

**CARLA VERMEULEN CARVALHO GRADE**

**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO PROMOTOR  
GÊNICO DA *MIOSTATINA*”**

**Campinas, 2013**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA

**CARLA VERMEULEN CARVALHO GRADE**

**“CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DO  
PROMOTOR GÊNICO DA *MIOSTATINA*”**

Este exemplar corresponde à redação final  
da tese defendida pelo(a) candidato (a)  
*Carla Vermeulen Carvalho Grade*  
*Lúcia Elvira Alvares*  
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Tese apresentada ao Instituto de  
Biologia da UNICAMP para  
obtenção do Título de Doutora em  
Biologia Celular e Estrutural, na área  
de Histologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares

Campinas, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR  
MARA JANAINA DE OLIVEIRA – CRB8/6972  
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

G754c

Grade, Carla Vermeulen Carvalho, 1983-  
Caracterização funcional do promotor gênico da  
miostatina / Carla Vermeulen Carvalho Grade. –  
Campinas, SP: [s.n.], 2013.

Orientador: Lúcia Elvira Alvares.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de  
Campinas, Instituto de Biologia.

1. Miostatina. 2. Regiões promotoras (Genética).  
3. Regulamento genético. I. Alvares, Lúcia Elvira,  
1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto  
de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em Inglês:** Functional characterization of the myostatin gene promoter

**Palavras-chave em Inglês:**

Myostatin

Promoter regions (Genetics)

Genetic regulation

**Área de concentração:** Histologia

**Titulação:** Doutora em Biologia Celular e Estrutural

**Banca examinadora:**

Lúcia Elvira Alvares [Orientador]

Luiz Lehmann Coutinho

Carla Cristina Judice Maria

Hozana Andrade Castillo

Henrique Marques Barbosa de Souza

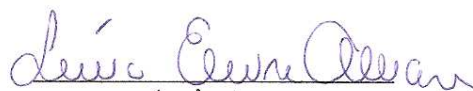
**Data da defesa:** 28-02-2013

**Programa de Pós Graduação:** Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 28 de fevereiro de 2013

**BANCA EXAMINADORA**

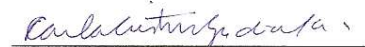
Dra. Lucia Elvira Alvares (Orientadora)

  
Assinatura

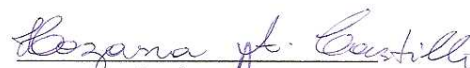
Dr. Luiz Lehmann Loutinho

  
Assinatura

Dra. Carla Cristina Judice Maria

  
Assinatura

Dra. Hozana Andrade Castillo

  
Assinatura

Dr. Henrique Marques Barbosa De Souza

  
Assinatura

Dra. Carmem Silvia Fontanetti Christofolletti

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Aureo Tatsumi Yamada

\_\_\_\_\_  
Assinatura

Dr. Luis Antonio Violin Dias Pereira

\_\_\_\_\_  
Assinatura

*“Quando penso que cheguei ao meu limite,  
descubro que tenho forças para ir além.”*

*Ayrton Senna*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, agradeço aos meus pais, pelos valores ensinados e pelo apoio incondicional perante todas as minhas escolhas. Nada teria sido possível sem vocês.

A todos os meus familiares e amigos, pelo carinho e compreensão pela minha ausência devido ao tempo dedicado a este estudo.

A Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela oportunidade.

Ao CNPq e DAAD pelo apoio financeiro, sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado.

Aos professores, funcionários, técnicos e alunos do Departamento de Histologia e Embriologia da UNICAMP, por sempre estarem disponíveis para ajudar. Da mesma forma, agradeço ao pessoal do Departamento de Anatomia e Embriologia Molecular da Ruhr-Universität Bochum, por terem me acolhido e ajudado como se eu tivesse sempre sido parte do grupo.

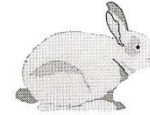
A minha orientadora e amiga Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares, por sempre acreditar em meu potencial.

A Profa. Dra. Beate Brand-Saberi, por ter me aceitado em seu laboratório e ter me proporcionado um diferente aprendizado de trabalho e de vida.

A Deus.

Este Trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, pelo Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural. Parte deste trabalho foi realizada no Departamento de Anatomia e Embriologia Molecular da Ruhr-Universität Bochum – Alemanha.

Este Trabalho contou com o auxílio financeiro das seguintes instituições: CNPq (processos 480960/07-0 e 142034/2009-6), FAEPEX (processo 1039/07), DAAD/CNPq (processo 290068/2010-0) e FoRUM (processo 6308100907).



CEEA/Unicamp

**Comissão de Ética na Experimentação Animal  
CEEA/Unicamp**

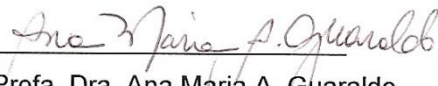
**CERTIFICADO**

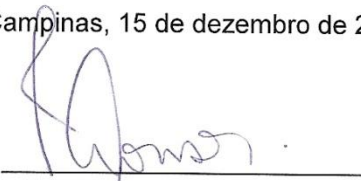
Certificamos que o Protocolo nº **1731-1**, sobre "**Caracterização funcional dos elementos cis-regulatórios da miostatina**", sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares / Carla Vermeulen Carvalho Grade**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal – CEEA/Unicamp em **15 de dezembro de 2008**.

**CERTIFICATE**

We certify that the protocol nº **1731-1**, entitled "**Functional characterization of the cis-regulatory elements of myostatin**", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the Brazilian College for Animal Experimentation (COBEA). This project was approved by the institutional Committee for Ethics in Animal Research (State University of Campinas - Unicamp) on **December 15, 2008**.

Campinas, 15 de dezembro de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Fátima Alonso  
Secretária Executiva



## RESUMO

A Miostatina é um regulador negativo da deposição de musculatura esquelética e mutações no gene que codifica esta proteína têm sido associadas a um aumento marcante na massa muscular de organismos vertebrados, resultado de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Nosso grupo identificou previamente o promotor basal do gene da *Miostatina* e análises de bioinformática revelaram a presença de sítios evolutivamente conservados para a ligação de CREB, Meis, FXR e NFY, além de um sítio TATA. No presente trabalho nós utilizamos mutagênese sítio-dirigida para gerar diversas construções delecionais que possuem um ou mais sítios mutados, e testamos sua atividade *in vitro* usando mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo sob condições de proliferação e diferenciação, para analisar o papel destes sítios de ligação sobre a atividade do promotor. Os resultados mostraram que FXR aparentemente não confere efeito na atividade transcricional do promotor da *Miostatina* em ambos os momentos analisados, indicando que o papel regulador desta proteína pode estar relacionado ao controle da expressão da Miostatina em outro tipo celular, que não o mioblasto. O NFY apresentou um papel de ativador transcricional, enquanto CREB e Meis atuaram inicialmente como repressores durante a proliferação, passando a relaxar esta repressão durante a diferenciação dos mioblastos, permitindo que a atividade do promotor aumentasse significativamente. Trabalhando juntos, estes fatores de transcrição são capazes de manter a atividade do promotor em níveis mais baixos durante a proliferação dos mioblastos e, com o início da diferenciação, a repressão é liberada, e os níveis de atividade podem aumentar. Este padrão está de acordo com o padrão de expressão dinâmico observado para a proteína da Miostatina durante o desenvolvimento da musculatura esquelética em vertebrados.

## ABSTRACT

Myostatin is a negative regulator of skeletal muscle deposition and mutations in the gene that encodes this protein have been associated to a remarkable increase in skeletal muscle mass, attributable to both hyperplasia and hypertrophy. We have previously identified *Myostatin*'s basal promoter and bioinformatic analyses revealed the presence of evolutionarily conserved binding sites for CREB, Meis, FXR and NFY, besides a TATA box. In the present study we used site-directed mutagenesis to generate several expression constructs possessing one or more mutated sites, and tested their activity *in vitro* using mouse C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> myoblasts in proliferation and differentiation conditions, to analyze the role of these sites on the activity of the promoter. The results show that FXR appears not to confer any effect on the transcriptional activity of the promoter in both conditions, indicating that the regulatory role of this protein might be involved in the control of Myostatin expression in another cell type. NFY presents a role as transcriptional activator, while CREB and Meis act initially as repressors during proliferation, releasing this repression upon differentiation, which allows the activity of the promoter to significantly increase. Working together, these transcription factors are capable of maintaining the promoter activity at lower levels during the proliferation of myoblasts and, upon differentiation, the repression is released, and activity levels can be increased. This pattern is in agreement with the dynamic expression pattern observed for Myostatin during the skeletal muscle development in vertebrates.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>Act RII A e B</b>	Receptores de activina tipo II A e B
<b>ATF</b>	Fator de transformação e ativação, do inglês <i>Activating transforming factor</i>
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>BCIP</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato, do inglês <i>5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate</i>
<b>cAMP</b>	Adenosina Monofosfato Cíclico, ou AMP cíclico
<b>cDNA</b>	Molécula de DNA complementar, do inglês <i>complementary DNA</i>
<b>CPI</b>	Complexo de Pré-Iniciação
<b>CRE</b>	Elemento responsivo à AMP cíclico, do inglês <i>cAMP responsive element</i>
<b>CREB</b>	Proteína de ligação ao elemento responsivo à AMP cíclico, do inglês <i>cAMP Responsive Element Binding protein</i>
<b>CREM</b>	Modulador do elemento responsivo à AMP cíclico, do inglês <i>cAMP Response Element Modulator</i>
<b>C-terminal</b>	Carboxi-terminal
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DIG</b>	Digoxigenina
<b>DMEM</b>	Meio de cultura Dulbecco, do inglês <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucléico, do inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i>
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados, do inglês <i>Deoxynucleotide</i>

*triphosphates*

<b>DTT</b>	Ditiotreitol, do inglês <i>Dithiothreitol</i>
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
<b>FXR</b>	Receptor Farnesóide X, do inglês <i>Farnesoid X Receptor</i>
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente, do inglês <i>Fluorescent Green protein</i>
<b>GPCR</b>	Receptor acoplado à proteína G, do inglês <i>G protein-coupled receptor</i>
<b>GTP</b>	Guanosina trifosfato
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de Hidrogênio
<b>HKII</b>	Hexoquinase II, do inglês <i>Hexokinase II</i>
<b>KDS</b>	Dodecil sulfato de potássio
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LDM</b>	Lábio dorso-medial
<b>LVL</b>	Lábio ventro-lateral
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de magnésio
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>NaOH</b>	Hidróxido de sódio
<b>NBT</b>	Nitroazul de tetrazólio, do inglês <i>Nitro blue tetrazolium</i>
<b>NFY</b>	Fator de transcrição nuclear Y, do inglês <i>Nuclear Transcription Factor Y</i>
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida, do inglês <i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i>
<b>Pb</b>	Pares de base
<b>PBS</b>	Salina tamponada com fosfato, do inglês <i>Phosphate buffered saline</i>
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain</i>

*Reaction*

<b>PEI</b>	Polietilenoimina, do inglês <i>Polyethyleneimine</i>
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PFA</b>	Paraformaldeído
<b>PKA</b>	Proteína quinase A, do inglês <i>Protein Kinase A</i>
<b>Rb</b>	Proteína retinoblastoma
<b>RFP</b>	Proteína vermelha fluorescente, do inglês <i>Red fluorescent protein</i>
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
<b>RNA<sub>m</sub></b>	Molécula de RNA mensageiro
<b>RNA<sub>t</sub></b>	Molécula de RNA transportador
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>RT-PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa, do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
<b>SDS</b>	Sulfato dodecil de sódio, do inglês <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
<b>SSC</b>	Tampão salino de citrato de sódio, do inglês <i>Saline-sodium citrate buffer</i>
<b>TALE</b>	<i>Three Aminoacid Loop Extension</i>
<b>TBP</b>	Proteína de ligação ao TATA, do inglês <i>Tata Binding Protein</i>
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	Fator de crescimento e transformação beta, do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
<b>TK</b>	Timidina quinase, do inglês <i>Thymidine kinase</i>
<b>T<sub>m</sub></b>	Temperatura de fusão, do inglês <i>Melting temperature</i>
<b>TR</b>	Transcriptase reversa
<b>UTP</b>	Uridina trifosfato
<b>x g</b>	Forças g

## ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1. Regulação gênica	2
1.2. Promotores gênicos	4
1.3. Regulação gênica no desenvolvimento embrionário	5
1.4. Miogênese	6
1.5. Miostatina	11
1.6. Promotor da Miostatina	16
1.7. Fatores transcricionais cujos sítios são conservados no promotor	19
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	26
3.1. Ensaio de hibridação <i>in situ</i>	27
3.1.1. Coleta de embriões	27
3.1.2. Síntese da sonda	27
3.1.3. Hibridação <i>in situ</i>	30
3.2. RT-PCR qualitativo	32
3.3. Mutagênese sítio-dirigida	34
3.3.1. Estratégia de mutagênese	35
3.3.2. Purificação dos <i>Primers</i>	38
3.3.3. Mutação sítio-dirigida	38
3.3.4. Transformação e Minipreparação de DNA plasmidial	39
3.3.5. Maxipreparação de DNA plasmidial	40
3.4. Ensaio em cultura celular	42

3.4.1. Transfecção	43
3.4.2. Lise e medição de luciferase/renilla	43
3.4.3. Análise dos resultados dos ensaios com luciferase/renilla	44
4. Resultados	45
4.1. Análise de expressão dos fatores transcricionais localizados no promotor da <i>Miostatina</i>	46
4.2. Ensaios mutacionais	48
4.3. Papel dos fatores de transcrição em mioblastos C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> em proliferação	49
4.4. Análise do comportamento do promotor da <i>Miostatina</i> através da diferenciação dos mioblastos C <sub>2</sub> C <sub>12</sub>	52
4.5. Papel dos fatores de transcrição em mioblastos C <sub>2</sub> C <sub>12</sub> em diferenciação	53
5. Discussão	55
5.1. O papel dinâmico de CREB	56
5.2. O papel estável de NFY	59
5.3. O papel dinâmico de Meis	60
5.4. A ausência de FXR em mioblastos de camundongo	61
5.5. Analisando o papel sinérgico de mutações múltiplas em mioblastos em proliferação	62
5.6. Promotor da <i>Miostatina</i> : um regulador dinâmico da expressão gênica	64
6. Conclusões	66
7. Referências Bibliográficas	68



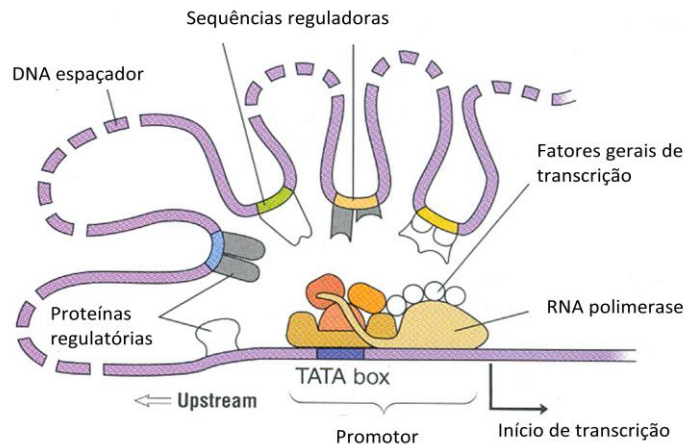


# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Regulação gênica

Ao longo de sua vida, as células de um organismo devem responder a numerosos estímulos internos e externos para manter sua completa homeostasia e, em resposta a estes estímulos, a expressão gênica deve ser modificada de forma precisa tanto temporal quanto espacialmente (revisado por Maeda 2011). Os elementos responsáveis por regular a expressão gênica estão presentes principalmente nas regiões não codificadoras do DNA, que correspondem a mais de 98% do genoma, no caso de humanos (Elgar e Vavouri 2008). Nestas regiões, são encontrados os denominados elementos *cis*-regulatórios, segmentos de DNA que contém diversos sítios de ligação para proteínas reguladoras, conhecidas como fatores transcricionais (Figura 1). Cada sítio de ligação possui tipicamente poucos pares de base e, por este motivo, tendem a acontecer aleatoriamente inúmeras vezes ao longo do genoma. Entretanto, elementos regulatórios isolados fisicamente e experimentalmente analisados em detalhe, sempre consistem de agrupamentos relativamente densos de sítios distintos, reconhecidos respectivamente por diversas proteínas de ligação ao DNA (Davidson 2006). Desta forma, os elementos *cis*-regulatórios possuem tipicamente centenas de pares de base, e podem estar localizados próximos ou afastados dos genes que eles regulam. Estudos demonstram que a maior complexidade de um organismo está altamente relacionada com a maior quantidade de regiões reguladoras elaboradas em seu genoma, e não com a quantidade de DNA codificante. Existem diversos tipos de elementos *cis*-regulatórios. Entre os mais bem caracterizados estão os promotores e as regiões reguladoras (ou *enhancers*), dentre elas ativadores, silenciadores e insuladores (revisado por Wang 2007).



**Figura 1 – Representação esquemática da interação entre fatores transcricionais ligados a regiões reguladoras e o promotor de um gene.** Dependendo da combinação de fatores transcricionais que se ligam a diferentes regiões reguladoras e interagem com a maquinaria transcricional através do dobramento da fita de DNA, diferentes respostas transcricionais são produzidas, regulando os genes alvo de forma diferencial tanto espacial quanto temporalmente. Figura adaptada de Wilt e Hake (2004).

O promotor é a sequência de DNA específica onde a RNA Polimerase e os fatores transcricionais gerais se conectam. Em geral, o promotor está localizado adjacente ou próximo ao sítio de iniciação da transcrição (Wilt e Hake 2004). Proteínas ativadoras ou supressoras geralmente atuam no promotor ou muito próximas a este, impedindo ou incentivando o acesso da RNA Polimerase ao promotor (trataremos aqui apenas da RNA Polimerase II). Muitas destas interações proteína-DNA ocorrem a centenas, às vezes milhares de pares de base de distância, antecedendo ou sucedendo o gene, através dos ativadores e silenciadores, que entram em contato direto ou indireto com o promotor por meio de dobramentos da fita de DNA (Wilt e Hake 2004). Os insuladores, por sua vez, funcionam como barreiras físicas que podem bloquear promotores e ativadores, ou impedir que proteínas de cromatina condensada se espalhem pela cromatina ativa. Isto se

faz necessário para prevenir que dois genes adjacentes que possuem padrões de expressão muito distintos não interfiram um sobre o outro (Burgess-Beusse *et al* 2002).

## **1.2. Promotores gênicos**

Os promotores de células eucarióticas estão localizados na porção 5' da região gênica que eles transcrevem e servem de ponto de início da transcrição (revisado por Heintzman e Ren 2006). O termo promotor se refere ao promotor basal e suas sequências adjacentes. O promotor basal possui geralmente 70 a 80 pares de base e contém as informações necessárias para o reconhecimento da maquinaria basal de transcrição e início da transcrição. Já o promotor proximal inclui a região que se estende antecedentemente ao promotor basal, contendo outras sequências críticas para a regulação transcricional, como sítios de ligação para fatores transcricionais tecido-específicos ou até mesmo regiões reguladoras (revisado por Heintzman e Ren 2007). Uma vez que os fatores transcricionais se ligam aos seus sítios específicos, recrutando coativadores, como enzimas de remodelação da cromatina e modificação de histonas, a estrutura e posição dos nucleossomos são alteradas, gerando uma reorganização da estrutura da cromatina na região do promotor, que permite a ligação da maquinaria basal de transcrição, composta da RNA Polimerase II e diversos fatores gerais, formando o Complexo de Pré-Iniciação (CPI) (revisado por Heintzman e Ren 2007). Através de um mecanismo pouco conhecido, 11-15 pares de base do DNA ao redor do sítio de início de transcrição sofrem uma modificação que permite o posicionamento da fita molde dentro do sítio ativo da RNA Polimerase II, iniciando a transcrição. Após aproximadamente 30 nucleotídeos terem sido transcritos, a RNA Polimerase II ultrapassa a região do promotor e separa-se do restante do CPI, iniciando a fase de alongamento transcricional, através da associação com diferentes fatores regulatórios (revisado por Heintzman e Ren 2007).

O primeiro elemento típico de promotores basais (porém não presente em todos) a ser identificado foi o sítio TATA, cuja sequência consenso (TATAWAAR) foi determinada pela comparação de 52 regiões flanqueadoras de diversos organismos (revisado por Heintzman e Ren 2007). Na maioria dos eucariotos, o sítio TATA localiza-se a aproximadamente 25-30 pares de base antecedendo o sítio de início de transcrição. Este sítio é tipicamente reconhecido pela proteína de ligação ao TATA (*TATA Binding Protein – TBP*), mas diversas proteínas relacionadas podem reconhecer este elemento (revisado por Heintzman e Ren 2007).

### **1.3. Regulação da expressão gênica no desenvolvimento embrionário**

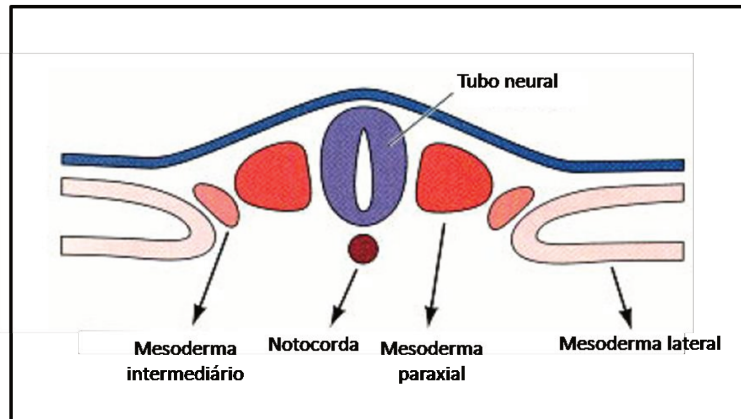
A regulação gênica é um processo chave que permite a formação de diferentes tipos celulares a partir de um conjunto de genes comum, que está presente em todas as células de um organismo em formação (Wasserman e Sandelin 2004). Durante o desenvolvimento embrionário, a transcrição gênica deve ser estritamente regulada, uma vez que qualquer erro pode comprometer a integridade do indivíduo em formação. Além disso, na maioria dos vertebrados, diversos tecidos formados durante o desenvolvimento possuem pouca ou nenhuma capacidade regenerativa quando danificados na vida adulta, de forma que o correto processo de formação é essencial. A formação da musculatura esquelética é um exemplo disto, uma vez que este tecido apresenta limitada capacidade regenerativa, que depende da ação das células-satélite (revisado por Aziz *et al* 2012). Em aves e mamíferos, o número de fibras musculares formadas durante o desenvolvimento embrionário mantém-se praticamente inalterado após o nascimento (Swatland e Kieffer 1974; Swatland 1984; Konigsberg 1986) e, conseqüentemente, o aumento no número de fibras musculares (hiperplasia) não pode concorrer para ganhos de massa muscular. Nos organismos adultos, apenas o aumento do diâmetro das fibras musculares (hipertrofia)

pode resultar em ganhos significativos da massa muscular. Assim, a miogênese é um processo que demanda uma rígida regulação transcricional durante o desenvolvimento embrionário.

#### **1.4. Miogênese**

Em vertebrados, a musculatura esquelética é proveniente do mesoderma paraxial, que se dispõe lateralmente às estruturas axiais do embrião (tubo neural e notocorda) e é delimitado pelo mesoderma intermediário (Figura 2) (revisado por Stockdale *et al* 2000). Conforme o desenvolvimento embrionário progride, a linha primitiva adiciona continuamente material à extremidade posterior do mesoderma paraxial, enquanto células da extremidade anterior condensam-se, formando os somitos a uma razão de, aproximadamente, um par a cada uma hora e meia em embriões de galinha, a partir do estágio HH 7 (Hamburger e Hamilton 1951) (revisado por Stockdale *et al* 2000). A formação e a maturação dos pares de somitos ocorre da região cervical em direção à região caudal do embrião (Aoyama e Asamoto 1988; Ordahl e Le Douarin 1992).

Inicialmente, o somito é uma estrutura epitelial (Figura 3), composto de células colunares arranjadas radialmente ao redor de um lúmen. Rapidamente cada somito passa a apresentar compartimentos distintos que, subsequentemente, dão origem a linhagens celulares distintas. Em resposta a sinais vindos de tecidos adjacentes, a porção ventral dos somitos epiteliais sofre um processo de transição epitélio-mesênquimal, para formar o esclerótomo, que dará origem a vértebras e costelas, enquanto que a porção dorsal, ou dermomiótomo, permanece como uma camada epitelial (revisado por Brent e Tabin 2002).



**Figura 2 – Representação esquemática das estruturas mesodérmicas de um embrião de vertebrado.** A notocorda está localizada abaixo do tubo neural. Ao lado destas estruturas axiais, o mesoderma é subdividido em paraxial, intermediário e lateral. O mesoderma paraxial se segmenta durante o desenvolvimento embrionário formando os somitos, que são responsáveis por gerar todos os músculos esqueléticos do corpo do embrião, com exceção dos músculos craniofaciais. Figura adaptada de Gilbert 2000.

O dermomiótomo apresenta subdomínios que abrigam diferentes populações de células precursoras miogênicas: enquanto as células da porção dorso-medial do dermomiótomo originam a musculatura epaxial, representada pelos músculos vertebrais e das costas, as células da porção lateral formam a musculatura hipaxial, que corresponde à musculatura da parede corpórea ventral, dos membros, da língua e, nos mamíferos, a do diafragma. Com exceção dos músculos da cabeça e pescoço, que se originam do mesoderma paraxial anterior aos somitos e do mesoderma pré-cordal, todos os demais músculos esqueléticos dos organismos vertebrados derivam dos somitos (Christ e Ordahl 1995).

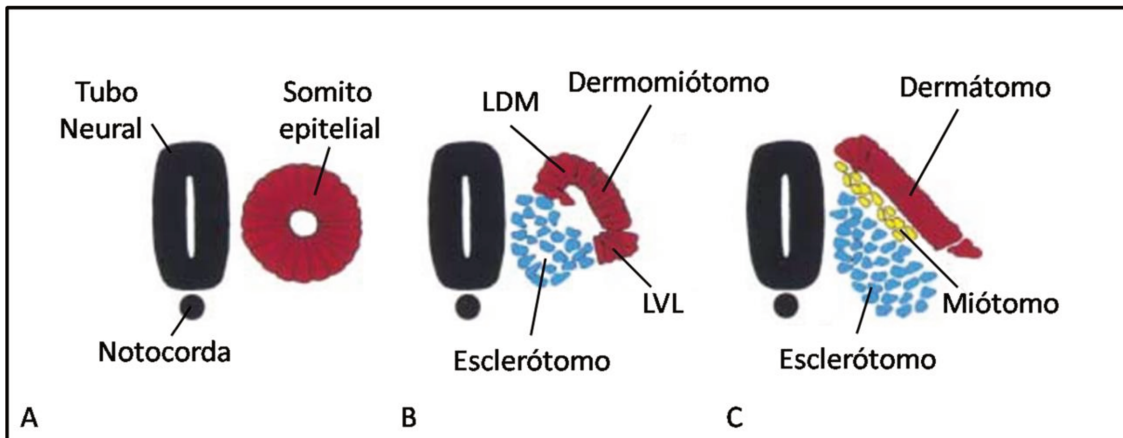
A musculatura epaxial começa a formar-se quando células do lábio dorso-medial (LDM) dos somitos expandem-se sob o dermomiótomo, formando um folheto contínuo

que origina o miótomo epaxial. Esta expansão permite que os mioblastos entrem no miótomo na posição correta para formar a musculatura epaxial. Uma vez atingindo o local apropriado, estas células interrompem o ciclo celular, alongam-se e diferenciam-se, formando as primeiras células musculares esqueléticas do embrião (Denetclaw *et al* 1997; Kahane *et al* 1998).

Já a musculatura hipaxial origina-se a partir de dois mecanismos distintos. Na região torácica, o lábio ventro-lateral (LVL) do dermomiótomo deposita o miótomo hipaxial por um mecanismo semelhante à formação do miótomo epaxial. Neste processo, as porções medial e lateral do miótomo misturam-se, formando uma lâmina contínua de mioblastos. Sob o controle de sinais locais, estas células irão dar origem à musculatura da parede ventral do corpo. Já ao nível dos membros e nas regiões occipital e cervical ocorre um mecanismo distinto, que tem início com a desagregação de células do LVL do dermomiótomo. Estes mioblastos migram lateralmente para o broto dos membros para formar a musculatura dos membros. Na região occipital, os mioblastos encaminham-se para a base dos arcos branquiais, formando a musculatura da língua. Além disso, nos mamíferos, células situadas acima do botão do membro anterior seguem uma rota posterior e ventral para formar a musculatura do diafragma (Denetclaw *et al* 1997; Cinnamon *et al* 1999).

Em ambos os casos, as células precursoras musculares irão progredir ao longo da linhagem miogênica para eventualmente tornarem-se mioblastos (revisado por Buckingham *et al* 2003). Estes irão então interromper o ciclo celular, alinhar-se e fundir-se uns com os outros, diferenciando-se finalmente em miotubos multinucleados, que irão formar as miofibras do músculo esquelético maduro (Figura 4). Este processo é acompanhado pela ativação de genes músculo-específicos que codificam proteínas estruturais e contráteis.



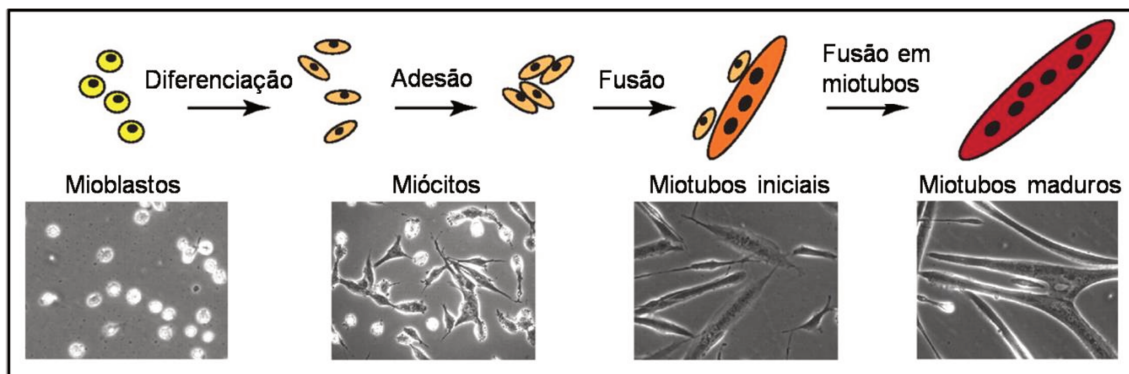


**Figura 3 – Representação esquemática da maturação dos somitos.** **A:** somito epitelial ao lado das estruturas axiais do embrião (tubo neural e notocorda); **B:** formação do esclerótomo e dermomiótomo, que possui lábio dorso-medial (LDM) e lábio ventro-lateral (LVL); **C:** exemplo de formação do miótomo a partir do LDM ao nível dos membros, com início da migração de células do LVL. Figura adaptada de Brent *et al* (2003).

Os principais reguladores da miogênese, os fatores miogênicos MyoD, Myf, MRF4 e Miogenina, se associam com fatores ativadores ou inibidores, em um mecanismo complexo e requintado de controle da expressão gênica durante a ontogenia (Ludolph e Konieczny 1995). Myf5 é o primeiro a ser detectado e é logo seguido por MyoD (revisado por Francis-West *et al* 2003). Estas moléculas coordenam a especificação das células precursoras multipotentes nas fases mais precoces da miogênese (Braun *et al* 1992; Rudnicki *et al* 1992). Uma superexpressão de *MyoD* é capaz de converter uma variedade de tipos celulares em mioblastos, mostrando que este é o regulador central do programa miogênico (Qin *et al* 2007). *MyoD* também é necessário para a regeneração de miofibras adultas em resposta à injúria (Megeny *et al* 1996). Em seguida, *MRF4* é transientemente expresso, sendo seguido pela *Miogenina*. Estas duas moléculas regulam

a diferenciação e maturação dos mioblastos (Hasty *et al* 1993; Braun e Arnold 1995). O programa de diferenciação executado por *Miogenina* e *MRF4* leva à expressão de proteínas estruturais do citoesqueleto músculo-específicas, e os miócitos fusionam-se formando miotúbulos multinucleados. Camundongos nulos para *Miogenina* sobrevivem o desenvolvimento fetal, mas morrem ao nascimento devido a severas deficiências na musculatura esquelética (Hasty *et al* 1993). Neste caso, os mioblastos formam-se e migram para a correta localização embrionária, mas a maioria não se funde para formar as miofibras.

Os fatores miogênicos estão também envolvidos no crescimento da musculatura em adultos, que é resultado do recrutamento de células musculares quiescentes, as chamadas células-satélite (Yusuf e Brand-Saberi 2012). Elas estão localizadas ao longo das fibras musculares e, após a ativação, proliferam e fusionam-se à fibra, fornecendo mais núcleos e, conseqüentemente, mais potencial de sintetizar proteínas musculares.



**Figura 4 – Representação esquemática da maturação das células precursoras musculares.**

Os mioblastos já comprometidos com o destino miogênico iniciam a diferenciação e param de migrar, originando os miócitos. Estes passam a aderir-se uns aos outros, fusionando-se para a formação dos miotubos multinucleados maduros. Figura adaptada de Abmayr e Pavlath (2012).

## 1.5. Miostatina

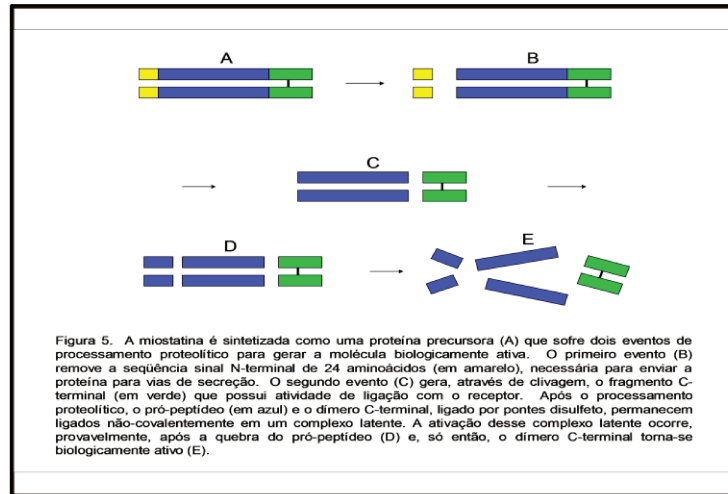
Em adição aos fatores miogênicos, fatores de crescimento desempenham um importante papel no desenvolvimento da musculatura (Fuchtbauer 2002). A Miostatina é uma das moléculas-chave envolvidas na regulação da miogênese. Esta proteína pertence à família TGF- $\beta$  de fatores de crescimento e diferenciação e representa um regulador negativo da deposição de musculatura esquelética (McPherron *et al* 1997). Em camundongos, a inativação do gene da *Miostatina* leva à hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares, gerando músculos individuais duas a três vezes maiores do que os de animais selvagens. Além disso, mutações no gene da *Miostatina* estão associadas com o fenótipo de musculatura dupla em diversas outras espécies animais, como em raças de gado (*Belgian Blue* e *Piedmontese*) (McPherron e Lee 1997), além de cães (Mosher *et al* 2007) e ovelhas (Clöp *et al* 2006). Na raça de gado *Belgian Blue*, o gene da *Miostatina* contém uma deleção de 11 nucleotídeos no terceiro exon, o que causa uma mudança no quadro de leitura, eliminando virtualmente toda a região ativa da molécula. A sequência do gene da raça *Piedmontese* contém uma mutação do tipo *missense* no terceiro exon, resultando na substituição de tirosina por uma cisteína na região madura da proteína (McPherron e Lee 1997). Em cachorros da raça *Whippet*, foi observada uma deleção de dois pares de base no terceiro exon da *Miostatina*, que resulta em um códon de término prematuro no aminoácido 313 (Mosher *et al* 2007). No caso das ovelhas *Texel*, foi observada uma transição de Guanina para Adenina na região da UTR 3', que cria um sítio-alvo para dois microRNAs (mir1 e mir206) altamente expressos no músculo esquelético, causando uma inibição translacional do gene (Clöp *et al* 2006). Estudos demonstraram que animais da raça *Belgian Blue* que possuem mutações no gene da *Miostatina* são viáveis e férteis, além de produzirem maior quantidade de carne de boa qualidade, o que indica um grande potencial de produção de maior massa muscular em

outros animais, como ovelhas, porcos, galinhas, perus e peixes, que apresentam alto grau de conservação de sequência desta proteína (McPherron e Lee 1997).

A função da Miostatina parece estar conservada até mesmo em humanos. Schuelke *et al* (2004) relataram o primeiro caso de uma criança nascida com mutações neste gene, que já apresentava musculatura mais proeminente que o normal a termo. Uma transição Guanina-Adenina no nucleotídeo g.IVS1+5 mostrou-se presente em ambos os alelos do paciente, resultando provavelmente em uma inserção de parte do intron 1 à molécula, causando perda de função (Schuelke *et al* 2004).

Além disso, níveis aumentados de Miostatina são observados no sangue de pacientes durante condições de perda e atrofia muscular. A inibição de sua expressão ou atividade influencia significativamente a massa muscular, melhorando o processo de regeneração após injúria ou em doenças degenerativas como distrofias de *Duchenne* e *Becker* (Jouliia-Ekaza e Cabello 2007). A Miostatina também está provavelmente envolvida em processos de caquexia, uma síndrome degenerativa com processo de perda de tecido adiposo e muscular esquelético acompanhado de injúria severa, doenças malignas crônicas ou em estágio terminal (câncer) e doenças infecciosas (AIDS) (Jespersen *et al* 2006). Por este motivo, algumas técnicas têm sido estudadas buscando regular a expressão da Miostatina *in vivo*. Uma vacina de DNA contra a Miostatina está sendo estudada, e sua administração é responsável por um aumento do peso corporal e da massa muscular esquelética, mas sem aumento do tecido adiposo. Durante os testes em camundongos, não foram observadas alterações na bioquímica do soro sanguíneo ou efeitos colaterais aparentes (Tang *et al* 2007). Um anticorpo neutralizador e um receptor dominante-negativo também têm sido usados para bloquear a função da Miostatina (Takata *et al* 2007).

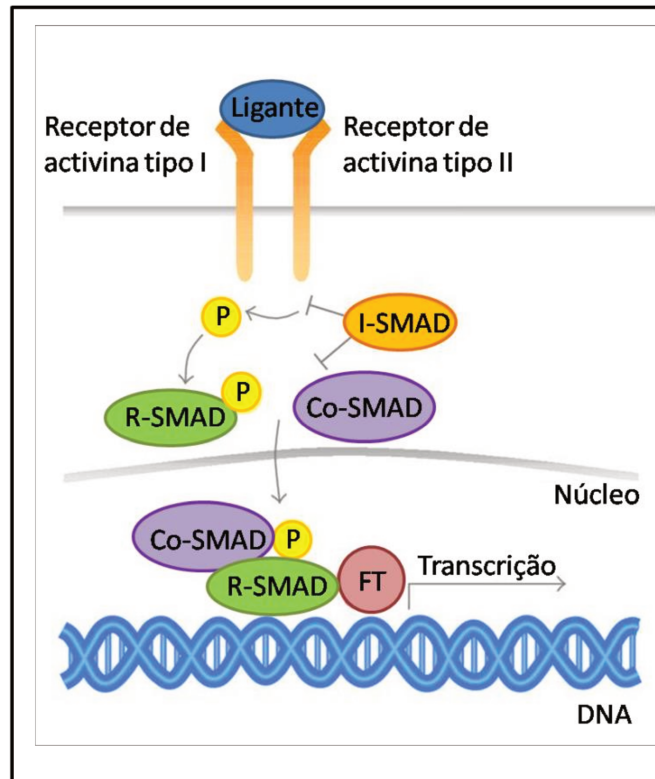
O gene da Miostatina é altamente conservado entre as espécies, tanto em estrutura quanto em função. A região codificadora da porção C-terminal demonstrou ser idêntica em humano, rato, murino, porco, peru e galinha (McPherron *et al* 1997). A Miostatina é sintetizada como um precursor de 376 aminoácidos, contendo uma sequência sinal, um domínio pró-peptídeo N-terminal e um domínio C-terminal (molécula ativa) (Jouliia-Ekaza e Cabello 2007) (Figura 5). Como outros membros da família TGF- $\beta$ , a Miostatina é sintetizada como uma proteína precursora que sofre dois eventos de processamento proteolítico para gerar a molécula biologicamente ativa. O primeiro evento remove a sequência sinal N-terminal de 24 aminoácidos, necessária para enviar a proteína para vias de secreção. O segundo evento gera, através de clivagem, o fragmento C-terminal, que possui atividade de ligação com os receptores de activina do tipo II (Act RIIA e Act RIIB) (Lee 2004). Após o processamento proteolítico, o pró-peptídeo e o dímero C-terminal, unidos por pontes dissulfeto, permanecem ligados não-covalentemente em um complexo latente, que pode também estar associado a outras proteínas (Lee e McPherron 2001). Após sua liberação, o dímero liga-se então aos receptores de activina do tipo II, ativando uma cascata de sinalização interna, mediada pelas proteínas SMADs (Lee e McPherron 2001).



**Figura 5 – Representação esquemática do processamento da Miostatina.** A: Proteína precursora, contendo sequência sinal N-terminal (amarelo), pró-peptídeo (azul) e fragmento C-terminal (verde). B: primeiro evento proteolítico de remoção da sequência sinal N-terminal. C: segundo evento proteolítico gerando o fragmento C-terminal que permanece ligado não covalentemente ao pró-peptídeo em um complexo latente. D: quebra do pró-peptídeo. E: liberação do dímero C-terminal ativo.

Através da via clássica mediada por SMADs (Otten *et al* 2010), a ligação de um ligante específico ao receptor de activina do tipo II faz com que ele recrute e fosforile o receptor de activina do tipo I. Este, por sua vez, fosforila SMADs reguladas pelo receptor (R-SMAD), que formam então complexos com SMADs mediadoras do tipo comum (CoSMAD). Estes complexos se translocam para o núcleo onde induzem a transcrição de genes alvo, através da interação com fatores transcricionais específicos (FT). SMADs inibidoras (I-SMAD) representam importantes estruturas de retroalimentação negativa, podendo bloquear a sinalização através da ligação competitiva ao receptor do tipo I, ou as R-SMADs (Figura 6). A transcrição induzida por Miostatina necessita da participação das

R-SMADs 2 e 3 e da Co-SMAD4. A SMAD7 inibitória reduz a transcrição induzida por Miostatina (Zhu *et al* 2004).



**Figura 6 – Representação esquemática da via de sinalização mediada por SMADs.** A presença do ligante causa a ativação do receptor de activina do tipo I pelo receptor de activina do tipo II, que passa, então, a fosforilar SMADs reguladas pelo receptor (R-SMAD). Estas formam complexos com SMADs mediadoras comuns (Co-SMAD), são translocadas para o núcleo e interagem com fatores transcricionais (FT) para ativar a transcrição de genes específicos. A presença de SMADs inibidoras (I-SMAD) bloqueia a sinalização. Figura adaptada de Otten *et al* 2010.

Estudos *in vitro* usando mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongos mostraram que a superexpressão de Miostatina diminui a sua proliferação, gerando acúmulo de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> nas fases G1 e G2 do ciclo celular (Joulia *et al* 2003). Durante a fase de proliferação ativa dos mioblastos, a Miostatina regula negativamente a transição de G1 para S através de vias dependentes e independentes de Rb (proteína retinoblastoma) (McFarlane *et al* 2005). Além disso, através da inativação dos fatores miogênicos MyoD e Miogenina, a Miostatina inibe fortemente a diferenciação terminal, um evento crucial para a formação das fibras musculares. Níveis aumentados desta proteína reduzem significativamente a taxa de apoptose de mioblastos, indicando que a Miostatina endógena protege as células da apoptose. A proteína p21 (inibidora de Cdk-ciclina, regula a transição da fase G1 para S no ciclo celular) é um provável alvo específico da Miostatina endógena, envolvida na influência da Miostatina sobre a proliferação, diferenciação e apoptose, pois a superexpressão da Miostatina aumenta os níveis das proteínas p21 e de p53 (regulador transcricional de p21) (Joulia *et al* 2003).

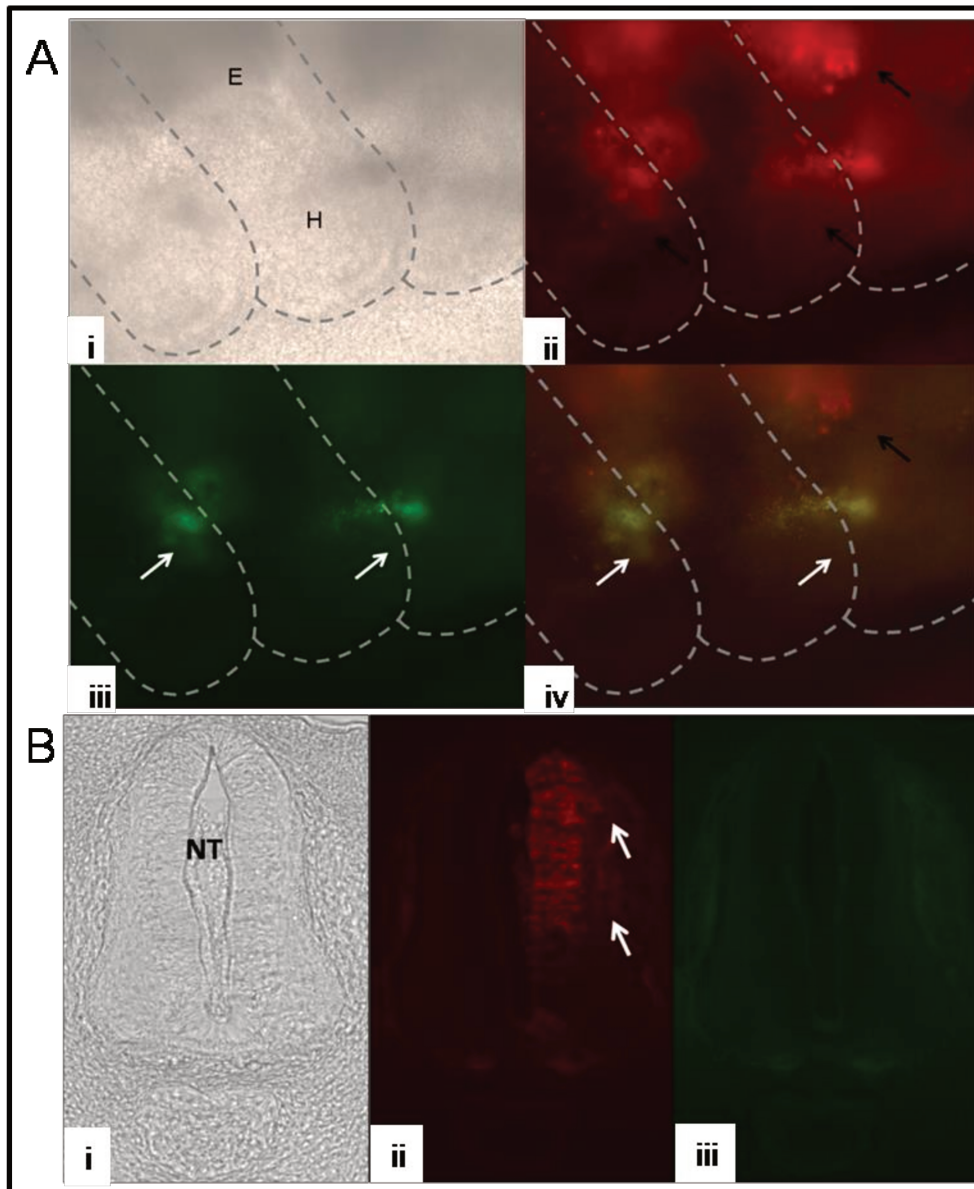
### **1.6. Promotor da Miostatina**

A região 5' que antecede o gene da *Miostatina* de humano, bovino, porco e murino tem considerável homologia de sequência e compartilha muitos sítios de ligação para fatores transcricionais (Salerno *et al* 2004). Alguns sítios E (*E-boxes*), aos quais se ligam os fatores miogênicos, são conservados em posição e sequência dentre as diferentes espécies, indicando que a expressão conservada da Miostatina pode ser atribuída à conservação do promotor (Spiller *et al* 2002).

Apesar do vasto conhecimento sobre sua função, pouco se sabe sobre a regulação da expressão do gene da *Miostatina*. Com o intuito de localizar elementos *cis-*



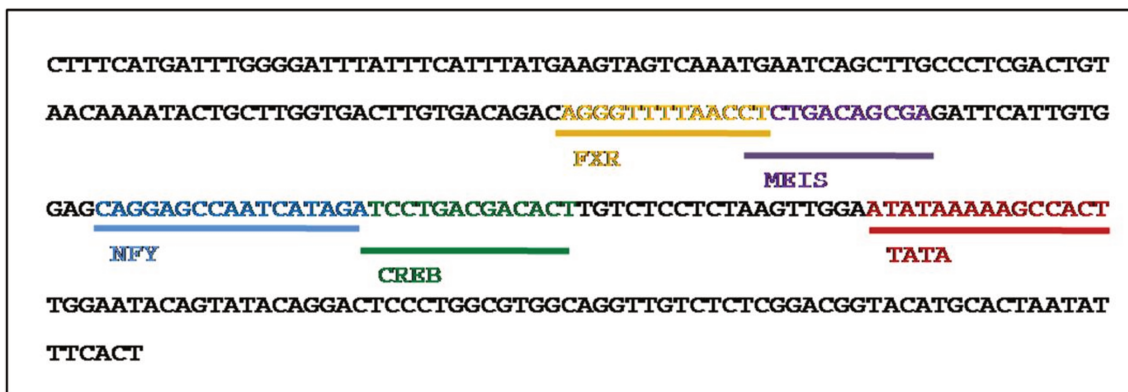
regulatórios que regulam a expressão deste gene, realizamos previamente a identificação e caracterização funcional do promotor gênico da *Miostatina* (Grade *et al* 2009). Através de ensaios de bioinformática de alinhamento do locus deste gene, foi identificada uma região de 259 pares de base (pb) antecedendo imediatamente o início de transcrição, altamente conservada entre vertebrados amniotos (92% de identidade de sequência entre humano e camundongo, 77% entre humano e galinha). Esta região foi então isolada e sua capacidade de dirigir a expressão de um gene repórter foi testada *in vitro* e *in vivo* (Figura 7), comprovando assim seu papel de promotor gênico. Apesar de ser capaz de dirigir a expressão do gene repórter GFP na região do domínio hipaxial dos somitos (Figura 7Aiii), o promotor não foi capaz, como esperado, de fazê-lo na região do domínio epaxial dos somitos e no tubo neural (Figura 7Aiv e 7Biii) (Grade *et al* 2009), onde normalmente não há expressão do gene da *Miostatina* (Amthor *et al* 2002). Visando identificar os componentes ativos que possam conferir esta especificidade espacial ao promotor, uma análise refinada dos sítios de ligação para fatores transcricionais no promotor da *Miostatina* demonstrou a presença de um sítio TATA, além de sítios para CREB, NFY, Meis e FXR, conservados entre os vertebrados (Figura 8).



**Figura 7 – A: Análise *in vivo* do promotor da *Myostatina* em somitos de embriões de galinha.**

(i) visão lateral da região dos somitos entre membros onde foi realizada a eletroporação, dorso para cima, E: domínio epaxial, H: domínio hipaxial; (ii) expressão da construção repórter controle pCAB/RFP na região dos domínios epaxial e hipaxial dos somitos (setas pretas); (iii) expressão da construção repórter pPMM/GFP contendo o promotor da *Myostatina*, na região hipaxial dos somitos (setas brancas); (iv) sobreposição de (ii) e (iii), indicando a expressão concomitante de GFP e RFP em amarelo (setas brancas); apenas RFP é expresso na região epaxial dos somitos (setas pretas),

indicando que o promotor da *Miostatina* possui especificidade espacial. **B: Análise *in vivo* do promotor da *Miostatina* no tubo neural de embriões de galinha.** (i) Visão geral do corte transversal na região entre membros, dorso para cima, NT: tubo neural; (ii) RFP é expresso na região do tubo neural (setas brancas); (iii) GFP não é expresso no tubo neural, reforçando a existência de especificidade espacial no promotor da *Miostatina*. Figura adaptada de Grade *et al* 2009.

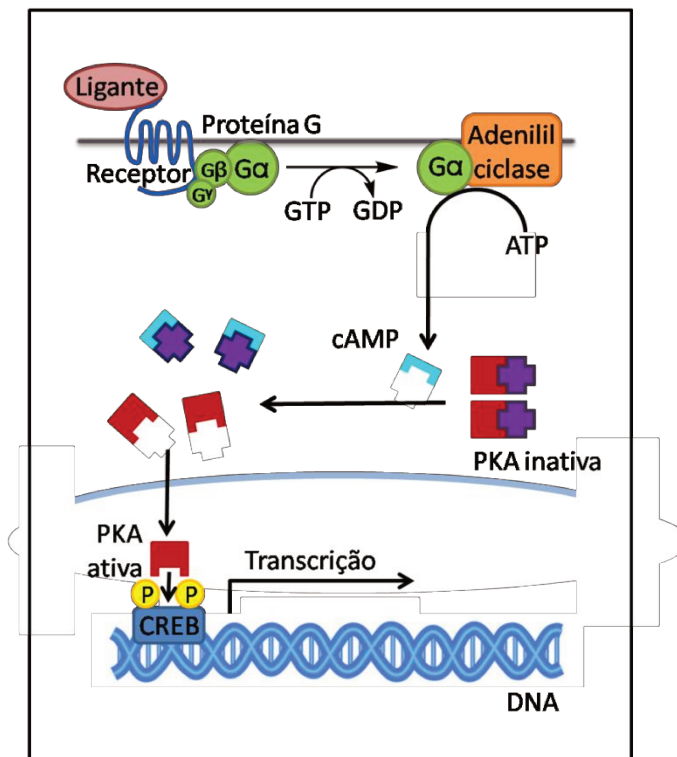


**Figura 8 – Estrutura do promotor da *Miostatina* em vertebrados.** Disposição dos sítios de ligação conservados para os fatores transcricionais CREB, NFY, Meis e FXR, além de TATA, encontrados em peixes, aves e mamíferos.

### 1.7. Fatores transcricionais cujos sítios são conservados no promotor

CREB é um membro da família CREB de fatores de transcrição do tipo *Basic Leucine Zipper*, que também inclui ATF e CREM. Estes fatores se ligam ao elemento responsivo ao cAMP (ou *cAMP responsive element* - CRE) como homo ou heterodímeros e ativam a transcrição de genes alvo, uma vez fosforilados por PKA (Chen *et al* 2005). A via clássica de sinalização mediada por cAMP (Figura 9) é induzida por GPCR, uma

família de receptores transmembrana ligados à proteína G, que transmite sinais externos para o núcleo (Pourquié 2005). A sinalização inicia com a ativação de uma proteína G trimérica associada ao receptor. O GTP ligado à subunidade  $\alpha$  da proteína G é hidrolizado e faz com que esta subunidade se dissocie, regulando a atividade da adenilil ciclase. Uma vez ativada, esta enzima converte ATP em cAMP, que se liga e ativa a proteína quinase A (ou *protein kinase A* – PKA). A subunidade catalítica da PKA entra no núcleo e fosforila os fatores de transcrição da família CREB, que regulam a expressão de genes contendo o sítio de ligação CRE (Pourquié 2005).



**Figura 9 – Esquema representativo da via de sinalização mediada por cAMP.** O ligante induz a quebra de GTP em GDP e a subunidade  $\alpha$  da proteína G é então dissociada e passa a regular a enzima adenilil ciclase que, por sua vez, transforma ATP em cAMP. Este libera a subunidade ativa

de PKA, que vai para o núcleo e fosforila os fatores da família CREB, regulando a transcrição de genes específicos. Figura adaptada de Pourquié 2005.

NFY (*Nuclear Transcription Factor Y*) é uma proteína heteromérica (formada pelas subunidades A, B e C) amplamente expressa e se liga principalmente ao sítio CCAAT (Mantovani 1999). Estes sítios são elementos ubíquos, encontrados em diversos promotores gênicos, especialmente aqueles que possuem também um sítio CRE (Zhang *et al* 2005), e são envolvidos na regulação de genes alvo. Tipicamente, os sítios CCAAT são flanqueados por pelo menos um elemento de promotor funcionalmente importante, e a interação entre eles é essencial para o funcionamento da unidade reguladora (Mantovani 1999).

Meis pertence à família TALE (*Three Aminoacid Loop Extension*) de fatores de transcrição, que possuem em comum um homeodomínio (Coy e Borycki 2010). Os membros da família homeobox são fortemente envolvidos com o controle gênico do desenvolvimento do padrão anatômico, como é o caso dos genes *Hox*. Meis está relacionado ao correto desenvolvimento de membros em camundongo, galinha e *Drosophila* (Mercader *et al* 1999).

Por fim, FXR (*Farnesoid X Receptor*) está envolvido na redução da produção endógena de ácidos graxos e acelera sua biotransformação e excreção. Adicionalmente, FXR possui um papel crítico no metabolismo de lipídios e no controle de carboidratos hepáticos. Camundongos mutantes para este gene apresentam uma diminuição de tecido adiposo, baixa concentração de leptina no soro e níveis elevados de ácidos graxos no plasma (Sinal *et al* 2000). De fato, já foi demonstrado que a Miostatina é expressa no

fígado e no tecido adiposo de aves e mamíferos (Sundaresan *et al* 2007; McPherron *et al* 1997).

O presente trabalho teve por intuito verificar o papel que cada um destes sítios de ligação possui sobre a atividade do promotor gênico da *Miostatina*, através do uso de mutagênese sítio-dirigida. Os resultados encontrados permitiram compreender como o promotor da *Miostatina* se comporta ao longo da diferenciação de mioblastos de camundongo, e como os fatores transcricionais que a ele se ligam orquestram sua dinâmica atividade. Um melhor entendimento da atividade do promotor gênico da *Miostatina* pode fornecer ferramentas para a criação de estratégias terapêuticas que visam amenizar os sintomas causados pela elevação dos níveis desta proteína no sangue de pacientes com distrofia.

# *Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Determinar o papel dos sítios de ligação para fatores de transcrição conservados encontrados no promotor do gene da *Miostatina*.

### 2.2. Específicos

- a. Analisar o padrão de expressão dos fatores transcricionais CREB, NFY, Meis e FXR para os quais há sítios de ligação conservados no promotor gênico da *Miostatina*, através de ensaios de hibridação *in situ* de embriões de galinha.
- b. Verificar a presença dos fatores transcricionais para os quais há sítios de ligação conservados no promotor gênico da *Miostatina* em mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo em condições de proliferação e diferenciação, através de RT-PCR qualitativo.
- c. A partir de uma construção contendo o promotor da *Miostatina* dirigindo a expressão de um gene repórter (Luciferase), produzir mutantes deletionais, contendo diferentes combinações de mutações nos sítios para a ligação de CREB, NFY, Meis e FXR.
- d. Analisar o papel das construções deletionais geradas na capacidade de dirigir a expressão do gene repórter, utilizando transfecção de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo em condições de proliferação.



- e. Analisar o comportamento do promotor da *Miostatina* ao longo do processo de diferenciação de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo.
  
- f. Analisar o comportamento das construções delecionais geradas, utilizando transfecção de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo em condições de diferenciação.
  
- g. Estabelecer um esquema didático que explique o papel de cada fator de transcrição sobre o promotor da *Miostatina* durante condições de proliferação e diferenciação de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.

# *Materiais e Métodos*

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Ensaios de hibridação *in situ***

##### **3.1.1. Coleta de embriões**

Buscando verificar o padrão de expressão das moléculas analisadas no presente estudo, foram conduzidos ensaios de hibridação *in situ*. Embriões de galinha foram coletados a partir de ovos fertilizados da granja Yamaguishi após incubação a 38,5°C em atmosfera umedecida. O estágio escolhido para as análises, de acordo com a classificação dada por Hamilton e Hamburguer (1951), foi HH25, que representa o maior pico de expressão da Miostatina em somitos (Amthor *et al* 2002). Após a coleta, os embriões foram lavados em PBS, tiveram suas membranas extraembrionárias removidas com auxílio de pinças e foram fixados *overnight* em PFA 4%.

Após a fixação *overnight*, os embriões foram então preparados para os ensaios de hibridação *in situ*, sendo lavados em PBT (PBS + 0,1% Tween 20) e desidratados em uma sequência de soluções de metanol a 25%, 50% e 75% em PBT, seguido de um banho de uma a duas horas de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% em Metanol, para finalmente serem armazenados em metanol 100% a -20°C.

##### **3.1.2. Síntese da sonda**

A introdução de RNases em qualquer momento de um experimento de hibridação, desde a coleta até a formação do híbrido de RNA endógeno/sonda, pode causar um sinal fraco ou ausente. Para que isto não aconteça, a água e todas as soluções utilizadas no procedimento são tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC, 100µL de DEPC por litro de solução), um forte inibidor enzimático que atua desnaturando as proteínas, como as

RNAses. Depois de tratadas, as soluções são deixadas *overnight* em uma capela para evaporação do DEPC, sendo em seguida autoclavadas para então serem utilizadas.

As sondas de RNA utilizadas nos ensaios de hibridação *in situ* para Miostatina, Meis e MyoD foram preparadas a partir de seu respectivo cDNA molde. O clone da Miostatina foi fornecido pelo Dr. Luiz Lehmann Coutinho, da Esalq/USP – Brasil; o clone para Meis foi fornecido pelo Dr. Miguel Torres, da Fundación CNIC – Espanha; e o clone para MyoD foi fornecido pelo Dr. Bodo Christ, da Universidade de Freiburg – Alemanha. Os plasmídios contendo os DNAs de interesse foram inicialmente submetidos à técnica de PCR utilizando os *primers* M13 direto (5' CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGAC 3') e M13 reverso (5' TCACACAGGAAACAGCTATGAC 3') a fim de amplificar somente a sequência-molde. Para a reação de amplificação (PCR), foi preparada uma reação de volume final de 50µL, na qual foram adicionadas quantidades equivalentes a 300ng de DNA molde; 0,2 mM de cada dNTP; 2 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5% de DMSO; 1,25 u/50 µL de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas); 1X *Taq buffer* fornecido pelo fabricante; 0,5 µM de cada um dos *primers* (direto e reverso); e, por fim, água tratada com DEPC, em suficiente quantidade para completar o volume final da reação para 50 µL.

Esta reação foi submetida a 35 ciclos de amplificação que consistem em uma fase de desnaturação (94 -96°C), uma fase de pareamento dos *primers* (55°C) e uma fase de extensão do DNA (72-76°C) em que irá ocorrer a síntese de uma nova fita antiparalela sobre a fita anteriormente desnaturada, função que é exercida pela enzima *Taq* DNA polimerase.

No caso de CREB, NFY e FXR, as sondas foram preparadas através de uma estratégia de amplificação por PCR. Neste caso, um fragmento de interesse de cDNA foi gerado por RT-PCR a partir de RNA total extraído de embriões de galinha, utilizando *primers* específicos (ver Tabela 1). O produto desta reação foi usado como molde para

uma segunda PCR, utilizando novos *primers* (ver Tabela 1) contendo adicionalmente a sequência do promotor da T7 RNA polimerase, ou na região 5' (para a sonda anti-senso) ou na região 3' (para a sonda senso, usada como controle), com o intuito de artificialmente introduzir um sítio que permite a síntese de transcritos de RNA sem a necessidade de clonar.

Após verificação em gel de agarose 1,5%, o produto da PCR foi quantificado para então ser utilizado no preparo das sondas de RNA. No preparo da reação foi utilizado de 250 a 500ng do produto de PCR; 2  $\mu$ L de tampão de transcrição 10X (10X *transcription buffer* - Ambion), 2  $\mu$ L de 0,1M de DTT, 2  $\mu$ L de uma mistura contendo ribonucleotídeos e UTP conjugado a Digoxigenina (DIG), 0,5  $\mu$ L de inibidor de RNase, 1  $\mu$ L da T7 RNA polimerase e água livre de ribonucleases para completar o volume final de 20  $\mu$ L. Esta reação foi então incubada a 37°C por duas horas.

O RNA transcrito foi então tratado com 2 $\mu$ L de DNase I (2U) (Fermentas) por 15 minutos a 37°C e, em seguida, purificado em coluna (*SigmaSpin Sequencing Reaction Clean-Up* - Sigma). Após quantificação do material, a sonda pôde então ser diluída em um tampão de Pré-hibridação (formamida 50%, SSC 5X pH 4,5, 50  $\mu$ g/mL de RNA de levedura, SDS 1% e 50  $\mu$ g/mL de heparina) à uma concentração final de 1  $\mu$ g/mL.

**Tabela 1** – *Primers* desenhados para a síntese das sondas anti-senso, utilizadas na hibridação *in situ*. A sequência do promotor da T7 RNA polimerase está sublinhada.

<b>Nome do Gene</b>	<b>Referência</b>	<b>Primer direto</b>	<b>Primer reverso</b>
<i>NFY</i> 1ª PCR	NM_001006 325.1	TTCCTGTCCCTTCTGCAAGT	ACCCCCTTCAGTTTCTGTCA
<i>NFY</i> 2ª PCR		TTCCTGTCCCTTCTGCAAGT	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAGA</u> ACCCCCTTCAGTTTCTGTCA
<i>FXR</i> 1ª PCR	NM_204113 .2	GGCATTCTTTCAGAGCCAAT	CCATTTGCTTGCATTTTCCTT
<i>FXR</i> 2ª PCR		GGCATTCTTTCAGAGCCAAT	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> ACCATTTGCTTGCATTTTCCTT
<i>CREB</i> 1ª PCR	NM_204450 .2	CCACAGGTCCAGACAGTTCA	TGCCATGACTACTCCAGGTG
<i>CREB</i> 2ª PCR		CCACAGGTCCAGACAGTTCA	<u>TAATACGACTCACTATAGGGAG</u> ATGCCATGACTACTCCAGGTG

### 3.1.3. Hibridação *in situ*

Com os embriões coletados armazenados em metanol 100% e as sondas prontas, pôde-se dar início aos ensaios de hibridação *in situ*. A princípio os embriões foram reidratados através de banhos seriados decrescentes de metanol em PBT (75%, 50% e 25%), seguidos de mais duas lavagens de cinco minutos de PBT. Depois de feitas tais lavagens, os embriões foram tratados com uma mistura de detergentes contendo Igepal 1%, SDS 1%, Deoxicolato 0,5%, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0 e NaCl 150 mM, que atuam facilitando o acesso da ribossonda ao RNAm no interior de cada célula no momento da hibridação, sem que o embrião tenha sua integridade comprometida. Após seguidos banhos da mistura de detergentes os embriões foram então refixados em PFA 4% e lavados em PBT. Ao final destas etapas os embriões foram lavados primeiramente com tampão de Pré-hibridação (formamida 50%, SSC 5X pH 4,5, 50 µg/ml de RNAt de levedura, SDS 1% e 50 µg/ml de heparina) pré-aquecido no banho à 70°C, preparada a 50% em PBT, para em seguida serem lavados em um tampão de Pré-hibridação 100%

também aquecido. Depois de serem lavados, foram deixados durante uma hora no mesmo tampão, mas agora no banho a 70°C, para somente enfim serem incubados em tampão de hibridação com a sonda de interesse *overnight* no banho a 70°C.

Após ficarem *overnight* no banho à 70°C com a sonda, os embriões foram lavados exaustivamente com uma Solução X aquecida, que contém 50% de Formamida, SSC 2X pH 4,5 e 1% de SDS. Em seguida, foram dados quatro banhos de 30 minutos cada e um banho de 10 minutos com a mesma Solução X 50% diluída em MABT (Ácido maléico 100 mM, NaCl 150 mM, Levamisole 2 mM e Tween 20-0,1%, em pH 7,5). Após esta etapa, os embriões foram pré-bloqueados em reagente de bloqueio *Boehringer Mannheim* (BBR) a 2% em tampão MABT durante uma hora à temperatura ambiente. Posteriormente, os embriões foram bloqueados em uma solução de alta concentração protéica (BBR 2%, soro de ovelha inativado 10% em tampão MABT) por 2 horas. A etapa de bloqueio é importante para bloquear sítios aos quais o anticorpo pode eventualmente se ligar inespecificamente. Após o bloqueio, os embriões foram incubados em solução contendo 2% de BBR em tampão MABT, 1% de soro de ovelha inativado e anticorpo anti-DIG conjugado à fosfatase alcalina na titulação de 1:2000 durante pelo menos 16 horas a 4°C. No dia seguinte, os embriões foram lavados sete vezes com intervalos de 1h em tampão MABT à temperatura ambiente, e por mais pelo menos 16 horas a 4°C para completa eliminação de marcação inespecífica pela fosfatase alcalina.

Antes de começar a revelação do sinal, os embriões foram lavados quatro vezes por 10 minutos em solução tampão NTMT (NaCl 100 mM, Tris 100 mM pH 9,5, MgCl<sub>2</sub> 50 mM, Tween-20 0,1%, Levamisole 2 mM) à temperatura ambiente. Posteriormente às lavagens, os embriões foram tratados com Tampão NTMT juntamente ao substrato para fosfatase alcalina, NBT/BCIP (18,75 mg/ml de NBT, 9,4 mg/ml de BCIP) em NTMT,

protegidos da luz, a fim de detectar a ação da fosfatase alcalina até a reação atingir a intensidade desejada.

Para interromper a reação, os embriões foram lavados em PBT 1X, fixados em PFA 4% a 4°C por pelo menos 20 minutos. Após a fixação os embriões foram lavados em PBS 1X, tratados em série crescente de glicerol em PBT (25%, 50% e 80%) e armazenados em glicerol 80%.

Os embriões foram então embebidos em gelatina a 20% em PBS, em dois banhos de 1 hora cada, a 55°C. Após os banhos, o material foi emblocado em pequenas formas e, após secar, levado ao PFA 4% por pelo menos um período *overnight*. Após o endurecimento dos blocos de gelatina, foram realizados cortes de 50 µm em vibrátomo na região do tronco entre membros. Os cortes foram então analisados e fotografados ao microscópio Nikon E800 utilizando a objetiva de 20x.

### **3.2. RT-PCR qualitativo**

Com o intuito de verificar a presença de transcritos dos fatores transcrionais estudados, bem como da *Miostatina*, foram realizados ensaios de RT-PCR qualitativo. Primeiramente foi extraído o RNA total dos mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> de camundongo. Após terem sido cultivadas normalmente em meio de proliferação ou de diferenciação, as células foram lavadas com PBS e receberam 1 mL do reagente Trizol. Elas foram deixadas em temperatura ambiente por alguns minutos, e em seguida foram homogeneizadas com auxílio de seringa e agulha. Após cinco minutos em temperatura ambiente, foram adicionados 200 µL de clorofórmio e os tubos foram invertidos por 15 segundos. Após mais três minutos em temperatura ambiente, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos, a 11.400 rpm, 4°C. O sobrenadante foi recuperado para um tubo limpo e a ele



foram adicionados 0,5 mL de isopropanol, seguido de agitação por inversão. Após descansar por dez minutos em temperatura ambiente, foi realizada uma centrifugação de 15 minutos, a 11.400 rpm, 4°C. O pellet foi então lavado com 1 mL de etanol 75% e centrifugado por cinco minutos a 8.900 rpm, 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e, após secagem de dez minutos, o pellet foi ressuscitado com 50 µL de água tratada com DEPC. Após verificar a qualidade e quantidade do RNA, este foi estocado a -80°C.

Para o preparo do cDNA, foi utilizado o *kit Quantitative Reverse Transcription*, da Qiagen, conforme instruções do fabricante. Foram misturados 1 µg de RNA, 2 µL do reagente gDNA e 11,3 µL de água, e mantidos a 42°C por 5 minutos. Em seguida, foram acrescentados 4 µL de *buffer* TR, 1 µL de *Primer Mix* e 1 µL da enzima TR (Transcriptase Reversa). O tubo foi então mantido por 30 minutos a 42°C, seguido de 3 minutos a 95°C. O cDNA foi estocado a -20°C.

Para a reação de RT-PCR, foram misturados 2 µL de *Buffer* 10x, 0,4 µL de dNTP, 0,5 µL de cada um dos *primers* (direto e reverso – Tabela 2), 1 µL de cDNA, 0,1 µL da enzima *Taq* DNA polimerase e 15,5 µL de água ultrapura. As condições de termociclagem foram: 94°C por 3 minutos, seguido de 34 ciclos de 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento (ver Tabela 2) por 1 minuto e 72°C por 1 minuto. Por fim, 72°C por 10 minutos para a extensão final e 12°C para sempre. Os *primers* usados e suas informações estão representados na Tabela 2. Em seguida, as amostras foram checadas em gel de agarose 1,5%.

**Tabela 2** – Sequência e informações dos *primers* utilizados para o experimento de RT-PCR qualitativo. 18s foi utilizado apenas como um controle endógeno.

Nome do Gene	Referência	<i>Primer</i> direto (5' > 3')	<i>Primer</i> reverso (5' > 3')	Tamanho do produto	Temperatura de anelamento
<b><i>Miostatina</i></b>	NM_010834	ACGCTACCACGGAAACAATC	GCAGTCAAGCCCAAAGTCTC	482 pb	55°C
<b><i>NFY</i></b>	NM_010913	AGCCAATACCAACACAAC	TCTTCTCCAGCATCTCT	168 pb	55°C
<b><i>Meis</i></b>	NM_001193271	TCGTCAGAGTCATTCAAT	AATCATCAAGTTATCCAGTTC	102 pb	55°C
<b><i>FXR</i></b>	NM_009108	CCAACCTGGGTTTCTACCC	CACACAGCTCATCCCTTT	185 pb	54°C
<b><i>CREB</i></b>	NM_001037726	CCTGCCATCACCCTGTGA	CCATCCGTACCATTGTTAGC	113 pb	55°C
<b><i>MyoD</i></b>	NM_010866.2	GATGGCATGATGGATTACAGC	GACTATGTCCTTTCTTTGGGG	528 pb	55°C
<b><i>Miogenina</i></b>	NM_031189.2	GCTCAGCTCCCTCAACCAG	ATGTGAATGGGGAGTGGGGA	424 pb	58°C

### 3.3. Mutagênese sítio-dirigida

O promotor da *Miostatina* (259 pb) de camundongo (Chr1: 53118271-53118530) foi previamente clonado em um vetor de expressão (pGL3-Basic) antecedendo a sequência que codifica o gene repórter da *Luciferase* (Grade *et al* 2009). A partir desta construção, que chamaremos pPMM, foram produzidas onze outras contendo mutações em sítios específicos, visando analisar o papel de cada um deles.

Os ensaios de mutação sítio-dirigida foram realizados utilizando o *kit QuickChange II - Site-Directed Mutagenesis*, da Agilent. O programa disponível no site [www.genomics.agilent.com](http://www.genomics.agilent.com) foi utilizado para desenhar os *primers* de acordo com instruções fornecidas pelo fabricante. O programa permite a troca de no máximo sete nucleotídeos, a fim de possibilitar o desenho de *primers* com as características sugeridas pelo catálogo, dentre as quais: ambos os *primers* devem conter a mutação desejada e

devem anelar na mesma sequência em fitas opostas do plasmídeo; devem ter entre 25 e 45 bases (*primers* maiores podem ser usados, mas quanto maior for o tamanho do *primer*, maiores as chances de formação de estruturas secundárias);  $T_m \geq 78^\circ\text{C}$ ; conteúdo GC  $\geq 40\%$ ; terminar em uma ou mais bases C ou G; além disso, a mutação desejada deve estar no meio do *primer* com cerca de 10–15 bases de sequência correta dos dois lados.

### 3.3.1. Estratégia do desenho dos *primers* utilizados na mutagênese

A estratégia para o preparo das construções de mutação foi elaborada de modo que a mutagênese fosse dividida em quatro ciclos, a fim de utilizar as construções mais simples para o preparo das construções com diversos sítios mutados. Para cada um destes ciclos, foi escolhido um sítio de uma enzima de restrição específica para ser inserido no sítio de ligação de interesse, a fim de facilitar a verificação do sucesso da mutagênese posteriormente, utilizando a digestão das construções. Os sítios de ligação mutados são representados por  $\Delta$  seguido da letras C, N, M ou F, onde C representa CREB, N representa NFY, M representa Meis e F representa FXR (Tabela 3).

Para cada ciclo, o desenho dos *primers* foi feito pela troca de alguns nucleotídeos. A troca dos nucleotídeos foi feita com base em uma prévia revisão bibliográfica, onde foram levantados trabalhos contendo estratégias eficientes de mutação dos sítios em estudo. Para os sítios CREB e NFY, foi utilizado como base o trabalho de Osawa *et al* (1996); para o sítio Meis, foi considerado o trabalho de Chang *et al* (1997) e para o sítio FXR foi utilizado como base o estudo de Forman *et al* (2005).

As construções com mutações em apenas um dos sítios (pPMM $\Delta$ C, pPMM $\Delta$ N, pPMM $\Delta$ M e pPMM $\Delta$ F), geradas diretamente a partir da construção pPMM, constituíram o Ciclo 1 e receberam a inserção da enzima de restrição *EcoRI* (5'-GAATTC-3').

As construções com mutações em dois sítios, geradas a partir das construções obtidas no Ciclo 1, fizeram parte do Ciclo 2 e tiveram um sítio para a enzima de restrição *Clal* (5'-ATCGAT-3') inserido. Neste caso, a construção pPMM $\Delta$ C deu origem à construção pPMM $\Delta$ CN e a construção pPMM $\Delta$ M deu origem à construção pPMM $\Delta$ MF.

As construções com mutações em três sítios, geradas a partir das construções obtidas no Ciclo 2, fazem parte do Ciclo 3. Neste caso, foram utilizadas duas diferentes estratégias. Primeiramente foi utilizada a inserção de um sítio para a enzima de restrição *PstI* (5'-CTGCAG-3') e a construção pPMM $\Delta$ CN deu origem as construções pPMM $\Delta$ CNM e pPMM $\Delta$ CNF. No segundo caso, foi utilizada a inserção do sítio para a enzima *SmaI* (5'-CCCGGG-3'), e a partir da construção pPMM $\Delta$ MF foi gerada a construção pPMM $\Delta$ CMF e também a construção pPMM $\Delta$ NMF.

Por fim, a construção contendo mutações em todos os sítios, pPMM $\Delta$ CNMF, gerada a partir da construção pPMM $\Delta$ CNM obtida no Ciclo 3, foi produzida no Ciclo 4, utilizando a inserção do sítio para a enzima de restrição *NotI* (5'-GCGGCCGC-3').

Os *primers* utilizados estão listados na Tabela 3. Todas as construções produzidas foram posteriormente sequenciadas para verificação do sucesso das mutagêneses.

**Tabela 3** – *Primers* desenhados para a obtenção das construções delecionais. D: *primer* direto; R: *primer* reverso. Nucleotídeos mutados estão sublinhados.

<b>pPMM<math>\Delta</math>C</b>	<b>D</b>	GTGGAGCAGGAGCCAATCATAGATCCAG <u>AATTC</u> TCTTGTCTCCTCTAAGTTGGAATATAA
	<b>R</b>	TTATATTCCAACCTTAGAGGAGACAAGAG <u>AATTC</u> TGGATCTATGATTGGCTCCTGCTCCAC
<b>pPMM<math>\Delta</math>N</b>	<b>D</b>	AGCGAGATTCATTGTGGAGCAGGAG <u>AATTC</u> CATAGATCCTGACGACACTTGTCTC
	<b>R</b>	GAGACAAGTGTGTCAGGATCTATG <u>AATTC</u> CCTGCTCCACAATGAATCTCGCT
<b>pPMM<math>\Delta</math>M</b>	<b>D</b>	GGTGACTTGTGACAGACAGGGTTTTAACCTG <u>AATTC</u> ACGAGATTCATTGTGGAGCAGGAGCCAA
	<b>R</b>	TTGGCTCCTGCTCCACAATGAATCTCGT <u>AATTC</u> AGGTTAAAACCCTGTCTGTCACAAGTCACC
<b>pPMM<math>\Delta</math>F</b>	<b>D</b>	ACTGCTTGGTGACTTGTGACAGACAG <u>AATTC</u> TATTCTGACAGCGAGATTCATTGTGGAG
	<b>R</b>	CTCCACAATGAATCTCGCTGTCAGAGAATG <u>AATTC</u> TGTCTGTCACAAGTCACCAAGCAGT
<b>pPMM<math>\Delta</math>CN</b>	<b>D</b>	CTGACAGCGAGATTCATTGTGGAGCAGGAG <u>AATTC</u> ATAGATCCAGAATTCCTTGTCTCCTCTAAG
	<b>R</b>	CTTAGAGGAGACAAGAGAATTCGGATCTA <u>AATTC</u> ATCTCCTGCTCCACAATGAATCTCGCTGTGAG
<b>pPMM<math>\Delta</math>MF</b>	<b>D</b>	AATACTGCTTGGTGACTTGTGACAGACAGG <u>AATTC</u> ATCTGAATTCACGAGATTCATTGTGGAGCAGG
	<b>R</b>	CCTGCTCCACAATGAATCTCGTGAATTCAG <u>AATTC</u> ATCTGCTGTCACAAGTCACCAAGCAGTATT
<b>pPMM<math>\Delta</math>CNM</b>	<b>D</b>	GTGACTTGTGACAGACAGGGTTTTAACCTCAG <u>CTGCAG</u> TGATTCATTGTGGAGCAGGAGAAATCGATTAG
	<b>R</b>	CTAATCGATTCTCCTGCTCCACAATGAATCACT <u>GCAGCT</u> GAGGTTAAAACCCTGTCTGTCACAAGTCAC
<b>pPMM<math>\Delta</math>CNF</b>	<b>D</b>	ACTGCTTGGTGACTTGTGACAGACAGG <u>CTGCAG</u> TCTCTGACAGCGAGATTCATTGTGGAGC
	<b>R</b>	GCTCCACAATGAATCTCGCTGTCAGAG <u>CTGCAG</u> TCTCTGCTGTCACAAGTCACCAAGCAGT
<b>pPMM<math>\Delta</math>CMF</b>	<b>D</b>	TTCATTGTGGAGCAGGAGCCAATCATAGATCAGGAGTA <u>CCCGGG</u> TCTCCTCTAAGTTGGAATATAAAAAGCCAC
	<b>R</b>	GTGGCTTTTTATATTCCAACCTTAGAGGAG <u>CCCGGG</u> TACTCCTGATCTATGATTGGCTCCTGCTCCACAATGAA
<b>pPMM<math>\Delta</math>NMF</b>	<b>D</b>	CTGAATTCACGAGATTCATTGTGGAG <u>CCCGGG</u> AAAAGCATAGATCCTGACGACACTTGTCTCCT
	<b>R</b>	AGGAGACAAGTGTGTCAGGATCTATGCTTTT <u>CCCGGG</u> CTCCACAATGAATCTCGTGAATTCAG
<b>pPMM<math>\Delta</math>CNMF</b>	<b>D</b>	AATACTGCTTGGTGACTTGTGACAGACAG <u>CGGCCGC</u> ATCTCAGCTGCAGTGATTCATTGTGGAGCAG
	<b>R</b>	CTGCTCCACAATGAATCACTGCAGCTGAGAT <u>GCGGCCGC</u> TGTCTGTCACAAGTCACCAAGCAGTATT

### 3.3.2. Purificação dos *Primers*

Inicialmente, os *primers* desenhados para os ensaios de mutagênese sítio-dirigida foram purificados através de eletroforese em gel de poliacrilamida 5% (PAGE). Para realizar este procedimento, foi preciso fazer uma corrida eletroforética com os *primers* em gel de poliacrilamida 5%, que foi posteriormente corado em banho de brometo para possibilitar a visualização das bandas de *primers* com um transiluminador. As bandas contendo os *primers* foram cortadas do gel e eluídas com auxílio de um *buffer* de eluição contendo acetato de amônio, acetato de magnésio, EDTA pH 8,0, e SDS, durante 12-16h a 37°C. No dia seguinte o material foi filtrado em lã de vidro para remover os resíduos de gel e foi submetido a lavagens com isobutanol saturado para remover o brometo. Em seguida, foi realizada uma extração com butanol para redução de volume e a amostra foi submetida a uma purificação com fenol/clorofórmio, seguida de uma extração com clorofórmio e, por fim, uma precipitação com NaCl e etanol. Para finalizar, o material foi então lavado duas vezes com etanol 70% para a retirada dos sais, e ressuspenso em 50 µL de água, deixando, assim, os *primers* prontos para serem utilizados.

### 3.3.3. Mutação sítio-dirigida

Com os *primers* purificados, primeiramente, realizou-se uma reação em cadeia da polimerase (PCR), contendo como enzima a *Pfu Ultra HF* DNA polimerase, que possui ultra-fidelidade de síntese de DNA, copiando a mutação apresentada nos *primers* de maneira exata para as moléculas-filhas. A reação de PCR foi preparada contendo 5 µL de *Buffer* de reação 5x concentrado, 50 ng de DNA molde (pPMM), 125 ng tanto do *primer* direto como do *primer* reverso e 1 µL de dNTP *mix*. O programa utilizado foi o mesmo sugerido pelo *kit* de mutagênese, composto por 30 segundos de pré-desnaturação a

95°C, seguidos de 18 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, alinhamento de *primers* a 55°C por 1 minuto e extensão a 68°C por 4 minutos. Em seguida, foi feita a digestão do DNA parental molde não mutado, com a enzima *Dpn* I, que degrada DNAs metilados e hemimetilados. Foram acrescentados 1 µL da enzima *Dpn* I ao produto de PCR e a amostra foi então incubada por 1 hora a 37°C. Finalmente, foi feita a transformação térmica de bactérias competentes, com intuito de amplificar os plasmídios de interesse.

#### **3.3.4. Transformação e Isolamento de DNA plasmidial**

Para a transformação térmica, as bactérias termo-competentes foram descongeladas em gelo e ao seu tubo foi acrescentado 4 ng do DNA de interesse (construções de mutação). Em seguida foi aplicado o choque térmico, sendo as bactérias rapidamente submetidas a banho de 42°C por 90 segundos, e imediatamente resfriadas em gelo por 5 minutos. Após o procedimento, foi acrescentado meio de cultura LB (Luria-Bertani) e as bactérias foram crescidas por 1 hora, a 37°C sob agitação. Em seguida, foram peletadas e plaqueadas em meio seletivo (LB ágar + ampicilina). Transcorrido um período *overnight*, colônias isoladas foram utilizadas para o preparo de inóculos em meio LB líquido e, após crescimento de 12-16 horas a 37°C sob agitação, foram utilizadas para extração do DNA plasmidial das bactérias (minipreparação).

As culturas líquidas de bactérias foram inicialmente peletadas e ressuspensas em 200 µL de solução tampão, contendo um tampão (Tris-HCl), EDTA, que é um quelante de Mg<sup>2+</sup> e Ca<sup>2+</sup> (para impedir seu uso como ativador de DNase) e glicose. Em seguida, foram acrescentados 300 µL de solução de lise, que contém NaOH e um agente de solvatação SDS (dodecilsulfato de sódio). Esta faz com que as proteínas sofram

desnaturação parcial e o SDS liga-se a elas misturando sua cadeia alifática ao cerne hidrofóbico das proteínas semi-desnaturadas. O DNA da bactéria não se desliga das proteínas semi-desnaturadas e é alvo de precipitação pela ação da próxima solução, a chamada solução precipitadora, que contém  $K^+$ . O sal de  $K^+$  do SDS precipita prontamente, levando consigo o DNA bacteriano e deixando o plasmídeo no sobrenadante. Este último foi precipitado mudando-se a constante dielétrica do meio com álcool, utilizando isopropanol. Por fim, o DNA foi lavado com etanol, para retirar o excesso de sais. Em seguida, foi feita a precipitação do DNA com NaCl, e foi adicionada uma solução de PEG 13%, para uma purificação mais eficiente do DNA. Por fim, novamente o DNA foi lavado com etanol para retirada dos sais em excesso. Após o término da extração, foi feita uma digestão com a enzima de restrição apropriada, acrescentando-se 10  $\mu$ L de DNA, 5  $\mu$ L de *buffer* 10x, 2  $\mu$ L da enzima e 33  $\mu$ L de água, totalizando 50  $\mu$ L, de modo que estes reagentes foram submetidos a 37°C por 1h30min. Por fim, a verificação da digestão foi realizada por eletroforese em gel de agarose 1%. Para confirmar a inserção da mutação, as construções foram enviadas para sequenciamento.

### **3.3.5. Isolamento de DNA plasmidial em larga escala**

Ao final, para uma produção em grande quantidade dos vetores de interesse, foi realizado um isolamento do material em grande quantidade, utilizando o *kit EndoFree® Plasmid Maxi*, da Quiagen. Inicialmente, foi realizada a transformação de cada construção em bactérias termo-competentes, e, a partir de uma colônia isolada, foi preparado um pré-inóculo contendo 5 mL de meio LB acrescido de antibiótico, que cresceu sob agitação a 37°C por um período *overnight*. No dia seguinte, 250  $\mu$ L desta cultura líquida foram transferidos para 250 mL de meio LB acrescido de antibiótico, crescendo sob agitação a 37°C, por 12-16h. Depois disso, as bactérias foram peletadas e ressuspensas em 10 mL



de *Buffer P1*, que contém RNase A, Tris-HCl pH 8,0 e EDTA, os quais facilitam a ressuspensão. Em seguida, para realizar a lise das células, foram adicionados 10 mL de *Buffer P2* contendo NaOH e SDS, e após mistura dos tubos por inversão, eles permaneceram por 5 minutos à temperatura ambiente (15-25°C). Após este período de incubação, foram adicionados 10 mL de *Buffer P3*, um tampão de neutralização composto por acetato de potássio pH 5,5, que deve estar pré-resfriado para aumentar a eficiência da precipitação do DNA genômico, de proteínas, de restos celulares e do dodecil sulfato de potássio (KDS). Após mistura por inversão, o lisado foi transferido para uma seringa *QIAfilter* cuja ponta estava tampada para evitar vazamento, e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos. A seringa *QIAfilter* permite a limpeza do lisado sem a necessidade de centrifugação, reduzindo o tempo para purificação do plasmídeo, e tornando-o livre de endotoxinas, permitindo que futuramente ele possa ser utilizado em ensaios de transfecção de células. Passado este tempo, a tampa foi removida e o êmbolo foi inserido para realizar a filtração do lisado em um novo tubo. Ao filtrado foram então acrescentados 2,5 mL de *Buffer ER* contendo isopropanol e Triton® X-100, e após mistura por inversão, o tubo foi incubado em gelo por 30 minutos. Enquanto isso, a coluna de purificação *QUIAGEN-tip 500* foi equilibrada pela aplicação de 10 mL de *Buffer QBT*, que contém 750 mM NaCl, 50 mM MOPS pH7,0, 15% isopropanol (v/v) e 0,15% Triton® X-100 (v/v), de modo que o fluxo do tampão iniciou-se automaticamente pela redução da tensão superficial causada pelo detergente e pela ação da gravidade. A coluna *QUIAGEN-tip 500* permite uma purificação rápida do material, tornando-o livre de endotoxinas sem a necessidade de utilizar brometo de etídio, fenol, clorofórmio ou CsCl. Após o término da incubação do filtrado em *Buffer ER*, o filtrado foi transferido para a coluna de purificação, de modo a entrar na resina pela ação da gravidade. Foram feitas, então, 2 lavagens da coluna com 30 mL de *Buffer QC*, composto por 1,0 M NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0 e 15% isopropanol (v/v). O DNA foi, então, eluído com 15mL de *Buffer QN*, composto por 1,6 M

NaCl, 50 mM MOPS pH 7,0 e 15% isopropanol (v/v), de modo que o conteúdo eluído foi coletado em um novo tubo. Foram então adicionados 10,5 mL (0,7 volumes) de isopropanol ao DNA eluído, e após misturar, foi feita a centrifugação a 15.000 x g por 30 minutos a 4°C, para precipitar o DNA. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA foi lavado com 5 mL de etanol 70% e foi feita a centrifugação a 15.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi então descartado, o pellet ficou secando por 5-10 minutos e o DNA foi redissolvido em 100 µL de *Buffer* TE. Em seguida, foi feita a quantificação do material em espectrofotômetro (NanoDrop).

#### **3.4. Ensaios em cultura celular**

Células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> (mioblastos de camundongos) foram cultivadas normalmente em meio de proliferação DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino.

Em preparação para as transfecções, os mioblastos foram tripsinados e então plaqueados em semi-confluência (aproximadamente 60%) em placas 6-*wells*. Para os experimentos em proliferação, a transfecção foi realizada no dia seguinte ao plaqueamento. Já para os experimentos em diferenciação, no dia seguinte o meio de proliferação foi substituído por meio DMEM contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 2% de soro equino. A transfecção foi então realizada após um, dois, três, quarto e cinco dias de diferenciação.

### 3.4.1. Transfecção

Para os ensaios de transfecção, o PEI (*polyethyleneimine*) foi utilizado como vetor para carregar as construções delecionais para dentro dos mioblastos. Para tanto foram misturados a 500  $\mu$ L de meio DMEM (apenas acrescido de 1% de penicilina/estreptomicina) 10  $\mu$ g de PEI, 10  $\mu$ g da construção delecional a ser testada, juntamente com 5  $\mu$ g do vetor controle pTK-RL (que contém o promotor ubíquo TK dirigindo a expressão do gene repórter *Renilla*). Para os ensaios de co-transfecção, foram utilizados 13  $\mu$ g de PEI para 10  $\mu$ g da construção delecional de interesse, 5  $\mu$ g do vetor de expressão pRc/cytomegalovirus (CMV)-ACREB, ou apenas ACREB (gentilmente fornecido pelo Dr. Chuck Vinson, do *National Institutes of Health*, EUA), e 5  $\mu$ g do vetor controle pTK-RL. Para um volume final de 6 mL foram então acrescidos 5,5 mL de meio DMEM contendo 1% de penicilina/estreptomicina e 10% de soro fetal bovino. Os mioblastos foram então lavados com meio DMEM acrescido de antibiótico e cada poço recebeu 3 mL da solução contendo os DNAs de interesse. Após 5-6 horas, esta solução foi removida, e substituída por meio de proliferação ou diferenciação, conforme necessário.

### 3.4.2. Lise e medição de luciferase/renila

Para a lise e medição dos valores de luciferase/renila foi utilizado o *kit Dual-Luciferase Reporter Assay System*, da Promega. Após aproximadamente 18 horas da transfecção, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com 2 mL de PBS. Em seguida cada poço da placa recebeu 250  $\mu$ L da solução de lise *Passive Lysis Buffer* (Promega) e as células foram então removidas com ajuda de um raspador e todo o volume foi transferido para tubos de 1 mL. Em seguida foram realizados dois ciclos de

congelamento/degelo em nitrogênio líquido, seguidos de uma centrifugação por 1 minuto, à 12.000 rpm (4°C). O sobrenadante foi então transferido para um tubo limpo e imediatamente utilizado para a medição de luciferase/renila (ver Anexo 1). Para esta etapa foi utilizado um luminômetro. Seguindo a instrução do fabricante do *kit*, foram utilizados 20 µL de cada amostra, para 100 µL do reagente para medir a luciferase, seguido de 100 µL do reagente para medir a renila. Cada medição foi feita por um período de 10 segundos.

#### **3.4.3. Análise dos resultados dos ensaios com luciferase/renila**

Cada construção teve sua atividade analisada em pelo menos 4 experimentos independentes, com 2 replicatas cada. Para a padronização dos resultados, os valores utilizados nas análises foram sempre a razão entre os valores de luciferase e renila encontrados em cada amostra.

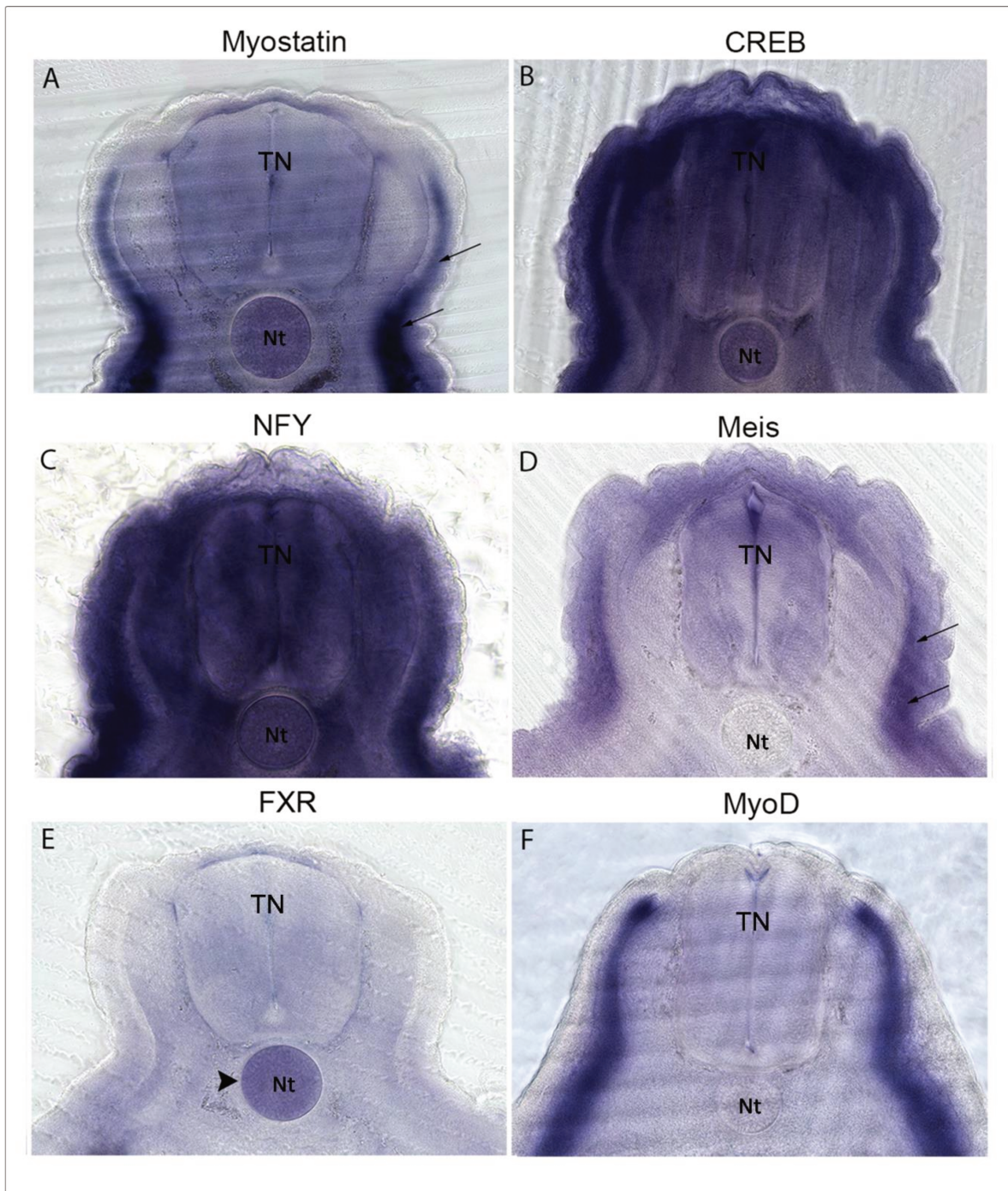
Os valores obtidos pelo luminômetro, em Unidades Relativas de Luz (*Relative Light Units* – RLU) foram transformados para “vezes de mudança” (*fold change*). Estes resultados foram então analisados quanto à sua distribuição normal (Gauss) e os valores com menos de 5% de probabilidade de fazerem parte da população foram excluídos. Em seguida, as médias foram comparadas através do teste *t* de Student.

# *Resultados*

## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise de expressão dos fatores transcricionais localizados no promotor da *Miostatina*.

Uma vez que a relação entre o gene regulado (*Miostatina*) e seus reguladores putativos (*CREB*, *NFY*, *Meis* e *FXR*) necessita que haja domínios de expressão coincidentes ou complementares, iniciamos o estudo através do estabelecimento do padrão de expressão destas moléculas em embriões de galinha em estágio HH25, que representa um pico de expressão de *Miostatina* na região entre membros (Amthor *et al* 2002). Como pode ser observado na Figura 10, neste estágio de desenvolvimento, *Miostatina* e *Meis* são proeminentemente expressos no dermomiótomo hipaxial, enquanto *CREB* e *NFY* são expressos ubiquamente neste nível axial dos embriões. Estes achados dão suporte à ideia de que estes fatores transcricionais estão se ligando ativamente ao promotor e regulando a expressão da *Miostatina* durante o desenvolvimento muscular dos embriões de galinha. Entretanto, *FXR* demonstrou ser expresso exclusivamente na região da notocorda. *MyoD* foi usado como marcador miogênico devido ao seu papel muito bem estabelecido durante a miogênese de vertebrados (Francis-West *et al* 2003).

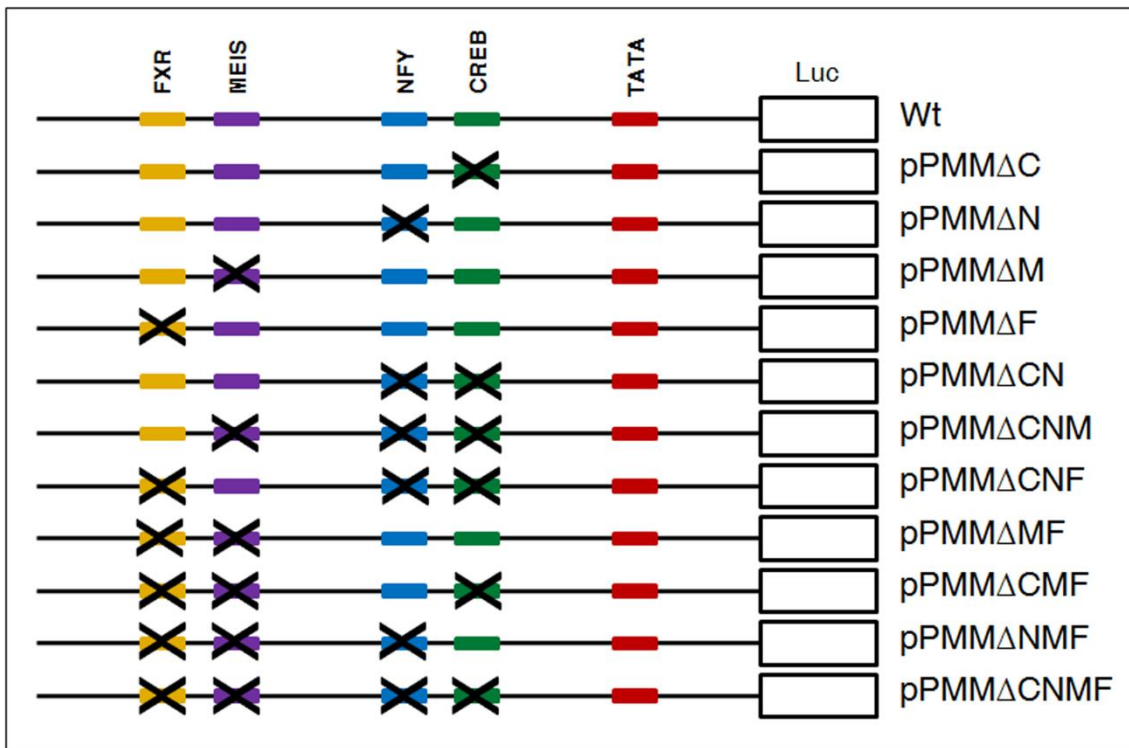


**Figura 10 –** Secções transversais da região entre membros de embriões de galinha em estágio HH25 submetidas à hibridação *in situ*. Os padrões de expressão de (A) *Miostatina*, (B) *CREB*, (C) *NFY*, (D) *Meis*, (E) *FXR* e (F) *MyoD* estão representados. A região dorsal está voltada para cima. As flechas indicam a expressão proeminente de *Miostatina* e *Meis* na região do

dermomiótomo hipaxial; a cabeça de seta indica a expressão de *FXR* na notocorda. TN: tubo neural; Nt: notocorda.

#### 4.2. Ensaios mutacionais

Com o intuito de caracterizar funcionalmente o papel de cada um dos quatro sítios de ligação para fatores transcricionais identificados no promotor da *Miostatina*, foram criados diversos vetores mutacionais (Figura 11), que foram utilizados nos ensaios de transfecção descritos a seguir.



**Figura 11 – Representação esquemática das construções deletivas utilizadas no presente estudo.** As mutações são representadas por um (X) nos sítios de ligação para CREB (C), NFY (N), Meis (M) e/ou FXR (F); Wt: *wildtype* (tipo selvagem); Luc: Luciferase.



#### 4.3. Papel dos fatores de transcrição em mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> em proliferação

A transfecção de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> é um sistema conveniente para testar a modulação da expressão gênica por diferentes moléculas e é extensivamente usada para estudos sobre os mecanismos da miogênese (Ríos *et al* 2001). Portanto, este sistema foi escolhido para analisar o papel dos reguladores putativos do promotor gênico da *Miostatina*, através de ensaios mutacionais.

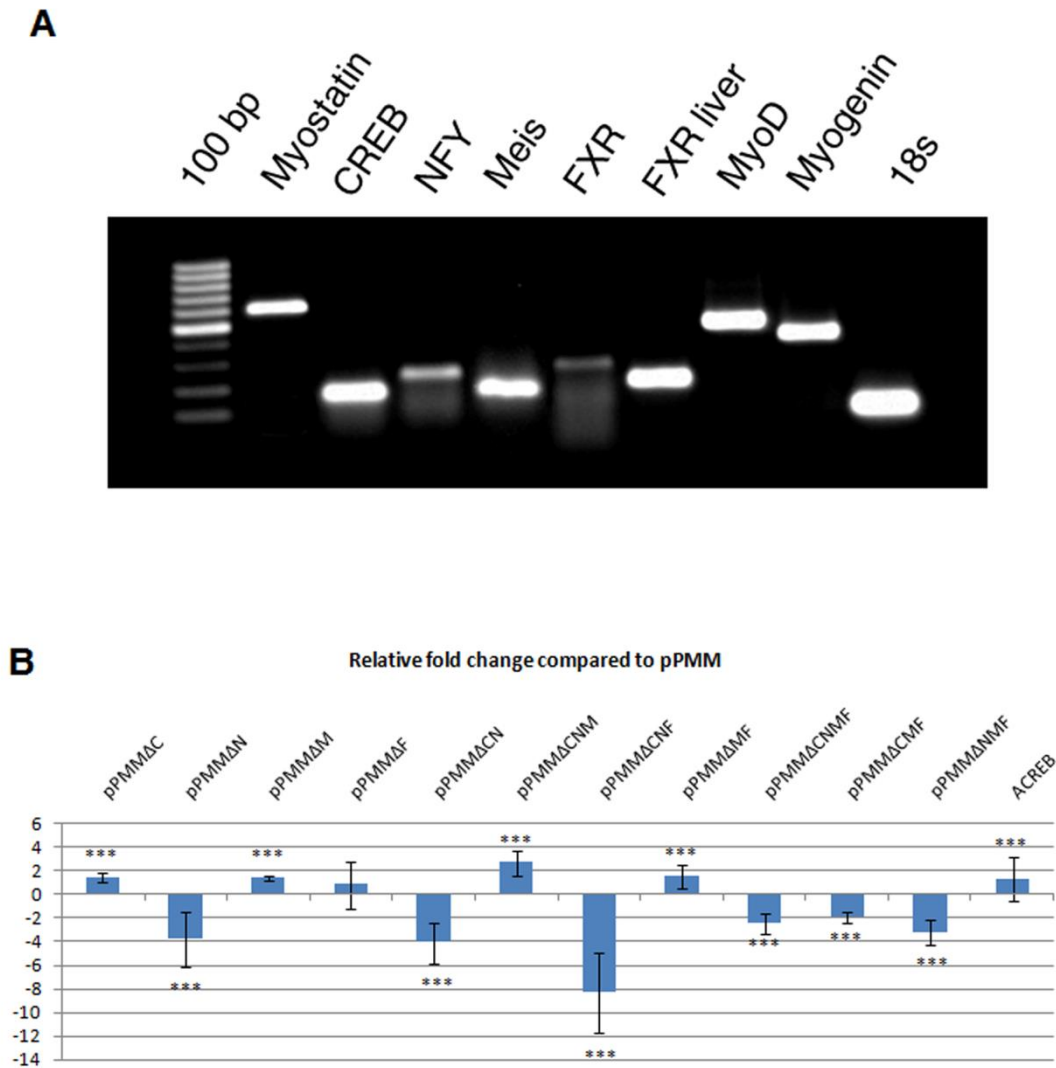
Inicialmente, foram analisados mioblastos submetidos a condições normais de proliferação. Para verificar se os fatores transcricionais em estudo, e também a *Miostatina*, estão presentes neste contexto, foram realizados ensaios de RT-PCR qualitativo (Figura 12A). MyoD e Miogenina foram usados como controles miogênicos, e o RNA ribossomal 18s como um controle endógeno. Os resultados mostram que todas as moléculas testadas estão presentes em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> em proliferação. FXR apresentou um tamanho diferente do esperado (183 pb) e, por isso, foi utilizado RNA de fígado para realizar um controle para este fator transcricional. Os resultados indicam que o FXR é expresso como transcritos diferentes em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> e no fígado.

Em seguida, todas as construções mutacionais produzidas previamente para este estudo foram transfectadas em mioblastos em proliferação. Adicionalmente, uma forma dominante negativa da proteína CREB (ACREB) foi co-transfectada com o promotor selvagem (pPMM), que teve sua expressão repórter analisada. Os resultados obtidos estão representados na Figura 12B.

A mutação gerada no sítio de ligação para CREB (pPMMΔC) resultou em um aumento de 1,4 vezes na atividade do promotor, quando comparado ao promotor selvagem, indicando que esta molécula atua como um repressor durante a proliferação de mioblastos. Da mesma forma, a co-transfecção do vetor ACREB com a construção contendo o promotor intacto resultou em um aumento na atividade do promotor (1,2

vezes). O mesmo foi observado para a mutação no sítio para o fator Meis (pPMM $\Delta$ M), que causou um aumento de 1,3 vezes na atividade do promotor da *Miostatina*. Em contraste, quando a mutação foi gerada no sítio para NFY (pPMM $\Delta$ N), houve uma queda de 3,8 vezes na atividade do promotor, sugerindo que o NFY atua como um ativador durante a proliferação dos mioblastos. A mutação no sítio para FXR (pPMM $\Delta$ F) não resultou em alteração significativa na atividade do promotor.

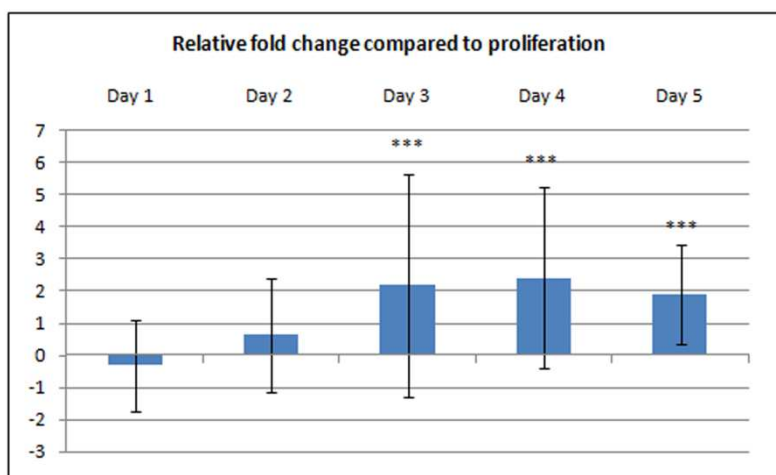
Construções contendo mutações múltiplas resultaram ora em um aumento e ora em uma diminuição na atividade do promotor. A construção contendo mutações nos sítios para Meis e FXR (pPMM $\Delta$ MF) gerou um aumento de 1,5 vezes na atividade de luciferase, e a construção com sítios mutados para CREB, NFY e Meis (pPMM $\Delta$ CNM) resultou em um aumento de 2,6 vezes de expressão repórter. Todas as demais construções apresentaram uma diminuição na atividade do gene repórter: quando os sítios para CREB e NFY foram mutados (pPMM $\Delta$ CN), um decréscimo de 4,1 vezes foi observado; quando as mutações foram localizadas nos sítios para CREB, NFY e FXR (pPMM $\Delta$ CNF), a diminuição foi de 8,3 vezes; a construção com alterações nos sítios para CREB, Meis e FXR (pPMM $\Delta$ CMF) apresentou um decréscimo de 1,9 vezes na atividade da luciferase; quando as mutações eram localizadas nos sítios para NFY, Meis e FXR (pPMM $\Delta$ NMF), a diminuição foi de 3,2 vezes; finalmente, quando todos os sítios foram mutados (pPMM $\Delta$ CNMF), a atividade do gene repórter diminuiu 2,4 vezes.



**Figura 12 – A: Ensaios de RT-PCR qualitativo.** Expressão dos fatores de transcrição analisados e da Miostatina durante a proliferação de células  $C_2C_{12}$  *in vitro*. A primeira coluna corresponde ao indicador de peso molecular de 100 pb. **B: Análise da atividade das construções delecionais através de transfecção de células  $C_2C_{12}$  durante a proliferação.** Resultados mostram a variação da expressão do gene repórter das construções mutacionais em relação ao promotor selvagem, e são apresentados de acordo com a variação em “vezes” (eixo y), barras indicam médias  $\pm$  desvio  $***P < 0.05$ .

#### 4.4. Análise do comportamento do promotor da *Miostatina* através da diferenciação dos mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>

Sabendo que a *Miostatina* apresenta maior expressão em estágios mais tardios da miogênese (Amthor *et al* 2002), foi realizado em seguida um ensaio de curso temporal, para determinar o ponto de maior expressão do promotor em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> em diferenciação. Para isso, mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> foram submetidos a condições de diferenciação por um, dois, três, quatro e cinco dias, e foram então transfectados com a construção contendo o promotor intacto (pPMM), para que o comportamento do promotor pudesse ser testado ao longo do processo de diferenciação (Figura 13). O promotor da *Miostatina* apresentou um pico de atividade a partir do terceiro dia de diferenciação, e esta regulação positiva foi mantida até o quinto dia. Por esse motivo, o terceiro dia foi escolhido para as análises envolvendo C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> em diferenciação.



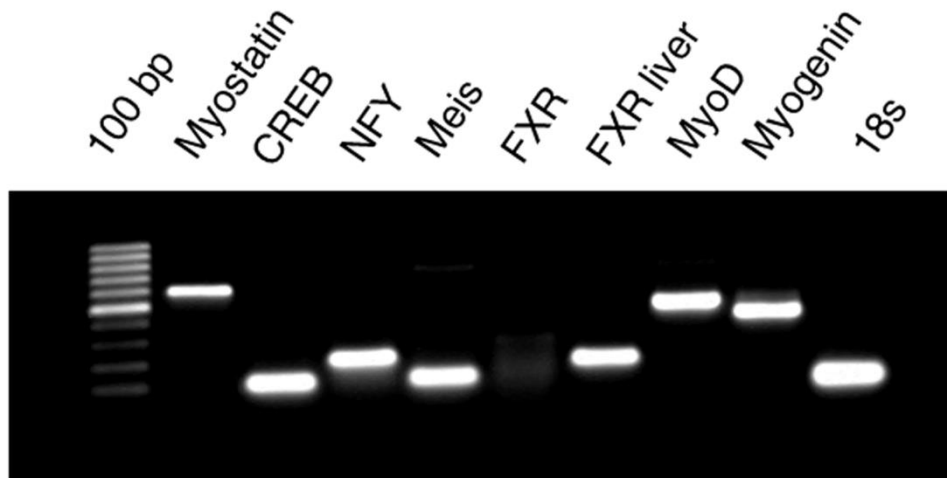
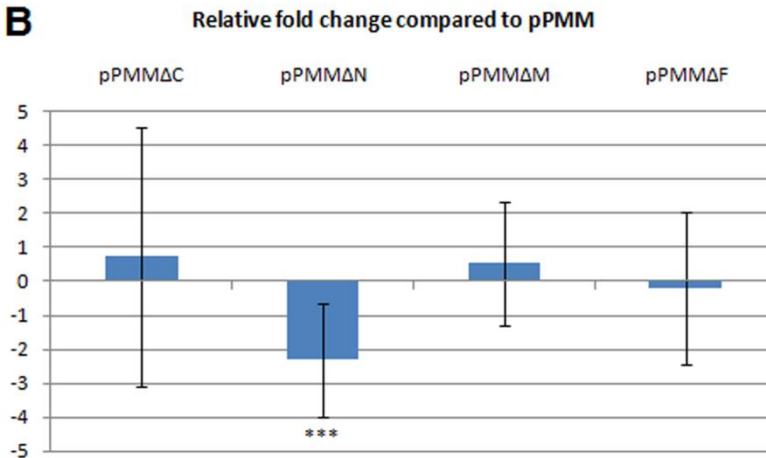
**Figura 13 – Análise da atividade do promotor da *Miostatina* ao longo da diferenciação.**

Resultados mostram a variação da expressão do gene repórter da construção pPMM após um, dois, três, quatro e cinco dias de diferenciação em relação ao promotor selvagem em condições de proliferação, e são apresentados de acordo com a variação em “vezes” (eixo y), barras indicam médias  $\pm$  desvio \*\*\*P<0.05.

#### **4.5. Papel dos fatores de transcrição em mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> em diferenciação**

A regulação positiva sofrida pelo promotor da *Miostatina* durante o processo de diferenciação dos mioblastos indica que esta região regulatória encontra-se sob a influência de estímulos variáveis, que controlam sua atividade de uma forma dinâmica através do curso da diferenciação. Os fatores de transcrição analisados no presente estudo são potenciais candidatos a tais reguladores, e podem promover a regulação positiva observada na atividade do gene repórter. Com o intuito de analisar esta hipótese, primeiramente foi verificado se todos os fatores estudados são expressos em mioblastos submetidos a três dias de diferenciação (Figura 14A). Os ensaios de RT-PCR qualitativo mostram que, mais uma vez, FXR é o único fator transcricional que não é expresso da forma esperada, produzindo um padrão de corrida diferente do que aquele observado em fígado.

Em seguida, para verificar se os fatores transcricionais que se ligam ao promotor da *Miostatina* se comportam de forma diferente durante o processo de diferenciação, permitindo o aumento da sua atividade, as quatro construções contendo mutações simples foram transfectadas em células diferenciadas por três dias (Figura 14B). Como pode ser observado, as mutações individuais geradas nos sítios de ligação para CREB, Meis e FXR não resultaram em diferença significativa quando comparadas ao promotor selvagem. Entretanto, quando a mutação foi realizada no sítio para NFY, foi observado um decréscimo na atividade do promotor, sugerindo que este fator atua como um ativador durante o processo de diferenciação.

**A****B**

**Figura 14 – A: Ensaios de RT-PCR qualitativo.** Presença dos fatores de transcrição analisados e da Miostatina durante o terceiro dia de diferenciação de células  $C_2C_{12}$  *in vitro*. A primeira coluna corresponde ao indicador de peso molecular de 100 pb. **B: Análise da atividade das construções deletoriais através da transfecção de células  $C_2C_{12}$  durante a diferenciação.** Resultados mostram a variação da expressão do gene repórter das construções mutacionais em relação ao promotor selvagem, e são apresentados de acordo com a variação em “vezes” (eixo y), barras indicam médias  $\pm$  desvio  $***P < 0.05$ .

# *Discussão*

## 5. DISCUSSÃO

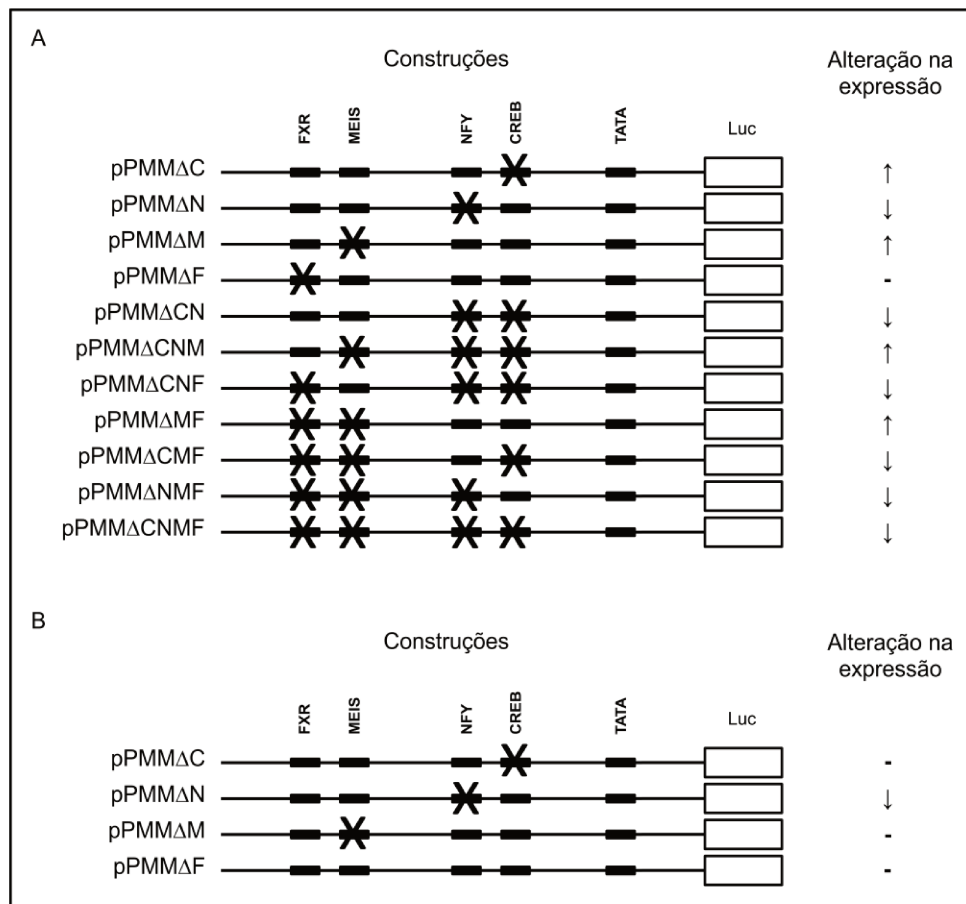
A Miostatina é uma proteína que começa a ser expressa em estágios tardios do desenvolvimento, aparecendo *in vivo* após a compartimentalização dos somitos em dermomiótomo e esclerótomo (Amthor *et al* 2002). Em células  $C_2C_{12}$  *in vitro*, a Miostatina é gradualmente regulada positivamente após a indução da diferenciação, e atinge um pico de expressão durante o terceiro dia de diferenciação (Ríos *et al* 2001). De fato, a Miostatina é um regulador negativo da formação de musculatura (McPherron *et al* 1997) e sua atividade deve ser estritamente regulada, permitindo que os mioblastos se multipliquem apropriadamente antes de sair do ciclo celular para iniciar a diferenciação. Durante a proliferação dos mioblastos, a Miostatina regula negativamente a transição da fase G1 para a fase S do ciclo celular (Mcfarlane *et al* 2005) e sua superexpressão gera um acúmulo de células nas fases G1 e G2 (Joulia *et al* 2003). Por isso, a Miostatina deve ser mantida inicialmente em níveis baixos, permitindo mais ciclos de proliferação, antes de ter sua atividade estimulada. O promotor da *Miostatina* parece obedecer a esta mesma dinâmica, apresentando um aumento significativo de expressão apenas a partir do terceiro dia de diferenciação. Isto demonstra que os elementos presentes no promotor não apenas são responsáveis por sua atividade basal, mas também controlam os seus níveis de atividade, dependendo do ambiente celular.

### 5.1. O papel dinâmico de CREB

Um dos elementos regulatórios encontrados no promotor da Miostatina é o CREB. Chen *et al* (2005) demonstraram uma expressão ubíqua da proteína CREB em cortes de tecido embrionário de camundongo em estágio E9.5 e E10.5 do desenvolvimento. Da mesma forma, os ensaios de hibridação *in situ* realizados no presente trabalho



demonstraram que CREB apresenta um padrão de expressão generalizado, como seria esperado para um regulador deste tipo (Figura 10B). O padrão de expressão ubíquo de CREB em embriões de galinha em estágio HH25 já foi reportado pelo banco de dados do National Institutes of Health (2013), *Geisha – Gallus Expression in Situ Hybridization Analysis*, através do Identificador CREB1.UApcr.



**Figura 15 – Representação esquemática dos resultados obtidos nos ensaios de transfecção durante (A) proliferação e (B) diferenciação dos mioblastos.** Aumento e diminuição da expressão do gene repórter Luciferase em relação ao promotor selvagem são indicados por ↑ e ↓, respectivamente.

A deleção no sítio de ligação para CREB na região do promotor da *Miostatina* (pPMM $\Delta$ C) resultou em um aumento significativo da expressão do gene repórter em mioblastos em proliferação (Figura 15A), indicando um papel como repressor para esta proteína durante este contexto celular. De fato, já foi demonstrado que CREB possui um papel de repressor no promotor de vários genes (Giono *et al* 2001; Ofir *et al* 1991; Lamphet *al* 1990; Vallejo *et al* 1995). Nestes casos, a atividade de repressão de CREB está relacionada à ausência de fosforilação por PKA. Enquanto desfosforilado, CREB pode se ligar ao sítio CRE, mas não consegue transativar o gene alvo. Entretanto, sua presença física parece atrapalhar a ligação de outros fatores cruciais para a transcrição, resultando em uma inibição da atividade gênica. Foi demonstrado que esta condição é temporária, e uma vez fosforilado por PKA, CREB libera a repressão, permitindo que a expressão do gene seja regulada positivamente. Este mecanismo parece ser observado no promotor da *Miostatina*, onde o papel de repressor apresentado por CREB durante a proliferação parece ser perdido com a diferenciação das células, quando a mutação neste sítio resulta em nenhuma alteração na atividade do promotor (Figura 15B), quando comparado ao selvagem. Isto pode indicar que a partir de determinado ponto, CREB, previamente desfosforilado e impedindo a expressão, está sendo fosforilado, liberando a inibição e permitindo que outros fatores se liguem e ativem a expressão de uma forma mais eficiente. Se este for o caso, a presença da PKA ativa seria um fator limitando para a mudança da função de CREB. A transição de um estado desfosforilado para um de fosforilação deve ser altamente controlada, restringindo a atividade da *Miostatina* de uma forma adequada que permita a sua função apenas em momentos cruciais. Assim, não é estranho observar que os valores obtidos pelas construções com deleção no sítio CREB durante a diferenciação apresentam considerável variação, às vezes com picos de regulação positiva. Esta heterogeneidade de resultados se dá devido ao fato de que durante a diferenciação, os mioblastos respondem diferentemente à mudança de meio, de

forma que em uma mesma placa é possível observar mioblastos ainda proliferando e miotubos já em formação. Conseqüentemente, em um mesmo ambiente há células que apresentam CREB desfosforilado, atuando como repressor, e outras onde a fosforilação já aconteceu e a atividade do gene repórter está aumentada. De fato, esta variação foi observada para todas as construções testadas durante a diferenciação.

Os ensaios de co-transfecção, testando a atividade do promotor intacto juntamente com um vetor expressando o dominante negativo de CREB (ACREB) nos mioblastos em proliferação resultaram em um aumento significativo na expressão do gene repórter. Isto está de acordo com os demais resultados, uma vez que ACREB interage com o CREB endógeno e impede sua ligação ao DNA (Ahn *et al* 1998). Desta forma, ACREB provavelmente previne que a presença de CREB desfosforilado iniba a formação dos complexos de transcrição adicionais, permitindo que a atividade do promotor seja mais eficiente.

## **5.2. O papel estável de NFY**

O segundo sítio de ligação testado foi aquele onde se liga o fator transcricional NFY. Este sítio está localizado imediatamente ao lado do sítio CRE, que, por sua vez, está situado a 18 pb de distância do sítio TATA. Como seria esperado para uma molécula envolvida na regulação de diversos genes, NFY foi amplamente expresso nos cortes de embriões de galinha em estágio HH25 analisados nos ensaios de hibridação *in situ* (Figura 10C), assim como previamente pelo National Institutes of Health (2013) - Identificador: FYA.UApcr.

A construção deletional criada através da deleção do sítio NFY (pPMM $\Delta$ N) mostrou uma diminuição na expressão do gene repórter, durante ambos os períodos de

proliferação e diferenciação dos mioblastos (Figura 15A e B). Isto indica que o NFY atua como um ativador da atividade basal do promotor em ambos os contextos. De fato, NFY apresenta um papel similar no promotor gênico da *Hexoquinase II (HKII)* (Osawa *et al* 1996). A região reguladora deste gene contém um sítio TATA próximo ao sítio de iniciação, seguido por um sítio CRE, ao qual se ligam CREB e ATF. Em seguida, há um sítio CCAAT e um sítio Y, aos quais o NFY se liga. Os sítios Y, CCAAT e CRE contribuem para a atividade basal do gene da *HKII*. Adicionalmente, os sítios CCAAT e CRE possuem um papel importante na expressão induzida por cAMP. No caso do promotor da *Miostatina*, é relevante notar que o sítio para NFY está localizado imediatamente ao lado do sítio CRE, e esta proximidade pode ter um efeito sobre a ligação destas proteínas.

### **5.3. O papel dinâmico de Meis**

O terceiro sítio de ligação analisado no promotor da *Miostatina* foi o sítio para a ligação de Meis. Esta proteína é expressa desde estágios precoces do desenvolvimento na mesoderme e nos somitos. De acordo com Coy e Borycki (2010), a partir do estágio HH24, Meis se torna restrito ao dermomiótomo hipaxial, que coincide com os principais sítios de expressão da *Miostatina* (Amthor *et al* 2002). Nossos ensaios de hibridação *in situ* também mostraram padrões de expressão sobrepostos de Meis e *Miostatina* no dermomiótomo hipaxial dos somitos localizados na região entre membros de embriões de galinha em estágio HH25 (Figura 10D).

A deleção do sítio de ligação para Meis encontrado no promotor da *Miostatina* (pPMM $\Delta$ M) gerou um aumento significativo de atividade durante a proliferação dos mioblastos (Figura 15A), indicando um papel como repressor durante este contexto. Entretanto, durante o processo de diferenciação, a mesma construção apresentou

atividade equivalente ao promotor intacto (Figura 15B), demonstrando uma mudança de função. De fato, o complexo Hox-Pbx, formado por proteínas homeobox como o Meis, é capaz de mudar de um estado de repressor para ativador, através da interação com diferentes coreguladores e esta mudança é dependente da sinalização mediada por PKA (Saleh *et al* 2000). Poderia ser possível extrapolar este comportamento para o Meis durante a diferenciação dos mioblastos, sugerindo que a PKA possa ser responsável pela mudança de estado de Meis de repressor para neutro. Desta forma, a presença de PKA na sua forma ativa (por exemplo, através da sua liberação por algum possível repressor, ou devido a aumento nos níveis de cAMP) seria um fator limitante para a mudança de um estado de repressão para outro de relaxamento da repressão, tanto pra CREB (provavelmente através de fosforilação), e para Meis (possivelmente através da interação diferencial com coreguladores), permitindo que o promotor da *Miostatina* eleve sua atividade durante a diferenciação dos mioblastos. Seria relevante verificar alterações na presença da PKA ativa e de cAMP durante este processo.

#### **5.4. A ausência de FXR em mioblastos de camundongo**

O ultimo fator de transcrição identificado no promotor da *Miostatina* é o FXR. A mutação no sítio de ligação para esta proteína (pPMM $\Delta$ F) não conferiu nenhuma alteração no promotor da *Miostatina* durante a proliferação ou diferenciação dos mioblastos (Figura 15A e B). De acordo com Cariou *et al* (2006), FXR não é expresso na musculatura esquelética mas é observada em baixos níveis no tecido adiposo, sendo induzido durante a diferenciação dos adipócitos *in vitro*. Da mesma maneira, os ensaios de hibridação *in situ* revelaram que em HH25, FXR não é expresso em somitos, mas apenas na notocorda (Figura 10E). Já os ensaios de RT-PCR qualitativo realizados neste estudo mostraram que o FXR é aparentemente expresso como um transcrito alternativo

em células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, gerando uma banda diferente do que aquela produzida quando os mesmos *primers* foram usados juntamente com RNA de fígado. De fato, como já citado anteriormente, a Miostatina é expressa no fígado e no tecido adiposo de aves e mamíferos (Sundaresan *et al* 2007; McPherron *et al* 1997). Assim, é possível que FXR tenha um papel ativo na regulação da *Miostatina* de uma maneira tecido-específica, atuando no promotor em fígado e tecido adiposo, mas não na musculatura esquelética. Seria interessante testar esta hipótese em diferentes culturas celulares. Além disso, seria relevante efetuar uma expressão ectópica de FXR em mioblastos para verificar se sua presença é capaz de causar alguma alteração na atividade do promotor da *Miostatina*.

#### **5.5. Análise do papel sinérgico de mutações múltiplas em mioblastos em proliferação.**

Após olhar para cada fator transcricional individualmente, começamos a analisar o efeito de mutações múltiplas nos sítios de ligação durante a proliferação de células C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, para verificar possíveis papéis sinérgicos ou antagonistas dos fatores transcpcionais neste contexto (Figura 15A).

A construção contendo mutações nos sítios para CREB e NFY (pPMMΔCN) apresentou uma queda na atividade do gene repórter. Isto já era esperado, considerando-se que quando CREB e NFY estão mutados, os únicos sítios ativos são aqueles para a ligação de FXR e Meis. O primeiro é considerado neutro por estar ausente do contexto, e o segundo foi apontado como um forte repressor da atividade do promotor. Da mesma forma, a construção contendo mutação no sítio FXR, juntamente com CREB e NFY (pPMMΔCNF), também apresentou uma queda forte na atividade do promotor.

Uma construção contendo mutações nos sítios para Meis e FXR (pPMM $\Delta$ MF) causou um aumento na atividade repórter. Neste caso, os sítios para o ativador NFY e o repressor CREB estão ativos. Aparentemente, o efeito de ativador de NFY é mais forte do que a repressão causada por CREB, demonstrando que a repressão de Meis é muito importante para manter níveis baixos de expressão da *Miostatina* durante a proliferação. Por outro lado, quando as mutações foram realizadas nos sítios para NFY, Meis e FXR (pPMM $\Delta$ NMF), deixando apenas o CREB ativo, a atividade repórter foi diminuída, demonstrando o papel de repressor que CREB desempenha sobre o promotor durante a proliferação. Uma construção contendo mutações nos sítios para Meis, NFY e CREB (pPMM $\Delta$ MNC) resultou em um aumento na atividade do promotor, uma vez que ambos os repressores estavam inativos. Isto também demonstra que o NFY não é o único responsável pela ativação do promotor da *Miostatina*, indicando que outras moléculas ligam-se ao promotor e estimulam a expressão.

Uma construção contendo mutações nos sítios para CREB, Meis e FXR (pPMM $\Delta$ CMF), deixando apenas o NFY ativo, apresentou uma diminuição na atividade do promotor. Este resultado foi inesperado, uma vez que o NFY foi considerado um ativador do promotor. Uma possível explicação para isto poderia ser o fato de que NFY possa necessitar da interação com o CREB para se ligar apropriadamente ao DNA e promover a transcrição. De fato, o NFY interage com diversos outros elementos reguladores e a distância entre eles é crucial para sua atuação (Mantovani 1999). Desta forma, poderia ser possível que a ausência de CREB no sítio vizinho previna a ligação apropriada de NFY ao DNA, dificultando a transcrição.

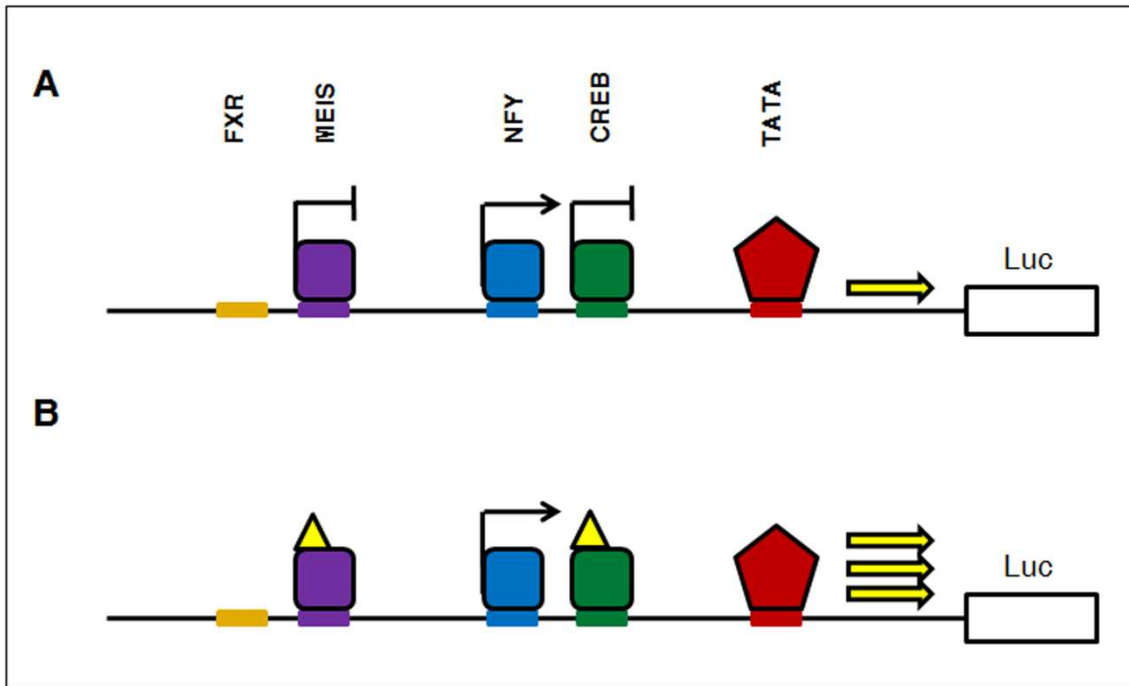
Finalmente, quando todos os quatro sítios de ligação foram mutados (pPMM $\Delta$ CNMF), o promotor apresentou atividade reduzida, apesar de não ter sido tão acentuada como quando os repressores estavam ativos.

## 5.6. Promotor da *Miostatina*: um regulador dinâmico da expressão gênica

O presente estudo demonstrou que o promotor da *Miostatina* possui uma atividade dinâmica, e que os fatores transcricionais que se ligam a ele possuem sua atividade modificada ao longo da diferenciação, e apresentam influência uns sobre os outros, interagindo de uma forma ativa para fornecer os níveis apropriados de atividade promotora em diferentes contextos celulares. Estudos futuros poderão desvendar os mecanismos responsáveis pela mudança de função observada para CREB e Meis.

A Figura 16 mostra um diagrama esquemático que sumariza o papel de cada sítio de ligação do promotor da *Miostatina*, durante a proliferação e diferenciação, de acordo com os achados deste estudo. Como pode ser observado, durante a proliferação dos mioblastos, NFY ativa o promotor da *Miostatina*, enquanto CREB e Meis funcionam como bloqueadores da sua expressão. Como resultado, a expressão do gene repórter é reduzida. Entretanto, durante a diferenciação dos mioblastos, Meis e CREB possuem sua atividade modificada e deixam de reprimir o promotor, que, contando ainda com a ativação de NFY, tem sua atividade aumentada. Em ambos os momentos, FXR não está presente.





**Figura 16 – Representação esquemática do papel de cada fator sobre a atividade do promotor da *Miostatina*.** Os triângulos representam alterações nas proteínas durante a transição de (A) proliferação para (B) diferenciação (possivelmente por fosforilação ou associação com diferentes coreguladores). As setas amarelas representam os níveis de transcrição.

# *Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

- Os fatores transcricionais para os quais são encontrados sítios de ligação conservados no promotor gênico da *Miostatina* são expressos durante o desenvolvimento embrionário de aves, sendo que CREB e NFY apresentam um padrão ubíquo de expressão, enquanto Meis está presente especialmente na região do dermomiótomo, assim como a *Miostatina*, e FXR não é expresso nos somitos, mas apenas na notocorda.
- O promotor da *Miostatina* comporta-se de maneira dinâmica ao longo da transição do estado de proliferação para diferenciação dos mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, aumentando sua atividade a partir do terceiro dia após a mudança do meio.
- Todos os fatores transcricionais analisados são expressos durante a proliferação e diferenciação de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, entretanto os RNAs para FXR apresentam-se na forma de um possível transcrito alternativo.
- NFY atua como um ativador da atividade do promotor da *Miostatina* tanto na proliferação quanto na diferenciação dos mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>.
- CREB e Meis apresentam papel de repressores durante a proliferação de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, liberando esta inibição conforme a diferenciação das células acontece, permitindo que a atividade do promotor da *Miostatina* aumente.
- FXR não é expresso nas situações analisadas e por este motivo não apresenta papel funcional sobre o promotor da *Miostatina* no contexto de mioblastos C<sub>2</sub>C<sub>12</sub>, tanto em proliferação quanto em diferenciação.

*Referências  
Bibliográficas*

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abmayr SM and Pavlath GK. 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development*. 139: 641-56.

Ahn S, Olive M, Aggarwal S, Krylov D, Ginty DD and Vinson C. 1998 A Dominant-Negative Inhibitor of CREB Reveals that It Is a General Mediator of Stimulus-Dependent Transcription of c-fos. *Molecular and Cellular Biology*. 18(2):967.

Amthor H, Huang R, Mckinnell I, Christ B, Kambadur R, Sharma M and Patel K. 2002 The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Developmental Biology*. 251: 241-257.

Aoyama H and Asamoto K. 1998. Determination of somite cells: independence of cell differentiation and morphogenesis. *Development*. 104:15-28.

Aziz A, Sebastian S and Dilworth FJ. 2012. The origin and fate of muscle satellite cells. *Stem Cell Reviews*. 8: 609-22.

Braun T and Arnold HH. 1995. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. *EMBO Journal*. 14: 1176-1186.

Braun T, Rudnicki MA, Arnold HH and Jaenisch R. 1992. Target inactivation of the muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. *Cell*. 71: 369-382.

Brent AE and Tabin CJ. 2002. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Current Opinion in Genetics & Development*. 12:548-557.

Brent AE, Schweitzer R and Tabin CJ. 2003. A Somitic Compartment of Tendon Progenitors. *Cell*. 113: 235–248.

Buckingham M, Bajard L, Chang T, Daubas P, Hadchouel J, Meilhac S, Montarras D, Rocancourt, D and Relaix, F. 2003. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. *Journal of Anatomy*. 202:59-68.

Burgess-Beusse B, Farrell C, Gaszner M, Litt M, Mutskov V, Recillas-Targa F, Simpson M, West A and Felsenfeld G. 2002. The insulation of genes from external enhancers and silencing chromatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 4:16433-7.

Cariou B, van Harmelen K, Duran-Sandoval D, van Dijk TH, Grefhorst A, Abdelkarim M, Caron S, Torpier G, Fruchart J, Gonzalez F J, Kuipers F and Staels, B. 2006. The Farnesoid X Receptor Modulates Adiposity and Peripheral Insulin Sensitivity in Mice. *The Journal of Biological Chemistry*. 281: 11039-11049.

Chang CP, Jacobs Y, Nakamura T, Jenkins NA, Copeland NG and Cleary ML. 1997. Meis proteins are major in vivo DNA binding partners for wild-type but not chimeric Pbx proteins. *Molecular and Cellular Biology*.17(10):5679-87.

Chen AE, Ginty DD and Fan C. 2005. Protein kinase A signaling via CREB control myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*. 433: 317-322.

Christ B and Ordahl CP. 1995. Early stages of chick somite development. *Anatomy and Embryology*. 191:381-396.

Cinnamon Y, Kahane N and Kalcheim C. 1999. Characterization of the early development of specific hypaxial muscles from the ventrolateral myotome. *Development*. 126:4305-4315.

Clop A, Marcq F, Takeda H, Pirottin D, Tordoir X, Bibe B, Bouix J, Caiment F, Elsen J-M, Eychenne F, Larzul C, Laville E, Meish F, Milenkovic D, Tobin J, Charlier C and Georges

M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*. 38: 813-818.

Coy SE and Borycki A. 2010. Expression Analysis of TALE Family Transcription Factors During Avian Development. *Developmental Dynamics*. 239: 1234–1245.

Davidson EH. *The regulatory genome – Gene regulatory networks in development and evolution*. Academic Press. Elsevier. 2006.

Denetclaw WF, Christ B and Ordahl CP. 1997. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development*. 124:1601-1610.

Elgar G and Vavouri T. 2008. Tuning in to the signals: noncoding sequence conservation in vertebrate genomes. *Trends in Genetics*. 2008 24(7):344-52.

Forman BM, Goode E, Chen J, Oro AE, Bradley DJ, Perlmann T, Noonan DJ, Burka LT, McMorris T, Lamph WW, Evans RM and Weinberger C. 1995. Identification of a nuclear receptor that is activated by farnesol metabolites. *Cell*. 81: 687-693.

Francis-West PH, Antoni L, Anakwe and K. 2003. Regulation of myogenic differentiation in the developing limb bud. *Journal of Anatomy*. 202: 69-81.

Fuchtbauer EM. 2002. Inhibition of skeletal muscle development: less differentiation gives more muscle. in: Brand-Saberi B. (Ed.) *Results and Problems in Cell Differentiation*. 38: 143-161.

Gilbert, SF. 2000. *Developmental Biology* 6<sup>th</sup> edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates.

Giono LE, Varone CL and Cánepa ET. 2001. 5-Aminolaevulinate synthase gene promoter contains two cAMP-response element (CRE)-like sites that confer positive and negative responsiveness to CRE-binding protein (CREB). *Biochemical Journal*. 353: 307-316.

Grade CVC, Salerno MS, Schubert FR, Dietrich S and Alvares LE. 2009 An evolutionarily conserved Myostatin proximal promoter/enhancer confers basal levels of transcription and spatial specificity in vivo. *Development Genes and Evolution*. 219: 497-508.

Hamburger V and Hamilton HL. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*. 88: 49-92.

Hasty P, Bradley A, Morris JH, Edmondson DG, Venuti JM, Olson EN and Klein WH. 1993. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the Myogenin gene. *Nature*. 364: 501-506.

Heintzman ND and Ren B. 2007. The gateway to transcription: identifying, characterizing and understanding promoters in the eukaryotic genome. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 64(4):386-400.

Jespersen J, Kjaer M and Schjerling P. 2006. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scandinavian Journal of Medicine & Science in Sports*. 16: 74-82.

Joulia D, Bernardi H, Garandel V, Rabenoelina F, Vernus B and Cabello G. 2003. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*. 286: 263-275.

Joulia-Ekaza D and Cabello G. 2007. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current Opinion in Pharmacology*. 7: 1-6.



Kahane N, Cinnamon Y and Kalcheim C. 1998. The origin and fate of pioneer myotomal cells in the avian embryo. *Mechanisms of Development*. 74:59-73.

Konigsberg IR. 1986. The embryonic origin of muscle. *Myology*. 1:39-71.

Lamph WW, Dwarki VJ, Ofir R, Montminy M and Verma IM. 1990. Negative and positive regulation by transcription factor cAMP response element-binding protein is modulated by phosphorylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87: 4320-4324.

Lee S-J. 2004. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 20:61-86.

Lee S-J and McPherron AC. 2001. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 98:9306-9311.

Ludolph DC and Konieczny SF. 1995. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *Federation of American Societies for Experimental Biology*. 9:1595-1604.

Maeda RK and Karch F. 2011. Gene expression in time and space: additive vs hierarchical organization of cis-regulatory regions. *Current Opinion in Genetics & Development*. 21:187–193.

Mantovani R. 1999. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y. *Gene*. 239: 15–27.

Mcfarlane C, Langley B, Thomas M, Hennebry A, Plummer E, Nicholas G, McMahon C, Sharma M and Kambadur R. 2005. Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. *Developmental Biology*. 283: 58-69.

McPherron AC, Lawler AM and Lee S-J. 1997. Regulation of skeletal muscle mass by a new TGF- $\beta$  superfamily member. *Nature*. 387: 83-90.

McPherron AC and Lee SJ. 1997. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94(23):12457-61.

Megeney LA, Kablar B, Garrett K, Anderson JE and Rudnicki MA. 1996. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. *Genes Dev*. 10:1173-83.

Mercader N, Leonardo E, Azpiazu N, Serrano A, Morata G, Martínez AC and Torres M. 1999. Conserved regulation of proximodistal limb axis development by Meis1/Hth. *Nature*. 402: 425-429.

Mosher DS, Quignon P, Bustamante CD, Sutter NB, Mellersh CS, Parker HG and Ostrander EA. 2007. A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs. *PLoS Genetics*. 3: 0779-0786.

National Institutes of Health. Geisha: gallus expression in situ hybridization analysis. Disponível em: <http://geisha.arizona.edu/geisha/>. Acesso em: 22 abr. 2013.

Ofir R, Dwarki VJ, Rashid D and Verma IM. 1991. CREB represses transcription of fos promoter: role of phosphorylation. *Gene Expression*. 1(1): 55-60.

Ordahl CP and Le Douarin NM. 1992. Two myogenic lineages within developing somite. *Development*. 114:339-353.

Osawa H, Robey RB, Printz RL and Granner DK. 1996. Identification and Characterization of Basal and Cyclic AMP Response Elements in the Promoter of the Rat Hexokinase II Gene. *The Journal of Biological Chemistry*. 271: 17296–17303.

Otten J, Bokemeyer C and Fiedler W. 2010. Tgf-Beta superfamily receptors-targets for antiangiogenic therapy? *Journal of Oncology*. 2010: 317068.

Pourquié O. 2005. Signal transduction: a new canon. *Nature*. 433: 208-209.

Qin RF, Mao TQ, Gu XM, Hu KJ, Liu YP, Chen, JW and Nie X. 2007. Regulation of skeletal muscle differentiation in fibroblasts by exogenous MyoD gene in vitro and in vivo. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 302: 233-9.

Ríos R, Carneiro I, Arce VM and Devesa J. 2001. Myostatin Regulates Cell Survival during C2C12 Myogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 280: 561–566.

Rudnicki MA, Braun T, Hinuma S and Jaenisch R. 1992. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic HLH gene Myf-5 and results in apparently normal development. *Cell*. 71: 383-390.

Saleh M, Rambaldi I, Yang X and Featherstone MS. 2000. Cell Signaling Switches HOX-PBX Complexes from Repressors to Activators of Transcription Mediated by Histone Deacetylases and Histone Acetyltransferases. *Molecular and Cellular Biology*. 20: 8623-8633.

Salerno MS, Thomas M, Forbes D, Watson T, Kambadur R and Sharma M. 2004. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*. 287: 1031-1040.

Schuelke M, Wagner KR, Stolz LE, Hübner C, Riebel T, Kömen W, Braun T, Tobin JF and Lee SJ. 2004. Myostatin Mutation Associated with Gross Muscle Hypertrophy in a Child. *The New England Journal of Medicine*. 350: 2682-8.

Sinal CJ, Tohkin M, Miyata M, Ward JM, Lambert G and Gonzalez FJ. 2000. Targeted disruption of the nuclear receptor FXR/BAR impairs bile acid and lipid homeostasis. *Cell*. 102: 731-744.

Spiller MP, Kambadur R, Jeanplong F, Thomas M, Martyn JK, Bass JJ and Sharma M. 2002. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor myod. *Molecular and Cellular Biology*. 22:7066-7082.

Stockdale FE, Nikovits W and Christ B. 2000. Molecular and cellular biology of avian somite development. *Developmental Dynamics*. 219:304-321.

Sundaresan NR, Saxena VK, Singh R, Jain P, Singh KP, Anish D, Singh N, Saxena M and Ahmed KA. 2007. Expression profile of myostatin mRNA during the embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Research in Veterinary Science*. 85:86-91.

Swatland HJ. 1984. Structure and development of meat animals. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, NJ.

Swatland HJ and Kieffer NM. 1974. Fetal development of the double-muscled condition in cattle. *Journal of Animal Science*. 38:1090-1102.

Takata H, Terada K, Oka H, Sunada Y, Moriguchi T and Nohno T. 2007. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Developmental Dynamics*. 236: 2800-2807.

Tang L, Yan Z, Wan Y, Han W and Zhang Y. 2007. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle & Nerve*. 36: 342-348.

Tobin JF and Celeste AJ. 2005. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Current Opinion in Pharmacology*. 5:328-332.

Vallejo M, Gosse ME, Beckman W and Habener JF. 1995. Impaired Cyclic AMP-Dependent Phosphorylation Renders CREB a Repressor of C/EBP-Induced Transcription of the Somatostatin Gene in an Insulinoma Cell Line. *Molecular and Cellular Biology*. 15: 415-424.

Wang Z, Wei G-H, Liu D-P and Liang C-C. 2007. Unravelling the world of cis-regulatory elements. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 45:709–718.

Wasserman WW and Sandelin A. 2004. Applied bioinformatics for the identification of regulatory elements. *Nature Reviews Genetics*. 5: 276-87.

Wilt FH and Hake SC. 2004. *Principles of developmental biology*. W. W. Norton & Company, Inc., New York.

Yusuf F and Brand-Saberi B. 2012. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochemistry and Cell Biology*. 138: 187-99.

Zhang X, Odom DT, Koo S, Conkright MD, Canettieri G, Best J, Chen H, Jenner R, Herbolsheimer E, Jacobsen E, Kadam S, Ecker JR, Emerson B, Hogenesch JB, Unterman T, Young RA and Montminy M. 2005. Genome-wide analysis of cAMP-response element binding protein occupancy, phosphorylation, and target gene activation in human tissues. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 102: 4459–4464.

Zhu X, Topouzis S, Liang L and Stotish R. 2004. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*. 26: 262-272.



# *Anexos*

## 8. ANEXOS

**Anexo 1.** Dados obtidos nos experimentos de transfecção e utilizados para as análises estatísticas, em Unidades Relativas de Luz (*Relative Light Units – RLU*). Os valores marcados em vermelho foram excluídos das análises por teste *t* de Student por apresentarem menos de 5% de probabilidade de pertencerem à população, de acordo com a distribuição normal de Gauss.



Dados obtidos pelos experimentos de transfecção das construções em proliferação								
	pPMMΔ1	pPMMΔ2	pPMMΔ3	pPMMΔ4	pPMMΔ5	pPMMΔ6	pPMMΔ7	pPMMΔ8
	1,475618	-2,24852	1,318905	-1,19085	-4,24894	4,536033	-6,61269	1,660284
	1,1246	-1,51127	1,6400	-1,1507	-2,7453	2,5833	-4,5939	1,4149
	1,3022	-4,4294	1,1113	-1,5458	-2,8658	2,9675	-5,5523	-1,1943
	2,4386	-4,85616	1,4286	-1,10384	-2,88523	3,563995	-6,01756	1,401851
	1,2202	-1,60032	1,7725	2,431759	-2,57876	1,215167	-11,1184	1,689486
	1,2970	-4,04689	1,1066	1,6586	-4,3096	1,7141	-14,7657	2,0023
	1,9770	-1,9454	1,2124	1,9287	-5,8345	2,3085	-9,3628	1,2064
	1,3915	-3,60825	1,1244	1,2840	-7,3376	2,1784	-8,3102	1,3701
		-2,93764		4,3914				
		-2,53183		2,0928				
		-5,60117		-1,4539				
		-5,53911		2,2365				
		-2,53244						
		-2,70392						
		-10,0329						
		-7,24442						
		-5,25887						
		-6,01818						
		-1,55044						
		-1,82927						
		-7,2026						
		-8,95974						
		-2,07332						
		-2,13892						
		-3,61371						
		-3,91349						
<b>Média</b>	1,5283	-4,07416	1,3393	0,7982	-4,1007	2,6334	-8,2917	1,1939
<b>Desvio</b>	0,449453	2,346928	0,25491	1,989002	1,719845	1,053517	3,38525	0,995956

<b>Dados obtidos pelos experimentos de transfecção das construções em proliferação (continuação)</b>				
	<b>pPMMΔ9</b>	<b>pPMMΔ10</b>	<b>pPMMΔ11</b>	<b>ACREB</b>
	-2,88662	-1,75723	-3,97446	-1,46646
	-2,9699	-2,02156	-4,20664	-1,57171
	-3,4028	-2,48591	-4,38219	1,234538
	-3,62627	-2,60118	-4,09153	1,367918
	-1,53542	-1,2906	-1,8290	-1,0005
	-1,5968	-1,27644	-1,80634	1,067037
	-1,7531	-2,1997	-2,7869	-1,04937
	-1,7703	-1,94866	-3,09531	-1,26784
				2,405074
				2,343527
				3,000872
				3,067422
				3,03634
				3,615792
				2,70245
				2,465558
<b>Média</b>	-2,4427	-1,9477	-3,2715	1,2469
<b>Desvio</b>	0,86718	0,493438	1,053435	1,885979

<b>Dados obtidos pelos experimentos de transfecção da construção com o promotor intacto em diferenciação</b>					
	<b>Dia 1</b>	<b>Dia 2</b>	<b>Dia 3</b>	<b>Dia 4</b>	<b>Dia 5</b>
	1,046446	1,7054	4,5862	1,2062	1,5957
	-1,0741	1,5261	5,6633	1,6773	1,1907
	1,207038	-1,8845	-1,3673	-1,7394	1,1026
	-1,04292	-1,83717	-1,5439	-1,31073	-1,40125
	-1,3762	1,451363	1,131437	6,787359	1,629714
	1,020286	1,189642	1,301119	6,804925	2,795845
	2,104175	1,164408	1,207507	-1,21674	2,300484
	1,870653	1,165762	1,669869	1,436278	1,478812
	-1,84138	-1,79649	1,085613	6,162658	1,605068
	-1,91675	-2,36249	1,251831	3,528762	1,926386
	-1,0164	1,443782	11,1447	3,430091	6,027146
	-1,15362	1,663051	7,814906	3,007092	2,569537
	-1,2447	2,040521	2,175258	2,031552	1,646903
	-1,26106	3,281942	3,236949	1,763276	2,510801
<b>Média</b>	-0,33418	0,625087	2,811247	2,397756	1,927038
<b>Desvio</b>	1,432044	1,787216	3,477035	2,813652	1,552648

<b>Dados obtidos pelos experimentos de transfecção das construções em diferenciação</b>				
	<b>pPMMΔ1</b>	<b>pPMMΔ2</b>	<b>pPMMΔ3</b>	<b>pPMMΔ4</b>
	-1,35488	-4,18918	-1,90048	-1,10721
	-1,51383	-4,80674	-1,80171	-1,10641
	3,654133	1,136028	2,840227	2,362206
	3,218841	1,106799	3,071019	3,140818
	1,24964	-3,34851	-1,44681	-1,8064
	1,352467	-2,92449	1,097995	-1,04487
	-1,66514	-2,04578	2,263515	1,527548
	1,168238	-2,09812	1,683088	2,157514
	1,523035	-3,17219	1,042247	-1,16678
	-1,09458	-1,76104	2,442559	-1,09538
	1,395213	-2,14646	1,37891	1,216732
	1,26324	-1,87527	2,518057	1,21966
	-1,53483	-3,23312	-1,57045	-1,26703
	-1,21279	-3,26292	-1,62315	-1,30357
	14,70494	-2,60013	1,62146	6,587105
	2,227578	1,41041	1,236548	-1,32148
	-1,81633	-3,37825	-1,01225	-2,0026
	-1,45479	-2,60059	-1,98443	-2,62812
	6,335271	-1,60394	-1,07262	1,285081
	1,749421	-1,55731	1,388844	-1,0177
<b>Média</b>	1,409743	-2,14754	0,508628	0,131455
<b>Desvio</b>	3,813532	1,679514	1,821403	2,253268