



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA

CARLA VERMEULEN CARVALHO GRADE

“IDENTIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS
ELEMENTOS CIS-REGULATÓRIOS 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.

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biologia para obtenção do Título de
Mestre em Biologia Celular e Estrutural,
na área de Biologia Celular.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares

Campinas, 2009

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA – UNICAMP**

G754I

Grade, Carla Vermeulen Carvalho

Identificação e caracterização funcional dos elementos *cis*-regulatórios da miostatina / Carla Vermeulen Carvalho Grade. – Campinas, SP: [s.n.], 2009.

Orientadora: Lúcia Elvira Alvares.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

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

(rcdt/ib)

Título em Inglês: Identification and functional characterization of the *cis*-regulatory elements of myostatin.

Palavras-chave em inglês: Myostatin; *Cis*-regulatory; Promoter regions (Genetics).

Área de concentração: Histologia.

Titulação: Mestre em Biologia Celular e Estrutural.

Banca examinadora: Lúcia Elvira Alvares, Luiz Lehmann Coutinho, Maéli Dal Pai Silva.

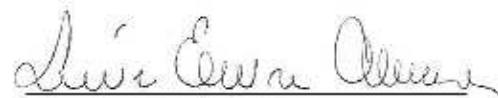
Data da defesa: 13/03/2009.

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural.

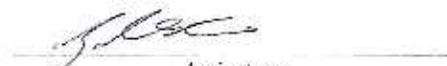
Campinas, 13 de março de 2009

BANCA EXAMINADORA

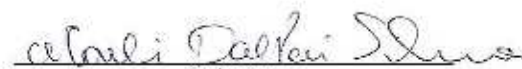
Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares (Orientadora)


Assinatura

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho


Assinatura

Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva


Assinatura

Profa. Dra. Érika Cristina Jorge

Assinatura

Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini

Assinatura

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, devo agradecer à Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade. Em seguida, agradeço à FAPESP, CNPq e FAEPEX pelo apoio financeiro, sem o qual esse trabalho não poderia ter sido realizado.

Agradeço aos professores, funcionários, técnicos e alunos do Departamento de Histologia e Embriologia, que nos acolheram e deixaram que usássemos sua estrutura para a realização deste e outros trabalhos. Obrigada por sempre estarem disponíveis para nos ajudar a qualquer momento.

À minha orientadora e amiga Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares, por acreditar em meu potencial e me permitir continuar a caminhada acadêmica ao seu lado.

À amiga e companheira de bancada Débora Rodrigues Sobreira, pela ajuda profissional e pelas horas de conversa sem fim, que tornaram a jornada mais fácil e agradável.

À Profa. Dra. Vera Nisaka Solferini e todos os alunos e funcionários do Laboratório de Diversidade Genética do IB/UNICAMP (em especial Helen e Célia), pela eterna disposição em nos ajudar. Esse trabalho não teria sido realizado sem sua ajuda.

Ao Prof. Dr. Gonçalo A. Guimarães Pereira e todos os alunos e funcionários do Laboratório de Genômica e Expressão do IB/UNICAMP (em especial Johana e Bruno) pela ajuda.

Ao Prof. Dr. Marcelo Menossi e todos os alunos e funcionários do Laboratório de Genoma Funcional do IB/UNICAMP (em especial Lúcia e Kevin) pelo carinho e ajuda.

Ao Dr. José Xavier-Neto e seus alunos do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do InCor (especialmente Hozana e Ana Paula) pela ajuda indispensável à realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Chao Yun Irene Yan do Laboratório de Embriologia Molecular de Vertebrados do ICB/USP pela boa vontade em nos ceder equipamentos indispensáveis para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Kleber Gomes Franchini e aos alunos e funcionários do Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular da FCM/UNICAMP (em especial Ana Paula, Carla e Carol Guido) pelo sorriso no rosto e eterna boa vontade em ajudar.

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho e à Dra. Érika Jorge do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP, pela ajuda no início desta caminhada e ao final dela.

À Profa. Dra. Maeli Dal Pai Silva do Laboratório de Biologia do Músculo Estriado da UNESP/Botucatu, por estar disponível para participar da banca examinadora deste trabalho e por estender a mão para a jornada que se inicia agora.

As secretárias Rita (DHE) e Liliam (DBC) pela disponibilidade em “quebrar galhos”. Ao técnico do LCI, Juvani, não apenas pela eterna boa vontade em subir a escada para buscar tubos no armário, mas também pelo bom humor e alegria contagiante.

A todos os meus amigos, em especial aos que estiveram mais perto durante a execução deste trabalho. Maria Amália, pelas muitas risadas que me fortaleceram para conseguir estar sempre bem disposta a trabalhar e Karina, por estar sempre disposta a ajudar em qualquer momento. A aqueles que, mesmo estando longe, foram indispensáveis para minha saúde emocional, e são tantos que nem me atrevo a listar para não correr o risco de esquecer alguém.

A todos os meus familiares, simplesmente por serem minha família amada.

Ao meu namorado, pela paciência.

Por fim, e mais importante, aos meus pais, por todo o apoio moral, ético, familiar e financeiro. A eles, devo tudo o que sou.

RESUMO

A proteína Miostatina (também conhecida como GDF8) é um membro da superfamília de crescimento e diferenciação β (TGF- β) e é expressa quase que exclusivamente em musculatura esquelética, tanto no embrião em desenvolvimento quanto no indivíduo adulto, onde circula livre pela corrente sanguínea. A Miostatina foi inicialmente identificada em 1997 por MCPHERRON *et al.* e, desde então, muitos estudos têm demonstrado seu papel essencial na regulação do desenvolvimento de musculatura esquelética de aves e mamíferos. O nocaute gênico da Miostatina causa hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares, resultando em músculos individuais até duas vezes maiores do que em animais selvagens. Isso demonstra que a Miostatina é um regulador negativo da deposição de musculatura esquelética. A estrutura e a função desta proteína são conservadas em diversas espécies, incluindo humanos, onde os níveis de Miostatina circulante no sangue se encontram aumentados durante condições de distrofia e na caquexia que acompanha alguns tipos de câncer e a AIDS. Um melhor entendimento dos mecanismos que regem a expressão da Miostatina é essencial para o desenvolvimento de estratégias que possam regular sua atividade durante tais condições. No presente trabalho, nós identificamos, com o uso de ferramentas de Bioinformática, elementos *cis*-regulatórios putativos (promotor e *enhancers*) que possivelmente regulam a transcrição do gene da Miostatina. Inicialmente foi realizada uma comparação dos *loci* do GDF8, incluindo as regiões intergênicas adjacentes, provenientes dos genomas de Humano, Camundongo e Galinha. Essa análise revelou a presença de diferentes regiões evolutivamente conservadas (RECs) adjacentes à sequência codificadora desta proteína, sete *downstream* e uma *upstream* ao gene. Por terem sido mantidas relativamente conservadas ao longo da evolução, essas regiões supostamente possuem um papel funcional, possivelmente como elementos *cis*-regulatórios do gene da Miostatina. Em

seguida, com o intuito de entender as funções que cada uma dessas regiões possa estar exercendo sobre a regulação da atividade transcricional do gene da Miostatina, foi realizada uma busca por sítios de ligação para fatores transcricionais que tenham sido conservados evolutivamente nessas RECs. Muitos sítios conservados foram observados nas sete RECs *downstream* ao gene da Miostatina, entre eles estão sítios para fatores relacionados ao desenvolvimento de musculatura esquelética (*MyoD*, *Myogenin*, *E47*, *EN1*), membros (*Pax3*, *Tbx5*) e coração (*Nkx2.5*, *Pitx2*). Juntos, esses dados sugerem uma regulação modular do gene da Miostatina durante a embriogênese dos vertebrados. A única REC localizada *upstream* ao GDF8 representa o promotor mínimo putativo deste gene. Essa hipótese é reforçada pela presença de um sítio de ligação conservado para a Proteína de Ligação ao sítio TATA. Com o intuito de validar as hipóteses formuladas com base nas análises de Bioinformática, no presente trabalho buscamos caracterizar funcionalmente o promotor mínimo do gene da Miostatina. Para tanto, a região do promotor mínimo foi inicialmente clonada em um vetor que não contém promotor e possui como gene repórter o GFP. Essa construção de expressão foi então testada através de experimentos de eletroporação em embriões de galinha *in ovo*. A análise dos embriões eletroporados revelou que a região de DNA elegida para as análises funcionais é capaz de dirigir a transcrição do gene repórter, indicando que ela corresponde ao promotor mínimo do gene da Miostatina. Além do sítio TATA, há, na região do promotor, diversos sítios conservados para a ligação de proteínas envolvidas na via de sinalização mediada por cAMP (CREB, ATF, NFY). Esse achado está de acordo com estudos recentes que demonstram o envolvimento do cAMP na regulação dos fatores miogênicos *Myf5* e *MyoD*, bem como de *Pax3*, sugerindo que a atividade do gene da Miostatina também possa estar sendo regulada por essa via de sinalização. Outras regiões do genoma humano que possuem arquitetura semelhante à observada no promotor da Miostatina foram identificadas, demonstrando que outros genes podem estar sob influência da mesma via

de sinalização que regula a atividade do promotor da Miostatina, dentre eles genes envolvidos na miogênese e neurogênese.

Palavras chave: Miostatina, elementos *cis*-regulatórios, promotor.

ABSTRACT

The Myostatin protein (also known as GDF8) is a member of the transforming growth factor- β (TGF- β) superfamily and is expressed almost exclusively in skeletal muscle, both in the embryo and in the adult, where the protein circulates in the blood flow. It was initially identified in 1997 by MCPHERRON *et al.*, and since then many studies have been demonstrating its essential role in the regulation of the development of skeletal muscle from birds and mammals. The knockout of the *Myostatin* gene causes both hyperplasia and hypertrophy of the skeletal muscle fibers, resulting in muscles twice as big as the wildtype ones, thus showing that Myostatin is a negative regulator of skeletal muscle deposition. The GDF8 structure and function is conserved in many species, including humans where the Myostatin levels are increased during dystrophy conditions and in the cachexia that accompanies some types of cancer and AIDS. A better understanding of the mechanisms that rule the Myostatin expression is essential for the development of strategies that might regulate its activity during such conditions. In this research, we have identified, with the use of bioinformatic tools, the cis-regulatory elements (promoter and enhancers) that regulate the *Myostatin* gene transcription. We compared the GDF8 *loci* from human, chicken and mouse and found different evolutionary conserved regions (ECRs), adjacent to the GDF8 coding sequence. Because these intergenic sequences remained relatively conserved throughout evolution, they supposedly have a functional role, possibly as cis-regulatory elements for the *Myostatin* gene. Our analyses revealed the presence of seven possible enhancers downstream of the *GDF8* gene and one conserved region upstream of it. In order to understand the role these regions might have in the regulation of Myostatin's transcription activity, we searched for binding sites that were also evolutionary conserved. Many conserved binding sites were observed in the RECs downstream to the *Myostatin* gene, and among them are sites for

factors related to the development of the skeletal muscle (*MyoD*, *Myogenin*, *E47*, *EN1*), limbs (*Pax3*, *Tbx5*) and heart (*Nkx2.5*, *AREB6*, *Pitx2*). Together, these data suggest a modular regulation of the *Myostatin* gene during vertebrates' embryogenesis. The only REC observed upstream of the *Myostatin* locus represents the putative basal gene promoter. This hypothesis is strengthened by the presence of a binding site for the Tata Binding Protein conserved for the studied species. In this research, we aimed at functionally characterizing the *Myostatin* gene basal promoter. For that purpose, we cloned the studied region in a promoterless vector, which contains GFP as a reporter gene. This expression construct was then tested through *in ovo* electroporation assays. The analysis of the electroporated embryos revealed that the cloned DNA region is capable of driving the transcription of the reporter gene, which indicates that it truly corresponds to the basal promoter of the *Myostatin* gene. Moreover, there are conserved binding sites for the CREB and ATF1 transcription factors in the basal promoter, which are activated by the cAMP signaling path. This finding is in agreement with recent studies that demonstrate the involvement of cAMP in the regulation of the myogenic factors *Myf5* and *MyoD*, as well as *Pax3*, thus suggesting that the activity of the *Myostatin* gene might be under the influence of this signaling path. Other regions of the human genome that have a similar architecture to the one observed in the *Myostatin* promoter were identified. This demonstrates that other genes are possibly under the influence of the same signaling path regulating the activity of the *Myostatin* promoter, among them genes involved in myogenesis and neurogenesis.

Key words: *Myostatin*, cis-regulatory elements, promoter.

ÍNDICE

Agradecimentos	iv
Resumo	vi
Abstract	ix
1) INTRODUÇÃO	01
1.1. Miostatina	02
1.2. Padrão de Expressão	05
1.3. Fatores Envolvidos na Regulação da Miostatina	07
1.4. Estudo do promotor e outros elementos regulatórios da Miostatina	10
2) OBJETIVOS	16
2.1. Geral	17
2.2. Específicos	17
3) MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Análise de Bioinformática	19
3.1.1. Análise das Regiões Evolutivamente Conservadas	19
3.1.2. Análise dos Sítios de Ligação para Fatores Transcricionais Evolutivamente Conservados	19
3.1.3. Análise de Genes com Regiões Reguladoras com Estrutura Semelhante à Miostatina	20
3.2. Clonagem do Promotor Mínimo do Gene da Miostatina no Vetor pTKeGFP	20
3.2.1 Amplificação do promotor mínimo	20
3.2.2 Purificação do produto da PCR	22

3.2.3	Preparação do produto da PCR para clonagem	23
3.2.4	Preparação do vetor para clonagem	23
3.2.5	Reação de ligação e transformação	25
3.2.6	Mini-preparações de DNA e <i>screening</i> dos clones	26
3.2.7	Maxi-preparações de DNA	28
3.3.	Ensaio de Eletroporação	28
4)	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
4.1.	Análise das Regiões Evolutivamente Conservadas	32
4.2.	Análise dos Sítios de Ligação para Fatores Transcricionais Evolutivamente Conservados	34
4.3.	Análise do Promotor Putativo da Miostatina	44
4.4.	Ensaio Funcional com a Construção de Expressão Contendo o Promotor Mínimo da Miostatina	45
4.5.	Influência da via de Sinalização mediada por cAMP no promotor da Miostatina	48
4.6.	Análise de Genes com Regiões Reguladoras com Estrutura Semelhante à Miostatina	50
5)	CONCLUSÕES	64
6)	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
7)	ANEXOS	77

1) INTRODUÇÃO

1) INTRODUÇÃO

1.1. Miostatina

A proteína Miostatina (também conhecida como GDF-8) é um membro da superfamília TGF- β de fatores de crescimento e transformação, expressa quase que exclusivamente na musculatura esquelética dos amniotos (DU *et al.* 2007).

Ela foi inicialmente identificada por MCPHERRON *et al.* (1997) e, desde então, estudos buscando caracterizar sua função vêm demonstrando seu papel essencial na regulação do desenvolvimento da musculatura esquelética de aves e mamíferos. Ao realizar o nocaute do gene da Miostatina, MCPHERRON *et al.* (1997) observaram um aumento na massa muscular esquelética dos camundongos mutantes, resultado de hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares, com músculos individuais até duas vezes maiores que dos animais selvagens. Portanto, a Miostatina é um regulador negativo da deposição de musculatura esquelética. Outra técnica de silenciamento genético, utilizando iRNA, revelou que a ausência da Miostatina gera um atraso na fusão celular dos miotubos multinucleados, além de mudanças na morfologia das células, com aparecimento de agregados nucleares em vários miotubos. Essas células são curtas e largas, o comprimento dos miotubos é encurtado significativamente (60% do controle) e a largura está aumentada (140% do controle) (SATO *et al.* 2006).

A superexpressão da Miostatina diminui a proliferação dos mioblastos, gerando acúmulo de células C2C12 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 do fator miogênico MyoD, a Miostatina inibe fortemente a diferenciação terminal, um evento crucial para a formação das células 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).

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) (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007). Como outros membros da família TGF- β , 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 o receptor de activina do tipo II (Act RIIA e Act RIIB) (LEE 2004). Após o processamento proteolítico, o pró-peptídeo e o dímero C-terminal, unido por pontes dissulfeto, permanecem ligados não-covalentemente em um complexo latente, que pode estar associado a outras proteínas também (LEE & MCPHERRON 2001).

Após sua liberação, o dímero liga-se então aos receptores de activina do tipo II (Act RIIA e Act RIIB), ativando uma cascata de sinalização interna, mediada pelas proteínas SMADs (LEE & MCPHERRON 2001). A transcrição induzida por Miostatina necessita da participação das SMADs regulatórias SMAD2 e SMAD3 e da co-SMAD4. A SMAD7 inibitória reduz a transcrição induzida por Miostatina (ZHU *et al.* 2004).

O gene da Miostatina é altamente conservado entre as espécies. A região codificadora da porção C-terminal é idêntica em humano, rato, murino, porco, peru e galinha. A função deste gene parece ser igualmente conservada, uma vez que mutações

têm sido identificadas como sendo a razão para a existência de fenótipos de musculatura dupla em raças de gado (Belgian Blue e Piedmontese) (MCPHERRON & LEE 1997), cachorros (MOSHER *et al.* 2007) e ovelhas (CLOP *et al.* 2006).

A divulgação do primeiro caso de mutação da Miostatina em uma criança humana demonstra que a sua função parece ser conservada até em humanos. Ao nascer, essa criança aparentava ser extremamente musculosa e análises genéticas revelaram a presença de uma mutação de ponto no seu gene da Miostatina. A mutação de ponto resultou em um RNAm com *splicing* errôneo e níveis indetectáveis da proteína da Miostatina no sangue. Com quatro anos de idade, a criança continua saudável, tem massa muscular aumentada e é extremamente forte. Esses resultados sugerem fortemente que a Miostatina exerce um papel similar na regulação da massa muscular esquelética em humanos, como o faz em outras espécies (TOBIN & CELESTE 2005).

A expressão da Miostatina aumenta 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 as distrofias de Duchenne e Becker (JOULIA-EKAZA & 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), podendo levar à morte (JESPERSEN *et al.* 2006). Um melhor entendimento dos mecanismos moleculares que governam o papel da Miostatina durante períodos de perda de massa muscular pode fornecer base para intervenções terapêuticas melhores para pacientes com massa e função muscular danificadas (ALLEN & UNTERMAN 2007).

Assim, a criação de agentes farmacológicos capazes de bloquear a atividade da Miostatina pode possibilitar a promoção de crescimento da musculatura esquelética perante doenças humanas, e em animais de criação (LEE & MCPHERRON 2001).

Entretanto, estudos recentes apontam que a massa muscular aumentada observada em camundongos nulos para Miostatina não é acompanhada de aumento proporcional na geração de força. Há uma diminuição no número de mitocôndrias por volume de citoplasma e um aumento do número de fibras do tipo II, de contração rápida, à custa das fibras do tipo I, de contração lenta. Portanto, ainda é necessário mais estudo para avaliar com clareza os efeitos da Miostatina sobre o desenvolvimento da musculatura esquelética (AMTHOR *et al.* 2007).

1.2. Padrão de Expressão

A expressão da Miostatina em embriões de galinha inicia-se relativamente tarde em relação ao desenvolvimento do somito, após a diferenciação de esclerótomo, dermomiótomo e miótomo. É observada forte expressão na porção intermediária do dermomiótomo, do miótomo e em futuras células dermais. Em nenhum momento é observada expressão nos lábios dorsomedial e ventrolateral do dermomiótomo (AMTHOR *et al.* 2002).

A Miostatina começa a ser detectada a partir do estágio HH15 (HAMBURGER & HAMILTON 1951), com transcritos na porção ventrolateral dos quatro ou cinco somitos mais rostrais; além disso, pouca expressão é detectada nos somitos I-II e no botão caudal. Esta última não está mais presente já no estágio HH17, e a expressão da Miostatina é, então, observada na porção ventrolateral de todos os somitos occipitais e cervicais, incluindo a região formadora da musculatura da língua. A expressão da Miostatina é observada ao nível dos membros no estágio HH19 e, no HH20, está presente em todos os somitos, exceto os mais caudais. Nesse momento, a expressão é observada

no centro do dermomiótomo e no lado ventral dos somitos, correspondendo a células situadas próximas ao botão hipaxial do dermomiótomo, mesoderme intermediária e dobra da endoderme da cavidade celômica. A expressão da Miostatina no dermomiótomo se estende até a ectoderme no estágio HH22, na região que formará a derme das costas. Há também expressão nas partes rostral e caudal do miótomo, mas não em seu centro. No estágio HH25 a Miostatina é detectada no dermomiótomo e na parte hipaxial do miótomo. Em estágios mais tardios, a expressão da Miostatina é regulada negativamente no dermomiótomo e em HH30 só é observada na musculatura hipaxial.

Durante o desenvolvimento dos membros, a Miostatina é inicialmente expressa em células miogênicas e adicionalmente em células não-miogênicas do núcleo mesenquimal. A expressão se torna localizada a músculos específicos do membro apenas em estágios mais tardios do desenvolvimento.

No estágio HH21 a Miostatina é primeiramente detectada no domínio próximo-medial dos botões de membros. Esse padrão de expressão se estende distalmente ao longo do desenvolvimento do membro. Em HH22 são observados três domínios de expressão mesenquimais: um mais dorsal, que coincide com o padrão de expressão de MyoD na massa pré-muscular dorsal; um segundo domínio ventral, coincidindo com a expressão de MyoD na massa pré-muscular ventral; o último domínio central corresponde ao núcleo mesenquimal do botão do membro e persiste até o estágio HH28, enquanto os dois primeiros são regulados negativamente a partir de HH22. Em HH30 a expressão diminui na musculatura ventral do membro e a partir de HH31 a expressão da Miostatina passa a ser confinada a músculos individuais, sendo que o nível de expressão varia de acordo com o músculo.

Durante o desenvolvimento da cabeça, a expressão da Miostatina é detectada a partir do estágio HH20 e em HH21 é observada em duas zonas de expressão, uma no primeiro e outra no segundo arco branquial. No estágio HH23 a expressão é mais forte

no segundo arco branquial, estendendo-se até a ectoderme e está confinada a porção central do mesênquima do primeiro arco branquial (AMTHOR *et al.* 2002).

1.3. Fatores Envolvidos na Regulação da Miostatina

Apesar da função da Miostatina ser amplamente conhecida, pouco se sabe sobre os mecanismos que regulam a sua expressão (SALERNO *et al.* 2004).

A Miostatina é secretada na forma latente, associada ao pró-peptídeo e o processamento proteolítico libera a forma ativa. Ambas as formas não-processada e madura formam dímeros e o dímero maduro é a única forma ativa. O pró-peptídeo da Miostatina, quando permanece ligado ao dímero C-terminal inibe a ligação com o receptor (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007).

A Miostatina pode ser encontrada ligada a várias proteínas que modulam sua ativação, secreção ou ligação ao receptor, e essas estratégias têm sido usadas na tentativa de modular a atividade da Miostatina (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007).

A Folistatina regula negativamente a Miostatina, ligando-se ao dímero C-terminal e inibindo sua habilidade de ligar-se aos receptores (LEE & MCPHERRON 2001), assim como a proteína relacionada à Folistatina (FLRG). A proteína GASP1 (*growth and differentiation factor-associated serum protein-1*) inibe a ativação da proteína, assim como hSGT (*human small glutamin-rich tetratricopeptide repeat-containing protein*), que também inibe sua secreção (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007). A proteína Titin-cap também se associa com a forma intracelular da Miostatina (MCFARLANE *et al.* 2005).

Doses de dexametasona promovem a redução no peso total e na massa muscular em ratos de maneira dose-dependente, associada a uma regulação positiva dose-dependente do RNAm e da proteína Miostatina intra-muscular (MA *et al.* 2003). De fato, a região 5' *upstream* ao gene da Miostatina de mamíferos possui sítios para elementos responsivos a glicocorticóides, podendo estar envolvidos na atrofia muscular induzida por

glicocorticóides observada em humanos sob tratamento para desordens inflamatórias (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007).

O fator transcricional FoxO1 ativa o promotor da Miostatina, podendo causar atrofia muscular. FoxO1 muda a expressão de fatores autócrinos em direção a um programa que favorece a atrofia muscular, aumentando a atividade do promotor da Miostatina. Já foi demonstrado em células C2C12 que FoxO1 induz a expressão aumentada da Miostatina e atividade aumentada do promotor-repórter (KAMEI *et al.* 2004). Além disso, a Miostatina é também um alvo *downstream* de SMAD, que, juntamente com FoxO, porém por vias independentes, aumenta a atividade do promotor deste gene, inibindo a proliferação de mioblastos. Um aumento da atividade do promotor é também observado perante tratamento com TGF- β e SMAD (ALLEN & UNTERMAN 2007). Entretanto, outro trabalho mostra que a Miostatina inibe sua própria expressão através da indução de SMAD7. A expressão de SMAD7 é induzida pela Miostatina através das SMAD2, SMAD3 e SMAD4, funcionando como um inibidor do tipo *feedback* negativo, para terminar a sinalização da Miostatina (ZHU *et al.* 2004). Portanto, a expressão da Miostatina depende da razão total de SMADs regulatórias (SMAD2 e SMAD3), co-SMADs (SMAD4) e inibitórias (SMAD7) em um dado momento (ALLEN & UNTERMAN 2007).

O fator bFGF ou FGF-2 (*basic fibroblast growth factor*) é importante para a estimulação da regeneração da musculatura esquelética e a aplicação de bFGF exógeno em células C2C12 diminui o mRNA endógeno de Miostatina, indicando que o fator bFGF suprime a expressão da Miostatina (LIU *et al.* 2006).

A expressão da Miostatina no dermomiótomo, mas não no miótomo, depende de sinalização proveniente da ectoderme, uma vez que a remoção da ectoderme do tronco resulta em uma regulação negativa da expressão da Miostatina, permanecendo apenas na parte central do miótomo, mas não no dermomiótomo. A deleção da ectoderme da asa

das superfícies dorsal e ventral em HH22-23 resulta em regulação positiva da Miostatina e as asas são menores, mostrando que a ectoderme inibe a Miostatina em estágios iniciais de desenvolvimento de membro (AMTHOR *et al.* 2002).

A expressão da Miostatina no dermomiótomo é perdida quando são implantados *beads* de *Shh* em embriões de galinha nos estádios HH18-19. Já a expressão da Miostatina no miótomo foi regulada positivamente após um período de reincubação seguindo o tratamento com *Shh*, o que resultou no aumento do domínio do miótomo. A remoção da notocorda e da placa do assoalho do tubo neural, estruturas secretoras de *Shh*, resultou em somitos menores, sem distinção entre dermomiótomo, esclerótomo e miótomo. Entretanto, há forte expressão na parte ventral do somito, onde seria o esclerótomo, o que indica que a notocorda e a placa do assoalho inibem a expressão da Miostatina nessa região. O implante de *beads* embebidas na proteína *Shh* no mesênquima do botão da asa em HH20 resulta em completa ausência de Miostatina e em asas maiores após um período de 20 horas, porém a reincubação por um tempo mais longo (31 horas) resultou no reaparecimento da Miostatina com domínio de expressão aumentado no centro mesenquimal (AMTHOR *et al.* 2002).

A remoção do tubo neural em HH13-14 resulta em somitos menores, mas bem diferenciados em dermomiótomo, miótomo e esclerótomo, e com forte expressão de Miostatina no dermomiótomo, mostrando que poucas células que expressam Miostatina nesta região dependem dessa sinalização (AMTHOR *et al.* 2002).

O processamento proteolítico da Miostatina é feito por uma protease serina cálcio-dependente chamada Furina, que pertence a uma família de enzimas de processamento de mamíferos chamada Pró-proteína Convertases (PCs). O processamento e secreção da Miostatina são reduzidos durante as fases de diferenciação celular e a Miostatina autorregula a extensão do processamento através da regulação da expressão do gene da sua enzima de conversão Furina (MCFARLANE *et al.* 2005).

Através de microarranjo, foram identificados diversos genes responsivos a Miostatina. Dentre eles, os componentes envolvidos na sinalização de Wnt4 eram preferencialmente aumentados após deleção da Miostatina, sugerindo que esta última atue *upstream* de Wnt4, inibindo sua sinalização. Um aumento na expressão da Miostatina ocasiona um aumento na fosforilação de SMAD2, mas quando Wnt4 é adicionado, a quantidade de SMAD2 fosforilada não é alterada, sugerindo que Wnt4 é antagonista da Miostatina na fosforilação de SMAD2/3. Os resultados obtidos pela expressão ectópica de Wnt4 são idênticos aos obtidos por nocaute do gene da Miostatina, onde os animais possuem músculos com maior proporção de fibras rápidas tipo II e uma proporção reduzida de fibras lentas tipo I, quando comparados com animais selvagens. Isso leva à hipótese de que Wnt4 atue contra a Miostatina primariamente em músculos de contração rápida, sugerindo que há uma comunicação entre a via da Miostatina e a via de sinalização promovida por Wnt4 (TAKATA *et al.* 2007).

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 sangüíneo 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).

1.4. Estudo do Promotor e outros Elementos Regulatórios da Miostatina

A seqüência regulatória na região 5' *upstream* ao gene da Miostatina em humano, bovino, porco e murino tem considerável homologia de seqüência e compartilha muitos sítios de ligação para fatores transcrpcionais (SALERNO *et al.* 2004). Alguns E-boxes são

conservados em posição e sequência dentre as diferentes espécies, indicando que a expressão conservada da Miostatina pode ser atribuída à conservação do promotor (Figura 1) (SPILLER *et al.* 2002). Entretanto estudos indicam que a atividade do promotor da Miostatina *in vivo* é espécie-específica; por exemplo, o promotor bovino apresenta atividade mais baixa que o de camundongo (SALERNO *et al.* 2004).

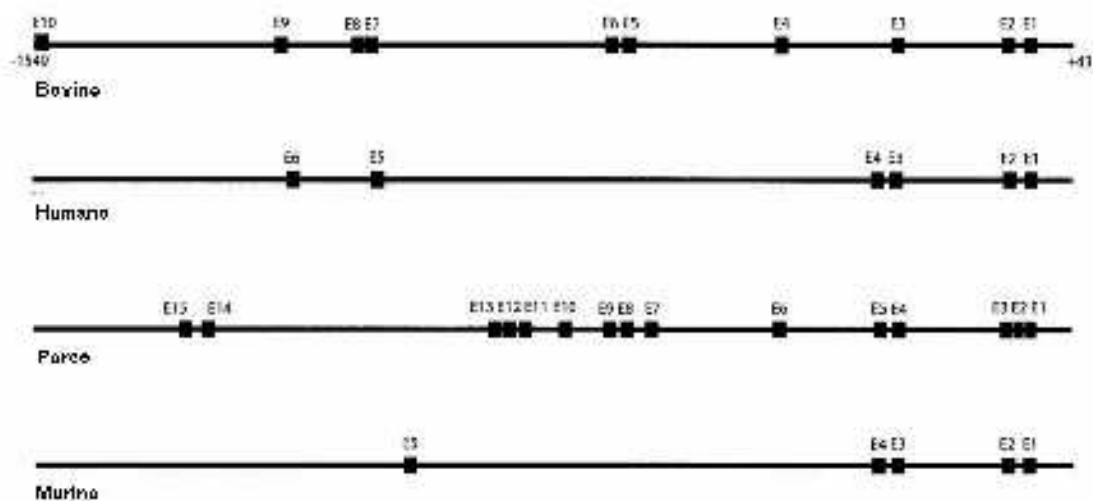


Figura 1 – Comparação do posicionamento dos E-boxes em diferentes mamíferos.

O estudo de 3,3 kb da região 5' *upstream* ao gene da Miostatina humano, revelou a presença de três sítios TATA, um sítio CCAAT parcial, cinco seqüências homólogas ao sítio consenso de ligação das proteínas POU, dois sítios para MEF2, um para PPAR γ , um para NF-kB, um para ARE (elemento responsivo a andrógeno), cinco sítios para GRE (elemento responsivo a glicocorticóide), três para TRE (elemento responsivo a hormônio da tireóide), três para ERG, dois para CRE (elemento responsivo a cAMP) e 12 E-boxes. Os E-boxes são sítios de ligação para os fatores transcricionais da família dos Fatores de Regulação Miogênica (MyoD, Myf5, MRF4 e Miogenina), e sua presença sugere que a Miostatina responda à sinalização desses fatores. Através de experimentos de deleção

destes sítios, foi constatado que os elementos necessários para a transcrição basal da Miostatina e sua atividade responsiva a glicocorticóides estão presentes nos 327 pb mais proximais da região do promotor. Observou-se também que o promotor tem duas regiões capazes de inibir a transcrição da Miostatina (entre 3322 – 2062 e 1447 – 1187) e áreas com possíveis *enhancers* (entre 1187 – 529 e 529 – 327). A presença de dexametasona regula positivamente a quantidade de RNAm e de proteína Miostatina nas células musculares esqueléticas *in vitro*, devido, em parte, a um aumento na sua transcrição. Então, a administração de glicocorticóide pode ser responsável pelo aumento da expressão da Miostatina, diminuindo a quantidade de massa muscular esquelética em humanos (MA *et al.* 2001).

Ao analisar um fragmento de 2,5 kb da região imediatamente *upstream* do gene da Miostatina de camundongo, foram identificados um sítio para MEF2 a 1,3 kb e mais sete sítios E-box arranjados em agrupamentos (*clusters*). O primeiro *cluster* inclui os E-boxes E1 e E2, que possuem seqüência idêntica (CACTTG). O segundo *cluster* contém os E-boxes E3 e E4, ambos com a seqüência CAAATG. O E-box E5 encontra-se sozinho na posição 1005 kb e o último *cluster* inclui os E-boxes E6 e E7. Experimentos com diferentes construções incluindo diferentes números de E-boxes em células C2C12 revelaram que o efeito dos E-boxes sobre a atividade da Miostatina parece se aditivo. Entretanto, os cinco primeiros sítios são suficientes para obtenção da máxima atividade do promotor, sendo E5 crucial e capaz de induzir a máxima atividade do promotor sozinho, *in vivo*. A adição de MyoD ao experimento que testava a atividade da construção-repórter contendo os primeiros cinco E-boxes resultou em um aumento de seis vezes na atividade do promotor da Miostatina, sugerindo que este fator miogênico poderia controlar a transcrição da Miostatina de forma músculo-específica (e fibra-específica) (SALERNO *et al.* 2004). Ambos, Miostatina e MyoD, são preferencialmente expressos em fibras de contração rápida e têm padrões de expressão coincidentes

durante o desenvolvimento (SPILLER *et al.* 2002). A adição de Myf5, por sua vez, aumentou a atividade em duas vezes. O E-box E5 mostrou ser o sítio preferencial de ligação para MyoD e Myf5 (SALERNO *et al.* 2004).

Ao clonar 1,6 kb *upstream* ao gene da Miostatina de bovino, foram localizados os seguintes sítios para ligação de fatores transcricionais: um sítio CAAT, três sítios TATA, um sítio para MEF2, além de dez E-boxes arranjados em agrupamentos (SPILLER *et al.* 2002). As proteínas MEF2 são necessárias para a transcrição de genes músculo-específicos e para a diferenciação dos mioblastos durante a miogênese (DU *et al.* 2007) e a adição de MEF2 aumentou a atividade do promotor da Miostatina de bovinos em três vezes. Os E-boxes E1 e E2, ambos com a seqüência CACTTG formam o primeiro *cluster*, estando localizados próximos aos sítios TATA e ao início de transcrição. O segundo *cluster* compreende os E-boxes E3-E6, que possuem as seqüências CA A/T T/A TG. Os E-boxes E7-E10 formam o terceiro *cluster*. E7 e E9 possuem seqüência igual aos E-boxes do segundo *cluster*, E8 possui a seqüência CAGGTG e E10 CATCTG. Foram ainda localizados sítios para AP1, GATA, GATA1, GATA2 e GATA3. Dentro dos 1,6 kb analisados, estão presentes todos os elementos necessários para dirigir a expressão do gene repórter em células C2C12, sendo essa região, portanto, chamada promotor bovino. A presença dos seis primeiros E-boxes foi suficiente para estimular a atividade do promotor observada quando todos os E-boxes estavam presentes, e E6 tem um papel importante na regulação, sendo o principal sítio de ligação para os MRFs e podendo compensar pela perda dos demais E-boxes (SPILLER *et al.* 2002).

O estudo de um fragmento de 1,515 kb *upstream* do gene da Miostatina de ovelha revelou a presença dos seguintes sítios de ligação: três sítios TATA, um sítio CAAT, oito E-boxes putativos, um sítio de ligação para Octamer 1 (Octamer), para AP1, Gfi-1B, MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), MTBF (*muscle-specific Mt binding factor*), elemento responsivo a glicocorticóide (GRE) e elemento responsivo a progesterona (PRE) (DU *et*

al. 2005). Experimentos com deleções de diferentes E-boxes revelaram que alterações em E3, E4, E5 e E7 tiveram efeitos significativos na atividade do promotor da Miostatina, sendo E7 o mais importante de todos os sítios. E3, E4 e E5 formam um agrupamento que deve ser importante para melhor sustentação e estabilidade da ligação DNA-proteína. Experimentos gerando mutações nos sítios para MEF2 e MTBF tiveram efeitos positivos na atividade do promotor e mutações em sítios para elementos responsivos à glicocorticóide (GRE) diminuíram a atividade do promotor (DU *et al.* 2007).

GU *et al.* (2004) clonaram 1.2 kb da região 5' *upstream* ao gene da Miostatina de pato, ganso e codorna. Segundo os autores, uma comparação dessas seqüências revelou um alto grau de identidade, com número e localização de E-boxes bem conservados entre galinha e codorna (Figura 2). Entretanto, uma comparação do promotor de aves com a região do promotor de mamíferos (humano, camundongo e bovino) revelou um nível mais baixo de similaridade.

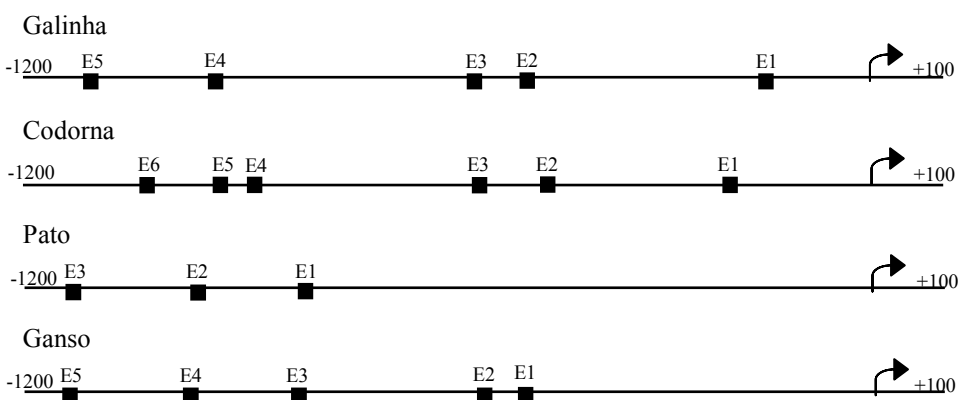


Figura 2 - Comparação do posicionamento dos E-boxes em diferentes aves.

Considerando que estudos buscando compreender os mecanismos que regem a regulação da Miostatina se restringem a elementos regulatórios localizados *upstream* ao gene da Miostatina em mamíferos (SALERNO *et al.* 2004; SPILLER *et al.* 2002; MA *et al.*

2001; DU *et al.* 2007) ou aves (GU *et al.* 2004), a proposta do presente trabalho foi identificar possíveis elementos *cis*-regulatórios (promotor e *enhancers*) desse gene, através da comparação entre diferentes organismos vertebrados (humano, camundongo e galinha). A manutenção destas seqüências conservadas ao longo da evolução sugere que elas tenham um papel funcional, provavelmente regulando a transcrição gênica. Utilizando ferramentas de bioinformática, foram localizadas oito regiões evolutivamente conservadas nas regiões adjacentes ao locus da Miostatina. Em seguida, foi realizada uma busca por potenciais sítios de ligação para fatores transcricionais que tenham sido conservados ao longo da evolução filogenética. Tais fatores foram analisados de acordo com seu posicionamento nas regiões conservadas e sua função. Por fim, o promotor mínimo do gene da Miostatina foi testado com relação a sua capacidade de dirigir a transcrição de um gene repórter, através de experimentos de eletroporação de embriões de galinha *in ovo*. Os resultados desses experimentos mostram que a região estudada representa o promotor mínimo da Miostatina, sendo capaz de regular a atividade do gene repórter em somitos de embriões de galinha.

2) OBJETIVOS

2) **OBJETIVOS**

2.1. **Geral**

Identificar novos elementos *cis*-reguladores da transcrição do gene da Miostatina e caracterizar em ensaios funcionais seu promotor mínimo.

2.2. **Específicos**

- a) Comparar o locus da Miostatina de diferentes vertebrados (Galinha, Camundongo e Humano) visando identificar seqüências conservadas evolutivamente (RECs).
- b) Identificar o promotor putativo do gene Miostatina.
- c) Localizar e classificar, segundo sua categoria e função, os sítios de ligação para fatores de transcrição, que sejam conservados filogeneticamente dentro dos RECs e do promotor putativo.
- d) Amplificar e clonar o promotor putativo identificado pelas análises de bioinformática em um vetor sem promotor, tendo como gene-repórter o GFP.
- e) Testar esta construção de expressão quanto a sua capacidade de dirigir a expressão do transgene por eletroporação em embriões de galinha *in ovo*.
- f) Realizar uma busca por regiões reguladoras com arquitetura semelhante ao promotor da Miostatina no genoma, através de bioinformática.

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3) MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANÁLISES DE BIOINFORMÁTICA

3.1.1. ANÁLISE DAS REGIÕES EVOLUTIVAMENTE CONSERVADAS

O estudo se iniciou com a identificação de Regiões Evolutivamente Conservadas (RECs) no locus da Miostatina de vertebrados, utilizando ferramentas de bioinformática. O trecho analisado inclui o gene Miostatina e as regiões intergênicas situadas entre as posições chr2:190455454 e chr2:190695663 do genoma humano, delimitadas pelo gene PMS1 e a sequência que codifica a proteína hipotética MGC13057. O alinhamento e a busca por tais sequências conservadas entre as diferentes espécies de vertebrados (Galinha, Camundongo e Homem) foram feitos com auxílio dos programas ECR Browser e Mulan, que podem ser acessados na *homepage* do Centro de Genômica Comparativa, no endereço <http://www.dcode.org>. Os parâmetros usados para definir uma REC foram comprimento mínimo de 100 pb e 70% de identidade de sequência. O Centro de Genômica Comparativa é mantido pelo Laboratório Lawrence Livermore e pela Universidade da Califórnia, que disponibilizam uma coleção de ferramentas de bioinformática que podem ser acessadas *on-line*.

3.1.2. ANÁLISE DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA FATORES TRANSCRICIONAIS EVOLUTIVAMENTE CONSERVADOS

Uma vez identificadas as RECs, os potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição conservados ao longo da evolução foram localizados com o auxílio do recurso multiTF do Mulan. Essa ferramenta utiliza a biblioteca V10.2 do TRANSFAC que possui um total de 467 famílias de fatores de transcrição de vertebrados. A similaridade de matriz foi prédefinida como otimizada para função (*optimized for function*), de forma a utilizar

diferentes parâmetros para diferentes sítios de ligação para fatores transcricionais. Na etapa seguinte, os fatores de transcrição que podem estar envolvidos na regulação da atividade transcricional da Miostatina foram categorizados com relação à classe e função com base nos dados do banco de dados Transfac (<http://www.gene-regulation.com/pub/programs.html>).

3.1.3. ANÁLISE DE GENES COM REGIÕES REGULADORAS COM ESTRUTURA SEMELHANTE À MIOSTATINA

A ferramenta de bioinformática Synor (<http://synor.dcode.org/>) foi utilizada com o intuito de localizar genes que possuam regiões reguladoras com arquitetura semelhante ao promotor mínimo da Miostatina, contendo os sítios para os fatores CREB, ATF, MEIS, NFY e FXR, não necessariamente nessa ordem. As limitações entre sítios vizinhos foram definidas como pelo menos 4pb mas não mais que 100 pb. O genoma humano foi utilizado como base e o camundongo foi usado para comparação.

A função desses genes foi analisada com ajuda das ferramentas *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM) e Pubmed do banco de dados National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

3.2. CLONAGEM DO PROMOTOR MÍNIMO DO GENE DA MIOSTATINA NO VETOR PTKEGFP

3.2.1 Amplificação do promotor mínimo

Para a amplificação da região identificada nas análises de bioinformática como o promotor mínimo putativo do gene da Miostatina de galinha, foram desenhados *primers* flanqueando a região desejada (Figura 3), os quais geram um fragmento de 258 pb.

(NheI)

CAGGCTAGC **ATCCTTTCAGTATGTGAAGA**

AAATAT **ATCCTTTCAGTATGTGAAGA** CGTATCCTCTACGAAGCCACCAGATAAATCAGTTCACCCTTGGCTGTAACCA

AATGCTGTCTAGTGACTTGTGATCGACAGGGCTTTAACCTCTGACAGCTAGATTCAATTGTTGGGACAACAACCAATCGTCG

GTTTTGACGACATGAGCCTAATCAAAGTTGGAGTATAAAAGCCCCCTTGGCATATATAAGGCACACCAGTGTGGCAAGCCG

TCTCTCAGATTGCATTTCCTGTCA CGGATCTGTTTAGAACTGAAAGAAAAGGGGAAAGGGAGAGGGGGGGGA

AGTCTAACGTAAACGACAGT TCGAATAC

(HindIII)

Figura 3: Região do promotor mínimo putativo do gene da Miostatina. Em vermelho está destacada a região do promotor mínimo e em verde estão destacadas as seqüências onde se ligam os *primers* escolhidos para amplificar a região de interesse. Os *primers* utilizados na amplificação estão representados em azul, com a adição dos sítios para enzimas de restrição. O sítio para a enzima NheI do *primer* direto não foi utilizado no trabalho, devido à mudanças na estratégia de clonagem.

Para a reação de amplificação (PCR), foi preparada uma reação de volume final de 50 µL, na qual foram adicionados 300 ng de DNA genômico de galinha. As concentrações finais dos reagentes foram de 0,2 mM para cada dNTP; 2 mM de MgCl₂; 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 água MilliQ autoclavada.

O DNA genômico utilizado foi obtido a partir de embrião de galinha, utilizando o Kit Wizard de Extração de DNA, da Promega, conforme instruções do fabricante. O programa utilizado para a amplificação do fragmento desejado está descrito abaixo (Termociclador Personal Multigene II, LA-TC020A, Labnet):

Pré-desnaturação:

95°C, 1 minuto

Primeira fase (5 ciclos):

95 °C, 15 segundos

65 °C, 15 segundos

72 °C, 1 minuto

Segunda fase (30 ciclos):

95 °C, 15 segundos

58 °C, 30 segundos

72 °C, 1 minuto

Extensão final:

72 °C, 10 minutos

A verificação da amplificação foi feita em gel de agarose 2,5%, no qual foram aplicados 5 µL do produto de PCR, 1 µL do corante Blue Green Loading Dye I (LGC Biotecnologia) e 4 µL de água MilliQ autoclavada. Para verificação do tamanho do fragmento foi utilizado 2 µL do marcador de peso molecular O'GeneRuler 1kb DNA Ladder (0,1 µg / µL, 50 µg, Fermentas), 1 µL do corante e 7 µL de água MilliQ autoclavada.

3.2.2 Purificação do produto da PCR

Após a verificação, o fragmento foi purificado através de precipitação com isopropanol. Primeiramente foi acrescentado ao produto de PCR o dobro do volume de isopropanol 65% gelado. Após homogeneizar por inversão e centrifugar a 13.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* foi adicionado o dobro do volume inicial de etanol 70% gelado, seguindo-se nova centrifugação a 13.000 rpm por 5 minutos. Após remoção do sobrenadante, o *pellet* foi seco e então ressuspenso em 50 µL de água MilliQ autoclavada.

3.2.3 Preparação do produto da PCR para clonagem

O produto da PCR purificado foi digerido com a enzima de restrição *Hind III*. Para 50 µL de produto de PCR, foram adicionados 2 µL da enzima *Hind III* (10 u / µL, Invitrogen) e 5 µL do 10x *Buffer* fornecido pelo fabricante. Essa reação foi incubada em banho à 37 °C por 1h 30 min.

Segue-se, então, a purificação deste material com fenol:clorofórmio. Para tanto, 50 µL de água MilliQ autoclavada foram acrescentados à reação de digestão para completar o volume para 100 µL, acrescentando-se então igual volume de fenol:clorofórmio. Esta mistura foi vortexada, centrifugada por três minutos e a fase aquosa (superior) que se formou foi coletada e transferida para um tubo limpo. Foi realizada em seguida, nova precipitação, conforme descrito abaixo.

Ao material recuperado da purificação com fenol:clorofórmio foram adicionados 100 mM de NaCl 5M e 2 volumes de etanol 100%, seguindo-se incubação *overnight* à -20 °C. Foi feita, então, centrifugação por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Ao *pellet* foram adicionados 500 µL de etanol 70%, seguindo-se centrifugação por 5 minutos e descarte do sobrenadante. Uma vez seco, o *pellet* foi ressuspensionado em 50 µL de água MilliQ autoclavada.

3.2.4 Preparação do vetor para clonagem

O vetor usado para a clonagem foi o pTKeGFP (Figura 4), que possui o promotor TK (Herpes simplex virus thymidine kinase promoter) *upstream* ao gene repórter GFP, que foi substituído pelo promotor mínimo da Miostatina. Para tanto, o vetor pTKeGFP foi digerido com as enzimas *Hind III* e *Xho I*. Dessa forma, o promotor TK foi excisado e o vetor foi linearizado tendo a extremidade 3' cortada por *Xho I* e a extremidade 5' cortada por *Hind III*. Isso proporcionou direcionalidade à clonagem, uma vez que o promotor

mínimo do gene da Miostatina foi preparado de forma a conter a extremidade 5' intacta e a extremidade 3' cortada por *Hind III*.

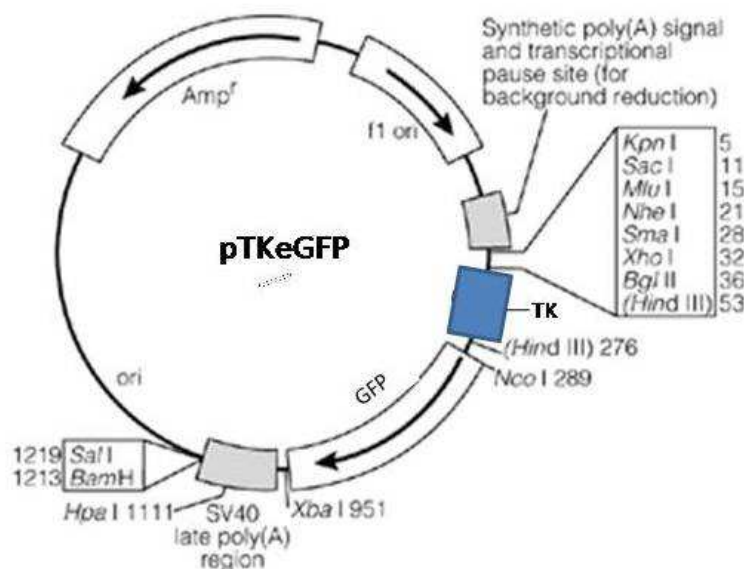


Figura 4: Vetor pTKeGFP utilizado para as clonagens. Em azul está destacado o promotor TK, *upstream* ao gene repórter GFP.

Para a digestão do vetor com *Xho I*, 2 μ L desta enzima (10 u / μ L, Invitrogen) foram adicionados a uma reação contendo 70 μ L de DNA (200 ng/ μ L) 10 μ L do 10x *Buffer* fornecido pelo fabricante e 18 μ L água MilliQ autoclavada, totalizando 100 μ L de reação. Segue-se, então, incubação por 2 horas à 37°C. Após verificar se o vetor havia sido devidamente clivado por eletroforese em gel de agarose 1%, o DNA do vetor foi precipitado conforme descrito anteriormente.

Para reparo (*fill in*) das extremidades do vetor cortado com a enzima *Xho I*, foi preparada reação contendo 2 μ L da enzima T4 DNA Polimerase (5 u / μ L, Invitrogen), 12 μ L do 5x *Buffer* fornecido junto com a enzima, 3 μ L de dNTP (10mM) e 43 μ L de água MilliQ autoclavada. A reação foi deixada em banho-maria à 37°C por 1 hora.

Após ser purificado com fenol:clorofórmio e precipitado, o vetor aberto foi submetido à digestão pela enzima *Hind III*. Para 20 µL do vetor cortado com *Xho I* e submetido ao reparo, foram adicionados 1 µL da enzima *Hind III*, 3 µL do 10x *Buffer* fornecido com a enzima e 6 µL de água MilliQ autoclavada. A reação foi deixada em banho à 37°C por 2 horas.

O produto dessa digestão foi submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% por 1 hora. As duas bandas (uma correspondente ao vetor cortado e a outra ao promotor TK excisado) foram observadas em transiluminador e a banda referente ao vetor cortado foi então extraída do gel, utilizando o *kit* de extração *Quick Gel Extraction* (Invitrogen), conforme instruções fornecidas pelo fabricante.

3.2.5 Reação de ligação e transformação

O vetor aberto, com uma extremidade intacta (cortada com *Xho I* e submetida ao reparo) e outra extremidade cortada por *Hind III*, e o fragmento referente ao promotor mínimo da Miostatina (com uma extremidade intacta e outra cortada com *Hind III*) foram então ligados (Figura 5). Para 36 µL do vetor aberto (total 200 ng), foram adicionados 3 µL do promotor cortado (total 25 ng), 2 µL da enzima T4 DNA Ligase (5 u / µL, 200u, Fermentas), 5 µL do 10x buffer fornecido com a enzima e 4 µL de água MilliQ autoclavada. A reação foi deixada em temperatura ambiente *overnight*. A ocorrência da ligação entre o vetor e o inserto foi verificada por eletroforese de uma alíquota em gel de agarose 0,7%.

A reação de ligação foi então empregada para transformar bactérias *E. coli* (DH5α) competentes através de eletroporação, cuja eficiência de eletroporação foi estimada em 10⁸ transformantes/ µg de DNA. A transformação foi feita com 1 µL do produto de ligação, que foi adicionado a 40 µL de bactérias competentes previamente

preparadas e estocadas a -80°C . Após a transformação, as bactérias receberam 1 mL de meio LB e permaneceram em estufa à 37°C por 1 hora. Após esse período, foram plaqueados 50 e 100 μL do produto da transformação em placas de meio LB agar contendo 50 mg / mL de ampicilina. As placas foram levadas à estufa à 37°C , onde permaneceram *overnight*.

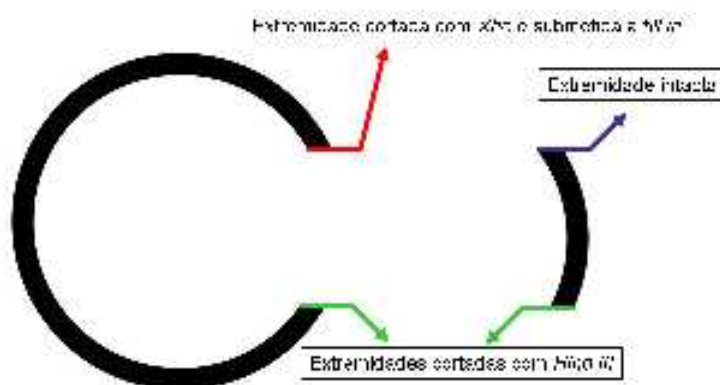


Figura 5: Esquema representando a reação de ligação que foi realizada entre o vetor aberto e o fragmento amplificado, onde a enzima de restrição *Hind III* proporcionou direcionalidade à clonagem.

3.2.6 Mini-preparações de DNA e *screening* dos clones

No dia seguinte à transformação, doze colônias isoladas foram inoculadas em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido (50 mg / mL ampicilina), os quais foram mantidos *overnight* sob agitação constante de 250 rpm à 37°C .

As culturas líquidas foram, então, utilizadas para obtenção de mini-preparações de DNA plasmidial. Para tanto, inicialmente foram transferidos 1,5 mL da cultura para um tubo, que foi centrifugado por 1 minuto a 13000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o excesso de meio foi cuidadosamente retirado com uma pipeta para obtenção do *pellet* bacteriano. O *pellet* foi ressuspendido em 100 μL de solução I (50 mM de glicose, 25 mM

de Tris-HCl, 10 mM de EDTA). Em seguida foram adicionados 10 µL de RNAase A (10 mg / mL). Após homogeneização, 200 µL de solução II (ou solução de lise: 0,2 N de NaOH, SDS 1%) foram adicionados à reação e o tubo invertido por quatro vezes. Depois, foram acrescentados 150 µL de solução III (ou solução precipitadora / de neutralização: 60 mL de acetato de potássio 5 M, 11,5 mL de ácido acético glacial, 28,5 mL de água MilliQ autoclavada) e a preparação foi homogeneizada, observando-se a formação do precipitado branco. Em seguida, o material foi centrifugado a 13000 rpm por 5 minutos à temperatura ambiente e o sobrenadante foi transferido para um tubo limpo, tendo o cuidado de não pipetar o material branco precipitado. Ao sobrenadante foram acrescentados 500 µL de isopropanol para precipitação do DNA plasmidial. Após centrifugação a 13000 rpm à 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 1.000 µL de etanol 70% para lavagem do *pellet*. Após centrifugação a 13000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi eliminado e o *pellet* foi seco à temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi ressuspendido em 20 µL de água MilliQ autoclavada e purificado com fenol e clorofórmio, conforme descrito anteriormente.

Para verificar se os clones obtidos continham o inserto de interesse, uma pequena alíquota das mini-preparações de DNA (1 µL) foi submetida a uma nova PCR, utilizando os *primers* e o protocolo usados inicialmente na amplificação. A verificação dos clones positivos para o inserto desejado foi feita em gel de agarose 2,5% e a partir desse resultado foram separados os clones que possuíam o fragmento do promotor mínimo da Miostatina. Subseqüentemente, a identidade do fragmento clonado foi confirmada por digestão dos clones selecionados com as enzimas *Xho I* e *Hind III*.

A construção resultante desta clonagem está representada na Figura 6.

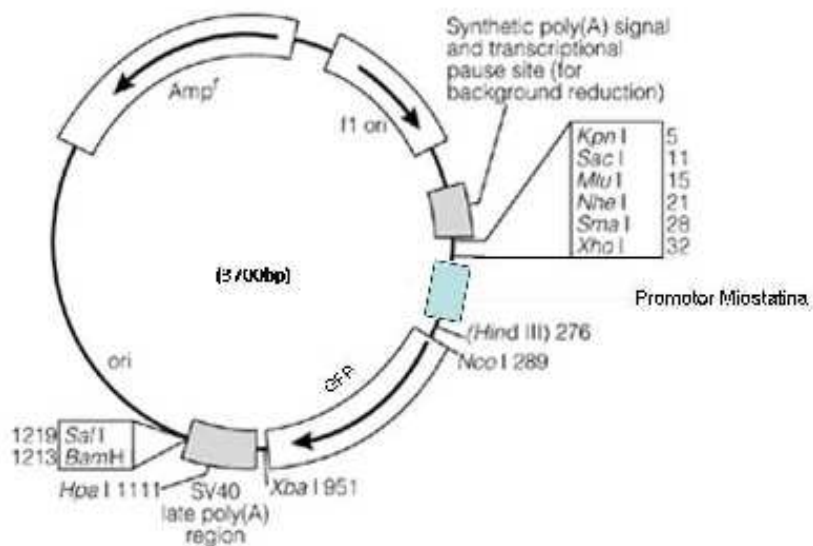


Figura 6: Construção repórter produzida através da clonagem do promotor mínimo da Miostatina (em azul) ao vetor pTKeGFP, *upstream* ao gene repórter GFP.

3.2.7 Maxi-preparações de DNA

Para obter uma alta concentração de DNA (entre 3 e 6 $\mu\text{g} / \mu\text{L}$) da construção contendo o promotor da Miostatina de galinha, bem como do vetor usado como controle (pCAB / RFP, um plasmídeo que contém como gene repórter a Proteína de Fluorescência Vermelha, cuja atividade é dirigida pelo promotor da β -actina de galinha), foi utilizado o *kit* de Maxi Preparação (QIAGEN *Plasmid Maxi Kit*) e o protocolo fornecido pelo fabricante foi seguido.

3.3. ENSAIOS DE ELETROPORAÇÃO

Os embriões de galinha utilizados para a eletroporação foram obtidos a partir de ovos fertilizados da granja Yamaguishi (www.yamaguishi.com.br) e incubados por um período de quatro dias, para obtenção de embriões em estágio HH22 (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

Inicialmente, foram removidos 6 mL de albumina de cada um dos ovos, com auxílio de uma seringa introduzida em um furo na porção mais abaulada do ovo. Em seguida,

uma janela (de 2 - 3 cm) foi aberta na casca, com auxílio de uma tesoura e fita adesiva, para evitar rachaduras. Para melhor visualização dos embriões, tinta nanquim (Acrilex, diluição 1:10 em PBS contendo Penicilina/Estreptomicina) foi injetada embaixo do embrião. Durante o procedimento, várias gotas de PBS estéril contendo os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (10.000 u/mL de Penicilina e 10.000 µg/mL de Estreptomicina - Invitrogen) foram adicionadas ao embrião, para mantê-lo úmido e livre de contaminações.

O protocolo de eletroporação segue o descrito por ALVARES *et al.* (2003). Quantidades equimolares de DNA da construção controle (pCAB/RFP) e da construção de expressão (contendo o promotor mínimo e o gene repórter GFP) foram misturados, seguindo-se adição do corante *Fast Green*. Em seguida, uma pequena quantidade deste material foi injetada na porção medial de somitos localizados na região entre membros, com auxílio de uma micro-agulha fabricada a partir de capilares de vidro (Thin Wall Glass Capillaries, TW100-6, 6 in. (152 mm), 1 / 0.75 OD/ID (mm), Fire Polished, World Precision Instruments). Os eletrodos foram imediatamente posicionados adjacente ao corpo do embrião e a corrente transmitida (3 pulsos de 10V por 3-5 ms). O eletrodo positivo foi mantido na região ventral dos somitos, enquanto o negativo foi fixado na região dorsal. Dessa forma, o DNA foi arrastado para a porção ventral (hipaxial) dos somitos (Figura 7).

Após o procedimento de eletroporação, a janela aberta nos ovos foi fechada utilizando fita adesiva, e os ovos re-incubados *overnight*. Os embriões foram então coletados, tiveram as membranas removidas e foram fixados em fixador paraformaldeído 4%. A eficiência da eletroporação foi verificada em microscópio de fluorescência (IX71 Olympus Inverted Microscope) e os resultados obtidos registrados fotograficamente.

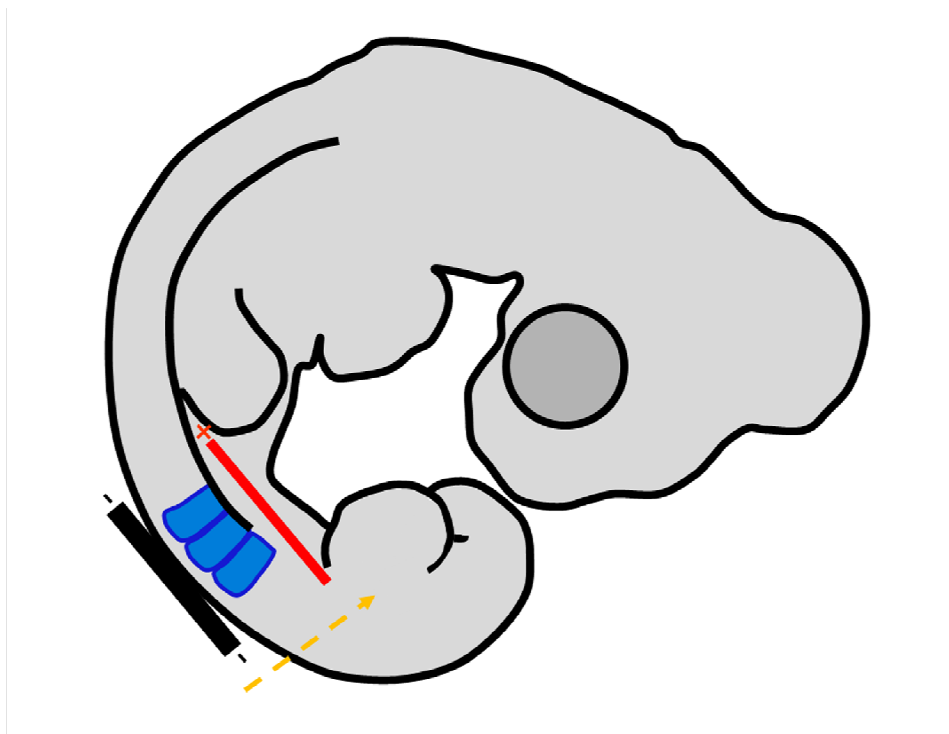


Figura 7: Esquema representando o procedimento de eletroporação. O embrião mostrado está no estágio HH22; em azul estão representados os somitos onde foi injetado o DNA, na porção medial dos somitos entre membros; em preto e vermelho estão indicados os eletrodos negativo e positivo, respectivamente; a seta amarela indica a direção da corrente, que arrasta o DNA para o pólo positivo.

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4) RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. ANÁLISE DAS REGIÕES EVOLUTIVAMENTE CONSERVADAS

Devido ao importante papel que a Miostatina possui tanto na medicina quanto na criação de animais de corte, muitos estudos têm buscado compreender os mecanismos que regem a regulação da Miostatina. No presente trabalho, buscamos identificar elementos *cis*-regulatórios do gene da Miostatina, através de uma abordagem evolutiva. Inicialmente, as seqüências genômicas referentes aos *loci* da Miostatina (incluindo região codificadora e intergênicas adjacentes) de humano, camundongo, galinha, *Xenopus* e peixe zebra foram comparadas, buscando identificar regiões evolutivamente conservadas (RECs). O genoma humano foi usado como referência e a região analisada está compreendida entre os nucleotídeos 190455454 e 190695663 do cromossomo 2. Esse alinhamento resultou em nenhuma REC entre as espécies estudadas, provavelmente devido ao alto nível de divergência observado quando espécies tão distantes quanto o homem e o peixe são comparados. Quando a comparação inclui apenas homem e camundongo, inúmeras RECs são identificadas, provavelmente mostrando seqüências que evoluíram rapidamente e que podem representar elementos regulatórios específicos da linhagem dos mamíferos. Finalmente, optamos por realizar a comparação com as seqüências dos vertebrados amniotos (humano, camundongo e galinha). Uma vez que a divergência entre mamíferos e aves ocorreu há aproximadamente 310 milhões de anos (HEDGES 2002), regiões que tenham se mantido conservadas entre esses organismos representam fortes candidatas a regiões regulatórias.

O gene da Miostatina de humanos possui orientação 3' → 5', por isso os resultados serão analisados da direita para a esquerda. Os resultados dos alinhamentos realizados entre os *loci* da Miostatina de humano, camundongo e galinha estão mostrados na Figura 8. Os exons (em azul) apresentam-se altamente conservados entre as três

espécies analisadas, como já era esperado. Na região correspondente aos dois introns (em rosa) há uma elevada identidade de seqüência entre o gene humano e de camundongo, sugerindo que possa haver elementos regulatórios exclusivos dos mamíferos localizados nos introns. Nas UTRs (em amarelo) que flanqueiam o gene GDF8, observou-se uma alta identidade de seqüência entre humano, camundongo e galinha, embora a similaridade entre as seqüências seja maior quando a comparação restringe-se aos mamíferos.

Upstream ao gene GDF8 há apenas uma região conservada entre homem, camundongo e galinha, situada entre os nucleotídeos 190635656 e 190635915 do cromossomo dois humano. Essa REC é constituída de 259 pares de base e, devido à sua localização em relação ao gene, representa o promotor putativo do gene da Miostatina. Em contraste, na região *downstream* ao gene GDF8, foram encontradas sete regiões conservadas entre humano, camundongo e galinha. A REC1 situa-se entre os nucleotídeos 190625475 e 190625630 do cromossomo dois humano e possui 155 pb. A REC2 possui 210 pb e está localizada entre 190605261 e 190605471. A terceira REC, situada entre os nucleotídeos 190532492 e 190532751, possui 259 pb, e a quarta REC, que possui 196 pb, encontra-se entre os nucleotídeos 190508719 e 190508915. A REC5 está localizada entre os nucleotídeos 190508161 e 190508330 do cromossomo dois humano, e possui 169 pb. A REC6 possui 244 pb e está presente entre 190486538 e 190487185, e a última REC, localizada entre 190486567 e 190486860, possui 293 pb. A seqüência de nucleotídeos de cada uma das RECs bem como sua localização no genoma de cada espécie são mostradas no Anexo 1.

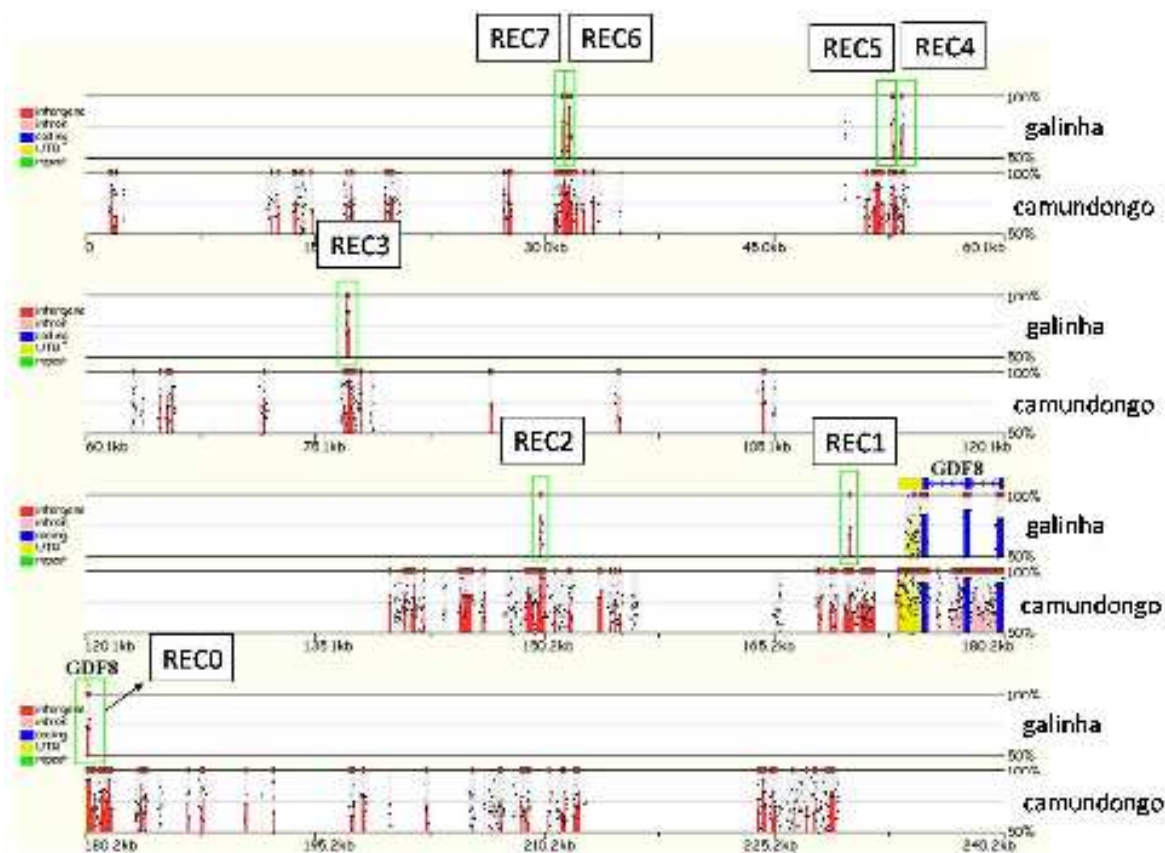


Figura 8 – Figura adaptada do *site* ECR Browser mostrando as Regiões Evolutivamente Conservadas (REC0 – REC7) entre humano, camundongo e galinha, dispostas nas regiões intergênicas adjacentes ao gene da Miostatina (GDF8). O genoma humano é usado como base e regiões conservadas em exons são mostradas como barras azuis; regiões conservadas em introns são mostradas em rosa; regiões conservadas em UTRs são indicadas em amarelo; regiões conservadas entre genes são mostradas em vermelho.

4.2. ANÁLISE DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO PARA FATORES TRANSCRICIONAIS EVOLUTIVAMENTE CONSERVADOS

Com o intuito de criar hipóteses a respeito da função que cada uma dessas RECs pode estar exercendo na regulação do gene da Miostatina, foi realizada uma busca por sítios de ligação para fatores transcricionais que tenham sido conservados entre as

espécies estudadas, dentro de cada uma das RECs (Figura 9). A sequência de nucleotídeos e a disposição exata dos sítios de ligação para os diferentes fatores transcricionais em cada uma das RECs identificadas são apresentados no Anexo 2.

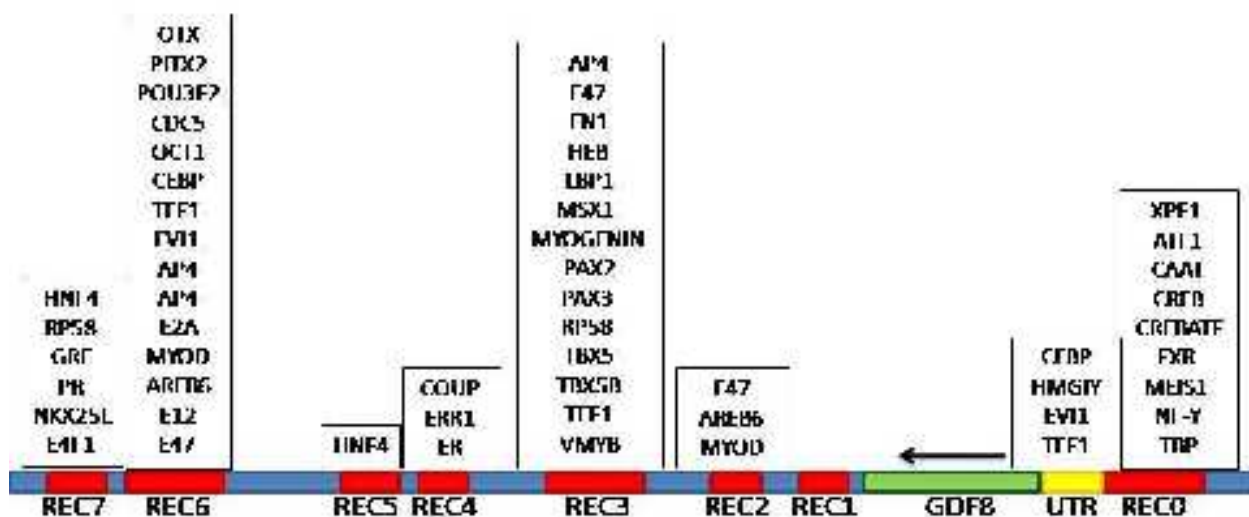


Figura 9 – Esquema indicando os sítios de ligação para fatores transcricionais conservados encontrados em cada uma das RECs (REC0 - REC7). Em verde está o gene da Miostatina (GDF8), em amarelo a UTR 5', e em vermelho as RECs.

A REC0 será discutida posteriormente, no item 4.3.

A UTR 5' apresentou conservação entre os três organismos analisados. Nessa região foi observado um sítio de ligação conservado para o fator transcricional C/EBP. A família C/EBP (*CCAAT/enhancer binding protein*) de fatores transcricionais é responsável pela transdução de sinais de fatores de crescimento em diversas respostas celulares, incluindo diferenciação celular em uma variedade de tecidos. A expressão das C/EBPs é também encontrada durante diversas condições fisiológicas e patofisiológicas em resposta à sinais extracelulares, como hormônios, mitógenos e citocinas. Recentemente foi mostrado que C/EBP forma complexos com NeuroD, membro da família bHLH (hélice-volta-hélice básicos) de fatores transcricionais, regulador importante da determinação do

destino e diferenciação neural, e esse complexo é recrutado para promotores alvo (CALELLA *et al.* 2007).

Outro fator transcricional cujo sítio de ligação foi encontrado conservado na UTR5' é o HMGIY. Mutações nesse gene são encontradas em casos de Leiomioma, tumores benignos de musculatura lisa, especialmente comuns no miométrio uterino (LIGON & MORTON 2001). Ainda na UTR5', foi identificado um sítio conservado para a ligação de EVI-1. Este fator transcricional interage com as proteínas Smad, reprimindo sua atividade, atuando como repressor da transcrição mediada por Smad, TGF- β e BMP (ALLISTON *et al.* 2005).

Por fim, foi identificado um sítio conservado para o fator TEF-1(*transcriptional enhancer factor-1*). Os membros da família TEF-1 se ligam aos elementos MCAT, localizados nas regiões de genes específicos de musculatura cardíaca, lisa e esquelética, e desempenham um papel importante na sua regulação durante o desenvolvimento e em doenças (YOSHIDA 2008).

A REC1 não apresentou nenhum sítio de ligação para fator transcricional conservado.

A REC2 parece ser caracterizada por apresentar apenas sítios envolvidos na miogênese. Na REC2 foram identificados três sítios de ligação para fatores de transcrição que são conservados filogeneticamente: MyoD, E47 e AREB6. Estes três fatores são capazes de interagir com o E-box. Este achado é particularmente importante pois o E-box (CANNTG) é uma das seqüências reconhecidas como sendo um componente regulatório crítico na expressão de genes relacionados à musculatura. E-boxes são sítios de ligação para os fatores de transcrição básicos hélice-volta-hélice, coletivamente chamados de fatores regulatórios miogênicos (MRFs). Os MRFs incluem os fatores de transcrição *MyoD*, *Myf5*, Miogenina e MRF4 (SPILLER *et al.* 2002), que são ativadores transcricionais de genes da musculatura esquelética, capazes de ativar o programa de

diferenciação muscular mesmo quando expressos em células não-musculares (BRENT & TABIN 2002). *MyoD* e *Myf5* são expressos em mioblastos e miotúbulos durante a embriogênese e demonstrou-se que eles são requeridos para a formação de musculatura esquelética. Em comparação a *MyoD*, o RNAm da miogenina aumenta significativamente quando os mioblastos se diferenciam e é, dessa forma, requerido para a formação dos miotúbulos. Diversos sítios de ligação para fatores de transcrição capazes de ligar-se ao E-box foram encontrados neste trabalho, em diferentes regiões conservadas. Um sítio para o fator HEB foi observado na REC3, sítios para os fatores *MyoD* foram identificados nas REC2 e REC6, um sítio para a miogenina foi encontrado na REC3, além de sítios para os fatores E47 (RECs2, 3 e 6), E2A e E12 (REC6), que são capazes de formar heterodímeros com *MyoD*.

Além disso, é de particular interesse a presença na REC2 de um sítio para o fator AREB6, presente também na REC6. É sabido que a Miostatina é um alvo *downstream* de *MyoD* (SPILLER *et al.* 2002), entretanto os padrões de expressão destas duas moléculas não se sobrepõem. *MyoD* é observado nos somitos de embriões de galinha a partir do estágio HH9 (HACKER & GUTHRIE, 1998) (HAMBURGER & HAMILTON, 1951) e a Miostatina aparece apenas depois da diferenciação dos somitos entre dermomiótomo, miótomo e esclerótomo, em HH15 (AMTHOR *et al.* 2002). Esta diferença poderia estar sendo causada pela ação de um repressor. De fato, o fator transcricional AREB6 (ou ZEB) se liga a E-boxes de genes envolvidos na miogênese, impedindo a ligação dos fatores miogênicos, reprimindo ativamente a transcrição. Conforme a diferenciação progride, os fatores miogênicos se acumulam em níveis suficientes para retirar AREB dos E-boxes, podendo então se ligar e ativar a transcrição dos genes-alvo (POSTIGO & DEAN, 1997). Esse modelo de repressão poderia explicar o atraso da expressão da Miostatina em relação ao seu ativador *MyoD*. Essa REC deve ser um *enhancer* músculo-específico do

gene da Miostatina, que está controlando sua expressão em somitos através da repressão por AREB, conforme sugerido por POSTIGO & DEAN (1997).

A REC3 possui 14 sítios conservados para a ligação de fatores transcricionais, dentre eles fatores envolvidos principalmente no desenvolvimento de musculatura esquelética, cardíaca e do tecido nervoso, além de outros. Dentre os fatores encontrados estão dois membros da família das proteínas E (E47 e HEB), já citadas na REC2. Outro sítio conservado é para a proteína AP4, que é um membro do subgrupo bHLH-LZ da família bHLH, que forma homodímeros e liga-se ao E-box CAGCTG. Inicialmente, foi mostrado que AP4 ativa a transcrição, mas estudos mostram que AP4 também é capaz de reprimir a atividade de certos genes (JUNG *et al.* 2008).

Continuando nessa mesma região conservada, foi identificado um sítio para o fator En1. O fator transcricional En1 subdivide molecularmente o dermomiótomo de amniotos, marcando o domínio epaxial, enquanto Sim1 marca o domínio hipaxial dos amniotos. A expressão dessas duas moléculas persiste nas células que deixam o dermomiótomo, e vão dar origem a músculos e pele (AHMED *et al.* 2006). A expressão da Miostatina está restrita ao domínio hipaxial do miótomo (AMTHOR *et al.* 2002), sugerindo que En1 possa atuar como um inibidor de sua atividade no domínio epaxial, restringindo sua ação à porção ventrolateral dos somitos.

A presença de um sítio de ligação para a Miogenina nessa REC3 reforça a atuação dos fatores miogênicos sobre a atividade da Miostatina. Além disso, é de bastante destaque a presença de um sítio para o fator Pax3, expresso em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário em domínios espacialmente restritos, incluindo os músculos dos membros, crista neural e tubo neural. Essa proteína atua na diferenciação de melanócitos-tronco, cardiogênese e neurogênese, além de estar envolvido na migração e diferenciação de populações de precursores celulares, como as células que formarão os músculos dos membros (NAKAZAKI *et al.* 2008). É importante notar que

Pax3 atua especificamente no desenvolvimento dos músculos esqueléticos hipaxiais, sendo expresso nos mesmos locais onde são encontrados transcritos do gene miostatina.

Ainda na REC3, foram identificados sítios para fatores transcripcionais envolvidos no desenvolvimento cardíaco. Isso está de acordo com a observação da Miostatina em tecido muscular cardíaco (AMTHOR *et al.* 2002). TBX5 é um membro da família gênica T-box que codifica um fator transcricional que regula a expressão de outros genes no desenvolvimento de coração e membros. Mutações no gene TBX5 causam a síndrome Holt-Oram (HOS), uma condição autossomal dominante caracterizada por defeitos cardíacos congênitos e anomalias nos membros (BASSON *et al.* 1997). Em seguida, foi identificado um sítio para o fator transcricional MSX1 que desempenha diversas funções em vários órgãos e tecidos durante o desenvolvimento dos vertebrados, incluindo o coração e botões de membro (HEWITT *et al.* 1991). Além desses fatores, foi ainda identificado um sítio de ligação para o fator TEF-1, já citado.

Um sítio para Pax2 também foi observado nessa REC. Esse fator transcricional é expresso durante o desenvolvimento e mutações no seu gene causam a síndrome renal-coloboma. Mutantes homozigotos são letais, apresentando diversas malformações de órgãos, especialmente no cérebro e rins (TAMIMI *et al.* 2008). O fator transcricional RP58, para o qual também foi identificado um sítio na REC3, é um repressor transcricional, envolvido na proliferação, migração e diferenciação neuronal durante o desenvolvimento do córtex cerebral (OHTAKA-MARUYAMA *et al.* 2007).

Ainda na REC3, foi observado um sítio para o fator LBP1. Esta proteína celular se liga fortemente à seqüências próximas ao sítio de iniciação do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) e de maneira mais fraca ao sítio TATA, possuindo papel duplo, ativando ou inibindo a transcrição de HIV-1, dependendo do contexto (YOON *et al.* 1994).

Por fim, foi identificado um sítio para o fator VMYB, oncogene que causa o aparecimento tardio de linfomas de células T quando expresso na linhagem de células T de camundongos transgênicos (DAVIES *et al.* 1999).

A REC4 parece estar envolvida na regulação da Miostatina durante a adipogênese. Isso dá suporte ao achado de MCPHERRON *et al.* (1997), que afirmaram ter observado um sinal claramente detectável de mRNA do GDF8 em tecido adiposo, através de análise do tipo *Northern-blot*. ERR1 (*estrogen-related receptor 1*) é membro da superfamília de receptores de hormônio nucleares, expresso em tecidos que preferencialmente metabolizam ácidos graxos. Camundongos nulos para ERR1 são viáveis, férteis e não possuem grandes alterações morfológicas, com exceção do peso do corpo e depósitos de gordura reduzidos, sugerindo que ERR1 funcione como um regulador metabólico (LUO *et al.* 2003). ER é um receptor de estrogênio, expresso no tecido adiposo e também em outros órgãos associados à saciedade e alimentação, como o hipotálamo e a pituitária. A ausência de ER resulta em grande aumento do tecido adiposo branco em camundongos, acompanhado de resistência à insulina e intolerância à glicose (HEINE *et al.* 2000). Além desses fatores, foi identificado um sítio para o fator COUP. Os fatores transcricionais COUP-TFI e COUP-TFII (*chicken ovalbumin upstream promoter*) são requeridos para a especificação temporal de células tronco/progenitoras neurais (NAKA *et al.* 2008).

A REC5 apresentou apenas um sítio conservado para o fator transcricional HNF4. Esse fator pertence à família de receptores de hormônio nucleares e é expresso no divertículo hepático no início do desenvolvimento do fígado. HNF4 é dispensável para a especificação e desenvolvimento inicial do fígado, mas é essencial para a diferenciação dos hepatócitos durante o desenvolvimento do fígado de mamíferos e é também crucial para a regulação metabólica e funcionamento do fígado (LI 2000).

A REC6 aparenta ser uma região reguladora músculo-específica, assim como as RECs 2 e 3. Nessa REC foram identificados 14 sítios conservados para a ligação de fatores transcrpcionais. Dentre os já citados estão três membros da família de proteínas E (E2A, E12 e E47), TEF1, EVI1, AP4, MYOD e AREB, todos envolvidos no desenvolvimento muscular.

Os demais fatores apresentam, dentre outras funções, relação com o desenvolvimento do sistema nervoso, assim como o já citado C/EBP. OTX desempenha papel importante no desenvolvimento do cérebro, onde camundongos nulos para esse gene exibem comportamento epilético, e com cérebros apresentando diversas anomalias. É expresso também em células progenitoras de eritrócitos e células pluripotentes hematopoiéticas, tendo papel na regulação da produção de células do sangue (LEVANTINI *et al.* 2003). POU3F2 pertence a uma grande família de fatores transcrpcionais que se ligam à seqüência octamérica de DNA ATGCAAAT. É expresso em células de Schwann em desenvolvimento, promovendo a transição de células prómielinizadas em células de Schwann mielinizadas (JAEGLE *et al.* 2003). PITX2 é um fator transcricional que possui papel crucial na assimetria direita-esquerda do coração, atuando em um passo intermediário na morfogênese cardíaca (LU *et al.* 1999b).

Já CDC5 é um gene envolvido no ciclo de divisão celular, essencial para a progressão da fase G2 e entrada na mitose. Pode ter papel relevante na citocinese e divisão celular assimétrica (YOSHIDA *et al.* 2006). Por fim, OCT1 (transportador de cátion orgânico) tem características comuns com o transporte de cátion na membrana basolateral dos túbulos proximais renais e em hepatócitos. É encontrado nos rins, fígado e intestino. Transloca cátions orgânicos hidrofóbicos e hidrofílicos de diferentes estruturas, sendo considerado importante para a eliminação de drogas (GRÜNDEMANN *et al.* 1994).

A última região evolutivamente conservada, REC7, apresentou seis sítios conservados para a ligação de fatores transcricionais, dentre eles os já citados HNF4 e RP58.

Dentre os demais sítios encontrados nessa REC, são de particular interesse aqueles para a ligação dos fatores transcricionais GRE (elemento responsivo à glicocorticóides) e PR (receptor de progesterona). Como citado na introdução, foi demonstrado que a Miostatina é responsiva a hormônios (JOULIA-EKAZA & CABELLO 2007), podendo esse ser um *enhancer* específico para o controle da atividade da Miostatina na presença de estímulo hormonal.

Além desses sítios, é de grande destaque a presença de um sítio para o fator NKX25L, essencial para o desenvolvimento cardíaco. Mutações no Csx (gene que codifica NKX25) causam diversas doenças cardíacas congênitas (HIROI *et al.* 2001). O NKX25 induz o desenvolvimento cardíaco sinergisticamente com TBX5, fator transcricional para o qual foi identificado um sítio na REC3.

Por fim, foi observado um sítio para a ligação do fator E4F1, homólogo de CREB. Esse fator transcricional é ubiqüamente expresso e camundongos nulos para E4F1 morrem no estágio de pré-implantação. Blastocistos mutantes cultivados *in vitro* exibem defeitos na progressão mitótica, segregação errônea de cromossomos e apoptose aumentada, sendo crucial durante ciclos celulares de fases iniciais da embriogênese e funcionando também durante a mitose (LE CAM *et al.* 2004).

Juntos, esses dados sugerem uma regulação modular do gene da Miostatina durante a embriogênese dos vertebrados, onde cada uma das regiões reguladoras pode atuar de maneira temporal e/ou espacialmente específica, regulando a atividade do gene da Miostatina em diferentes contextos celulares e teciduais, bem como em momentos diferentes da vida embrionária e adulta. Assim, um melhor entendimento a esse respeito poderia permitir a modulação da atividade do gene da Miostatina em determinado

momento e local de interesse, como por exemplo em casos de distrofia muscular, sem afetar sua ação em outros contextos, evitando prejudicar a formação e/ou manutenção de outros tecidos e órgãos. Com esse intuito, o papel funcional de cada uma dessas RECs será testado futuramente, através da sua clonagem em plasmídios repórteres que serão posteriormente eletroporados em embriões de galinha *in ovo*.

4.3. ANÁLISE DO PROMOTOR PUTATIVO DA MIOSTATINA

A disposição dos sítios de ligação para fatores transcricionais conservados encontrados na REC0 (chr2:190635656-190635915) é mostrada com maior detalhe na Figura 10. Devido ao posicionamento dessa REC, localizada imediatamente *upstream* ao gene, presume-se que se trate do promotor do gene da Miostatina. A análise realizada para identificação de potenciais sítios de ligação para fatores de transcrição indicou a presença de sítios conservados, entre eles um sítio de ligação para o fator de transcrição geral TBP (*TATA Binding Protein*), o que reforça a possibilidade de essa região se tratar do promotor. Os demais sítios de ligação para fatores transcricionais encontrados no promotor putativo serão discutidos a seguir.

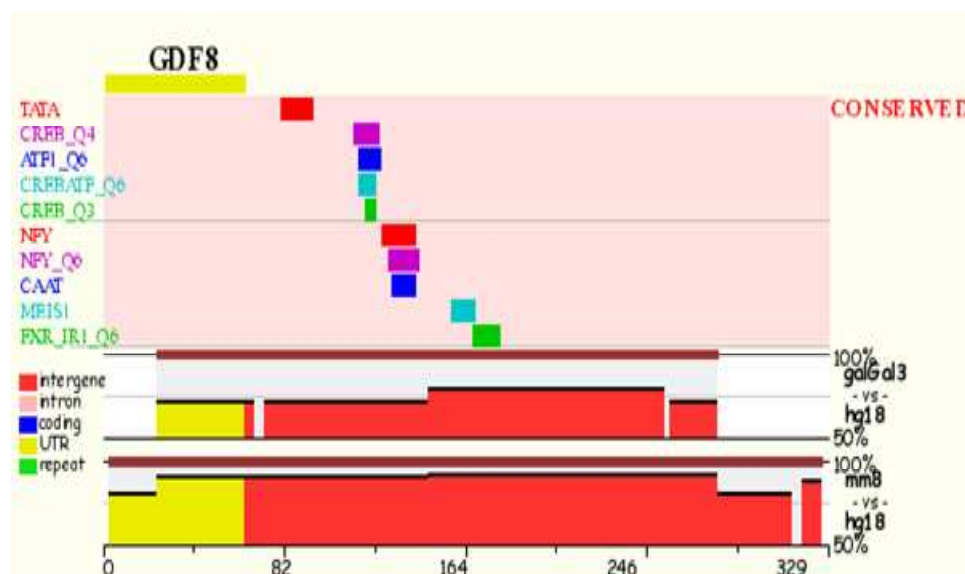


Figura 10 – Figura adaptada do *site* Mulan, mostrando a disposição dos sítios de ligação para fatores transcricionais em REC0.

4.4. ENSAIOS FUNCIONAIS COM A CONTRUÇÃO DE EXPRESSÃO CONTENDO O PROMOTOR MÍNIMO DA MIOSTATINA

Os somitos de animais amniotos são divididos lateromedialmente em dois domínios morfológicamente indetectáveis, porém com marcadores moleculares próprios: o domínio dorsomedial, ou epaxial, e o domínio ventrolateral, ou hipaxial (DIETRICH *et al.* 1998). O dermomiótomo epaxial dos somitos dá origem à musculatura das costas além da derme dorsal, enquanto que a região hipaxial origina a musculatura da parede do corpo, dos membros e língua (DIETRICH *et al.* 1998). Durante o desenvolvimento embrionário de galinha, a Miostatina é predominantemente expressa no domínio central do dermomiótomo, sendo primeiramente detectada em embriões no estágio HH15, com transcritos localizados na porção ventrolateral dos quatro somitos mais rostrais, progredindo para todos os somitos conforme o desenvolvimento avança. No estágio HH25, a expressão da Miostatina é observada na porção hipaxial do miótomo de todos os somitos, mas não na porção epaxial (AMTHOR *et al.* 2002).

Com o intuito de validar as hipóteses feitas sobre a funcionalidade das diferentes RECs identificadas nas análises de bioinformática, a sequência identificada como o promotor putativo do gene da Miostatina foi empregada em ensaios funcionais. Estes ensaios tiveram por objetivo verificar se a sequência predita como sendo promotora do gene tinha a capacidade de dirigir a transcrição de um gene repórter em ensaios de eletroporação de embriões de galinha *in ovo*. Este procedimento usa pulsos de campo elétrico para desestabilizar a membrana plasmática transientemente, criando poros através das quais o DNA é internalizado por sua carga negativa. O promotor mínimo identificado foi clonado em um plasmídio repórter, *upstream* ao gene GFP (*Green Fluorescent Protein*). Essa construção foi então injetada no somito, juntamente com uma construção controle (pCAB / RFP) e a corrente foi transmitida. As análises da fluorescência produzida após eletroporação mostram que o promotor mínimo da

Miostatina é capaz de dirigir a transcrição do gene repórter GFP na região do domínio hipaxial dos somitos, mas não na porção epaxial, indicando que há uma especificidade tecidual regulando a atividade deste promotor (Figura 11). Esse resultado foi observado em oito dos 15 embriões eletroporados.

Esta especificidade poderia ocorrer devido à presença de um sítio de ligação para o fator transcricional Meis (identificado na sequência do promotor mínimo, Figura 10). Segundo KNOEPFLER *et al.* (1999), a presença de um complexo Pbx-Meis dirige a especificidade e aumenta a potência de outros ativadores transcricionais. Em alguns casos, a ativação de um *enhancer* só é possível na presença do fator de ligação quando o complexo Pbx-Meis está presente, restringindo sua atividade às células que possuam ambos em determinado contexto (KNOEPFLER *et al.* 1999). O complexo Pbx-Meis é necessário para a ativação do gene da Miogenina, pelo fator miogênico MyoD. Estudos sugerem que a interação entre Pbx-Meis e MyoD/E12 no promotor da Miogenina facilita a ligação do MyoD à um E-box imperfeito (não-canônico), crucial para a miogênese, e permite o recrutamento dependente de MyoD de moléculas que remodelam a cromatina e subsequentemente estabilizem a ligação dos heterodímeros de MyoD/E12 ao promotor (HEIDT *et al.* 2007). Essa interação de MyoD e Pbx-Meis pode regular a transcrição de vários genes-alvo dos fatores miogênicos (KNOEPFLER *et al.* 1999), como é o caso da Miostatina. Esse evento poderia explicar o fato de que, apesar de ser considerado um alvo *downstream* ao MyoD (SPILLER *et al.* 2002), o padrão de expressão da Miostatina não coincide com aquele de MyoD. Poderíamos especular que o promotor da Miostatina necessita da interação de Pbx-Meis com MyoD para a sua correta ligação ao DNA, para, só então, poder ativar a transcrição.

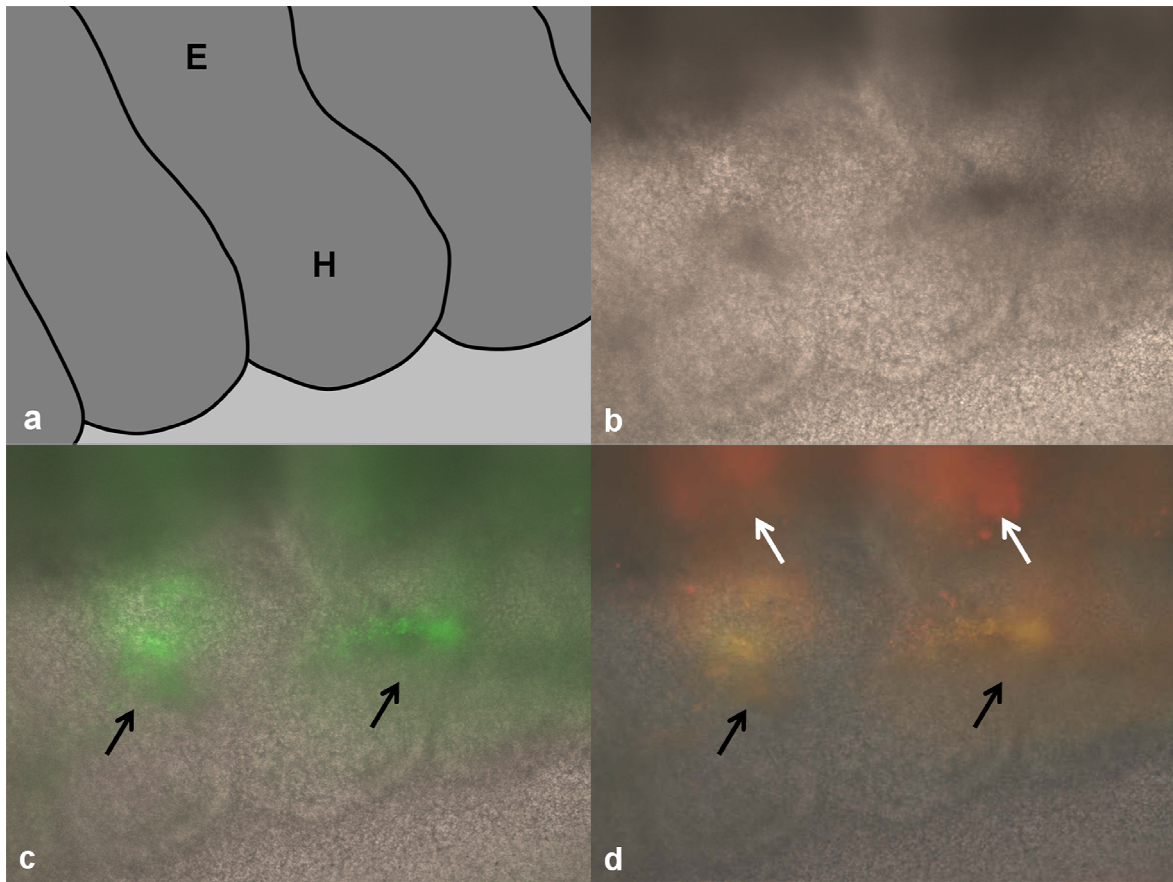


Figura 11 – Atividade do promotor mínimo do gene da Miostatina. **a:** diagrama representando a região dos três somitos que são mostrados na figura (H representa o domínio hipaxial; E representa o domínio epaxial) **b:** detalhe de três somitos na região entre membros de um embrião de galinha onde foi realizada a eletroporação (H – domínio hipaxial; E – domínio epaxial). **c:** o GFP mostra a atividade do promotor mínimo da Miostatina na região hipaxial dos somitos (setas pretas). **d:** sobreposição do GFP com o controle (RFP); regiões de sobreposição completa no domínio hipaxial aparecem em amarelo (setas pretas), regiões sem sobreposição no domínio epaxial em vermelho (setas brancas).

4.5. INFLUÊNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO MEDIADA POR cAMP NA ATIVIDADE DO PROMOTOR DA MIOSTATINA

Além do sítio TATA, o promotor da Miostatina possui ainda quatro sítios conservados (CREB, ATF1, NF-Y e CAAT), para a ligação de fatores de transcrição que possuem função na via de sinalização mediada por cAMP. CREB é o membro fundador da família CREB de fatores transcripcionais *Basic Leucine Zipper* (que inclui ATF-1 e CREM), que se ligam ao elemento responsivo a cAMP (CRE) como homodímeros ou heterodímeros e ativam a transcrição através da fosforilação por PKA (no sítio de regulação transcricional – Ser 133) (CHEN *et al.* 2005). A via clássica da sinalização mediada por cAMP é induzida por GPCR. GPCR é uma família de receptores transmembrana ligados à proteína G que transmitem 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 α da proteína G é hidrolisado; a subunidade se desassocia e regula a atividade da enzima adenil ciclase. Adenil ciclase ativada converte ATP em cAMP, que se liga e ativa uma enzima – proteína quinase A (PKA). A subunidade catalítica de PKA entra no núcleo e fosforila o fator de transcrição CREB, que ativa genes que contêm elementos responsivos a cAMP (POURQUIÉ 2005).

Estudos recentes demonstraram que a via de sinalização Wnt está envolvida na regulação dos genes miogênicos Myf5, MyoD e Pax3, sendo dependente da via de sinalização mediada por cAMP (CHEN *et al.* 2005). Segundo esse novo modelo, uma proteína Wnt se liga ao receptor Frizzled apropriado, ativando dessa forma uma proteína G associada, desencadeando assim a via de sinalização mediada por cAMP (Figura 12). Foi observado que a indução da miogênese é acompanhada pela fosforilação de CREB e que a inibição de PKA ou CREB bloqueia o início da miogênese. Sinais Wnt mostraram-se capazes de aumentar a ativação de genes que possuem CRE nas suas regiões promotoras (Myf5 e Pax3), entretanto ainda não se sabe se de maneira direta (CHEN *et*

al. 2005). A região *upstream* do gene da Miostatina analisado no presente estudo possui sítios de ligação conservados para CREB, além de sítios para outros genes que possuem função na via de sinalização mediada por cAMP. Essa evidência levanta a hipótese de que a Miostatina, assim como os fatores miogênicos (Myf5, MyoD) e Pax3, poderia estar sendo regulada pela via de sinalização responsiva a cAMP e, ainda, pelas proteínas Wnt.

Esta nova hipótese será avaliada em trabalhos futuros, com o intuito de verificar a resposta da atividade do promotor da Miostatina perante sinalização de cAMP e demais elementos de sua via de sinalização.

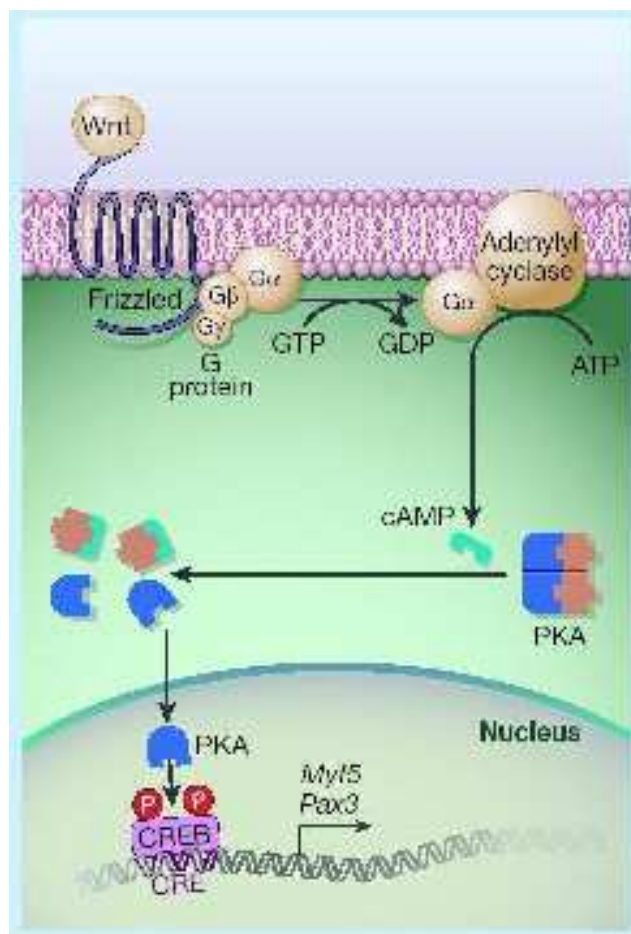


Figura 12 – Esquema da nova via de sinalização envolvendo as proteínas Wnt e cAMP, proposta por Pourquié, 2005.

4.6. ANÁLISE DE GENES COM REGIÕES REGULADORAS COM ESTRUTURA SEMELHANTE À MIOSTATINA

Uma arquitetura de sítios de ligação semelhante à aquela observada para o promotor mínimo da Miostatina já foi descrito por OSAWA *et al.* (1996), para o promotor do gene da *Hexocinase II (HKII)*. Hexocinases catalizam a fosforilação da glicose, dando início ao metabolismo celular da glicose (LEE & PEDERSEN 2003). HKII é o principal membro das hexocinases expressa em musculatura esquelética, coração e tecido adiposo, coincidindo com os principais locais de expressão da Miostatina. Além disso, a superexpressão da HKII serve como um marcador comum a diversos tipos de câncer, o que leva à um aumento nas taxas de catabolismo de glicose (LEE & PEDERSEN 2003).

O promotor da *HKII* contém um sítio TATA próximo ao sítio de início de transcrição, seguido por um sítio CRE, onde se ligam as proteínas CREB e ATF. Em seguida, há um sítio CCAAT e um sítio Y, onde o fator transcricional NF-Y se liga. Os sítios Y, CCAAT e CRE contribuem para a atividade basal do gene da *HKII*, e os sítios CCAAT e CRE possuem um papel importante na expressão induzida por cAMP (OSAWA *et al.* 1996). Devido a arquitetura semelhante e sítios de expressão concomitantes, é possível especular que o promotor mínimo da Miostatina funciona de uma maneira parecida ao promotor da *HKII*, responsiva ao estímulo da via de sinalização mediada por cAMP. Considerando essa similaridade de promotores, é de se esperar que ambas as moléculas sejam expressas no mesmo contexto. Isso poderia explicar o fato de que uma superexpressão da HKII é observada em pacientes com alguns tipos de câncer (LEE & PEDERSEN 2003), da mesma forma que a Miostatina se encontra aumentada na corrente sanguínea de pacientes que sofrem da caquexia que acompanha alguns tipos de câncer (JESPERSEN *et al.* 2006).

Com o intuito de identificar outras regiões regulatórias no genoma que apresentam uma arquitetura similar a aquela observada para o promotor mínimo da Miostatina, foi

realizada uma busca utilizando a ferramenta SynoR. Os sítios CREB, ATF, MEIS, NFY e FXR, não necessariamente nessa ordem, foram utilizados como isca. Um total de 44 regiões foram identificadas, presentes em UTRs, promotores, regiões intergênicas e codificadoras de diversos genes. Um estudo das funções de cada um desses genes foi realizado com auxílio da ferramenta *Online Mendelian Inheritance in Man* (OMIM), do banco de dados *National Center for Biotechnology Information* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Quando as informações contidas neste banco de dados não eram suficientes, foram realizadas buscas complementares no banco de dados PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para alguns genes não foram encontrados dados a respeito de suas funções. Os dados referentes à função desses genes estão dispostos na Tabela 1. A figura 13 mostra os principais genes agrupados de acordo com sua função.

Dentre os elementos regulatórios putativos identificados, quatro regiões estão localizadas próximas a genes relacionados ao metabolismo de glicose, semelhante à HKII; quatro outras regiões estão próximas a genes expressos no fígado e recentemente foi demonstrado que a Miostatina é expressa durante o desenvolvimento do fígado (SUNDARESAN *et al.* 2007); dois outros genes encontrados nessa busca codificam proteínas responsivas à estímulo hormonal e outro gene está envolvido na adipogênese e miogênese. Já foi demonstrado que o gene da Miostatina é responsivo à estímulo hormonal (MA *et al.* 2003) e que seus transcritos são também detectados durante o desenvolvimento do tecido adiposo (MCPHERRON *et al.* 1997). Isso indica que esses genes podem estar sob a influência da mesma rede molecular que regula a atividade da Miostatina.

Essa busca também identificou 19 genes localizados próximos a genes que são expressos no tecido nervoso. O desenvolvimento dos músculos e sua inervação são processos que devem ocorrer de maneira coordenada para que a mobilidade possa

ocorrer de forma apropriada. Dessa forma, não seria de se surpreender que o desenvolvimento dos tecidos nervoso e muscular esteja sob a influência de uma rede de sinalização comum e sincronizada.

O achado mais interessante dessa busca por elementos regulatórios com arquitetura similar ao promotor da Miostatina é a identificação de regiões próximas a 22 genes que estão envolvidos com o desenvolvimento da musculatura, especialmente esquelética, mas também cardíaca e lisa. Entre os genes que podem estar compartilhando uma regulação comum com a Miostatina estão os genes *Eya1* e *Dach1*. *Eya* e *Dach* são homólogos dos vertebrados dos genes de *Drosophila*, *eyes absent* e *dachshund*. Em insetos, eles fazem parte de uma rede molecular que determina a formação do olho de *Drosophila* e os respectivos homólogos de vertebrados fazem parte uma rede funcional similar que atua na diferenciação da musculatura de galinha. Em camundongos, *Eya1/2* e *Dach1/2* são coexpressos durante a formação dos somitos, antes da diferenciação muscular e seu sinergismo é mediado por CBP (*CRE Binding Protein*) (IKEDA *et al.* 2002). *Eya* também forma complexos com a proteína Six e atua *upstream* de Pax3, especificamente na miogênese hipaxial (GRIFONE *et al.* 2007). Pax3 é expresso no dermomiótomo e, conforme os somitos amadurecem, sua expressão é mantida alta no dermomiótomo hipaxial e nos progenitores miogênicos que migram dele (RELAIX & BUCKINGHAM 1999). Durante a formação do lábio hipaxial, Pax3 ativa c-MET, que promove a transição epitélio-mesênquima das células do dermomiótomo hipaxial, permitindo que elas ativem Lbx1 e migrem para seus destinos finais (GRIFONE *et al.* 2007). Interessantemente, *MET* é um dos genes localizados próximo a uma das regiões com arquitetura semelhante ao promotor mínimo da Miostatina.

Outro gene próximo a uma das regiões regulatórias putativas identificadas nesse estudo é *Meox2*. *Meox2* é um gene requerido para o desenvolvimento dos membros,

expresso nos somitos e botões de membros. Mutações nesse gene resultam em redução na massa muscular e ausência de músculos específicos (REIJNTJES *et al.* 2007).

A Musculina, ou MyoR, é um fator transcricional da família bHLH cujo gene está localizado próximo à uma região com arquitetura semelhante ao promotor mínimo da Miostatina. A Musculina é expressa predominantemente na musculatura esquelética em desenvolvimento e, assim como a Miostatina, atua como um repressor do desenvolvimento muscular. A Musculina é capaz de formar heterodímeros com as proteínas E. As proteínas E, quando heterodimerizadas com fatores miogênicos, se ligam aos E-boxes e ativam a transcrição de genes alvo (LASSAR *et al.* 1991). Heterodímeros MyoR/proteínas E se ligam aos E-boxes, impedindo a ligação dos heterodímeros MyoD/proteínas E, bloqueando assim a miogênese e a ativação de genes musculares dependentes de E-boxes (LU *et al.* 1999a).

Outro gene localizado próximo a uma das regiões identificadas pela busca do SynoR é o *IGF1* (*insulin-like growth factor 1*). A expressão estável desse gene em células C2C12 (mioblastos de camundongos) resulta na hipertrofia de miotubos diferenciados, mobilização de células satélite e uma mudança para um metabolismo glicolítico (SEMSARIAN *et al.* 1999). Camundongos *Mdx*, um modelo animal natural para a distrofia muscular de Duchenne, quando submetidos à superexpressão de *IGF1*, apresentam um aumento de pelo menos 40% na massa muscular, com redução na fibrose e mionecrose (BARTON *et al.* 2002). Portanto, IGF1 atua de maneira oposta à Miostatina, promovendo a hipertrofia muscular ao invés de preveni-la.

Juntos, esses resultados corroboram para a hipótese de uma correção desses genes, especialmente no domínio hipaxial dos somitos. Isso indica que a sinalização molecular que regula a atividade do promotor mínimo da Miostatina pode ser composta por uma rede geral, compartilhada, não só por genes envolvidos na miogênese, mas também em outros processos relacionados à atividade da Miostatina.

Essa hipótese será futuramente testada, através de ensaios de RT-PCR.

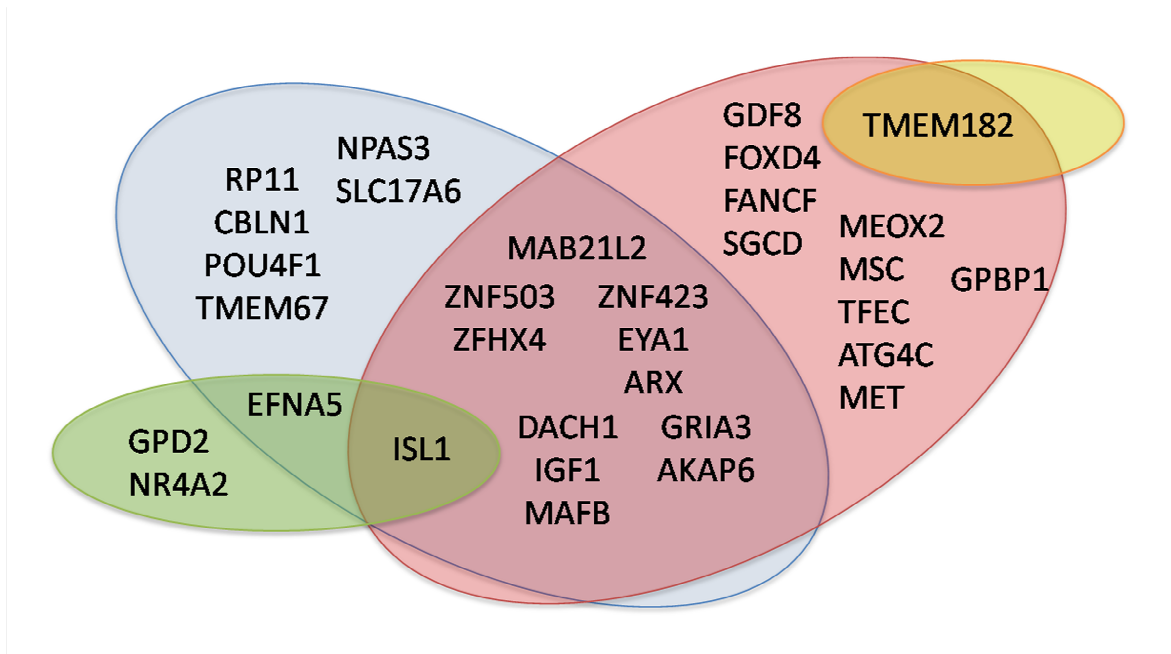


Figura 13 – Esquema dos principais genes com regiões regulatórias semelhantes ao promotor da Miostatina, agrupados de acordo com suas funções no Tecido Nervoso (em azul), Tecido Muscular (em rosa), Tecido Adiposo (em laranja) e Metabolismo de Glicose (em verde).

Tabela 1 – Relação dos genes com regiões reguladoras semelhantes à Miostatina.

Nome	Localização	Tipo	Função
KLF9	chr9:72218708-72218905	UTR	KRUPPEL-LIKE FACTOR 9 Proteína de interação com receptor de progesterona que modula processos celulares regulados pela isoforma A do receptor de progesterona no útero. A ablação desse gene resulta em hipoplasia uterina, número reduzido de filhotes devido a menos sítios de implantação e aumento no número de mortes neonatais. A superexpressão desse gene em células B de memória atrasou sua entrada na divisão celular e proliferação.
GDF8	chr2:190635749-190635840	Promotor	Miostatina
AK023445	chr10:76724647-76724845	Promotor	Próximo ao gene ZNF503 Expresso de maneira restrita durante a embriogênese de camundongo e galinha, com expressão particularmente dinâmica no desenvolvimento de membros, face, somitos e cérebro (MCGLINN <i>et al.</i> 2008).
ZFP2	chr5:178269406-178269569	Intron	
ZFHX4	chr8:77875193-77875452	Intron	ZINC FINGER HOMEBOX 4 O gene ZFH4 de murinos codifica uma proteína de homeodomínio “zinc finger” que é um fator transcricional expresso nos tecidos muscular e nervoso.
NPAS3	chr14:33158787-33159043	Intron	NEURONAL PAS DOMAIN PROTEIN 3 Pode desempenhar um grande papel na neurogênese. Pode controlar vias regulatórias relevantes à esquizofrenia e doenças psicóticas.
GPD2	chr2:157154972-157155249	Intron	DEHIDROGENASE GLICEROL-3-FOSFATO MITOCHONDRIAL 2 Está localizado na superfície externa da membrana mitocondrial interna e cataliza a conversão unidirecional de glicerol-3-fosfato (G-3-P) em dehidroxiacetona fosfato (DHAP) com redução concomitante de FAD. Junto com um GPD ligado a NAD citosólico (GPD1), GPD2 forma um veículo glicerol fosfato, que usa a interconversão de G-3-P e DHAP para transferir equivalentes reduzidos para a mitocôndria, resultando na reoxidação do NADH formado durante a glicólise. Sua atividade está reduzida em camundongos-modelo para diabetes não dependente de insulina.
GPC3	chrX:132880037-132880236	Intron	GLYPICAN 3 Proteoglicanos de sulfato heparina de superfície celular são compostos de uma proteína associada a membrana substituída com um número variável de cadeias de sulfato heparano. Membros da família de

			proteoglicanos integrais de membrana relacionados à <i>Glypican</i> (GRIPS) contém uma proteína no core ancorada à membrana citoplasmática via ligações glicosil fosfatidilinositol. Essas proteínas podem desempenhar um papel no controle da divisão celular e regulação do crescimento. Mutações de deleção nesse gene estão associadas com a síndrome Simpson-Golabi-Behmel. Camundongos nulos para GPC3 apresentam crescimento aumentado significativamente após o dia embrionário 12.5. Embriões entre os dias 10.5 e 13.5 apresentam sinalização por Hedgehog aumentada.	
FRMD5	chr15:41968985-41969120	Intron		
ESRRG	chr1:214803252-214803389	Intron	ESRRG Receptor gama relacionado com estrogênio. Receptor órfão. Se liga especificamente à um elemento responsivo à estrogênio e ativa genes repórter controlados por elementos responsivos à estrogênio.	
DKFZp686K03100	chr4:151672716-151672859	Intron	LRBA LPS-RESPONSIVE VESICLE TRAFFICKING, BEACH AND ANCHOR CONTAINING. Pacientes com síndrome de Chediak-Higashi sofrem de uma imunodeficiência sistêmica envolvendo defeitos no tráfico polarizado de vesículas em um número de tipos celulares do sistema imune. Em camundongo, essa síndrome é reproduzida em variedades com uma mutação no gene “<i>beige</i>” que resulta em proteínas com ausência de domínio BEACH (<i>Beige</i> e CHS1) e repetições C-terminal WD. LRBA contém características chave de ambas as proteínas âncora <i>beige</i>/CHS1 e A quinase.	MAB21L2 Os genes Mab21l1 e Mab21l2 são expressos no embrião em territórios parcialmente sobrepostos do cérebro, olho e membros, bem como em derivados das cristas neurais.
DKFZp586K0717	chr4:54576661-54576932	Intron	Dentro da região codificadora de CHIC2 - CYSTEINE-RICH HYDROPHOBIC DOMAIN 2.	

			A proteína codificada tem um motivo hidrofóbico rico em cisteína (CHIC), e está localizada em estruturas vesiculares e na membrana plasmática. Esse gene está associado com alguns casos de leucemia mielóide aguda.	
CBWD2	chr2:113930867-113931143	Intron	CBWD2 MEMBRO 2 DA FAMÍLIA COBALAMIN SYNTHETASE W DOMAIN	Próximo ao gene FOXD4-LIKE 1
CBWD1	chr9:150173-150385	Intron	Dentro da região codificadora de COBALAMIN SYNTHETASE W DOMAIN-CONTAINING PROTEIN 1	Dentro da região codificadora de FOXD4 É um fator transcricional da família dos genes <i>Forkhead</i> . Análises por <i>Northern blot</i> revelaram a presença de seu transcrito na maioria dos tecidos, principalmente no coração e musculatura esquelética.
BNC2	chr9:16439295-16439547	Intron	BNC2 <i>Basonuclin 2</i> . Provável fator de transcrição específico para queratinócitos da pele. Pode desempenhar um papel na diferenciação de espermatozóides de oócitos. Transcritos expressos em níveis mais elevados no ovário, rins e pele.	
BC032407	chr2:156663423-156663662	Intron	NR4A2 Os membros da família NR4A de receptores nucleares órfãos independentes de ligação são mediadores <i>downstream</i> da ação do cAMP no controle hormonal da gliconeogênese.	Próximo ao GPD2
ZNF536(53.6kb)<->BC040412(295.4kb)	chr19:35794399-35794580	Intergênico	ZNF536	
TMEM182(971.6kb)<->CR609970(264.3kb)	chr2:103771922-103772123	Intergênico	TMEM182 O tecido adiposo branco é o sítio mais importante de expressão dos transcritos de TMEM182. Sofre uma dramática regulação positiva durante a adipogênese e miogênese <i>in vitro</i> sugerindo que TMEM182 pode ter função em vias intracelulares importantes desses dois tipos celulares (WU & SMAS 2008).	
SPATA8(377.5kb)<->BC024169(373.7kb)	chr15:95507352-95507514	Intergênico	SPATA8	
SLC17A6(136.8kb)<->FANCF(106.1kb)	chr11:22494394-22494518	Intergênico	SOLUTE CARRIER FAMILY 17 (SODIUM PHOSPHATE	FANCONI ANEMIA, COMPLEMENTATION GROUP F.

			COTRANSPORTER), MEMBER 6 Expresso predominantemente no cérebro adulto e fetal. A hibridação <i>in situ</i> de fatias de cérebro de camundongo mostrou expressão em regiões ricas em neurônios do córtex cerebral, hipocampo, hipotálamo e tálamo.	Mutações nesse gene, ou em algum dos membros dessa família, levam ao quadro de anemia Fanconi. Essa doença é uma desordem autossomal recessiva que afeta os elementos da medula óssea e está associada com malformações cardíacas, renais, e de membros e modificações na pigmentação da derme.
PARP8(343.5kb)<->CR604031(190.9kb)	chr5:50517405-50517739	Intergênico	PARP8 FAMÍLIA POLY (ADP-RIBOSE) POLYMERASE, MEMBRO 8.	Próximo a ISL1 Camundongos nulos para o gene <i>Isl1</i> exibem retardo no crescimento no dia embrionário 9.5 e morrem no dia 10.5. Os corações desses camundongos são severamente anormais. A expressão de <i>Isl1</i> define populações celulares progenitoras cardíacas e é necessária para o desenvolvimento e a assimetria normal do coração. Além disso, a proteína codificada por esse gene desempenha um papel importante na embriogênese das ilhotas pancreáticas de Langerhans e em embriões de camundongo, uma deficiência desse gene resulta na falha na diferenciação de neurônios motores do tubo neural.
NXPH1(447.8kb)<->NR_002790(433.3kb)	chr7:9206870-9207095	Intergênico	NXPH1 NEUREXOPHILIN 1; NXPH1 Membro da família de glicoproteínas neuronais, entretanto não é observada no cérebro, mas sim no baço.	
NR_000039(353.3kb)<->EFNA5(1927.1kb)	chr5:104816987-104817182	Intergênico	EFNA5 Células da ilhota pancreática de camundongos que não expressam <i>Efna5</i> têm aumento na secreção basal de insulina e não secretam insulina em resposta à estimulação da glicose. Além disso, <i>Efna5</i> é necessário para a orientação apropriada de axônios no cérebro.	
MRPL22(283.7kb)<-	chr5:154610418-	Intergênico	MITOCHONDRIAL	SARCOGLYCAN, DELTA

>SGCD(504.6kb)	154610663		RIBOSOMAL PROTEIN L22 MRPL22 é um dos mais de 70 componentes protéicos dos ribossomos mitocondriais que são codificados pelo genoma nuclear.	Relacionado à distrofia muscular e cardiomiopatia, forma um complexo protéico que promove ligação estrutural entre o citoesqueleto subsarcolemal e a matrix extracelular de células musculares.
MEOX2(79.1kb)<->BC047638(444.4kb)	chr7:15771926-15772242	Intergênico	MESENCHYME HOMEBOX 2 Meox2 é um importante regulador da miogênese de membros dos vertebrados. Camundongos nulos para Meox2 têm defeito no desenvolvimento da musculatura dos membros, caracterizada por uma redução na massa muscular e eliminação de músculos específicos. Meox2 não é necessário para a migração de precursores miogênicos até o broto do membro, mas é essencial para a regulação normal de genes miogênicos, como Pax3 e Myf5, mas não MyoD.	
ISL1(1204.6kb)<->PELO(188.4kb)	chr5:51930962-51931162	Intergênico	ISL LIM HOMEBOX 1	DROSOPHILA HOMOLOG OF PELOTA Camundongos nulos para Pelo não sobrevivem além do dia 7.5 do desenvolvimento embrionário, devido à um defeito na proliferação celular, supostamente por falta de estabilidade genômica, uma vez que observa-se um aumento significativo no número de células aneuplóides.
IGF1(76.2kb)<->PAH(281.4kb)	chr12:101474636-101474799	Intergênico	INSULIN-LIKE GROWTH FACTOR I Estimula a hipertrofia da musculatura esquelética e uma mudança para um metabolismo glicolítico. Camundongos mdx, modelo para a distrofia muscular de Duchenne, com superexpressão de Igf1, tiveram aumento de massa muscular, geração de força, fibrose reduzida e redução na mionecrose. Camundongos nulos para Igf1 apresentam	PHENYLALANINE HYDROXYLASE Cataliza a hidroxilação de fenilalanina em tirosina, passo limitante no catabolismo de fenilalanina.

			também defeitos no desenvolvimento neurológico, indicando que Igf1 deve ter papel no crescimento axonal e mielinização.	
DUSP26(1229.7kb)<->UNC5D(405.6kb)	chr8:34806636-34806879	Intergênico		UNC5D Receptor transmembrana para netrin-1. Na ausência de netrin-1, UNC5 inicia a apoptose.
DHX35(599.1kb)<->MAFB(1046.7kb)	chr20:37700924-37701191	Intergênico		V-MAF MUSCULOAPONEUROTIC FIBROSARCOMA ONCOGENE FAMILY, PROTEIN B; MAFB Análises de <i>Northern blot</i> detectam expressão ubíqua de MAFB. Um transcrito de 3.0 kb aparece em todos os tecidos analisados, e um transcrito de 1.8 kb é expresso predominantemente na medula óssea e na musculatura esquelética, com baixa expressão no coração. Mutações no MAFB de murinos são responsáveis pelo mutante Kreisler, um defeito no desenvolvimento no cérebro.
DACH1(565.3kb)<->LOC440145(275.6kb)	chr13:71904601-71904852	Intergênico	DACHSHUND, DROSOPHILA, HOMOLOG OF, 1; DACH1 Análises de <i>Northern blot</i> mostram transcritos de DACH expressos mais abundantemente nos rins, coração, fígado, músculo esquelético e placenta de indivíduos adultos, com expressão mais baixa no cérebro, baço, pulmão e leucócitos periféricos. Durante o desenvolvimento de camundongos, DACH1	Perto de RETINITIS PIGMENTOSA 11; RP11 Relacionado com defeitos visuais severos.

			aparece especificamente nos rins, olhos e botões de membros.	
CR614284(362.3kb)<->BC035112(108.3kb)	chr2:14178072-14178186	Intergênico		
CBLN1(46.8kb)<->C16orf78(45.2kb)	chr16:47919959-47920153	Intergênico	CEREBELLIN 1 PRECURSOR; CBLN1 Transcritos encontrados principalmente no cerebelo.	Perto de ZINC FINGER PROTEIN 423; ZNF423 RT-PCR ELISA de embriões detecta forte expressão no cérebro, pulmão, musculatura esquelética e ovário, expressão intermediária no coração, fígado, rins, pâncreas, baço e testículos. Em tecidos adultos de humano, <i>Northern blot</i> detecta transcritos no cérebro, pulmão, musculatura esquelética, coração, pâncreas e rins, mas não no fígado e na placenta.
C13orf7(120.6kb)<->RBM26(539.9kb)	chr13:78251955-78252176	Intergênico	Perto de POU DOMAIN, CLASS 4, TRANSCRIPTION FACTOR 1; POU4F1 Altamente expresso no desenvolvimento do sistema nervoso sensorial e em linhagens de linfócitos B e T.	
BC089453(397.4kb)<->FAM92A1(136.0kb)	chr8:94645679-94645977	Intergênico	Perto de TRANSMEMBRANE PROTEIN 67; TMEM67 Análises de PCR quantitativo em tempo real de tecidos embrionários humanos detectaram alta expressão de TMEM67 no cordão espinhal e níveis moderados no tecido adrenal, cérebro e rins.	
BC048982(220.2kb)<->MSC(73.4kb)	chr8:72842660-72842894	Intergênico	Perto de EYA1 - EYES ABSENT 1; EYA1 Envolvido na formação dos olhos, componentes do ouvido interno, rins. Além disso, foi observada expressão na musculatura esquelética de camundongos.	MUSCULIN; MSC Expresso em mioblastos não-diferenciados em cultura e é regulado negativamente durante a diferenciação. É também expresso especificamente na linhagem de musculatura esquelética entre os dias embrionários 10.5 e 16.5 da embriogênese de camundongo e é regulado negativamente durante o período subsequente de miogênese secundária.
BC039665(144.6kb)<->TFEC(107.6kb)	chr7:115254540-115254812	Intergênico	TRANSCRIPTION FACTOR EC; TFEC Possui uma estrutura de zíper de leucina e hélice-	

			volta-hélice básico, podendo se ligar à E-boxes.	
ATG4C(133.6kb)<->BC040309(160.9kb)	chr1:63236265-63236430	Intergênico	AUTOPHAGY 4, S. CEREVISIAE, HOMOLOG OF, C; ATG4C Análises de <i>Northern blot</i> mostram transcritos em muitos tecidos, com maior expressão na musculatura esquelética, coração, fígado e testículos, além de algumas linhagens de tumores.	Perto de FOXD3 - FORKHEAD BOX D3; FOXD3 Expresso durante a embriogênese inicial, no epiblasto e mais tarde em células da crista neural. É um marcador de linhagens de células tronco humanas. FOXD3 não é expresso em oócitos não fertilizados ou embriões fertilizados com apenas uma célula, mas é expresso em estágios de blastocisto. Camundongos nulos para FOXD3 morrem após a implantação, no dia 6.5 pós coito.
ARX(191.2kb)<->MAGEB18(931.2kb)	chrX:25134940-25135218	Intergênico	ARISTALESS-RELATED HOMEODOMAIN, X-LINKED; ARX ARX é expresso predominantemente no cérebro e musculatura esquelética de feto e adulto. Está associado a alguns tipos de retardo mental.	
MET	chr7:116202209-116202395	Região codificadora	MET PROTOONCOGENE; MET Está envolvido no desenvolvimento da musculatura, do fígado e da placenta.	
MAGI1	chr3:65390553-65390840	Região codificadora	MAGI-1 está presente em junções de aderência, onde funciona como um suporte estrutural e de sinalização. Durante a apoptose, MAGI-1 é clivado por caspases, permitindo o desmanche das junções celulares, uma das características chave da apoptose.	
GRIA3	chrX:122427113-122427431	Região codificadora	GLUTAMATE RECEPTOR, IONOTROPIC, AMPA 3; GRIA3 Receptores de glutamato mediam a maioria das neurotransmissões excitatórias no cérebro de mamíferos e também participam em processos de plasticidade sináptica e eficácia no aprendizado e memória. Mutações no gene GRIA3 resultam em deficiências na musculatura.	
DKFZp686D0972	chr5:56813684-56813816	Região codificadora	Perto de GC-RICH PROMOTER-BINDING PROTEIN 1; GBBP1 Expressão em diversos tecidos, especialmente nas células da musculatura lisa vascular, ovários, aorta. Gbbp é um fator nuclear que pode formar complexos com proteínas de ligação ao sítio TATA.	
DCUN1D3	chr16:20778801-20778964	Região codificadora	DCN1, DEFECTIVE IN CULLIN NEDDYLYATION 1, DOMAIN CONTAINING 3 Expresso em diversos tecidos tumorais, envolvido na regulação do ciclo celular e na sobrevivência celular (MA <i>et al.</i> 2008).	

AKAP6	chr14:32362962-32363154	Região codificadora	A-KINASE ANCHOR PROTEIN 6; AKAP6 Expressão elevada na musculatura cardíaca e esquelética, além de certas áreas do cérebro, incluindo cerebelo, hipocampo, córtex frontal e córtex motor. Está envolvido na via de sinalização mediada por cAMP.
--------------	-------------------------	---------------------	---

5) CONCLUSÕES

5) CONCLUSÕES

- A região dos três exons do gene da Miostatina é bastante conservada entre humano, camundongo e galinha. Entretanto, a região dos introns possui identidade de sequência apenas entre os mamíferos, indicando que deve haver elementos reguladores específicos para essa ordem nessa região.
- Nas regiões intergênicas adjacentes à região codificadora do gene da Miostatina há regiões evolutivamente conservadas entre homem, camundongo e galinha. Essas regiões representam fortes candidatos a regiões reguladoras, por terem sido conservadas por tanto tempo.
- *Downstream* ao gene da Miostatina há sete regiões que foram evolutivamente mantidas desde a galinha até o homem e essas regiões possuem diversos sítios de ligação para fatores transcricionais que também foram conservados. As funções desses fatores transcricionais mostram que esses elementos devem regular a atividade do gene da Miostatina de maneira modular, havendo *enhancers* especificamente envolvidos na sua regulação durante o desenvolvimento da musculatura esquelética e outros utilizados em outros momentos.
- *Upstream* ao gene da Miostatina há apenas uma região que foi evolutivamente conservada desde a galinha até o homem (chr2:190635656-190635915). Devido à sua posição e à presença de um sítio TATA, essa região possivelmente representa o promotor mínimo do gene da Miostatina. Essa hipótese foi validada através de experimentos de eletroporação, que mostraram que essa região é capaz de dirigir a transcrição de um

gene repórter em um contexto de somito hipaxial, mas não epaxial, indicando que o promotor mínimo da Miostatina atua de maneira específica.

- Na região do promotor, foram encontrados sítios de ligação para proteínas envolvidas na via de sinalização mediada por cAMP, indicando que o gene da Miostatina, assim como alguns fatores miogênicos, deve estar sob influência dessa via.
- Foram identificadas 44 regiões no genoma humano que possuem arquitetura semelhante a aquela observada no promotor mínimo da Miostatina. Essas regiões se encontram em porções intergênicas, promotores, introns e seqüências codificadoras de genes que estão envolvidos em diversas funções no organismo, principalmente na miogênese e a neurogênese. Esses genes, assim como a Miostatina, podem estar sofrendo influência da via de sinalização mediada por cAMP.

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMED, U. A., CHENG, L. & DIETRICH, S. Establishment of the Epaxial–Hypaxial Boundary in the Avian Myotome. *Developmental Dynamics*, **235**:1884–1894, 2006.
- ALLEN, D. L. & UNTERMAN, T. G. Regulation of myostatin expression and myoblast differentiation by FoxO and SMAD transcription factors. *Am J Physiol Cell Physiol*, **292**: 188-199, 2007.
- ALLISTON, T., KO, T. C., CAO, Y., LIANG, Y. Y., FENG, X. H., CHANG, C. & DERYNCK, R. Repression of bone morphogenetic protein and activin-inducible transcription by Evi-1. *J Biol Chem*, **280**:24227-37, 2005.
- ALVARES, L.E., SCHUBERT, F.R., THORPE, C., MOOTOOSAMY, R.C., CHENG, L., PARKYN, G., LUMSDEN, A. & DIETRICH, S. Intrinsic, *Hox*-Dependent Cues Determine the Fate of Skeletal Muscle Precursors. *Developmental Cell*, **5**: 379–390, 2003.
- AMTHOR, H., HUANG, R., MCKINNELL, I., CHRIST, B., KAMBADUR, R., SHARMA, M. & PATEL, K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Developmental Biology*, **251**: 241-257, 2002.
- AMTHOR, H., MACHARIA, R., NAVARRETE, R., SCHUELKE, M., BROWN, S. C., OTTO, A., VOIT, T., MUNTONI, F., VRBÓVA, G., PARTRIDGE, T., ZAMMIT, P., BUNGER, L. & PATEL, K. Lack of myostatin results in excessive muscle growth but impaired force generation. *PNAS*, **104** (6): 1835-1840, 2007.
- BARTON, E.R., MORRIS, L., MUSARO, A., ROSENTHAL, N. & SWEENEY, H. L. Muscle-specific expression of insulin-like growth factor I counters muscle decline in mdx mice. *J. Cell Biol*, **157**: 137-147, 2002.
- BASSON, C. T., BACHINSKY, D. R., LIN, R. C., LEVI, T., ELKINS, J. A., SOULTS, J., GRAYZEL, D., KROUMPOUZOU, E., TRAILL, T. A., LEBLANC-STRACESKI, J., RENAULT, B., KUCHERLAPATI, R., SEIDMAN, J. G. & SEIDMAN, C. E. Mutations in

human cause limb and cardiac malformation in Holt-Oram syndrome. *Nature Genet*, **15**: 30-35, 1997.

BRENT, A. E. & TABIN, C. J. Developmental regulation of somite derivatives: muscle, cartilage and tendon. *Curr Opin Genet Dev*, **12**:548-57, 2002.

CALELLA, A. M., NERLOV, C., LOPEZ, R. G., SCARRETTA, C., VON BOHLEN UND HALBACH, O., BERESHCHENKO, O. & MINICHELLO, L. Neurotrophin/Trk receptor signaling mediates C/EBPalpha, -beta and NeuroD recruitment to immediate-early gene promoters in neuronal cells and requires C/EBPs to induce immediate-early gene transcription. *Neural Develop*, **2**:4. 2007.

CHEN, A. E., GINTY, D. D. & FAN, C. Protein kinase A signaling via CREB control myogenesis induced by Wnt proteins. *Nature*, **433**: 317-322, 2005.

CLOP, A., MARCQ, F., TAKEDA, H., PIROTTIN, D., TORDOIR, X., BIBE, B., BOUIX, J., CAIMENT, F., ELSER, J-M., EYCHENNE, F., LARZUL, C., LAVILLE, E., MEISH, F., MILENKOVIC, D., TOBIN, J., CHARLIER, C. & GEORGES, M. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. *Nature Genetics*, **38** (7): 813-818, 2006.

DAVIES, J., BADIANI, P. & WESTON, K. Cooperation of Myb and Myc proteins in T cell lymphomagenesis. *Oncogene*, **18**:3643-7, 1999.

DIETRICH, S., SCHUBERT, F. R., HEALY, C., SHARPE, P. T. & LUMSDEN, A. Specification of the hypaxial musculature. *Development*, **125**: 2235-2249, 1998.

DU, R., CHEN, Y. F., NA. X. R., YANG, X. Y., MA, Y., ZHANG, L., YUAN, X. L., CHEN, L. M. & QIN, J. Cloning and sequence analysis of myostatin promoter in sheep. *DNA Seq*, **16** (6): 412-7, 2005.

DU, R., NA, X., CHEN, Y. & QIN, J. Some motifs were important for myostatin transcriptional regulation in sheep (*Ovis aries*). *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, **40** (4): 547-553, 2007.

GRIFONE, R., DEMIGNON, J., GIORDANI, J., NIRO, C., SOUIL, E., BERTIN, F., LACLEF, C., XU, P-X. & MAIRE, P. Eya1 and Eya2 proteins are required for hypaxial somitic myogenesis in the mouse embryo. *Developmental Biology*, **302**: 602–616, 2007.

GRÜNDEMANN, D., GORBOULEV, V., GAMBARYAN, S., VEYHL, M. & KOEPESELL, H. Drug excretion mediated by a new prototype of polyspecific transporter. *Nature*, **372**:549-52, 1994.

GU, Z., Zhang, Y., Shi, P., Zhang, Y-P., Zhu, D. & Li, H. Comparison of avian myostatin genes. *Animal Genetics*, **35**: 462–504, 2004.

HACKER, A. & GUTHRIE, S. A distinct developmental programme for the cranial paraxial mesoderm in the chick embryo. *Development*, **125**:3461-72, 1998.

HAMBURGER, V. & HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morphol*, **88**: 49-92, 1951.

HEIDT, A.B., ROJAS, A., HARRIS, I.S. & BLACK, B.L. Determinants of Myogenic Specificity within MyoD Are Required for Noncanonical E Box Binding. *Molecular and Cellular Biology*, **27**: 5910–5920, 2007.

HEINE, P. A., TAYLOR, J. A., IWAMOTO, G. A., LUBAHN, D. B. & COOKE, P. S. Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc. Nat. Acad. Sci*, **97**: 12729-12734, 2000.

HEWITT, J. E., CLARK, L. N., IVENS, A. & WILLIAMSON, R. Structure and sequence of the human homeobox gene HOX7. *Genomics*, **11**: 670-678, 1991.

HIROI, Y., KUDOH, S., MONZEN, K., IKEDA, Y., YAZAKI, Y., NAGAI, R. & KOMURO, I. Tbx5 associates with Nkx2-5 and synergistically promotes cardiomyocyte differentiation. *Nat Genet*, **28**:276-80, 2001.

IKEDA, K., WATANABE, Y., OHTO, H. & KAWAKAMI, K. Molecular Interaction and Synergistic Activation of a Promoter by Six, Eya, and Dach Proteins Mediated through CREB Binding Protein. *Molecular and Cellular Biology*, **Oct**: 6759–6766, 2002.

JAEGLE, M., GHAZVINI, M., MANDEMAKERS, W., PIIRSOO, M., DRIEGEN, S., LEVAVASSEUR, F., RAGHOENATH, S., GROSVELD, F. & MEIJER, D. The POU proteins Brn-2 and Oct-6 share important functions in Schwann cell development. *Genes Dev*, **17**:1380-91, 2003.

JESPERSEN, J., KJAER, M. & SCHJERLING, P. The possible role of myostatin in skeletal muscle atrophy and cachexia. *Scand J Med Sci Sports*, **16**:74-82, 2006.

JOULIA, D., BERNARDI, H., GARANDEL, V., RABENOELINA, F., VERNUS, B. & CABELLO, G. Mechanisms involved in the inhibition of myoblast proliferation and differentiation by myostatin. *Experimental Cell Research*, **286**: 263-275, 2003.

JOULIA-EKAZA, D. & CABELLO, G. The myostatin gene: physiology and pharmacological relevance. *Current Opinion in Pharmacology*, **7**: 1-6, 2007.

JUNG, P., MENSSEN, A., MAYR, D. & HERMEKING, H. AP4 encodes a c-MYC-inducible repressor of p21. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**:15046-51, 2008.

KAMEI, Y., MIURA, S., SUZUKI, M., KAI, Y., MIZUKAMI, J., TANIGUCHI, T., MOCHIDA, K., HATA, T., MATSUDA, J., ABURATANI, H., NISHINO, I. & EZAKI, O. Skeletal Muscle FOXO1 (FKHR) Transgenic Mice Have Less Skeletal Muscle Mass, Down-regulated Type I (Slow Twitch/Red Muscle) Fiber Genes, and Impaired Glycemic Control. *The Journal of Biological Chemistry*, **279**: 41114–41123, 2004.

KNOEPFLER, P.S., BERGSTROM, D.A., UETSUKI, T., DAC-KORYTKO, I., SUN, Y.H., WRIGHT, W.E., TAPSCOTT, S.J. & KAMPS, M.P. A conserved motif N-terminal to the DNA-binding domains of myogenic bHLH transcription factors mediates cooperative DNA binding with Pbx-Meis/Prep1. *Nucleic Acids Research*, **27**: 3752-3761, 1999.

LASSAR, A.B., DAVIS, R.L., WRIGHT, W.E., KADESCH, T., MURRE, C., VORONOVA, A., BALTIMORE, D. & WEINTRAUB, H. Functional activity of myogenic HLH proteins requires hetero-oligomerization with E12/E47-like proteins in vivo. *Cell*, 6: 305-15, 1991.

LE CAM, L., LACROIX, M., CIEMERYCH, M. A., SARDET, C. & SICINSKI, P. The E4F protein is required for mitotic progression during embryonic cell cycles. *Mol Cell Biol*, **24**:6467-75, 2004.

LEE, M.G. & PEDERSEN, P.L. Glucose Metabolism in Cancer: Importance of transcription factor-DNA interactions within a short segment of the proximal regions of the type II hexokinase promoter. *The Journal of Biological Chemistry*, 278: 41047–41058, 2003.

LEE, S. & MCPHERRON, A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *Proceedings of National Academy of Science (USA)*, **98**: 9306-9311, 2001.

LEE, S-J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, **20**: 61-86, 2004.

LEVANTINI, E., GIORGETTI, A., CERISOLI, F., TRAGGIAI, E., GUIDI, A., MARTIN, R., ACAMPORA, D., APLAN, P. D., KELLER, G., SIMEONE, A., ISCOVE, N. N., HOANG, T. & MAGLI, M. C. Unsuspected role of the brain morphogenetic gene Otx1 in hematopoiesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**:10299-303. 2003.

LIGON, A. H. & MORTON, C. C. Leiomyomata: heritability and cytogenetic studies. *Hum Reprod Update*, **7**:8-14, 2001.

LIU, H., LI, Q., YANG, X., LIU, L., LIU, L., NA, X. & CHEN, Y. Expression of basic fibroblast growth factor results in the decrease of myostatin mRNA in murine C2C12 myoblasts. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, **38** (10): 697-703, 2006.

LU, J., WEBB, R., RICHARDSON, J.A. & OLSON, E.N. MyoR: A muscle-restricted basic helix–loop–helix transcription factor that antagonizes the actions of MyoD. *Developmental Biology*, 96: 552–557, 1999a.

LU, M. F., PRESSMAN, C., DYER, R., JOHNSON, R. L. & MARTIN, J. F. Function of Rieger syndrome gene in left-right asymmetry and craniofacial development. *Nature*, **401**: 276-278, 1999b.

LUO, J., SLADEK, R., CARRIER, J., BADER, J.-A., RICHARD, D. & GIGUERE, V. Reduced fat mass in mice lacking orphan nuclear receptor estrogen-related receptor-alpha. *Molec. Cell Biol*, **23**: 7947-7956, 2003.

MA, K., MALLIDIS, C., ARTAZA, J., TAYLOR, W., GONZALES-CADAVID, N. & BHASIN, S. Characterization of 5'-regulatory region of human myostatin gene: regulation by dexamethasone in vivo. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **281**: E1128-E1136, 2001.

MA, K., MALLIDIS, C., BHASIN, S. MAHABADI, V., ARTAZA, J., GONZALES-CADAVID, N., ARIAS, J. & SALEHIAN, B. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy is associated with upregulation of myostatin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, **285**: E363–E371, 2003.

MA, T., SHI, T., HUANG, J., WU, L., HU, F., HE, P., DENG, W., GAO, P., ZHANG, Y., SONG, Q., MA, D. & QIU, X. *DCUND*, a novel UVC-responsive gene that is involved in cell cycle progression and cell growth. *Cancer Sci*, **99**: 8-5, 2008.

MC FARLANE, C., LANGLEY, B., THOMAS, M., HENNEBRY, A., PLUMMER, E., NICHOLAS, G., MCMAHON, C., SHARMA, M. & KAMBADUR, R. Proteolytic processing of myostatin is auto-regulated during myogenesis. *Developmental Biology*, **283**: 58-69, 2005.

MCGLINN, E., RICHMAN, J. M., METZIS, V., TOWN, L., BUTTERFIELD, N. C., WAINWRIGHT, B. J. & CAROL WICKING, C. Expression of the NET family member *Zfp503* is regulated by hedgehog and BMP signaling in the limb. *Developmental Dynamics*, **237**:1172–1182, 2008.

MCPHERRON, A. C. & LEE, S.-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 12457–12461, 1997.

MCPHERRON, A. C., LAWIER, A. M. & LEE, S-J. Regulation of skeletal muscle mass by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, **387**: 83-90, 1997.

MOSHER, D. S., QUIGNON, P., BUSTAMANTE, C.D., SUTTER, N.B., MELLERSH, C.S., PARKER, H.G. & OSTRANDER, E.A. A Mutation in the Myostatin Gene Increases Muscle Mass and Enhances Racing Performance in Heterozygote Dogs. *PLoS Genetics*, **3**: 0779-0786, 2007.

NAKA, H., NAKAMURA, S., SHIMAZAKI, T. & OKANO, H. Requirement for COUP-TFI and II in the temporal specification of neural stem cells in CNS development. *Nat Neurosci*, **11**:1014-23, 2008.

NAKAZAKI, H., REDDY, A. C., MANIA-FARNELL, B. L., SHEN, Y. W., ICHI, S., MCCABE, C., GEORGE, D., MCLONE, D. G., TOMITA, T. & MAYANIL, C. S. Key basic helix-loop-helix transcription factor genes Hes1 and Ngn2 are regulated by Pax3 during mouse embryonic development. *Dev Biol*, **316**:510-23, 2008.

OHTAKA-MARUYAMA, C., MIWA, A., KAWANO, H., KASAI, M. & OKADO, H. Spatial and temporal expression of RP58, a novel zinc finger transcriptional repressor, in mouse brain. *J Comp Neurol*, **502**:1098-108, 2007.

OSAWA, H., ROBEY, R.B., PRINTZ, R.L. & GRANNER, D.K. 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, 1996.

POSTIGO, A. A. & DEAN, D. C. ZEB, a vertebrate homolog of Drosophila Zfh-1, is a negative regulator of muscle differentiation. *EMBO J*, **16**:3935-43, 1997.

POURQUIÉ, O. A new C anon. *Nature*, **433**: 208-209, 2005.

REIJNTJES, S., STRICKER, S. & MANKOO, B.S. A comparative analysis of Meox1 and Meox2 in the developing somites and limbs of the chick embryo. *Int. J. Dev. Biol*, **51**: 753-759, 2007.

RELAIX, F. & BUCKINGHAM, M. From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes Dev.*, 13: 3171-8, 1999.

SALERNO, M. S., THOMAS, M., FORBES, D., WATSON, T., KAMBADUR, R. & SHARMA, M. Molecular analysis of fiber type-specific expression of murine myostatin promoter. *Am J Physiol Cell Physiol*, **287**: 1031-1040, 2004.

SATO, F., KUROKAWA, M., YAMAUCHI, N. & HATTORI, M. Gene silencing of myostatin in differentiation of chicken embryonic myoblasts by small interfering RNA. *Am J Physiol Cell Physiol*, **291**: C538-C545, 2006.

SEMSARIAN, C., WU, M.-J., JU, Y.-K., MARCINIEC, T., YEOH, T., ALLEN, D.G., HARVEY, R.P. & GRAHAM, R.M. Skeletal muscle hypertrophy is mediated by a Ca(2+)-dependent calcineurin signalling pathway. *Nature*, 400: 576-581, 1999.

SPILLER, M. P., KAMBADUR, R., JEANPLONG, F., THOMAS, M., MARTYN, J. K., BASS, J. J. & SHARMA, M. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor myoD. *Molecular and Cellular Biology*, **Oct**: 7066-7082, 2002.

SUNDARESAN, N. R., SAXENA, V. K., SINGH, R., JAIN, P., SINGH, K. P., ANISH, D., SINGH, N., SAXENA, M. & AHMED, K. A. Expression profile of myostatin mRNA during the embryonic organogenesis of domestic chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Res Vet Sci*, **85**:86-91, 2007.

TAKATA, H., TERADA, K., OKA, H., SUNADA, Y., MORIGUCHI, T. & NOHNO, T. Involvement of Wnt4 signaling during myogenic proliferation and differentiation of skeletal muscle. *Developmental Dynamics*, **236**: 2800-2807, 2007.

TAMIMI, Y., EKUERE, U., LAUGHTON, N. & GRUNDY, P. WNT5A is regulated by PAX2 and may be involved in blastemal predominant Wilms tumorigenesis. *Neoplasia*, **10**:1470-80, 2008.

TANG, L., YAN, Z., WAN, Y., HAN, W. & ZHANG, Y. Myostatin DNA vaccine increases skeletal muscle mass and endurance in mice. *Muscle & Nerve*, **36**: 342-348, 2007.

TOBIN, J. F. & CELESTE, A. J. Myostatin, a negative regulator of muscle mass: implications for muscle degenerative diseases. *Current Opinion in Pharmacology*, **5**: 328-332, 2005.

WU, Y. & SMAS, C. M. Expression and regulation of transcript for the novel lineage. *BMC Research Notes*, **1**:85, 2008.

YOON, J.-B., LI, G. & ROEDER, R. G. Characterization of a family of related cellular transcription factors which can modulate human immunodeficiency virus type 1 transcription in vitro. *Molec. Cell. Biol*, **14**: 1776-1785, 1994.

YOSHIDA, S., KONO, K., LOWERY, D. M., BARTOLINI, S., YAFFE, M. B., OHYA, Y. & PELLMAN, D. Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science*, **313**:108-11, 2006.

YOSHIDA, T. MCAT elements and the TEF-1 family of transcription factors in muscle development and disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, **28**:8-17, 2008.

ZHU, X., TOPOUZIS, S., LIANG, L. & STOTISH R. Myostatin signaling through Smad2, Smad3 and Smad4 is regulated by the inhibitory Smad7 by a negative feedback mechanism. *Cytokine*, **26**: 262-272, 2004.

7) ANEXOS

7) ANEXOS

Anexo 1 – Sequências de nucleotídeos das Regiões Evolutivamente Conservadas, em humano, camundongo e galinha.

PROMOTOR
Humano (Chr2: 190635656-190635915) TAATGCATGTACAGTCTGAGAGACAACCTGCCACACCAGTGAATCTTTTATACTGTAT TCCAAGTGGCTTTTTATATTCCAACCTTAGATGAGACAAGTGTCTGTCAGGATCTATGAT TGGCTCTTGCTCCACAATGAATCTCGCTGTCAGAGGTTAAAACCCTGTCTGTCCCAA GTCACCAAGCAGTATTTTGTACAGTCAAGGGTGAGCTGATTCATTTGACTACTTCAT AAAAGAAATAAATCTACAAATAATAAAAG
Camundongo (Chr1: 53118271- 53118530) TAGTGCATGTACCGTCCGAGAGACAACCTGCCACGCCAGGGAGTCCTGTATACTGTA TTCCAAGTGGCTTTTTATATTCCAACCTTAGAGGAGACAAGTGTCTGTCAGGATCTATGA TTGGCTCCTGCTCCACAATGAATCTCGCTGTCAGAGGTTAAAACCCTGTCTGTGACA AGTCACCAAGCAGTATTTTGTACAGTCGAGGGCAAGCTGATTCATTTGACTACTTCA TAAATGAAATAAATCCCCAAATCATGAAAG
Galinha (Chr7: 198958 – 199212) TGACAGCAAATGCAATCTGAGAGACGGCTTGCCACACTGGTGTGCCTTATATATGCC AAGGGGGCTTTTATACTCCAACCTTGATTAGGCTCATGTCTGTCAAAACCGACGATTG GTTGTGTGCCCAACAATGAATCTAGCTGTCAGAGGTTAAAGCCCTGTGATCACAAG TCACTAGACAGCATTGTTGTTACAGCCAAGGGTGAAGTATTTATCTGGTGGCTTCGT AGAGGATACGTCTTCACATACTGAAAG
UTR5'
Humano (Chr2: 190629213-190630649) TAAAAATATACCAAAGTAAATAAAAAAGGAGACACTTATTTACAAAACAATATTGTATA CATATTATATAAATGCATTGTTTCAGTCTTTTTATACAATATTGATAGAGTCGATCATTT CTATTATTTTACCATAAAAACTGCAGTGTTGCAAAGGCAGTGTTGTAATTTTCCAAAGA CAAAATTACATACTTCTCCAAGTATGTTATTTTGACATTTTGATAAAAAACAAACACCATT TGACTGCCTTTTAAGATAATGCAGTTTCTCCAAGTATGCTACAGAATTGAAAGCCAAC CTCTAGAAAAATGATTCTTCTTACATTAAGAAAAATCCATTCTCATTGAGGTTGATG GAAAATGCACCTGAAGAAAAGAGAACTTACTATTTTACTGAATGTTTTTTATGTGATA AACCTGGTAGCCTCAGACATTGAGCCTATCGTATTAGCACCGTTGGCATGGATTGTT AATGTACTGTGTCAATTATAATAGGAATGGAAATTGCATATGCTGCACCATCCCTATTT TTGTGGAATTTTATCTTACCAAGTATACTACCATACAATATAAATTCAAGTGTTTAAGG ATGATTCGAATGATGGTATATAACAATCCTGCATTTTACCAATACTGTATGTGGATTTT TCTGTAAATATTAACAAAACCTTTAAAGAAATAGACTTTAAAGCATACTCCTTTAATTCA TCAGAACTCAAGGAGAATCGCTTTTCATTTCTCGCCGATGTTGTAATATATAGGAACA TAAATGTAATTTGATCTCCTTCTAGCTCAAAAACCTCTGGAAATCATAAACTTTCTTGT ATGATTTGTTTGGATGGTTAAATGCCAACCATGTCATATATTTCCCCCTTTTAGTTTACA TACTGTAGCTTATGCTTAAGTGACTGTAGCATACTCTAGGCCTATAGCCTGTGGTACT TAATTTACAGCTTCAAATTGTTGAGGGGAAAACCTTCCATGTTTTAGGAAGTTATG AACGCTTAATATAAATCTCATGAGCACCCACAGCGGTCTACTACCATCGCTGGAATTT TCCCATATATTATTTGTTCTTTGCCATTAAATATAGCATATTAATTGGAGACATCTTTG TGGGAGTACAGCAAGGGCCTGCTGAACCTCTGGGGTTTGCTTGGTGTACCAGATGA GTATGAGGATATTTTGTAAAAATACAAATTCACACTCTCCAGAGCAGTAATTGGCCT TATATCTTTTAGGAGCGATAATCCAATCCCATCCAAAAGCTTCAAATCCACAGTTAG

AGGGTAACGACAGCATCGTGATTCTGTTGAGTGCTCATCACAGTCAAGACCAAAATC
CCTTCTGGATCTTTTTGGTGTGTCTGTTACCTTGACCTCTAAAAACGGATTCTGTTG
AAAAGGAAAGAACAATCAGTAATATCAATAGG

Camundongo (**Chr1: 53123059- 53124435**)

TAAAAATATACCAAAGTAAATATAAAAAGGAGACACTTATTTACAAAACAATATTGTATA
CATATTATATAAATGTAATTGTTTCAGAGTCTTTTATACAATATTGATAGAACCAGTCAT
TTCCATTATTTTACCACAAAATTGCCATGTGATAAAGGCAGACAGTGATTTTGAAATTT
AGATTAAAAAATGAATACTGTTTGGCTGCCTTTTAAGATGCAGCAGTCACTCCCGCTG
TGCTAGAGTTGACTGAAAGTTGACCTCTAGAAAAAAGATTCTTCTTTCTTAAAGAA
AATGCATTGAACACTTAGTGCTGTGTGTGTGGAGATGCACCTGGAAGGGAGAGAGA
GACTCGTACTTTGTAGAGTGTTCTATCGAGAGGTCCAGTAGGAGCCATTGAGCACTG
CATTAGCACCGTGGTGGATTGTCCAATTATAATAGGAATGGCAATGTGTATGTAAGG
CCCCATTCTACTTTGTGGAATTTTATCTTACCAAGTATACAATACAAATATAAGTGTA
CATGATGTTTTTAAATGATAACAATCCTACACTTTACAAAGGCTACATATAGATTCTTC
CGTAAATATTAAGTGAACTGTTAGGAAATAAGACTTTACCTTTTAAATCATACCCTCCT
AACTCAGCAGACCACAAGATGTGCTCTCACTTCCTTGCCTAGATTGTAGTTGTAATAT
ACATATATGGACATAAATGTAATTTGATCTCCATCTATTTCAAAAACCTCTGGAAATCAT
ACAACATCCTATAGTATGTTTTATTTTGGTGGTTGAATGCCAACCATTGCATCTATTCT
CTCTTTTAGTTCATACACTGTAGCTTGTGCTTACGTTACTAGAGCATACTCAAGGCCT
ACAGCCTGTGGTGCTTGAATTCACAGTTTCGAAATTGAGGGGAAGACCTTCCATGAC
TTGGGAAATTTCTAACCTAATGCAAAGCTCATGAGCACCCACAGCGGTCTACTACCAT
GGCTGGAATTTTCCCATATATTATTTGTTCTTTGCCATTAAAATATAGCATATTAATGG
GAGACATTTTTGTGCGAGTGCAGCAAGGGCCTGCTGAGCCTCTGGGGTTTGCTTGG
TGCACAAGATGAGTATGCGGATATTTTTGTAAAAACAC
AAATTCACACTCTCCTGAGCAGTAATTGGCCTTATATCTTTTGGGTGCGATAATCCAG
TCCCATCCAAAGGCTTCAAATCGACCGTGAGGGGGTAGCGGCAGCACCGGGATTTC
CGTGGAGTGCTCATCGCAGTCAAGCCCAAAGTCTCTCCGGGACCTCTTGGGTGTGT
CTGTCACCTTGACTTCTAAAAAGGGATTCTGTGTGAAAAGGAAAGAACAATTATGTAA
ATAGAG

Galinha (**Chr7: 204840 – 205526**)

TAATGAATGTATACGAACAGATTAATAAATAAACATTTATTTACAAAATATTGATGCATA
CATATTACACAAGTCAGTTATATCAAAGTGGTTTTTAAACAATTTCTGTAGCAACCAAC
TATTTGCATTGGCTTATCATAGTGCAAACGGTAACGTTGCAAAGGCAGATTACGATAT
GGGATTATGGTTTGAACATCAGACTTCCGTGCTGCCTTTTGTTTTACTACGTTTAGAA
AACTATTCACCTTTTGTAAAAAATCCTTTTCTTGTGAATGTTGAATAGTGTACCT
GAGGATAGGGCAAATTCATTATTACTCTAAATTCTTCACTTAGATAACTATCTTTCTA
TTTACTCAGCCTGCTTACGTAGCACCATTGCCATTGATTACTAACATACTAACGAAAA
AAAGGAATGGAAACACGCTAAATACACTATACCATCCCTAACTTCAGGATTTGTCCAT
TTACGTGGAATTTTATCTTATCATAACTCTGCACTATATATTCAAGTGTTCAAGGATGA
TTCTGGTGGTAATGTGTAGTGGTGTATACGTTACCAGTATATATTTTGTGTAAATACA
ATATTAAGTGTAGCTGTGAAGAAGTTGATTTAATAGCCCGCTCCTTCTGTCCTCAGAG
GAGAAGGAGCTTACTTTTGATTACCAACATATGTTGAAAACCTGCATATAAATTTGTGTC
TGAATGACTGAATATTGATTCCCTCACAGTGTAAGAAACCCATTTGTAAATCCGGTG
ATTTTGATTGTAGCTTCTTTGTCCGTTGTTTCAAAGCCAGCCCTTAGGTAACCTCTACT
GTCTTTAAGTTCACATTCTGCAGCTCATGTTGTGATATATGTGGTCTGTACAGTTGTA
CAGTATATGGATGTTGGCAATGCCTAGCGTACGTAATTTACAGTTTCAAAGATGGAT
GAGGGGATATAGCTTTTTTTTTTGGTGGCTTCCACAATTTATCGAATGGTGGATCTCA
CGACAGCCTCATGAGCACCCGCAACGATCTACAACCATGGCTGGTATCTTTCCATAT
ATTATTTGTTCTTTTCCATTGAAATACAGCATGTTTATAGGGGACATCTTGGTGGGTGT
GCAGCAAGGGCCTGCTGAGCCTCTGGGATTTGCTTGGTGTACCAGGTGAGTGTGCG
GGTATTTCTGTAGAAACACAAATTTCGATTCTCCGGAGCAGTAATTGGCTTTGTATCT

TTTAGGTGCTATAATCCAGTCCCATCCAAAAGCTTCGAAATCCACTGTCAGCGGGTA GCGACAACATCGGGATTCCGTTGAGTGCTCATCACAGTCAAGGCCAAAATCTCTGCG GGACCGTTTTCGGTGTGTCTGTAACCTCTGACCTCTAAAATGGGTTCTGAGAGAAGAG GAAAAGGAATCGGAAGTATTAACAAG
REC 1
Humano (Chr2: 190625475-190625630) TTGAGAGGTAATGCCAAGGTTCTGAGTTCCACGGGAATACAGCCAAGAGACATTTGT CTTCTTAGACTTAGTGTCTGTGGGAGCGGACCTGAGAAAATCTTGTGGAGGATCTAT GGCCCAAACCGCATAATCAAATTTTGTCTGAATAGTGTCT
Camundongo (Chr1: 53126637- 53126794) TTGAAGGTAATGCCCAAATCCAGAGTTTCCTAGGAACAGAGCCAAGAGATATTTAGC TACTTAGCCAGACTTAATGTCCCTGGGAGCAGATCTGGAAAATGCTGTGCAGGATCT GAGGCCAAAACCGCATAAACAATTGTGTTGTGAATAAGGCCTT
Galinha (Chr7: 210742 – 210906) TGGAGGAGATGTTGCTAAATCTCTGACCAAGACCCATGGCAACACTGCCAGGGAACA ATTGGCTTCTGAATCAGTATTATGGTCCGTGGGAGCGGATCTGGGAAAGCCTCGTGA AGGCTGCATAGCCAAAACCGAATAATCACATTTGGTTCTAACTAAGCTCCT
REC 2
Humano (Chr2: 190605261-190605471) AAAATACTTAGGATTGGGAGTACTGGATGCCTCAGGGAATTGGTAATTTGATACAAAG CCTGTCACCTGTAAAATTTATCCTGGGTGAGTAGTGAATGAAATCATTATGACCTG ACAGGTGTTC
Camundongo (Chr1: 53142357- 53142473) AAAATACTTAGGATGGGGAGGGCGGGGGGAATTGTAATTTGACCCAAAGCCTGTC ACCTGTAAAATTTATCCCGGGTCAGAAGTGAATGAAACCATCAGCGCCGAACAGGT GTTC
Galinha (Chr7: 266139 – 266273) AAAAAAGTGATGGATGGGAAACTGGAAACCTCAGGGAATTAGTAATAGGATATAAAG CATTTACCTCTAGGTCACCAGTTCAAATTCACCAGGTTGGTAGTGACCAAAAGTAG TTACCATCTGGCAGCTGTTC
REC 3
Humano (Chr2: 190532492-190532751) TTTTCAAAAGTAAGTGCTACTATTGATACATTACTAGATTTTGCTGAGTAAAGCTCTTT CTACACACAAACATGTTGGCCACCTGCAACTGTTTGTGAGTGGACTTGGTTTGAGAA CACTAGTAGTAATTGTAACTTAGGAATGTGTGACAAGCTAACAGCCAGCTGTGCATA TCCTGACTTTTCCCAGGTGTTAAAATAAATATGACCATTTGGTTCACT
Camundongo (Chr1: 53180014 – 53180231) TTTGTAAGAGTGTTGAAGTTATTGACATGTACTTAGACCTGCTGGGTAAAGCTGCTC TGTCCAGAGCGTCTCACCACCTGCAACTGTTTGTGATTTCTTGGTTTGAGAACACCA GTAGTAATTGTAACTTAGGAATGTGTGACAAGCTAGCAGCCAGCTGTGTGCAGCCT GACTTTTCCAGGTGTTAAAATAAATATGACCATTTGGGGTTACG
Galinha (Chr7: 229690 – 229913) TCTACATATACAAGTGTTTCTATTGATACGTTATTTTTCTAAGATTTTGCTGAGTAAAG CTATTTCCACACAAGCATTTTGGCCATCTGCAACTGCTCGTCAGTGAGCCTGGTTTGA GAACACTGGTTGTAATTGTAACTCAGGAATGTGTGACCAGCTCGCAGCCAGCTGTG CATGCCCTGACTTTTCCCAGGTGTTAAGATCATGGCCACTTTTGTTCCT
REC 4

Humano (Chr2: 190508719-190508915) TTGTTCTTTAACTTTTAAATTTGTTGATCAAAAGATGTGTATAATATTAATAAATACATGC CAAGTAGGTTTGCTTCATGAATTTTACAGCATATAATAAATGAAAACCCTGGTGACCT TTTGGCCTTGTTGGTCACATGCATGAAGATGATTATCTGTTAATCTCTGC
Camundongo (Chr1: 53201453- 53201602) CTTAGCTGTTAACTGAACTGTGGATGAGCCAAAGCCAGCTCTCTGTAGCTCACTGC ATGGACTTATACCGTCGAGTGCACCTACCCCAACCCCATGACCTTTTGGTCTTTTGGAC CATATGCACAAAATGACCATCTGCTAATCTCAAC
Galinha (Chr7: 230906 – 231076) TTGTAACCTAACTTTGCAGTTTGTGACTTCAAGATACGTGCAATGTCTGAGAAATATA TGCCAAGTCTGCTTGCAATACGAGTTTTATAGCAAATAGTAAATTAACCGTAGTGA CCTTTTGGTCTTGCTGACCACGTGCATAAAGATGTTCTGTCGTAATCCCAGC
REC 5
Humano (Chr2: 190508161-190508330) GTGTTTTGGCATATTGTTGCTTGTTATAAGGAAGATTTAATAGCTTGTTTTGGACTATT AATATGAAGAGAAGTCATTTGGAGTTCAGACATATATTTAGAACTAGCACGTGTGCAA AAAGATACAAAGTGAATCAAGAAATTCTGGAAAAGATAGTTTGAAGAAAAGAA
Camundongo (Chr1: 53202032 – 53202139) ATATCTGTTTTATTGTTTGTGTTTAAAGAAAATTTAATAATTAATCATGGAATATTAATTTG GAGAGAAGTCATTTAGAGTTCAGATAGATATTAGAGCTGGTATATATGAAAAAAGAT ACAAAATTAATCAAGAAATTCAGGAAAAAAGTTATTTAAAGTAAGAAA
Galinha (Chr7: 231416 – 231587) GTATTTTGGCACAGAGCAGTTTGTGTAAGGAGGGTTTAATGGCTTGTTATGTCCTAT TTCTATAAACAGAAGTCATTTAGAGTTCAGCAGATATATTTAGAATCAGCATTTGTGCT GGTAGTTACAAGCTGAATAAAATTATCTCTGAAAAGCTCAATATGCAGAAGGGAA
REC 6
Humano (Chr2: 190486538-190487185) ATACGGAAATGAGGAGTAACTTTTATGTAAATGCCAAATTGGCACTTTACACCTGTT AGTGTGTTTCGTTTAGAACAGCTGTGTCTTTTATTATCAGTAAACAGATGCAGAAAGT AATGGAATGTTTTAAAGCAATATGTTAATCCTGTCTTCCACTACTGAACGTCTCACAA TATAGTGATTAAATATTGACTGTGCAGCTGTTACGTACAATTATAGAATTTCTTAGTTA ATTTCTCCTTC
Camundongo (Chr1: 53214628 – 53214870) AAAAGGAAATGAGGGGTAACCTTGACGTAAAGTGCCAGATTGGCACGTTACACCTGT TAGTGTACATCGTTTGAACAGCTGTGTCTTTTATTGTGAGTAAACAGATGCAGAACAA TACTGGAATGTTTTAAAGCAATATGTTAATCCTGCCTTCCCCTCCTGACCGTCTCACT GTGTAGTGATTAAATATTGGCTGGGCAGCTGTTACCCACAGCTATAGCATTGCTAGTT AATTTCTTCTTC
Galinha (Chr7: 234144 – 234388) AGGAGGAAATGGATGAGAATTATTGTTTTAAATCTCCAATGAATGGTTTACACCTGT TGATGTTACGTTTAGAACAGCTGTTTCTTTTATTATCAGTAAACAGATGCAGAAAGTAA TGGAATGTTTTAAAGCAATATGTTAATCCTGTCCCCAACTACTGAACATTCTCACAATC TCGTGATTAAATATTAATGTAATGCTGCTGTGTCATCTGCAGCTACAGAATTCTTAGGG TTTTCTCATTC
REC 7
Humano (Chr2: 190486567-190486860) TTGGATTAAATACATATGGCTATAGGTTAGCTGGAGCACTGATGAAAATAAATTGTAA GCTCAAACCTTCATTATCATTTGTAGCTTAAACATAGTGAATTTGATACAGTGTTACCTC ATAATTTTGTGCTCTTTGCAGTAAATTTGATATAGAACAGTTGCTAAAGAAACCCTGT TCAAATGTGTGACCATTTTTATGGAAAACATCTGGGGTAATTATAATTAGTTTCAGGAT

GTGTACTGTTTAAAAATAATCTTGAATTCATGGAGAATGAAGCATATCTTTTCCTTAGT G
Camundongo (Chr1: 53214950 – 53215224) TTGGTTTAAATATGAATGGCTGTAGGTAACTAAAGTACTGTGTCAAATAAATTACAA GCTCAAACCTTCATTTTTTTGGTTTAAGCACAGTGAAGTTGATACAATTCTTACTTCATAA TTTTGATGCTCTTTGCAGTGAATTTGATATAGAACATTTGCTAAAGATACCATTTTTTAT GGAAAACATCTGGGGTAATTATAATTAGTTCAGGATCTGTAGTGTTTGTTTTAAAAGC TGTTGAATTCATGGAGAAAGAAGCATCTTTTACATAATG
Galinha (Chr7: 234459 – 234797) TCGAATTAAGCACACATTGTTGCAGATGATTTGGAGGACTTATTTAAAGTAAATATACA ATTTCAAGCTCAATTATCATTCATAGTTTAACTACGCATAGTGAGGTATTAGGTCTGTG AATTTGATACAGTGTTACTTCATAATTATGATGCTTTTTTTACAGTAAATTTGATATAGA ACAGTTGCTAAAGGAAAGCTGCTGAATAGTGTGACCAAACATGTTATGGAACACATCT GGTGCATTAGTTCAGGATGTGCACTGCATAAGAACAGAGCCTCTAGCACAAAACGAG AAGGAAGCTAACTCCACATGTATAAGTTTTGTGGACATGAGAAGAG

Anexo 2 – Disposição dos sítios de ligação para fatores transcricionais sobre a sequência de nucleotídeos de cada REC.

PROMOTOR

roxo – TATA

piscina – CREB, ATF1, CREBATF

amarelo – NFY, CAAT

vermelho - MEIS1, FXR_IR1

```

::: block no. 143, score=137864.0, strand:+, base position:180190-180461
galGal3      AACAGATCCGTGACAGCAAATGCAATCTGAGAGACGGCTTGCCACACTGGTGTGCCTTAT
mm8          AGTGAAATATTAGT-GCATGTACCGTCCGAGAGACAACCTGCCACGCCAGGAGTCCTGT
hg18         AGCAAAATTTAAT-GCATGTACAGTCTGAGAGACAACCTGCCACACCAGTGAATCTTT 180250
              *   *   *   *** * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      A-----TATGCCAAGGGGGCTTTTATACTCCAACCTTTGATTAGGCTCATGTCGTCAAAAC
mm8          ATACTGTATTCCAAGTGGCTTTTTATATTCCAACCTTAGAGGAGACAAGTGTCTGTCAGGAT
hg18         ATACTGTATTCCAAGTGGCTTTTTATATTCCAACCTTAGATGAGACAAGTGTCTGTCAGGAT 180310
              *       *** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      CGACGATTGGTTGTTGTCCCAACAATGAATCTAGCTGTCAGAGGTTAAAGCCCTGTCGAT
mm8          CTATGATTGGCTCCTGCTCC-ACAATGAATCTCGCTGTCAGAGGTTAAAACCCTGTCCTGT
hg18         CTATGATTGGCTCTGCTCC-ACAATGAATCTCGCTGTCAGAGGTTAAAACCCTGTCCTGT 180369
              * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      CACAAGTCACTAGACAGCATTTGGTTACAGCCAAGGTGAAGTATTATCTGGTGGCTT
mm8          CACAAGTCACCAAGCAGTATTTTGTGTACAGTCGAGGGCAAGCTGATTCATTTGACTACTT
hg18         CCCAAGTCACCAAGCAGTATTTTGTGTACAGTCAAGGGTGAGCTGATTCATTTGACTACTT 180429
              *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      CGTAGAGG--ATACGTCTTCACATACTGAAAG
mm8          CATAAATGAAATAAATCCCCAAATCATGAAAG
hg18         CATAAAGAAATAAATCTACAAATAATAAAG 180461
              * * * * *   *   *   *   *   *   *

```

UTR3'

roxo – EVI1

amarelo - TEF1

rosa – CEBP

piscina – HMG1Y

```

::: block no. 135, score=140848.0, strand:+, base position:173759-175195
galGal3      TAATGAATGTATACGAA--CAGATTAAAAAATAAACATTTATTACAAAATATTGATGCA
mm8          ---TAAAAATATACCAAGTAAATATAAAAGGAGACACTTATTACAAAACATATTGTA
hg18         ---TAAAAATATACCAAGTAAATATAAAAGGAGACACTTATTACAAAACATATTGTA 173815
              * *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      TACATATTACACAAGTCAG-TTATATCAAAGTGGTTTTTAAACAATTCTGTAGCAACCA

```

mm8 TACATATTATATAAATGTAATTGTTTCAGAGT--CTTTTATACAATATTGATAG-AACCA
hg18 TACATATTATATAAATGCA-TTGTTTCAGTCT--TTTATACAATATTGATAG-AGTCG 173870
***** * * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 ACTATTTGCATTGGCTTATCATAGTGCAAA-CGGTAACGTTGCAAAGGCAG-----
mm8 GTCATTTCCATTATTTTACCACA---AAA-TTGCCATGTGATAAAGGCAG-----
hg18 ATCATTTCTATTATTTTACCATA---AAAACGTCAGTGTTGCAAAGGCAGTGTTGTAAT 173926
**** * * * * * * * * *

galGal3 -----ATTACG-----ATATGGGATTATGGTTTGAAC
mm8 -----ACA-----GTGATTTTGAAATTTAGATTAAAA
hg18 TTTCCAAAGACAAAATTACATACTTCTCCAAGTATGTTATTTTGACATTTTGAT--AAAA 173984
* * * * * * * * *

galGal3 ATCAG-ACTTCCGTGCTGCCTTTT-----GTTTTACT-----
mm8 ATGAATACTGTTTGGCTGCCTTTTAAAGATGCAGCAGTCACTCCCGCTGTGCTAGAGTTGA
hg18 ACAAACACCATTGACTGCCTTTTAAAGATAATGCAGTTTCTCCAAGTATGCTACAG--AA 174042
* * * * * * * * *

galGal3 -----ACGTTTAGAAAAC--ATTACCTTTTGTTTAAAAAAATCCTTTT---
mm8 CTGAAAGTTGACCTCTAGAAAAAAGATTCTTCTTTC-CTTAAAGAAAATGCATTGAACA
hg18 TTGAAAGCCAACCTCTAGAAAAAT-GATTCTTCTTAC-ATTAAGAAAATCCATTCTCA 174100
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 CTTGTGA---ATGTTGAATAGTGACCTGAG--GATAGGGCAAATTCATTATTACTCTA
mm8 CTTAGTGCTGTGTGTGGAGATGCACCTGGAAGGGAGAGAGAGACTCG-TACTTTGTAG
hg18 TTTGGAG---GTGTAGGAAAATGCACCTGAA--GAAAAGAGAACTTACTATTTTACTG 174154
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 AATTCTTTCACTTAGATAACTATCTTTCT--ATTTACTCAGCCTGCTTACGTAGCACCA
mm8 AGTGTTCTAT---CGAGAGGTCCAGTAGG--AGCCATTGAGC--ACTGCATTAGCACCG
hg18 AATGTTTTTTATGTGATAAACCTGGTAGCCTCAGACATTGAGCCTATCGTATTAGCACCG 174214
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 TTGCCATTGATTACTAACATACT---AACGAAAAAAGGAATGGAAACACGCTAAATAC
mm8 TGG--TGGATTGTC-----CAATTATAATAGGAATGGCAATG---TGTATGT
hg18 TTGGCATGGATTGTTAATGTACTGTGTCAATTATAATAGGAATGAAAT---TGCATAT 174270
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 ACTATACCATCCCTAACTTCAGGATTGTCCATTTACGTGGAATTCATCTTATCATAAC
mm8 AAGGCCCATTCCTACTTT-----GTGGAATTTTATCTTACC--AAG
hg18 GCTGCACCATCCCTATTTT-----TGTGGAATTTTATCTTACC--AAG 174311
**** * * * * * * * * *

galGal3 TCTGC-----ACTATATATTCAAGTGTTCAAGGATGATTCTGGTGGTAATGTGTAGT
mm8 TATAC-----AATACAAATATAAGGTACATGATGTTTTAAATGAT-----AAC
hg18 TATACTACCATACAATATAAATTCAGTGTTTAAAGGATGATTCGAATGATGGTATATAAC 174371
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3 GGT-GTATACGTTACCA-----GTATATATTTTGCTGTAAATACAATATTAAGTGTAG
mm8 AATCCTACACTTTACAAAGGCTACATATAGATTCTCCGTA-----AATATTAAGTGAAA
hg18 AATCCTGCATTTTACCAATACTGTATGTGGATTTTCTGTA-----AATATTAACAAAA 174426
* * * * * * * * * * * * * * *

galGal3	CTGTGAAGAAGTT-GATTTAA-----TAGCCCGCTCCTTCTGTCC-TCAGAGGAGAAGG	
mm8	CTGTTAGGAAATAAGACTTTACCTTTTAAATCATACCTCCTAACTCAGCAGACCACAAGA	
hg18	CTTTAAAGAAATA-GACTTTA-----AAGCATACTCCTTTAATTCATCAGAACTCAAGG	174479
	* * * * *	
galGal3	AG-CTTACTTTTGATTACCAACATATGTTGAAAAGTGCATATAAATTTGTGTCTGAATGA	
mm8	TG--TGCTCTCACTTCCTTGCCCTAGATTGTAGTTGTAATATACATATATG--GACATAA	
hg18	AGAATCGCTTTTCATTTCTCGCCGATGTTGTAAT-----ATATAGG--AACATAA	174527
	* * * * *	
galGal3	CTGAATATTGATTCCCTCACAGTGTAAGAAACCCATTTGTTAAATCCGGTGATTTTGAT-	
mm8	ATGTAATTTGATCTCCATCTATTTCAAAAAGTCTG----GAAATCATACAACATCCTAT	
hg18	ATGTAATTTGATCTCCTTCTAGCTCAAAAAGTCTG----GAAATCATAAAAGTCTTCTT-	174581
	* * * * *	
galGal3	--TGTAGCTTCTTTGTCCGTTGTTTCAAAGCCAGCCCTTAGGTAACCTCTACTGTCTTTAA	
mm8	AGTATGGTTTATTTT---GGTGGTTGAATGCCAACCATT--GCATCTATTCTCTCTTTTA	
hg18	-GTATGATTTGTTTG---GATGGTTAAATGCCAACCATT--GCATATATTCCCCCTTTTA	174635
	* * * * *	
galGal3	GTTACATTTCTGCAGCTCATGTTGTGATATATGTGGTCTGTACAGTTGTACAGTATA-TG	
mm8	GTTACATACACTGTAGCTTGTGCT-----TACGTTAC-----TAGAGCATACTC	
hg18	GTTTACATACTGTAGCTTATGCT-----TAAGTGAC-----TGTAGCATACTC	174678
	* * * * *	
galGal3	GATGTTGGCAATGCCTAGCGTACGTAATTTACAGTTTCAAAGATGGATGAGGGGATATA	
mm8	AAGGCCATACA--GCCTGTGGTGCTTGAATTCACAGTTTCGAAATTG---AGGGGAAG--	
hg18	TAGGCCATATA--GCCTGTGGTACTTAATTTACAGCTTCAAAATTGT-TGAGGGGAAA--	174733
	* * * * *	
galGal3	GCTTTTTTTTTTGGTGGCTTCCACAATTTATCGAATGGTGGAT--CTCACGACAGCCTCA	
mm8	-----ACCTTCCATGACTTGGGAAATTTCTAAC--CTAATGCAAAGCTCA	
hg18	-----ACCTTCCATGTTTTAGGAAGTTATGAACGCTTAATATAAATCTCA	174778
	* * * * *	
galGal3	TGAGCACCCGCAACGATCTACAACCATGGCTGGTATCTTTCCATATATTATTTGTTCTTT	
mm8	TGAGCACCCACAGCGGTCTACTACCATGGCTGGAATTTTCCATATATTATTTGTTCTTT	
hg18	TGAGCACCCACAGCGGTCTACTACCATCGCTGGAATTTTCCATATATTATTTGTTCTTT	174838
	* * * * *	
galGal3	TCCATTGAAATACAGCATGTTTATAGGGGACATCTTGGTGGGTGTGCAGCAAGGGCCTGC	
mm8	GCCATTAAATATAGCATATTAATGGGAGACATTTTGTGCGGAGTGCAGCAAGGGCCTGC	
hg18	GCCATTAAATATAGCATATTAATGGGAGACATCTTGTGCGGAGTGCAGCAAGGGCCTGC	174898
	* * * * *	
galGal3	TGAGCCTCTGGGATTTGCTTGGTGTACCAGGTGAGTGTGCGGGTATTTCTGTAGAAACAC	
mm8	TGAGCCTCTGGGGTTTGCTTGGTGCACAAGATGAGTATGCGGATATTTTGTAAAAACAC	
hg18	TGAACCTCTGGGGTTTGCTTGGTGTACCAGATGAGTATGAGGATATTTTGTAAAAATAC	174958
	* * * * *	
galGal3	AAATTCGCATTCTCCGGAGCAGTAATTTGGCTTTGTATCTTTTAGGTGCTATAATCCAGTC	
mm8	AAATTCACACTCTCCTGAGCAGTAATTTGGCTTATATCTTTTGGGTGCGATAATCCAGTC	
hg18	AAATTCACACTCTCCAGAGCAGTAATTTGGCTTATATCTTTTAGGAGCGATAATCCAATC	175018
	* * * * *	

vermelho – PAX2, PAX3, TEF1
rosa -VMYB

```

::: block no. 65, score=32208.0, strand:+, base position:77038-77297
galGal3      GAAAACATCACTGAGAAAATGCTAC-----ATCTACATATACAAGTGTTT
mm8          CAAAATAT---TTGGACACTGCCCTT-----GTTTGTAAGTGTGTGAAG
hg18         GAAAATAT---TTAGAAATTGCCATTCCCAAATACTGATATTTTCAAAAGTAAGTGCTA 77094
              **** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      CTATTGATACGTTATTTTCTAAGATTTTGCTGAGTAAAGCT-ATTTCACA--CAAGCA
mm8          TTATTGACATGTACTT-----AGACCT-GCTGGGTAAAGCTGCTCTGTCCA--GAGCG
hg18         CTATTGATACATTACT-----AGATTTTGCTGAGTAAAGCT-CTTCTACACACAAACA 77147
              ***** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      TTTTGGCCATCTGCAACTGCTCGTCAGTGAGCCTGGTTTGAGAACACTGGTTGTAATTGT
mm8          TCTCA-CCACCTGCAACTGTTTGTCAATT-CCTTGGTTTGAGAACACCAGTAGTAATTGT
hg18         TGTTGGCCACCTCGCAACTGTTTGTGAGTGACTTGGTTTGAGAACACTAGTAGTAATTGT 77207
              *   *   *** ***** *   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      AACCTCAGGAATGTGTGACCAGCTCGCAGCCAGCTGTGCATGCCCTGACTTTTCCCAGGT
mm8          AAACCTAGGAATGTGTGACAAGCTAGCAGCCAGCTGTGTGCAGCCTGACTTTTCCAGGT
hg18         AAACCTAGGAATGTGTGACAAGCTAACAGCCAGCTGTGCATATCCTGACTTTTCCCAGGT 77267
              **   *   ***** ***** ***** ***** *****

galGal3      GTTAAGAT---CATGGCCACTTTTGTTCACT
mm8          GTTAAATAAATATGACCATTGTTGGGTACG
hg18         GTTAAATAAATATGACCATT-GGTTCACT 77297
              ***** *   *   *   *   *   *

```

REC 4

roxo – COUP, ER e ERR1

```

::: block no. 47, score=6973.0, strand:+, base position:53265-53461
galGal3      TCAGAAATATTAACAACACTTTGCACTGAGTGTTTTGTAACCTAACTTTGCAGTTTGTT
mm8          GTAATAAGT-----CTTAGCTGT-TAACT----
hg18         TCAGCAATATTAATAG-----GAATTCAATGACTTGTTCTTAACTTT-TAATTTGTT 53317
              *   **   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      GACTTCAAGATACGTGCAATGTCTGAGAAATATATGCCAAGTCTGCTTGCAATACGAGTT
mm8          -----GAAACTGTGGATGA-----GCCA---AAGCCAGCTCTCTGTAGC
hg18         GATCAAAAGATGTGTATAATAT-TAAAAAATACATGCCAAGTAGGTTTGCTTCATGAATT 53376
              **   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      TTATAGCAAATAGT-----AAATTAA-----AACCGTAGTGACCTTTTGGTCTT
mm8          TCACTGCATGGACTTATACCGTCGAGTGCACTACCCCAACCCC-ATGACCTTTTGGTCTT
hg18         TTACAGCATATAAT-----AAATGAA-----AACCTGGTGACCTTTTGCCTT 53420
              *   *   ***   *   *   *   *   *   *   *   *   *

galGal3      GCTGACCACGTGCATAAAGATGTTTCGTCGTACTAATCCCAGC
mm8          TTTGACCATATGCACAAAAATGACCATC-TGCTAATCTCAAC

```

hg18 GTTGGTCACATGCATGAAGATGATTATC-TGTTAATCTCTGC 53461
 ** ** **** ** ** ** * ***** * *

REC5

roxo – HNF4

::::: block no. **45**, score=16865.0, strand:+, base position:**52707–52876**

galGal3 GTATTTTGGCACAGAGCAGTTTGTGTAAAGAGGGTTAATGGCTTGTATGTCCTATTT
 mm8 ATATCT----GTTTATTGTTTGTTTTAAAGAAAATTAATAATTAATCATGGAATATTA
 hg18 GTGTTTGGCATATTGTTGCTTGTATAAGGAAGATTAATAGCTTGTTTGGACTATTA 52766
 * * * * ***** ** * ***** * * ** ****

galGal3 CTATAACAGAAGTCATTTAGAGTTCAGCAGATATATTTAGAATCAGCATTTGTG-CTGG
 mm8 ATTTGGAGAGAAGTCATTTAGAGTTCAG-ATAGATA-TTAGAGCTGGTATATATGAAAA
 hg18 ATATGAAGAGAAGTCATTTGGAGTTTCAG-ACATATATTTAGAACTAGCACGTGTG-CAAA 52824
 * * * ***** ** * ***** * * * **

galGal3 TAGTTACAAGCTGAATAAAATTATCTCT--GAAAAGCTCAATATGCAGAAGGGAA
 mm8 AAGATACAAAATTAATCAAGAAAT-TCCAGGAAAAAAGTTATTTAAAGTAAGAAA
 hg18 AAGATACAAAGTGAATCAAGAAAT-TCT--GGAAAAGATAGTTGAAGAAAAGAA 52876
 ** ***** * ** ** ** * ** * * * * **

REC 6 e 7

REC6

roxo – E4F1, NKX25L

amarelo – GRE, PR

vermelho - HNF4

piscina - RP58

REC7

roxo – AP4, E47, EVI1

amarelo - AREB6, E2A, E12, E47, MYOD

piscina - CDC5, CEBP, OCT1, POU3F2

vermelho – OTX, PITX2

rosa - TEF1

::::: block no. **25**, score=70401.0, strand:+, base position:**31084–31731**

galGal3 TGGAAATGTTAAATCTTTTGTTAATGGCTTCGAATTAAGCACACATTGTTGCAGATGATT
 mm8 -----ATTTCCTTATGGTGCCCTTGGTTTAAATATGAATGGCTGTAGGTTAAC
 hg18 TTAAATATATTGGCTTTCCTCTTGGTTCTCTTGGATTAAATACATATAGGCTATAGGTTAGC 31143
 * * * * * * * ***** * * * * **

galGal3 TGGAGGACTTATTTAAAGTAAATATACAATTTCAAGCTCAATTATCATTCATAGTTTAAAC
 mm8 TAAAGTACTGTGTCAAAATAAAT-TACAAGCTCAAAC TTCATT-----TTTTGGTTTAA-
 hg18 TGGAGCACTG-ATGAAAATAAAT-TGTAAGCTCAAAC TTCATTATCATTTGTAGCTTAA- 31200
 * ** *** * ** ***** * ** ***** * * * * * **

DECLARAÇÃO

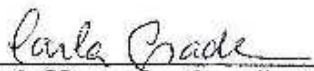
Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha Tese de Mestrado intitulada "Identificação e Caracterização Funcional dos Elementos *Cis*-regulatórios da Miostatina":

() não se enquadra no Artigo 1º, § 3º da Informação CCPG 01/2008, referente a bioética e biossegurança.

() está inserido no Projeto CIBio (Protocolo nº _____), intitulado _____

(X) tem autorização da Comissão de Ética em Experimentação Animal (Protocolo nº 1731-1).

() tem autorização do Comitê de Ética para Pesquisa com Seres Humanos (?) (Protocolo nº _____).



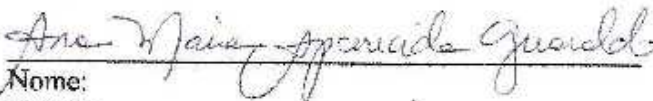
Aluna: Carla Vermeulen Carvalho Grade



Orientadora: Prof. Dra. Lúcia Elvira Alvares

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

(X) Deferido () Indeferido



Nome:

Função:

Prof. Dra. ANAMARIA A. GUARALDO

Presidente

Comissão de Ética na Experimentação Animal

CEEa/IB - UNICAMP

