



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

Análise da expressão gênica de *MyoD*, *MRF4*, Miogenina e Miostatina nos músculos *Bíceps femoris* e *Gastrocnemius lateralis* em duas linhagens de *Gallus gallus* (corte e postura).

MARCELO DE LIMA MARCHESIN

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

RIO CLARO
Estado de São Paulo - Brasil
JULHO - 2008

Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”
Instituto de Biociências - Rio Claro

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)

Análise da expressão gênica de *MyoD*, *MRF4*, Miogenina e Miostatina nos músculos *Bíceps femoris* e *Gastrocnemius lateralis* em duas linhagens de *Gallus gallus* (corte e postura).

Marcelo de Lima Marchesin

Licenciado em Ciências – Habilitado em Biologia

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Patrícia Pasquali Parise-Maltempi

Co-orientadora: Dr^a. Helena Javiel Alves

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

“Não vim até aqui, pra desistir agora...”

Engenheiros do Hawaii

*“O Dia Mentem a Cor da Noite e o Diamante a Cor dos Olhos, Os
Olhos Mentem Dia e Noite a dor da Gente”*

O Teatro Mágico

Aos meus pais, José Maria Marchesin e Zélia Bernardino de Lima Marchesin;
Pela Educação, dedicação, incentivo e apoio.

Aos meus irmãos, Bruna de Lima Marchesin e Felipe de Lima Marchesin;
Pelo apoio, compreensão e paciência.

A minha tia Zenaide B. L. Vedovello e meus primos, Gustavo, Camila e Mariana;
Pela hospedagem e o incentivo.

Ao meu avô João Bernardino de Lima;
Pelo incentivo e apoio.

Ao meu tio, Dr. Luiz João de Lima;
Pelo incentivo e apoio.

Dedico.

Agradecimentos

Agradeço a Deus em primeiro lugar.

A Prof^a. Dr^a. Patrícia Pasquali Parise Maltempí, por ter aceitado a orientação deste que vos escreve, pois sem ela, não estaria realizando este trabalho.

Ao Prof. Dr Luiz Lehmann Coutinho e a Dr^a. Helena Javiel Alves, da ESALQ/USP, pelo apoio, ensinamentos, orientação e compreensão no momento mais difícil que passei para realização deste mestrado.

A CAPES pelo apoio financeiro.

A seção de Pós-Graduação da UNESP de Rio Claro, pela ajuda nos momentos difíceis

A coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, Prof^a. Dr^a. Carmem Sílvia Fontanetti Christofolletti e a Prof^a. Dr^a. Maria Izabel Camargo Mathias, pelo apoio prestado nos momentos difíceis.

Aos amigos do Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ/USP, Érika Cristina Jorge, Karina Patrício, Clarissa Boschiero, Fernanda Savalio, Taiane Prestes, Lílian Rezende, Luiz Augusto Magrini Perón, Juliano Sangalli e aos técnicos Nirlei Aparecida da Silva e Jorge Luis Ferreira Andrade, pela ajuda e compreensão.

Em especial, agradeço aos amigos: Ana Paula Dini, Kerli Ninov, Raquel de Lello Rocha Campos, Marcel Ambo, Millor Fernandes do Rosário pela ajuda prestada, compreensão e o mais importante, a amizade.

Ao funcionário do Depto. de Zootecnia da ESALQ/USP, Alexandre Soares.

A Pós-doc Dr^a. Patrícia Pauletti, pela doação de materiais e ajuda prestada.

Aos amigos do C.E.I.S. (UNESP - Rio Claro), Joaquim Martins Junior, Paula Maria Moreira Martins, Cynara Mello Rodvalho, Nayla Ananias, André Rodrigues, Necis Miranda, Olívia Maria Costa de Souza e Silva, Itamar Cristina Reiss, Juliana Marafon, Bruna Ricci de Brito, Mara Fonseca Chiarelli Legaspe, enfim, todos!

Aos amigos de graduação (UNIMEP), Bonassa, Deborah Nishimura, Luis Gustavo ("Gusma"), Marina, Daiane ("Nani"), Thaise ("Tet's"), Tsuji, enfim, a toda "galerinha".

Aos moradores e amigos da famosa "rep. A casa dos Joselitos", Leandro "Batata", Lucas, Gabriel, Caetano e Marcel, pelas hospedagens.

As minhas cachorras, Klotilde e Mel, pela companhia nas horas e horas de elaboração desta dissertação.

Enfim, agradeço a todos, citados ou não, que de alguma maneira ajudaram ou ouviram meus desabafos nas horas de "stress" para elaboração deste trabalho.

Obrigado!!!

ÍNDICE

A. RESUMO	8
B. ABSTRACT.....	10
1. INTRODUÇÃO	12
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 Origem e desenvolvimento da musculatura esquelética	15
2.2 Formação da musculatura nos membros.....	18
2.3 Fatores miogênicos e miostatina	20
3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO	24
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1 Obtenção das Linhagens de frango.....	25
4.2 Incubação dos ovos.....	26
4.3 Coleta dos tecidos	26
4.4 Extração de RNA total	27
4.5 Síntese de cDNA.....	28
4.6 Desenho dos primers	28
4.7 RT-PCR quantitativa.....	29
4.8 Cálculo da eficiência de amplificação (E)	31
4.9 Quantificação relativa	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Extração de RNA total	33
5.2 PCR quantitativa.....	34
5.2.1 Otimização dos <i>primers</i>	34
5.2.2 Construção das curvas padrão e cálculo da eficiência de amplificação	36
5.2.4 Quantificação Relativa	39
6 DISCUSSÃO	43
7 CONCLUSÃO	47
8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA	48
ANEXOS	60

A. RESUMO

MARCHESIN, Marcelo de Lima. **Análise da expressão gênica de *MyoD*, *MRF4*, Miogenina e Miostatina nos músculos *Biceps femoris* e *Gastrocnemius lateralis* em duas linhagens de *Gallus gallus* (corte e postura).** 62 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

A formação da musculatura esquelética nos membros de frango é um processo complexo, dividido em várias etapas, desde a formação do somito, progenitor da musculatura, até o músculo propriamente dito. O presente trabalho teve o objetivo de caracterizar o perfil de expressão de genes associados aos fatores miogênicos *MyoD*, *MRF4* e Miogenina (responsáveis pela formação e manutenção da musculatura) e Miostatina. Utilizaram-se 40 animais de duas linhagens (20 de corte e 20 de postura), cujos tecidos das coxas e sobrecoxas foram coletados em duas idades (21 e 42 dias pós-eclosão). A técnica de PCR quantitativa foi empregada nas análises da expressão gênica e os dados obtidos foram analisados com a utilização do programa REST (Ferramenta para análise de expressão relativa - *Relative Expression Software Tool*) que se baseia em quantificação relativa. Devido à divergência fenotípica no padrão de crescimento das linhagens estudadas, esperava-se encontrar diferenças na expressão de miostatina, as quais não foram confirmadas. Por outro lado, foram verificadas diferenças para *MRF4* nos músculos Gastrocnêmio (coxa) e Biceps (sobrecoxa) em ambas as idades, e

para Miogenina, em Gastrocnêmio, aos 42 dias; com maior expressão na linhagem CC. A caracterização dos genes estudados foi parcial, abrindo a possibilidade para que outros genes possam ser selecionados com intuito de compreender o desenvolvimento muscular em frangos.

Palavras-chave: PCR quantitativa, fatores miogênicos, desenvolvimento muscular em frangos.

B. ABSTRACT

MARCHESIN, Marcelo de Lima. **Gene expression analysis of MyoD, MRF4, Miogenin and Miostatin in the muscles *Biceps femoris* and *Gastrocnemius lateralis* in two lines of *Gallus gallus* (broiler and layer)**. 62 p. Dissertation (Master's Degree) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2008.

The development of the chicken limb muscles is a complex process, divided into several stages from the initial somite formation to the muscle itself. This study aimed to characterize expression profile of genes associated to myogenic factors MyoD, MRF4 and Miogenin (responsible for muscle formation and maintenance) and Miostatin. It was used 40 animals from two lines (20 broiler and 20 layer), whose thigh and drumstick tissues were collected at two ages (21 and 42 days post-hatch). Gene expression employed techniques of quantitative PCR and data were analyzed by REST program, which is based on a relative quantification. Due to phenotypic divergence in the growth pattern of the strains studied, it was expected to find differences in the expression of miostatin that were not confirmed. On the other hand, differences were found for MRF4, with highest expression in CC line. The characterization of genes studied was partial, opening the possibility that other genes may be selected in order to understand the muscle development in chickens.

Keywords: quantitative PCR, myogenic factors, muscle development in chickens.

1. INTRODUÇÃO

A formação da musculatura esquelética em vertebrados inicia-se durante a embriogênese e é denominada de miogênese. Nessa fase, determinadas porções de estruturas denominadas somitos, originárias da mesoderme paraxial, sofrem alterações que possibilitam que parte das mesmas origine os precursores da musculatura esquelética, ou seja, os mioblastos (BUCKINGHAM et al., 2003).

De acordo com Gilbert (2006), o desenvolvimento da musculatura esquelética pode ser dividido em quatro estádios. No primeiro, denominado de determinação, ocorre o recrutamento de células dos somitos que serão exclusivamente as precursoras de músculo. Ainda nesse estágio, ocorre a migração dessas células para a região, como por exemplo, a musculatura dos membros onde se inicia a proliferação das mesmas.

No segundo estágio ocorre a proliferação celular, aumentando o número de células pré-musculares (somitos). A seguir, no terceiro estágio, ocorre a diferenciação destas células em células musculares, onde proteínas específicas de músculo começam a ser expressas (*MyoD*, *MRF4*, *Myf5* e miogenina). No quarto estágio, há o amadurecimento das células musculares, onde os mioblastos fundem-se dando origem a células alongadas polinucleadas, denominadas miotúbulos. Estes, por sua vez, agregam-se dando origem às fibras musculares.

Apesar desta abordagem simplista da miogênese, outros mecanismos de controle estão envolvidos, o que a torna um processo muito mais complexo e

longo. O controle desse processo deve ser específico temporalmente (ao longo do desenvolvimento) e localmente (regiões específicas de ação, como por exemplo, na sinalização para migração celular durante a formação da musculatura dos membros) (GILBERT, 2006).

Dentro da complexidade desse controle, existem inúmeros genes de ação já conhecida, que atuam desde a determinação da linhagem celular miogênica embrionária até a maturação da fibra muscular (KABLAR et al., 1997, WIGMORE e EVANS, 2002). Dos diversos genes envolvidos neste processo, destaca-se a família *MyoD*, composta pelos fatores de transcrição músculo-específicos: *MyoD*, *Myf-5*, *MRF4* e miogenina (revisado por PURI & SARTORELLI, 2000).

Outros genes importantes estão atuantes no desenvolvimento muscular dos membros como, por exemplo *c-met/HGF*, *Lbx1*, *Pax3*, *Mox2*, *Msx1* e *Six*, (SCHÄFER e BRAUN, 1999), além de reguladores negativos da miogênese, como por exemplo, a miostatina (MCPHERRON et al, 1997; CASTELHANO-BARBOSA et al., 2005).

Dentro das linhas de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Animal – USP/ESALQ destacam-se trabalhos utilizando-se duas linhagens de aves desenvolvidas pela Embrapa Suínos e Aves: uma selecionada para características de crescimento (ganho de peso, conversão alimentar, etc) denominada TT e outra selecionada para características de postura (fertilidade, eclodibilidade, etc) denominada CC. Estas linhagens são divergentes quanto ao crescimento muscular, em que TT apresenta maior taxa muscular em relação à CC, sendo, portanto, um excelente modelo animal para experimentos que pretendam desvendar o controle genético do desenvolvimento muscular em aves.

Os estudos envolvendo estas duas linhagens (TT e CC) têm constatado que os fatores miogênicos (*MyoD*, *Myf5*, *MRF4* e miogenina) e os fatores de crescimento *IGF-I*, *IGF-2* e miostatina apresentaram expressão diferencial na musculatura peitoral durante o desenvolvimento embrionário (GABRIEL et al., 2002; ALVARES et al., 2003).

O melhor entendimento das vias de ação dos fatores miogênicos, além de outros genes relacionados com a formação da musculatura esquelética, nos possibilitará o desenvolvimento de metodologias para obtenção de animais com maior potencial para produção de carne.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Origem e desenvolvimento da musculatura esquelética

A miogênese é um processo que envolve a determinação de células precursoras de músculo esquelético nos tecidos embrionários, a proliferação celular, a diferenciação e a maturação das fibras musculares (GILBERT, 2006). Esse evento exige uma rede complexa de fatores que o module, de modo a gerar uma especificidade espacial e temporal da expressão dos genes envolvidos no processo (ARNOLD & WINTER, 1998; ARNOLD & BRAUN, 2000).

No desenvolvimento do embrião, mais precisamente no mesoderma paraxial, ocorre uma deposição de células dispostas paralelamente ao tubo neural e a notocorda do embrião, originando, nos vertebrados, a musculatura esquelética (CHRIST & ORDAHL, 1995; RAWLS & OLSON, 1997; STOCKDALE et al., 2000). Essas células agrupam-se formando uma estrutura compactada denominada somito (Figura 2.1). Esse evento está associado à atuação de proteínas como a fibronectina (glicoproteína envolvida na adesão celular) e a N-caderina (responsável por organizar a placa neural) (OSTROSKY et al., 1984; LASH e YAMADA, 1986; HATTA et al., 1987). Os fatores de transcrição Notch1 e Paraxis também são proteínas importantes para a formação adequada dos somitos. Paraxis em conjunto com Escleraxis (proteínas bHLH) fazem parte de um percurso regulatório envolvido na

padronização da mesoderme paraxial e na criação de linhagens de células somíticas.(BURGESS et al., 1995).

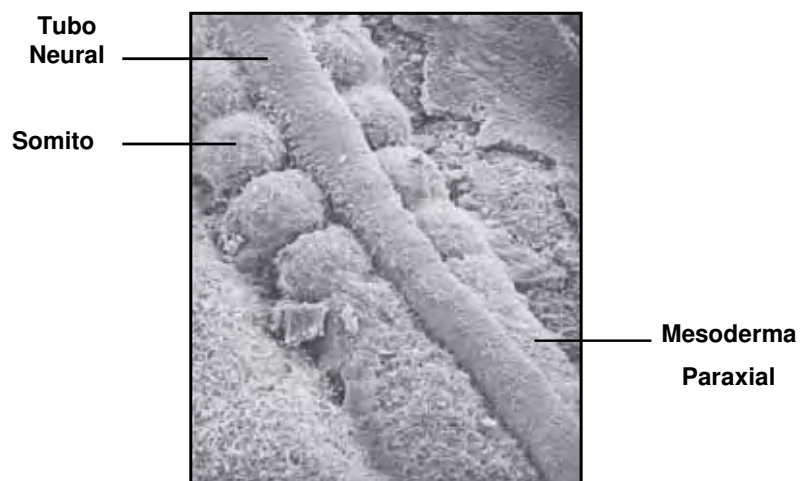


Figura 2.1. Microscopia eletrônica de varredura mostrando a disposição dos somitos ao redor do tubo neural. Fonte: Gilbert, 2006.

A somitogênese, nome dado ao desenvolvimento dos somitos, tem início quando em resposta a sinais oriundos das estruturas adjacentes (tubo neural e notocorda), os somitos compartimentalizam-se em três domínios celulares distintos: dermomiótomo, esclerótomo e miótomo (Figura 2.2). O miótomo consiste na primeira musculatura formada no embrião, o dermomiótomo é responsável pela formação da musculatura esquelética, derme e derivados vasculares, e o esclerótomo originará ossos e cartilagens (GILBERT, 2006).

Alguns fatores de transcrição do domínio bHLH (*basic-Helix-Loop-Helix*) *c-hairy1*, *c-hairy2* e *Lunatic Fringe* foram relacionados com a somitogênese. Esses fatores apresentam ondas cíclicas de expressão a cada 90 minutos, determinando uma formação gradativa dos somitos no sentido crânio-caudal. Cada onda equivale à formação de um somito. Devido a essa periodicidade, a somitogênese ocorre em intervalos sucessivos e regulares, uniformizando o tamanho dos blocos celulares (STOCKDALE et al., 2000, POURQUIÉ, 2001).

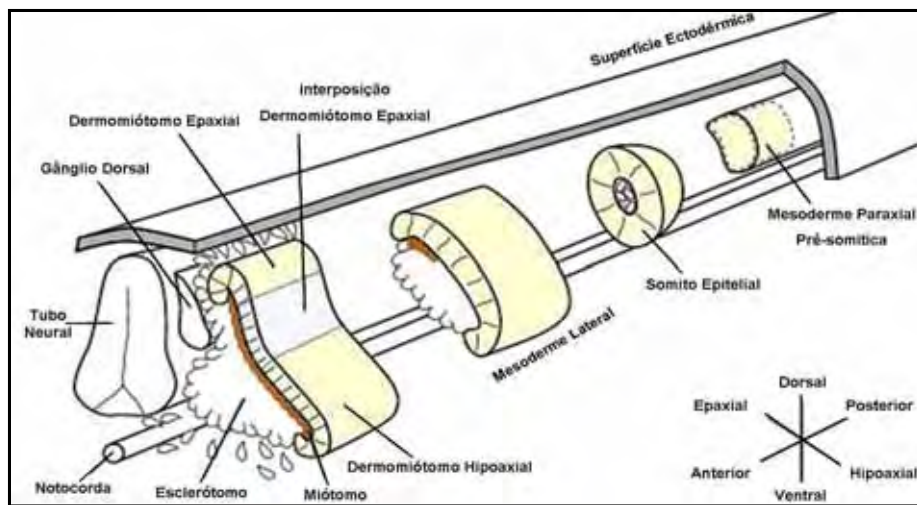


Figura 2.2. Esquema representativo do processo de compartimentalização dos somitos, em esclerótomo, miótomo e dermomiótomo (porções epaxial e hipoaxial). Fonte: Adaptado de Buckingham et al., 2003.

A musculatura hipoaxial tem origem por dois mecanismos distintos: um para a região torácica e outro para as regiões adjacentes aos membros do embrião. Na região torácica, durante o alongamento do dermomiótomo, o lábio ventro-lateral desta estrutura permanece arranjado como um epitélio, levando a deposição do miótomo hipoaxial. A porção medial e lateral do miótomo mistura-se, dando origem a uma lâmina contínua de mioblastos, que serão ativados por genes específicos levando a diferenciação muscular (CHRIST et al., 1983).

Para a formação da musculatura dos membros, existe a necessidade das células precursoras de musculatura migrarem até regiões específicas do corpo do embrião, onde os membros se desenvolverão. Na primeira fase desse processo, células provenientes do dermomiótomo hipoaxial desprendem-se. Em seguida, essas células migram, e iniciam a fase proliferativa. Em determinado momento, a proliferação cessa e inicia-se a fase de diferenciação celular (BUCKINGHAN et al., 2003).

2.2 Formação da musculatura nos membros

A origem embrionária dos membros é comum entre os vertebrados. Em embriões de humanos, os brotos dos membros surgem a partir do 28º dia de desenvolvimento e adquirem sua morfologia do 33º ao 35º dia. (HAUSCHKA, 1994). Em anfíbios (*Xenopus laevis*), parte dos brotos de membros começam a se desenvolver no final da fase larval, antes da metamorfose. O início da formação dos membros neste organismo difere totalmente de outros vertebrados, tais como aves e mamíferos, em que parte dos brotos dos membros emerge em fase precoce da embriogênese (SATO et al., 2005). Na galinha doméstica, o desenvolvimento dessas estruturas ocorre por volta do estágio 15, equivalente a 50-55 horas de incubação ou dois dias (HAMBURGER & HAMILTON, 1951).

De acordo com Buckingham e colaboradores (2003), a musculatura dos membros tem origem na delaminação do dermomiótomo hipoaxial, onde células são liberadas e migram até os brotos de membros, iniciando-se então os processos de proliferação, determinação e diferenciação em células musculares (Figura 2.3).

Vários fatores de transcrição estão envolvidos no processo de formação da musculatura dos membros, tais como: os genes *c-met/HGF*, *Lbx1* que estão atuantes durante a migração das células musculares; *Pax3*, *c-met*, *Mox2*, *Msx1* e *Six* que atuam durante a fase proliferativa; *Myf-5* e *MyoD* na determinação; e, por último, na diferenciação estão atuantes os genes miogenina (em conjunto com *MyoD* e *MRF4*), *Mef2* e as homoproteínas *Six* (BUCKINGHAM, et al., 2003). O gene *c-met* codifica uma proteína receptora de tirosina quinase que, por sua vez, interage com os ligantes de *HGF*, produzindo células de mesoderme não somáticas, delineando, assim, a rota migratória (DIETRICH, 1999). Bladt e colaboradores (1995) realizaram o silenciamento do gene *c-met* e Schmidt e colaboradores (1995) silenciaram o *HGF* e, ambos tiveram como resultado a ausência de musculatura nos membros dos organismos estudados.

Na migração celular, também está envolvido o fator de transcrição *Lbx1*. Schäfer & Braun (1999) demonstraram que na ausência de *Lbx1*, apesar de a

delaminação de células precursoras ocorrerem normalmente, essas células não migram.

A expressão de *Pax3* durante a embriogênese inicia-se no mesoderme paraxial pré-somítico, pouco antes da segmentação. Sua ação estende-se até o final da miogênese. A função deste gene está associada à formação de músculos hipoaxiais do tronco e à delaminação e migração de células progenitoras miogênicas (TAJBAKHSI & BUCKINGHAM 2000).

O fator *Mox2* está envolvido na proliferação de células precursoras de músculo nos membros, sendo uma proteína importante para a regulação da miogênese em vertebrados (MANKOO et al., 1999). Em trabalho realizado por Mankoo e colaboradores (1999), foi demonstrado que camundongos homocigotos nulos para *Mox2* apresentaram defeito no desenvolvimento da parte muscular, caracterizado por uma redução global da massa muscular e eliminação de músculos específicos.

Msx1 é uma proteína capaz de reprimir a miogênese e manter células em estado indiferenciado e proliferativo *in vitro*. No entanto, não foi detectada qualquer evidência de que *Msx1* seja expresso no músculo ou em seus precursores *in vivo* (HOUZELSTEIN et al., 1999).

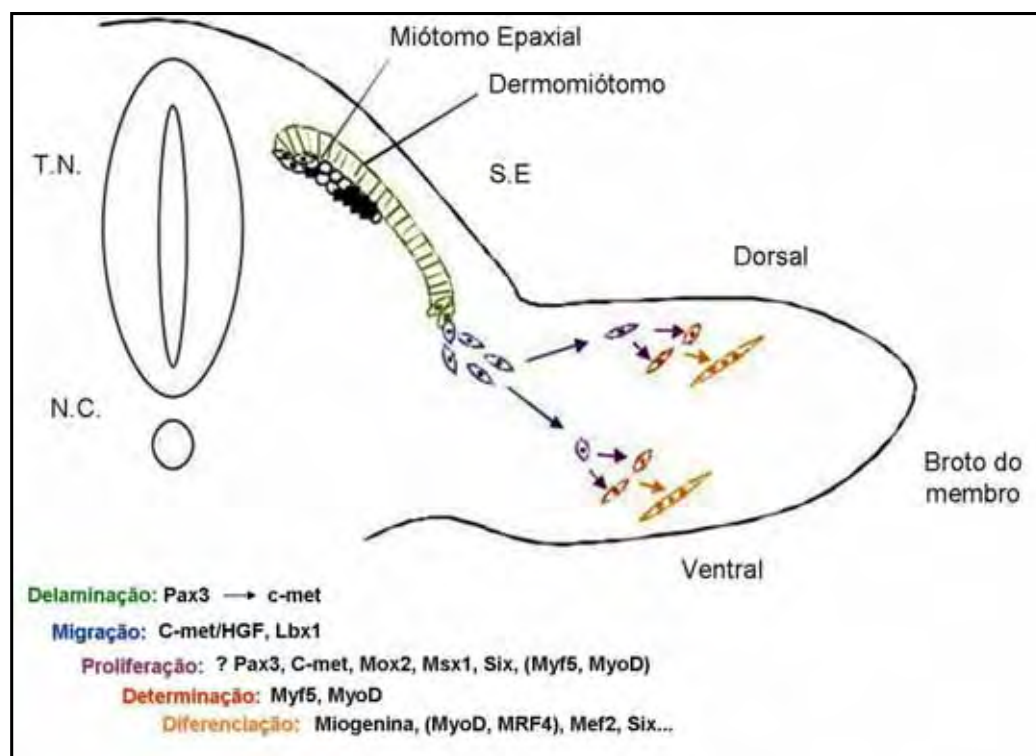


Figura 2.3. Esquema indicando as etapas para formação da musculatura nos membros e genes potencialmente envolvidos nesse processo. Onde, **N.C.**= Notocorda; **T.N.** = Tubo Neural; **S.E** = Superfície da Ectoderma. Fonte: Modificado de Buckingham et al., 2003.

2.3 Fatores miogênicos e miostatina

Dentre os diversos genes associados a miogênese destaca-se a superfamília *MyoD*, uma família de fatores de transcrição composta pelos genes: *MyoD*, *Myf-5*, miogenina e *MRF4*. Esses genes possuem dois domínios funcionais: uma região básica responsável pela interação com o DNA, e um domínio hélice-alça-hélice (HLH), responsável pela heterodimerização. A ligação eficiente ao DNA é obtida por heterodimerização desses fatores com as proteínas miogênicas *E2A* e membros da família *MEF2* (*myocyte enhancer factor*). Após este processo, essas moléculas ativam a expressão gênica ao associarem-se a domínios E-box (CANNTG) presentes em enhancers de genes alvo (SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

A ação da família *MyoD* já está definida durante o programa miogênico (PURI & SARTORELLI, 2000). *MyoD* e *Myf-5* são considerados MRFs (*Myogenic Regulatory Factors*) primários e *MRF4* e miogenina MRFs secundários (Figura 2.4). Os MRFs primários são necessários para a etapa de determinação, comprometendo as células proliferativas dos somitos com a linhagem miogênica. Já os MRFs secundários atuam na diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras (EMERSON, 1993; ARNOLD & BRAUN, 2000; PURI & SARTORELLI, 2000; SABOURIN & RUDNICKI, 2000).

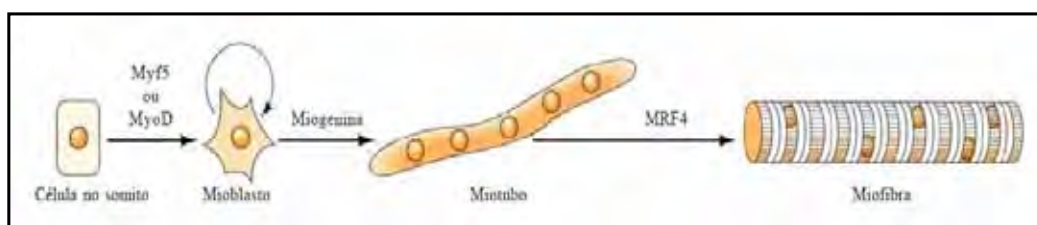


Figura 2.4. Representação das etapas do desenvolvimento muscular, desde a determinação dos precursores miogênicos nos somitos até a diferenciação e maturação em fibras contráteis. Fonte: Adaptado de Gilbert, 2006.

O fator *MyoD* atua no desenvolvimento e estabelecimento da linhagem miogênica na porção hipoaxial do embrião (KABLAR et al, 1997). Duplos mutantes *MyoD/Myf5* não formam musculatura esquelética, uma vez que a população de precursores de mioblastos encontra-se ausente (RUDNICKI et al., 2000).

A ausência desses fatores ainda revela que as células precursoras de mioblastos não se localizam nos sítios normais de miogênese e por isso, adotam outros destinos (TAJBAKSHI et al., 1996), demonstrando, portanto, o papel de *MyoD* e *Myf5* como fatores de determinação miogênica. Além disso, *MyoD* tem importante função em indivíduos que sofreram algum tipo de dano muscular, pois atua em células-satélites (MEGENEY et al. 1996).

Myf-5 tem papel crucial na formação de costelas. (ARNOLD & BRAUN, 2000). Em estudo realizado por Valdez e colaboradores (2000), foi sugerido que *Myf5* é insuficiente para ativar o programa miogênico, na ausência de outros fatores.

Braun e colaboradores (1992) demonstraram que camundongos nulos para *Myf-5* morriam logo após o nascimento, pois não apresentavam caixa torácica, o que gerava uma severa deficiência respiratória.

Miogenina e *MRF4* atuam tardiamente na miogênese, durante a diferenciação celular. A miogenina possui papel exclusivo e direto na diferenciação muscular e ativação de genes músculo-específicos. O controle da expressão de miogenina é regulado pela expressão do *MRF4*.

Em camundongos mutantes nulos para miogenina, os somitos desenvolveram-se normalmente, formando as estruturas como dermomiótomo e esclerótomo. Porém, os indivíduos apresentaram imobilidade e morreram logo após o nascimento. Além disso, tiveram massa muscular reduzida e malformação das costelas (HASTY et al. 1993, NABESHIMA et al. 1993).

A caracterização da expressão dos fatores miogênicos foi realizada em outros organismos modelo, como *Xenopus sp.* e *Danio rerio* (zebrafish) (revisado por POWNALL et al., 2002). De modo geral, existe uma complexa rede em que os quatro fatores miogênicos desempenham suas funções, de acordo com as exigências fisiológicas de cada tipo de organismo.

Além dos fatores miogênicos, outros genes destacam-se na regulação da miogênese, como é o caso da miostatina. A miostatina, também chamada *GDF8*, é membro da superfamília *TGF- β* (*Transforming Growth Factor*) e possui como função a regulação negativa da miogênese. A miostatina foi caracterizada como um importante regulador do crescimento muscular, que atua tanto no período embrionário, como também durante o ciclo pós-natal (MCPHERRON et al, 1997; ZIMMERS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003; MANCEAU et al., 2008). Em frangos, estudos anteriores já demonstraram que ocorre um aumento da expressão de miostatina em músculos esqueléticos durante a segunda metade do desenvolvimento embrionário e há um declínio dessa expressão logo após a eclosão (KOCAMIS et al.,1999; KOCAMIS e KILLEFER, 2002; GUERNEC et al., 2003). As baixas concentrações de miostatina durante as primeiras semanas de vida podem contribuir para o desenvolvimento de músculo esquelético em pintos recém-eclodidos (MOTT e

IVARIE, 2002). Quando ocorre a inibição desse gene, ocorre um aumento e tamanho das fibras musculares (MCPHERRON et al., 1997)

Uma proteína que vem sendo descrita com função antagônica a miostatina é a Folistatina, uma glicoproteína que antagoniza numerosos membros da superfamília *TGF- β* (MICHEL et al., 1993; HEMMATI-BRIVANLOU et al., 1994; FAINSOD et al., 1997; IEMURA et al., 1998; AMTHOR et al., 2002a; ZIMMERS et al., 2002). Folistatina e miostatina são expressos em locais próximos durante o desenvolvimento muscular (AMTHOR et al., 1996, 1999, 2002 a e b). Em experimentos realizados em camundongos, quando esses indivíduos foram induzidos a super-expressão de folistatina tiveram como resultado um aumento do músculo, já em indivíduos que tiveram a folistatina reprimida exibiram deficiência muscular (AMTHOR et al., 2004).

3 JUSTIFICATIVA E OBJETIVO

A carne de frango nada mais é do que massa muscular. Um animal que exiba maior taxa muscular sem o aumento de sua conversão alimentar (relação kg de alimento por kg de peso vivo) apresenta uma produção mais eficiente. Dessa forma, o custo final desta proteína pode ser barateado, e, associado ao seu excelente valor nutricional, pode torná-la mais acessível à população humana. Assim, pesquisas que permitam a compreensão do desenvolvimento muscular da espécie *Gallus gallus* são encorajadas.

Dentro deste contexto, o presente trabalho teve por objetivo estudar algumas etapas do desenvolvimento muscular por meio da caracterização do perfil de expressão de genes associados a fatores miogênicos (*MyoD*, *MRF4* e miogenina) e miostatina nos músculos *Biceps femoris* (sobrecosta) e *Gastrocnemius lateralis* (coxa) em duas linhagens (corte e postura), nas idades de 21 e 42 dias pós-eclosão.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção das Linhagens de frango

Neste trabalho, foram utilizadas duas linhagens de *Gallus gallus*, uma de corte (TT) e outra de postura (CC) (Figura 4.1), ambas desenvolvidas pela EMBRAPA – Suínos e Aves (Concórdia - SC). Para o desenvolvimento da linhagem CC, levou-se em consideração a seleção de algumas características, tais como: melhora na postura e peso dos ovos, maturidade sexual, fertilidade, eclodibilidade dos ovos. A seleção ocorreu dentro dos indivíduos da linhagem CC por oito gerações, sendo originada da raça *White Leghorn*. A linhagem TT tem origem das raças *White Plymouth Rock*, *New Hampshire* e *White Cornish*. E, o objetivo em selecionar esses animais, foi a obtenção de melhor peso corporal, rendimento de carcaça e peito, redução de gorduras abdominais, fertilidade e eclodibilidade. Esses animais foram selecionados dentro da linhagem por seis gerações.



Figura 4.1. Frangos da Linhagem TT (Corte) e Linhagem CC (Postura), ambos com 21 dias de idade.

4.2 Incubação dos ovos

Foram utilizados ovos férteis das linhagens CC e TT. Os ovos foram ambientados utilizando-se uma incubadora automática (CASP) com temperatura em torno de 37°C, em atmosfera devidamente umidificada (87%). Aos 18 dias de incubação, os ovos foram transferidos para um nascedouro (CASP) com temperatura e umidade semelhante aos da incubadora. Os pintinhos foram então divididos em dois grupos para abate com 21 e 42 dias de idade.

O abate foi realizado seguindo as normas de bem estar e conduta ética animal.

4.3 Coleta dos tecidos

Foram coletadas amostras de dois músculos da perna das aves: *Gastrocnemius lateralis* (G) e *Biceps femoris* (B) (Figura 4.2), de duas linhagens de frango: corte (TT) e postura (CC), em duas diferentes idades (21

dias de idade – estágio juvenil e 42 dias de idade – estágio adulto). Os tecidos foram coletados, imediatamente congelados em nitrogênio líquido (-196 °C) e armazenados em freezer -80 °C.

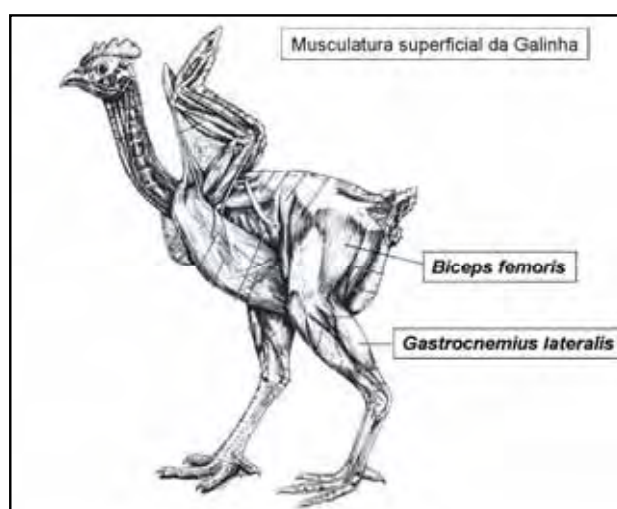


Figura 4.2. Musculatura superficial do frango. Em destaque, os músculos utilizados no estudo. Modificado de Ghetie, 1981.

4.4 Extração de RNA total

O RNA total foi obtido a partir de amostras dos dois tecidos coletados, nas duas idades.

Foi isolado o RNA total de 10 animais da linhagem de corte (TT) e de 10 animais da linhagem de postura (CC), em cada uma das idades. A extração foi feita utilizando-se o reagente *Trizol* (*Invitrogen*), de acordo com o protocolo descrito por Chomczynski e Sacchi (1987) (Anexo 1).

Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido, utilizando-se almofarizes e pistilos, e imediatamente homogeneizados em *Trizol* adicionando-se 1 mL do reagente para cada 100 mg de tecido. Após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 200 µL de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e incubou-se novamente por 5 minutos, seguindo-se de centrifugação a 11.000 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi então transferido para outro micro tubo (1,5 mL), iniciando-se a precipitação do RNA

total com 500 µL de isopropanol, seguindo-se de homogeneização e incubação por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C e o *pellet* lavado com 1 mL de etanol 75% (livre de RNases). Centrifugou-se novamente as amostras a 9.000 rpm por 5 minutos a 4 °C e após a remoção completa do etanol, por meio de secagem a temperatura ambiente, o *pellet* de RNA total foi ressuscitado em água tratada com DEPC (0,01%) As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em cuba devidamente tratada com peróxido de hidrogênio 3%. Para o cálculo de concentração, essas amostras foram submetidas à espectrofotometria (leituras a 260 e a 280 nm).

4.5 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada segundo protocolo do *Kit Super Script™ III First-strand Synthesis Supermix (Invitrogen)* (Anexo 2). Os cDNAs foram sintetizados a partir de 5 µg de RNA total, adicionando-se 50 µM de *primer* oligo (dT), e 1 µL de *Annealing Buffer*. Em seguida, incubou-se à 65 °C por 5 minutos e resfriou-se em gelo por 1 minuto. Adicionou-se 2 µL de *SuperScript III/RNaseOUT Enzyme Mix* e 10 µL de *2x First-Strand Reaction Mix* (10 mM MgCl₂ e 1 mM de cada dNTP), completando-se o volume com água livre de RNase/DNase para 20 µL. A transcrição reversa foi realizada a 55 °C por 50 minutos, terminando-se a reação por inativação da enzima a 80 °C durante 5 minutos.

4.6 Desenho dos *primers*

Foram desenhados *primers* específicos para a amplificação dos fatores miogênicos *MyoD*, *Myf-5*, *MRF4* e miogenina; miostatina (*MSTN*) e gene referência GAPDH (Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase); com base na seqüência completa do mRNA correspondente, disponível no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov) (Tabela 4.1). Utilizou-se para o desenho o programa

Primer 3 Input (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi) e os *primers* gerados foram avaliados (com relação a formação de grampos e dímeros), com a utilização do programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>).

Tabela 4.1. *Primers* desenhados para as análises de RT-PCR quantitativo.

Gene	Seqüência dos <i>Primers</i>	Tamanho do produto amplificado (pb)
MyoD	R: 5' GCTTCAGCTGGAGGCAGTAT 3'	123
	D: 5' ATCACCAAATGACCCAAAGC 3'	
Myf 5	R: 5' AGAGAGGCGGTCCACGAT 3'	105
	D: 5' TTCGAGGCGGGCTACTGC 3'	
MRF4-1	R: 5' ACCTCCTGCATTTTGTCTG 3'	136
	D: 5' CTCTGAAAAGGCGGACTGTG 3'	
Miogenina	R: 5' ACGATGGAGGAGAGCGAGT 3'	114
	D: 5' ATCCTGCAGCCCTGAGTG 3'	
Miostatina (MSTN)	R: 5' TGAGTGTGCGGGTATTTCTG 3'	100
	D: 5' CTTTGGATGGGACTGGATT 3'	
GAPDH (referência)	R: 5' TGGAGAGATGGCAGAGGTG 3'	142
	D: 5' AACAGAGACATTGGGGGTTG 3'	

Os *primers* foram desenhados em éxons distintos, com o cuidado de sempre utilizar a região de fronteira entre um éxon e o seguinte, pois o cDNA que tem origem da seqüência de RNAm, possui somente éxons, já o DNA possui éxons e íntrons. Com o desenho dos *primers* na região de fronteira éxon-éxon, evita-se a amplificação de DNA genômico ou intrônico.

4.7 RT-PCR quantitativa

As reações de RT-PCR quantitativa foram realizadas no equipamento *LightCycler PCR System (Roche)*. Nas reações foram utilizados: 0,4 µL de dNTP *mix* 10 mM, 10 µM de cada um dos *primers* (direto e reverso) específicos

para cada gene, 2 mM de MgCl₂, 0,005mg de BSA, ~1,5 U da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (*Invitrogen*), *Sybr Green* (5X diluído em DMSO) adicionando-se água *Milli-Q* para um volume final de 18 µL. As reações foram preparadas adicionando-se 18 µL do mix em cada capilar seguidos de 2 µL de cDNA em cada reação. Seguindo-se de uma breve centrifugação dos capilares a 1000 rpm por 5 segundos. Na tabela 4.2, estão descritas as condições de amplificação por RT-PCR quantitativa de cada um dos genes utilizados no presente estudo.

Tabela 4.2. Condições de amplificação utilizadas na PCR quantitativa em tempo real para cada um dos genes selecionados para o estudo.

Gene	Pré-incubação	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Nº de ciclos
MyoD	95 °C/2min.	95 °C/10seg.	55 °C/10seg	72 °C/10seg	40
MRF4-1	95 °C/2min.	95 °C/10seg.	55 °C/10seg	72 °C/10seg	40
Miogenina	95 °C/2min.	95 °C/10seg.	55 °C/10seg	72 °C/10seg	40
Miostatina (MSTN)	95 °C/2min.	95 °C/10seg.	55 °C/10seg	72 °C/10seg	40
GAPDH (referência)	95 °C/2min.	95 °C/10seg.	57 °C/10seg	72 °C/10seg	40

Com o intuito de tornar essa técnica acessível, Wittwer e colaboradores (1997) em parceria com a Roche[®], desenvolveram o sistema *LightCycler*[®] (figura 4.5).



Figura 4.5. Sistema *LightCycler*[®], Roche Applied Science

4.8 Cálculo da eficiência de amplificação (E)

Para cada um dos genes estudados, foram construídas curvas padrão de diluição em série de cDNA (com um *pool* de amostras selecionadas aleatoriamente) para calcular a eficiência de amplificação. A partir dos resultados obtidos na reação de amplificação, foi construído um gráfico dos *C_t*s versus o \log_{10} do número relativo de cópias da diluição em série. Foi feita então uma regressão linear para determinar o coeficiente angular da reta (*slope*), que foi usado no cálculo da eficiência de amplificação utilizando-se a fórmula determinada por Rasmussen (2001):

$$\text{Eficiência} = [10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}]$$

4.9 Quantificação relativa

Existem duas maneiras de se realizar a quantificação de transcritos por PCR em tempo real: a quantificação absoluta e a quantificação relativa. A quantificação absoluta é baseada no número de cópias do transcrito de interesse relacionado com o sinal da curva padrão. Já a quantificação relativa é

fundamentada em mudanças na expressão do gene alvo em relação a um grupo referência (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001).

A expressão relativa (R) do gene alvo é calculada baseando-se na eficiência de amplificação (E) e no ciclo da PCR onde foi detectado o aumento da fluorescência acima do sinal basal (Ct) (PFAFFL, 2001).

Para a quantificação relativa, foi utilizado o método descrito por Pfaffl (2001), onde a expressão relativa é determinada utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\text{Expressão relativa (R)} = \frac{E_{\text{gene alvo}}^{(\text{Ct gene alvo TT} - \text{Ct gene alvo CC})}}{E_{\text{gene controle}}^{(\text{Ct gene controle TT} - \text{Ct gene controle CC})}}$$

Onde,

E = Eficiência de amplificação do *primer*

Ct (*threshold cycle*) = o ciclo de PCR no qual foi detectada fluorescência acima do sinal basal do equipamento.

A relação apresentada anteriormente foi facilitada com o desenvolvimento do programa REST[®] 2005, onde dados foram submetidos à análise estatística, considerando-se significativos os valores de probabilidade de $P < 0,05$ (PFAFFL et al., 2002).

5 RESULTADOS

5.1 Extração de RNA total

As amostras de RNA total, extraídas dos músculos *Gastrocnemius lacteralis* (G) e *Biceps femoris* (B), foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade das mesmas. Na Figura 5.1 pode-se visualizar as bandas correspondentes às subunidades 28S e 18S do RNA ribossômico.

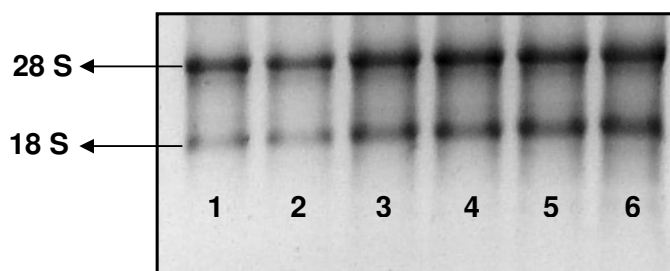


Figura 5.1 Eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade das amostras de RNA total extraídas. As canaletas correspondem a: 1. músculo *Gastrocnemius* (G) 21 dias linhagem TT 1; 2. músculo *Biceps* (B) 21 dias TT 7; 3. G 21 dias CC 1; 4. G 42 dias TT 2; 5. B 42 dias TT 5, 6. G 42 dias CC 2.

Depois de verificada a integridade do RNA total, o material foi quantificado em espectrofotômetro em leitura de absorbância a 260 nm e a concentração foi estimada segundo a relação:

$$\text{Concentração } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = \frac{(\text{Abs}_{260 \text{ nm}}) \times \text{DO} \times \text{DILUIÇÃO}}{1000}$$

Onde:

DO: Densidade Óptica (para RNA, DO=40).

Foi realizada também, a leitura da absorbância a 280 nm, comprimento de onda no qual se estima a concentração de proteínas. Calculou-se, então, a razão gerada entre a leitura a 260 nm e a 280 nm, visando estimar a pureza do ácido nucléico que, segundo Sambrook et al. (1989) deve ser $\geq 1,6$.

Os valores de razão das amostras analisadas no presente trabalho variaram de 1,6 a 1,8.

5.2 PCR quantitativa

5.2.1 Otimização dos *primers*

Os *primers* foram otimizados por reação de PCR. Para tal, foram realizadas reações com diferentes concentrações de MgCl_2 (de 1,5 mM a 2,5 mM) e diferentes temperaturas de anelamento (50 a 60 °C), buscando-se as melhores condições para a amplificação.

A especificidade de cada um dos *primers* foi analisada por meio da visualização de bandas únicas, de tamanho esperado, em gel de agarose 2%. Primeiramente os *primers* desenhados foram testados em termociclador convencional para posteriormente serem confirmadas as especificidades no sistema de PCR em tempo real.

Os *primers* desenhados para os genes *MyoD*, *Miostatina*, *MRF4* e *Miogenina* foram otimizados a temperatura de 55 °C (Figura 5.2 – canaletas 2, 3, 4 e 6). Contudo, o *primer* construído para o gene *Myf-5* (Figura 5.2 – canaleta 7) e o segundo par de *primers* construídos para o gene *MRF-4* (Figura

5.2 - canaleta 5) não foram específicos nessa temperatura de anelamento. Sendo assim, para as análises da expressão de MRF4 em PCR quantitativa foi utilizado o *primer* MRF4-1, pois o *primer* MRF4-2 apresentou amplificação com bandas inespecíficas. A reação de amplificação para o gene da Miogenina (Figura 5.2 – canaleta 6) apresentou bandas inespecíficas, porém quando feita a confirmação no sistema de PCR em tempo real, obteve-se reação específica, ratificada pela análise da curva de *melting* (Figura 5.3).

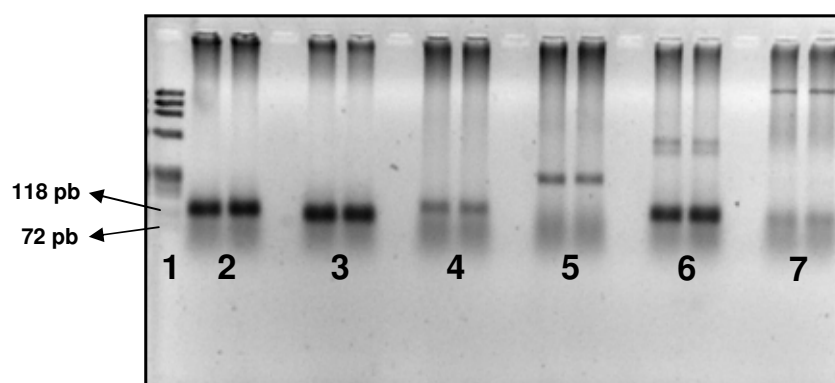


Figura 5.2 Visualização dos produtos de PCR em gel de agarose 2%. Onde: 1. Marcador de peso molecular $\Phi x 174$ (*Invitrogen*), 2. Produto amplificado para o gene *MyoD*; 3. Produto amplificado para o gene *Miostatina*; 4. Produto amplificado para o gene *MRF4-1*; 5. Produto amplificado para o gene *MRF4-2*; 6. Produto amplificado para o gene *Miogenina* e 7. Produto amplificado para o gene *Myf-5*.

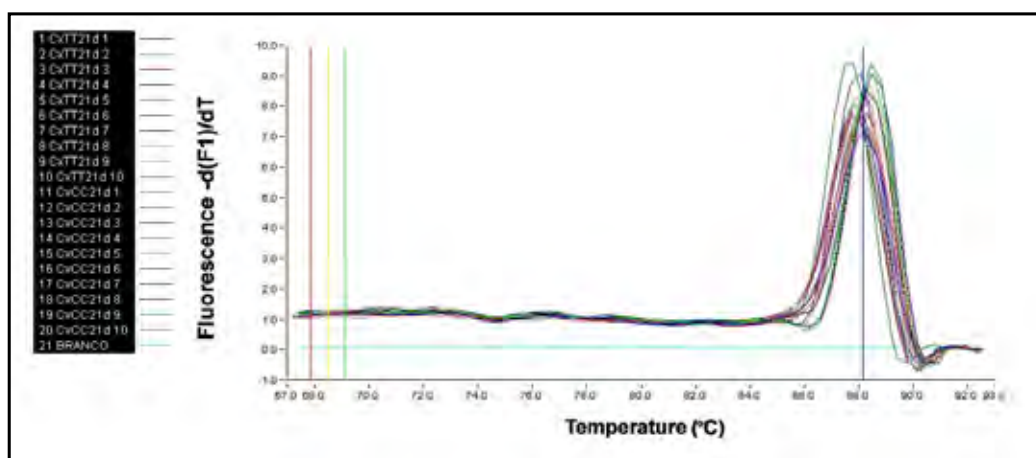


Figura 5.3 Curva de *melting* para o gene *miogenina*, confirmando a especificidade do *primer*.

O gene referência (GAPDH) apresentou amplificação específica a 57 °C (Figura 5.4).

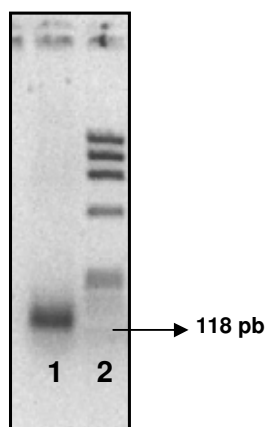


Figura 5.4. Visualização do produto de PCR do gene GAPDH em gel de agarose 2%. Onde: 1. Produto amplificado GAPDH e 2. Marcador molecular $\Phi x 174$ (Invitrogen).

5.2.2 Construção das curvas padrão e cálculo da eficiência de amplificação

Para estimar a eficiência de amplificação, foram utilizadas curvas padrão de diluição de cDNA. Para a construção das curvas, foi utilizado um *pool* de cDNA, feito a partir de amostras provenientes de amostras do músculo *Biceps femoris* de diversos animais de 21 dias. A partir deste, foram feitas as seguintes diluições: 5×10^{-1} , $2,5 \times 10^{-1}$, $1,25 \times 10^{-1}$, $6,25 \times 10^{-2}$, $3,12 \times 10^{-2}$ e $1,5 \times 10^{-2}$. Utilizando-se essa diluição seriada, foi realizada uma reação de RT-PCR quantitativa onde se obteve o valor de Ct, relativo à concentração de cDNA de cada uma das amostras (Figura 5.5).

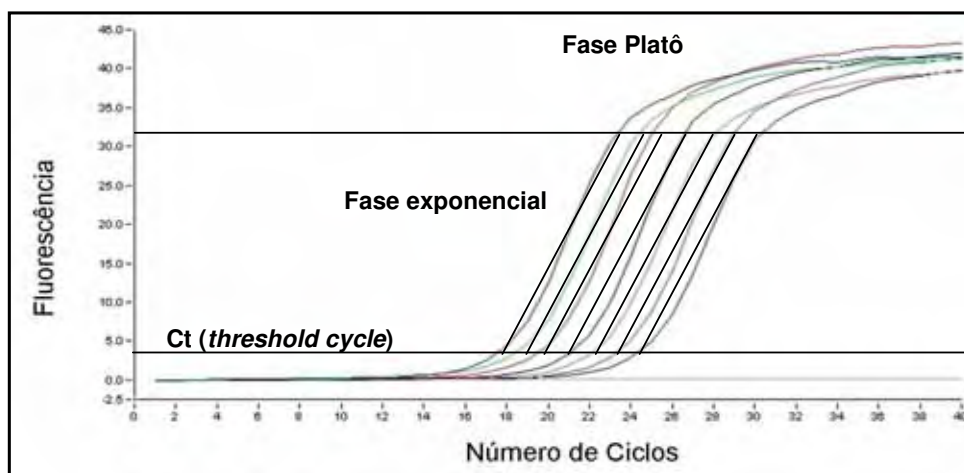


Figura 5.5 Curva de amplificação da diluição seriada para o gene MyoD.

O valor de Ct (*threshold cycle*) refere-se ao ciclo de PCR no qual foi detectado pelo equipamento o aumento na fluorescência acima do sinal basal. Portanto, quanto maior a expressão do gene, mais cedo ocorrerá a detecção da fluorescência e menor será o valor de Ct. Em se tratando de uma reação de PCR, que se dá em progressão geométrica, à diferença de um ciclo no valor de Ct é muito significativa em relação ao número inicial de cópias do gene alvo na amostra (GIULIETTI et al., 2001)

Foi observada uma relação linear entre a quantidade de cDNA das amostras utilizadas e os valores de Ct. Com base nesses dados foi gerado um gráfico de Ct *versus* o \log_{10} do número relativo de cópias da diluição em série (Figura 5.6).

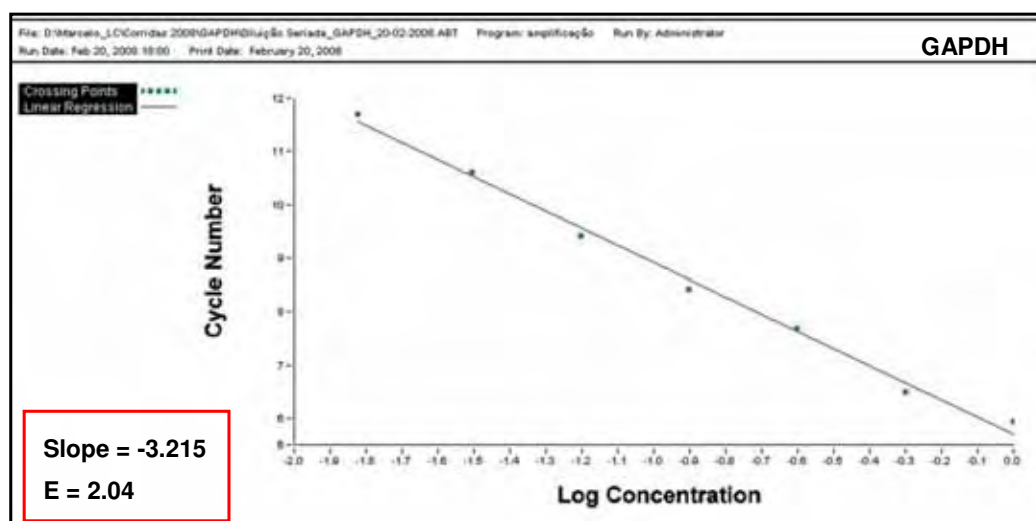


Figura 5.6. Curva padrão gerada para cálculo de eficiência de amplificação do gene GAPDH. Em destaque, o coeficiente angular da reta (*slope*) e o valor da eficiência (E).

A eficiência de amplificação (E) para cada *primer* foi calculada utilizando-se o valor referente ao coeficiente angular da reta (*Slope*), segundo equação proposta por Rasmussen, 2001:

$$E = 10^{(-1/\text{coeficiente angular da reta})}$$

Os valores da eficiência de amplificação podem variar de 1 (valor mínimo) até 2 (valor máximo e considerado ótimo) (PFFAFL et al., 2002). As eficiências calculadas para o presente estudo variaram de 1,73 para o gene MRF4-1 a 2,04 para o gene controle GAPDH (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Valores de eficiência de amplificação para cada gene utilizado

Gene	Eficiência de Amplificação
MRF4-1	1,73
Miostatina (MSTN)	1,77
MyoD	1,83
Miogenina	2,00
GAPDH	2,04

5.2.4 Quantificação Relativa

Foi utilizado o método de quantificação relativa, que é fundamentado em mudanças na expressão do gene alvo num determinado grupo, em relação a um grupo referência (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). Nas figuras 5.7 e 5.8, estão representadas as curvas de amplificação e *melting* geradas para o fator *MyoD*, respectivamente.

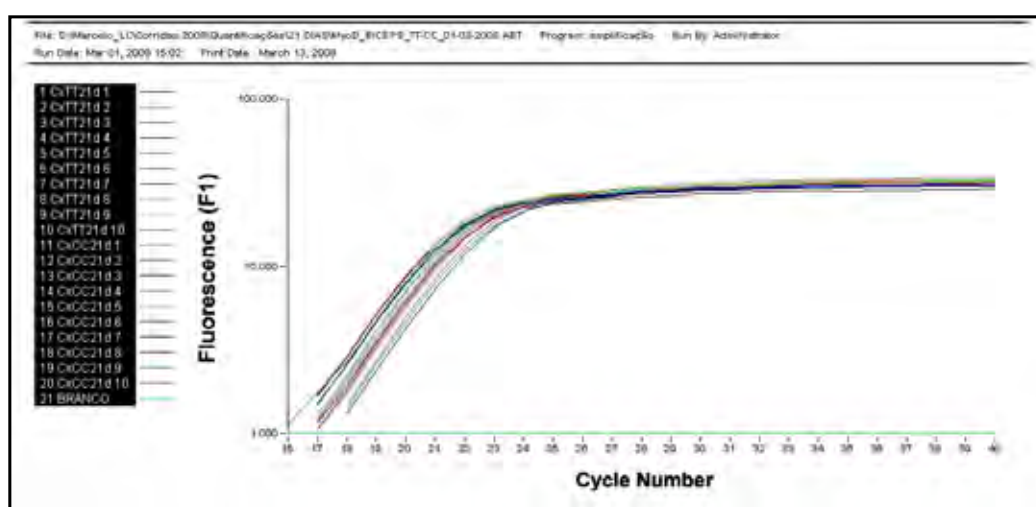


Figura 5.7 Amplificação do gene *MyoD* para o tecido *Biceps femoris* na idade de 21 dias nas linhagens TT e CC.

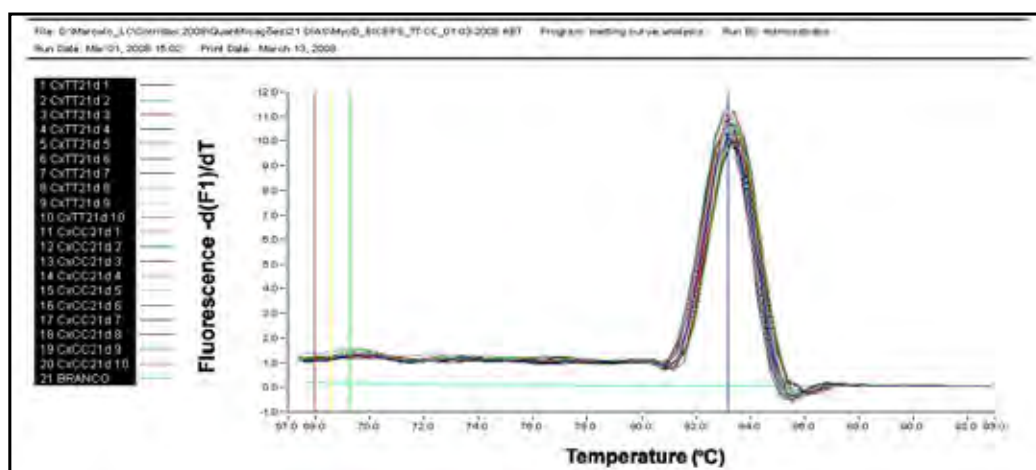


Figura 5.8 Curva de *melting* do gene *MyoD* para o tecido *Biceps femoris* na idade de 21 dias nas linhagens TT e CC. Todos os indivíduos das duas linhagens obtiveram pico de fluorescência único.

As análises dos resultados obtidos foram realizadas com auxílio do programa REST[®] 2005 (PFAFFL et al., 2002), utilizando -se a relação TT/CC (tabelas de 5.3 a 5.6).

Verificou-se que *MRF4* teve maior expressão na linhagem CC (postura) em relação à linhagem TT (corte) na sobrecoxa (Bíceps) nas idades de 21 e 42 dias e coxa (Gastrocnêmio) 42dias (Tabela 5.4). Em animais de 42 dias, na coxa, a miogenina também foi mais expressa na linhagem de postura (CC) em relação à linhagem de corte (TT) (Tabela 5.5).

Tabela 5.3 Resultado de expressão gênica para o gene *MyoD* gerado pelo programa REST 2005.

Gene	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
MYOD Sobrecoxa 21 dias TT/CC	0,443 - 1,116	0,301 - 1,612	0,258	NS
MYOD Coxa 21dias TT/CC	0,694 - 1,258	0,406 - 1,958	0,912	NS
MYOD Sobrecoxa 42 dias TT/CC	0,509 - 1,879	0,367 - 3,582	0,915	NS
MYOD Coxa 42dias TT/CC	0,319 - 0,740	0,188 - 1,033	0,122	NS

S = Significativo e **NS** = Não significativo.

Tabela 5.4 Resultado de expressão gênica para o gene *MRF4* gerado pelo programa REST 2005.

Gene	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
MRF4 Sobrecoxa 21dias TT/CC	0,298 - 0,656	0,210 – 0,879	0	S (D)
MRF4 Coxa 21dias TT/CC	0,575 - 1,177	0,296 – 1,750	0,485	NS
MRF4 Sobrecoxa 42 dias TT/CC	0,238 - 0,779	0,167 – 1,499	0,005	S (D)
MRF4 Coxa 42dias TT/CC	0,171 - 0,496	0,097 – 0,669	0	S (D)

S = Significativo e **NS** = Não significativo, **D** = menos expresso em TT.

Tabela 5.5 Resultado de expressão gênica para o gene Miogenina (Miog.) gerado pelo programa REST 2005.

Gene	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
MIOG. Sobrecoxa 21 dias TT/CC	0,457 - 1,225	0,318 - 5,138	0,606	NS
MIOG. Coxa 21dias TT/CC	0,440 - 1,381	0,239 - 2,122	0,521	NS
MIOG. Sobrecoxa 42 dias TT/CC	0,258 - 1,248	0,174 - 2,278	0,157	NS
MIOG. Coxa 42dias TT/CC	0,083 - 0,411	0,045 - 0,725	0	S (D)

S = Significativo, **NS** = Não significativo e **D** = menos expresso em TT.

Tabela 5.6 Resultado de expressão gênica para o gene Miostatina (MSTN) gerado pelo programa REST 2005.

Gene	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
MSTN Sobrecoxa 21dias TT/CC	0,532 - 6,328	0,345 - 22,115	0,369	NS
MSTN Coxa 21dias TT/CC	0,418 - 1,289	0,321 - 1,927	0,265	NS
MSTN Sobrecoxa 42 dias TT/CC	0,381 - 0,923	0,233 - 1,428	0,079	NS
MSTN Coxa 42dias TT/CC	0,355 - 1,074	0,219 - 1,624	0,581	NS

S = Significativo e **NS** = Não significativo.

Outra análise, comparando a expressão relativa entre animais de 21 e 42 dias demonstrou uma redução na expressão do gene da miostatina (MSTN) em ambos os músculos analisados, além de uma redução na expressão de *MyoD* no músculo da coxa em animais da linhagem de postura (tabelas 5.7 e 5.8).

Tabela 5.7 Resultado de expressão relativa entre idades no músculo da coxa. Para a análise foi utilizada a relação 42/21 dias.

Gene	Linhagem	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
GAPDH	TT	0,515 - 1,872	0,260 - 2,845	1	
MyoD	TT	0,278 - 0,676	0,172 - 1,054	0,472	
MRF4	TT	1,159 - 3,573	0,590 - 6,050	0,643	
Miogenina	TT	0,436 - 2,650	0,207 - 4,013	0,991	
MSTN	TT	0,149 - 0,526	0,107 - 0,832	0,019	S (D)
GAPDH	CC	0,645 - 1,581	0,501 - 1,963	1	
MyoD	CC	0,149 - 0,322	0,119 - 0,416	0,004	S (D)
MRF4	CC	0,451 - 1,122	0,338 - 1,389	1	
Miogenina	CC	0,138 - 0,437	0,092 - 0,617	0,069	
MSTN	CC	0,149 - 0,399	0,100 - 0,564	0,04	S (D)

S = Significativo, NS = Não significativo e D = menos expresso em TT.

Tabela 5.8 Resultado de expressão relativa entre idades no músculo da sobrecoxa. Para a análise foi utilizada a relação 42/21 dias.

Gene	Linhagem	Erro padrão	Intervalo Confiança 95%	P(H1)	Resultado
GAPDH	TT	0,634 - 1,580	0,433 - 2,157	1	
MyoD	TT	0,406 - 1,016	0,240 - 1,409	0,402	
MRF4	TT	0,653 - 1,437	0,435 - 2,057	0,994	
Miogenina	TT	1,171 - 3,590	0,615 - 15,172	0,175	
MSTN	TT	0,237 - 0,560	0,166 - 0,877	0,001	S (D)
GAPDH	CC	0,611 - 1,866	0,465 - 3,006	1	
MyoD	CC	0,273 - 0,951	0,189 - 1,477	0,902	
MRF4	CC	0,284 - 0,925	0,216 - 1,474	0,95	
Miogenina	CC	0,249 - 1,594	0,085 - 2,680	0,939	
MSTN	CC	0,018 - 0,218	0,005 - 0,372	0,001	S (D)

S = Significativo, NS = Não significativo e D = menos expresso em TT.

6 DISCUSSÃO

Os fatores miogênicos, assim como a Miostatina, estão associados a diversas fases do desenvolvimento da musculatura esquelética (ZIMMERS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003; MANCEAU et al., 2008; LEE, 2004; DAL PAI-SILVA e CARVALHO, 2007). Dessa forma, trabalhos que possibilitem um melhor entendimento dos mecanismos de ação desses genes são importantes e encorajados.

No trabalho desenvolvido por Alves (2004), a expressão de *MyoD* foi maior na linhagem de corte em relação a de postura durante toda a fase embrionária (9 e 17 dias de desenvolvimento embrionário). Já a miogenina e *MRF4* foram mais expressos na linhagem de corte tanto na fase embrionária quanto nos animais adultos (pintinhos de 1 dia e frangos de 21 dias de idade). Já neste trabalho, foram encontradas diferenças de expressão para *MRF4* e miogenina em animais adultos, ambos na linhagem de postura (CC). Este resultado divergente pode ser devido ao tipo de fibra muscular do tecido estudado, uma vez que Alves (2004) estudou a expressão no músculo peitoral e no presente trabalho, foram estudados os músculos da coxa e sobrecoxa.

Alguns trabalhos têm sugerido que *MRF4* atua sinergicamente com a miogenina tanto na diferenciação celular quanto na maturação dos mioblastos (HASTY et al., 1993; BRAUN & ARNOLD, 1995).

Zhou e Bornemann (2001), conduzindo um trabalho com regeneração de músculos peitorais necrosados de ratos adultos, verificaram um aumento na expressão de *MRF4* em fibras em regeneração. A regeneração da musculatura

esquelética se dá pelo recrutamento de células satélites, que consiste em uma população de células mononucleadas e indiferenciadas presentes no músculo esquelético (FOSCHINI et al, 2004). Estudos demonstraram que membros da família *MyoD* estão associados às vias de recrutamento de células satélites (MAIER et al, 2002; WAGER et al, 2005; RELAIX et al, 2006), entretanto a via de ação de *MRF4* pode ser distinta dos outros membros da família, uma vez que ele não é expresso em células satélites mas somente após a formação das miofibras (ZHOU e BORNEMANN, 2001).

Os resultados obtidos sugerem que músculos de animais CC, uma vez injuriados possam responder favoravelmente ao processo de regeneração muscular. No período de criação de aves de postura (CC) que é maior (1,5 ano) em relação às aves de corte (42 dias), diversas injúrias musculares podem ocorrer e, dessa forma, aves dessa linhagem podem se restabelecer antes que aves da linhagem de corte (TT).

A maior expressão de *MRF4* em CC foi surpreendente, pois se esperava uma diferença em miostatina, por se tratar de um fator de transcrição que atua diretamente no desenvolvimento muscular. Isto se justifica, pois fenotipicamente as duas linhagens utilizadas como modelo experimental neste trabalho apresentam diferenças bastante divergentes com relação ao crescimento muscular (detalhes, vide Figura 4.1). Diferenças significativas de peso vivo aos 41 dias entre as linhagens estudadas foram verificadas por Ledur et al. (2000) que relataram médias de 2,39 kg e 0,51 kg para TT e CC respectivamente. No trabalho de Alves (2004), foi verificado o peso do músculo peitoral das aves das linhagens TT e CC, obtendo-se valores que variaram de 1,5g para TT e 1,3g para CC aos 9 dias de desenvolvimento embrionário e aos 21 dias pós-eclosão, obteve-se valores de 778g para TT e 218g para CC.

Outra hipótese para ter havido uma maior expressão de *MRF4* na linhagem de postura ao invés de na corte com era o esperado, é que tenha ocorrido um atraso na expressão dos fatores miogênicos. Em estudo realizado com codornas por Coutinho e colaboradores (1993), foi observado que alguns somitos só desenvolvem-se após a expressão de um fator de regulação miogênica. No referido trabalho, foram utilizadas duas linhagens de codornas

(linhagem P e C – Controle), e se observou que transcorridas 47 horas de incubação, os embriões da linhagem C iniciaram a expressão de *qmf1* (*quail myogenic factor 1*, análogo ao *MyoD* em galinhas) com 12 somitos enquanto que os embriões da linhagem P iniciaram a expressão de *qmf1* com somente 7 somitos. Dessa forma, nos embriões da linhagem C ocorre um atraso de expressão desse fator miogênico em relação aos embriões da linhagem P.

Utilizando a linha de raciocínio utilizada por Coutinho e colaboradores (1993), a maior expressão de *MRF4* na linhagem de postura observada no presente trabalho, pode ser devido a um atraso na expressão desse fator miogênico. Porém, no presente estudo, foram utilizados animais adultos (21 e 42 dias) enquanto que no experimento citado foram utilizados animais em desenvolvimento embrionário.

Comparando-se os dados de expressão das duas idades estudadas, demonstrou-se que a Miostatina tem sua expressão reduzida de 21 para 42 dias em ambos os tecidos estudados, já quando realizamos análise comparando as linhagens estudadas (CC e TT), não há diferença de expressão. Dados de microscopia eletrônica de varredura obtidos por Patrício¹ para o músculo peitoral de ambas as linhagens, mostram que TT apresenta uma maior hipertrofia em relação a CC. Ainda, em TT há um aumento considerável no número de fibras musculares de 21 para 42 dias.

A redução da expressão da miostatina pode ser devido à função regulatória desse gene, uma vez que este é um importante regulador negativo da miogênese (ZIMMERS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003; MANCEAU et al., 2008). Supondo que a miostatina tivesse um aumento ao invés de diminuir, poderíamos ter animais com uma hipertrofia fora do comum. Clop e colaboradores (2006), em estudo realizado, encontraram o QTL (*Quantitative Trait Loci*) relacionado à hipertrofia muscular, ou seja, está relacionado com o gene da miostatina, em ovelhas da raça Texel. O silenciamento desse *locus* pode ocasionar um fenômeno chamado de musculatura dupla.

Kocamis e colaboradores (2001) analisaram a expressão do gene da Miostatina em galinhas nos músculos peitoral e da sobrecoxa (*Biceps femoris*).

¹ Patrício, K. (Laboratório de Biotecnologia Animal, Departamento de Zootecnia, USP/ESALQ). Comunicação Pessoal, 2008.

Não foi detectada a expressão de miostatina em cultura de células satélite em estágio inicial (0 hora) de incubação, mas com 48 horas, ocorreu um aumento na expressão se manteve constante até 144 horas de incubação em ambos os tecidos. Com 72 horas de incubação de células provenientes da sobrecoxa ocorreu um aumento acentuado de expressão gênica da miostatina. Relacionando-se com o presente estudo, pode-se considerar que em animais adultos a expressão de miostatina estava diminuindo, e devido a isso, não foram obtidos resultados significativos entre as linhagens. Já comparando-se entre idades (21 e 42 dias) ocorreu uma diminuição da expressão desse gene, o que pode representar uma redução de expressão ao longo do tempo.

Ainda, focando os trabalhos citados anteriormente, pode-se inserir em estudos futuros nessas linhagens, outros fatores de transcrição, como por exemplo, a família *Pax*. Dois membros dessa família, *Pax 3* e *7*, possuem funções homólogas que também estão relacionadas com a miogênese e animais em desenvolvimento embrionário, uma vez que se constatou a maior expressão neste período de desenvolvimento, pois assim poder-se-ia traçar o perfil mais completo de expressão gênica para os animais das linhagens TT e CC. Ainda, para melhor entendimento das vias celulares para essas linhagens (CC e TT), pode-se inserir estudos de microscopia paralelamente as análises moleculares, assim poderia-se entender melhor como os genes atuam nos tecidos estudados.

7 CONCLUSÃO

Foi possível traçar o perfil de expressão de alguns genes entre as duas linhagens (TT e CC), para a coxa (*Biceps femoris*) e a sobrecoxa (*Gastrocnemius lateralis*).

MRF4 apresentou maior expressão em CC na sobrecoxa aos 21 e 42 dias e coxa aos 42 dias. Miogenina apresentou maior expressão aos 42 dias na coxa. Entretanto para os demais genes não houve diferenças entre TT e CC.

Observou-se uma redução na expressão de miostatina, em ambos os músculos, de animais de 42 dias em relação aos de 21 dias. Padrão similar foi observado para *MyoD* no músculo da coxa.

8 REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALVARES, L.E.; MANTOANI, A.; CORRENTE, J.E.; COUTINHO, L.L. Standard-curve competitive RT-PCR quantification of myogenic regulatory factors in chicken embryos. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.36: p.1629-1641, 2003.

ALVES, H.J. Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte. 103 p. **Tese (Doutorado)** – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

AMTHOR, H.; CONNOLLY, D.; PATEL, K.; BRAND-SABERI, B.; WILKINSON, D.G.; COOKE, J.; CHRIST, B.. The expression and regulation of follistatin and a follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. **Developmental Biology**. v. 178, p. 343– 362, 1996.

AMTHOR, H.; CHRIST, B.; PATEL, K.. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth—A balance between proliferation and differentiation. **Development**, v. 126, p. 1041–1053,1999.

- AMTHOR, H.; CHRIST, B.; RASHID-DOUBELL, F.; KEMP, C.F.; LANG, E.; PATEL, K.. Follistatin regulates bone morphogenetic protein-7 (BMP-7) activity to stimulate embryonic muscle growth. **Developmental Biology**, v. 243, p. 115–127, 2002a.
- 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**, v. 251, p. 241–257, 2002b.
- AMTHOR, H.; NICHOLAS, G.; MCKINNELL, I.; KEMP, F.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; PATEL, K.. Follistatin complexes Myostatin and antagonises Myostatin-mediated inhibition of myogenesis. **Developmental Biology**, v. 270, p. 19–30, 2004.
- ARNOLD, H.H.; WINTER, B. Muscle differentiation: more complexity to the network of myogenic regulators. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 8, n. 5, p. 539-544, 1998.
- ARNOLD, H.H.; BRAUN, T. Genetics of muscle determination and development. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 48, p. 129-164, 2000.
- BLADT, F.; RIETHMACHER, D.; ISENMANN, S.; AGUZZI, A.; BIRCHMEIER, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. **Nature**, v. 376, n. 31, p. 768-761, 1995.
- BRAUN, T., RUDNICKI, M.A., ARNOLD, H.H., JAENISCH, R. Target inactivation of muscle regulatory gene Myf-5 results in abnormal rib development and perinatal death. **Cell**, v. 71, p. 369-382, 1992.

- BRAUN, T.; ARNOLD, H.H. Inactivation of Myf-6 and Myf-5 genes in mice leads to alterations in skeletal muscle development. **EMBO Journal**, 14, p. 1176-1186, 1995.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILHAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, v. 202, p. 59–68, 2003.
- BURGESS, R.; CSERJESI, P.; LIGON, K.L.; OLSON, E.N. Paraxis: a bHLH protein expressed in paraxial mesoderm and developing somites. **Developmental Biology**, v. 168, p. 296-306, 1995.
- CASTELHANO-BARBOSA, E.C.; GABRIEL, J.E.; ALVARES, L.E.; MONTEIRO-VITORELLO C.B.; COUTINHO L.L. Temporal and spatial expression of the myostatin gene during chicken embryo development. **Growth Development & Aging**, v. 69 (1), p. 3-12, 2005.
- CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBE, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSEN, J.M.; EYCHENNE, F. ; LARZUL, C.; LAVILLE, E., MEISH, F.1, 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**, v. 38, n. 7, p. 813-818, 2006.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step methods of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. **Analytical Biochemistry**, v. 162, p. 156-159, 1987.

- CHRIST, B.; JACOB, M. & JACOB, H.J. On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscle in the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. **Anatomy Embryology**. V. 126, p. 87-101, 1983.
- CHRIST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embryology**, v. 191, p. 381-396, 1995.
- COUTINHO, L.L.; MORRIS, J.; MARKS, H.L.; BUHR, R.J.; IVARIE, R. Delayed somite formation in a quail line exhibiting myofiber hyperplasia is accompanied by delayed expression of myogenic regulatory factors and myosin heavy chain. **Development**, v. 117, p. 563-569, 1993.
- DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO R.F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36 (suplemento especial), p.21-37, 2007.
- DIETRICH, S. Regulation of hypaxial muscle development. **Cell and Tissue Research**, v. 296, n. 1, p. 175-182, 1999.
- EMERSON, C.P. Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 3, p. 265-274, 1993.
- FAINSOD, A.; DEISLER, K.; YELIN, R.; MAROM, K.; EPSTEIN, M.; PILLEMER, G.; STEINBEISSER, H.; BLUM, M.. The dorsalizing and neural inducing gene follistatin is an antagonist of BMP-4. **Mechanics Development.**, v. 63, p. 39–50, 1997.
- FOSCHINI, R.M.S.A.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arquivo Brasileiro de Oftalmologia**, v. 67, p. 681-7, 2004.

- GABRIEL, J.E.; DA MOTA, A.F.; BOLELI, I.C., MACARI, M., COUTINHO, L.L.
Effect of moderate and severe heat stress on avian embryonic hsp70 gene expression. **Growth Development & Aging**, v.66(1), p.27-33, 2002.
- GHETIE, V.; CHITESCU, S. T.; COTOFAN, V.; HALLEBRAND, A. Atlas de la **Anatomia de las Aves Domésticas**. Zaragoza: Acribia, 294p., 1981.
- GILBERT, S.F. **Biologia do Desenvolvimento**. 5^a ed., 994p. FUNPEC editora, 2006.
- GIULIETTI, A.; OVERBERGH, L.; VALCKX, D.; DECALLONNE, B.; BOUILLON, R.; MATHIEU, C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to cytokine gene expression. **Methods**, v. 25, p. 386-401, 2001.
- GUERNEC A.; BERRI C.; CHEVALIER B.; WACRENIER-CERE, N.; LE BIHANDUVAL E.; DUCLOS M.J.. Muscle development, insulin-like growth factor-I and myostatin mRNA levels in chickens selected for increased breast muscle yield. **Growth Hormone & IGF Research.**, v. 13, p. 8–18, 2003.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.
- HATTA, K., TAKAGI, S., FUJISAWA, H., TAKEICHI, M. Spatial and temporal expression pattern of N-cadherin cell adhesion molecules correlated with morphogenetic processes of chicken embryos. **Developmental Biology**, v. 120(1), p. 215-227, 1987.

- HASTY, P.; BRADLEY, A.; MORRIS, J.H.; EDMONDSON, D.G.; VENUTI, J.M.; OLSON, E.N.; KLEIN, W.H. Muscle deficiency and neonatal death in mice with a targeted mutation in the myogenin gene. **Nature**, London, v. 364, n. 6437, p. 501-506, 1993.
- HAUSCHKA, S.D. The embryonic origin of muscle. In: ENGEL, A.G. **Myology** New York: Mcgraw Hill, cap. 1, p. 3-73, 1994.
- HEMMATI-BRIVANLOU, A.; KELLY, O.G.; MELTON, D.A.. Follistatin, na antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neutralizing activity. **Cell**, v. 77, p. 283– 295, 1994.
- HOUZELSTEIN, D.; AUDA-BOUCHER, G.; CHÉRAUD, Y.; ROUAUD, T.; BLANC, I.; TAJBAKHS, S.; BUCKINGHAM, M.E.; FONTAINE-PÉRUS, J.; ROBERT, B. The homeobox gene Msx1 is expressed in a subset of somites, and in muscle progenitor cells migrating into the forelimb. **Development**, v. 126, p. 2689-2701,1999.
- IEMURA, S.; YAMAMOTO, T.S.; TAKAGI, C.; UCHIYAMA, H.; NATSUME, T.; SHIMASAKI, S.; SUGINO, H.; UENO, N.. Direct binding of follistatin to a complex of bone-morphogenetic protein and its receptor inhibits ventral and epidermal cell fates in early *Xenopus* embryo. **Proceedings of the National. Academy of Science (U.S.A.)**, v. 95, p. 9337–9342, 1998.
- KABLAR, B.; KRASTEL, K.; YING, C.; ASAKURA, A.; TAPSCOTT, S.J.; RUDNICKI, M.A. MyoD and Myf-5 differentially regulate the development of limb versus trunk skeletal muscle. **Development**, v. 124, p. 4729-4738, 1997.

- KOCAMIS, H, KIRKPATRICK-KELLER, D.C.; RICHTER, J.; KILLEFER, J. The ontogeny of myostatin, Follistatin and Activin-B mRNA expression during chicken embryonic development. **Growth Development & Aging**, v. 63, p. 143–50, 1999.
- KOCAMIS, H.; MCFARLAND, D.C; KILLEFER, J. Temporal expression of growth factor genes during myogenesis of satellite cells derived from the biceps femoris and pectoralis major muscles of chicken. **Journal of cellular physiology**, n. 186, p. 146-152, 2001.
- KOCAMIS, H.; KILLEFER, J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. **Domestic Animal Endocrinology**, v. 23, p.447–54, 2002.
- LASH, J.W.; YAMADA, K. The adhesion recognition signal of fibronectin: A possible trigger mechanism for compaction during somitogenesis. In: BELLAIRS, R.; EDE, D.H.; LASH, J.W. (eds.). **Somites in Developing Embryos**, p. 201-208, 1986.
- LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; SAATKAMP, M.G.; BASSI, L. J.; COUTINHO, L.L. Peso e características de carcaça em linhagens utilizadas no desenvolvimento de populações referência para detecção de QTL em aves. **Anais da Conferência APINCO**, 2000.
- LEE, S.J. Regulation of muscle mass by myostatin. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, p. 61-86, 2004.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. **Methods**, New York, v. 25, p. 402-408, 2001.

- MAIER, A.; ZHOU, Z.; BORNEMANN, A. The expression profile of myogenic transcription factors in satellite cells from denervated rat muscle. **Brain Pathology**, v.12, p.170-177, 2002.
- MANCEAU, M.; GROS, J.; SAVAGE, K.; THOMÉ, V.; MCPHERRON, A.; PATERSON, B.; MARCELLE, C. Myostatin promotes the terminal differentiation of embryonic muscle progenitors. **Genes & Development**, v. 22, p. 668-681, 2008.
- MANKOO, B.S.; COLLINS, N.S.; ASHBY P.; GRIGORIEVA, E.; PEVNY L.H.; CANDIA A.; WRIGHT, C.V.; RIGBY P.W.; PACHNIS, V. Mox2 is a component of the genetic hierarchy controlling limb muscle development. **Nature**, n. 1; v. 400, p. 69-73, 1999.
- MCPHERRON, A.C; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, p. 83-90, 1997.
- MEGENEY, L.A.; KABLAR, B.; GARRET, K.; ANDERSON, J.E.; RUDNICKI, M.A. MyoD is required for myogenic stem cell function in adult skeletal muscle. **Genes Development**, v. 10, p. 1173-1183, 1996.
- MICHEL, U.; FARNWORTH, P.; FINDLAY, J.K.. Follistatins: more than follicle-stimulating hormone suppressing proteins. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 91, p. 1– 11, 1993.
- MOTT, I.; IVARIE, R. Expression of myostatin is not altered in lines of poultry exhibiting myofiber hyper- and hypoplasia. **Poultry Science**, v. 81, p. 799–804, 2002.
- NABESHIMA, Y.; HANAOKA, K.; HAYSAKA, M.; ESUMI, E.; LI, S.; NONAKA, I. Myogenin gene disruption results in perinatal lethality because of severe muscle defect. **Nature**, v. 364, p. 532-534, 1993.

- OSTROVSKY, D.; CHENEY, C.M.; SEITZ, A.W.; LASH, J.W. Fibronectin distribution during somitogenesis in the chick embryo. **Cell Differ**, v. 13, p. 217-223, 1984.
- PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, v.29, n.9. p. 2002:2007. 2001.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative Expression Software Tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real time PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n.9, e.36, p.1-10, 2002.
- POURQUIÉ, O. Vertebrates Somitogenesis. **Annual Review of Developmental Biology**, v.17, p. 311-350, 2001.
- POWNALL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON JR., C.P. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrates embryos. **Annual Review of Developmental Biology**, v. 18, p. 747-783, 2002.
- PURI, P.L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA-binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **Journal of Cellular Physiology**, v. 185, p. 155-173, 2000.
- RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In Meuer, S., Witter, C; and Nakagawara, K. (eds). **Rapid cycle Real time PCR, Methods and applications**, p. 21:34. 2001.
- RAWLS, A.; OLSON, E.N. MyoD meets its maker. **Cell**, v. 89, n. 4, p. 5-8, 1997.

RELAIX F, D MONTARRAS, S ZAFFRAN, B GAYRAUD-MOREL, D ROCANCOURT, S TAJBAKSHI, A MANSOURI, A CUMANO AND ME BUCKINGHAM. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. **Journal of Cell Biology**, v. 172, p. 91–102, 2006.

RUDNICKI, M.A.; SCHNEGELSBERG, P.N.; STEAD, R.H.; BRAUN, T.; ARNOLD, H.H.; JAENISCH, R. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. **Cell**, v. 75, n. 7, p. 1351-1359, 1993.

SABOURIN, L.A.; RUDNICKI, M.A. The molecular regulation of myogenesis. **Clinical Genetics**, v. 57, p. 16-25, 2000.

SAMBROOK J.; FRITSCH E. F.; MANIATIS T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, 3 v., 1989.

SATO, A.; SAKAMAKI, K.; IDE, H.; TAMURA, K. Characteristics of initiation and early events for muscle development in the *Xenopus* limb bud. **Developmental Dynamics**, n. 234, p. 846–857, 2005.

SAXENA, V.K.; SUNDARESAN, N.R.; FAIZI MALIK; AHMED, K.A; SAXENA, M.; SUMIT KUMAR; NANDEDKAR, P.V.; SINGH, R.V. Temporal expression of transforming growth factor- β 2 and myostatin mRNA during embryonic myogenesis in Indian broilers. **Research in Veterinary Science**, n. 82, p. 50-53, 2007.

SCHÄFER, K.; BRAUN, T. Early specification of limb muscle precursor cells by the homeobox gene *Lbx1*. **Nature Genetics**. v. 23, p. 213–216, 1999.

- SCHIMIDT, C.; BLADT, F.; GOEDECKE, S.; BRINKMANN, V.; ZSCHIESCHE, W.; SHARPE, M.; et al. Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. **Nature**, n. 373, p. 699-702, 1995.
- STOCKDALE, F.E.; NIKOVITS, J.R.; CHRIST, B. Molecular and cellular biology of avian somite development. **Developmental Dynamics**, v.219, p.304-321, 2000.
- TAGLINGER, K.; VAN NGUYEN, N.; HELPS, C.R.; DAY, M.J.; FOSTER, A.P. Quantitative real-time RT-PCR measurement of cytokine mRNA expression in the skin of normal cats and cats with allergic skin disease. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 122(3-4), p. 216-30, 2008.
- TAJBAKHSI, S.; BOBER, E.; BABINET, C.; POURNIN, S.; ARNOLD, H.H.; BUCKINGHAM, M. Gene targeting the myf-5 locus with nlacZ reveals expression of this myogenic factor in mature skeletal muscle fibres as well as early embryonic muscle. **Developmental Dynamics**, New York, v. 206, n. 3, p. 291-300, 1996.
- TAJBAKHSI, S.; BUCKINGHAM, M. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. In: **Current Topics in Developmental Biology, Somitogenesis** (ed. ORDAHL, C.P.), v. 47, p. 225–268, 2000.
- VALDEZ, M.R.; RICHARDSON, J.A.; KLEIN, W.H., OLSON, E.N. Failure of Myf-5 to support myogenic differentiation without myogenin, MyoD and MRF4. **Developmental Biology**, v. 219, n. 2, p. 287-298, 2000.
- VELLEMAN, S. G. Muscle Development in the Embryo and Hatchling. **Poultry Science**, v. 86, p. 1050-1054, 2007.

WAGERS A.J.; CONBOY, I.M. Cellular and molecular signatures of muscle regeneration: current concepts and controversies in adult myogenesis. **Cell** v. 122, p.659–667, 2005.

WITTEWER, C.T.; RIRIE, K.M.; ANDREW, R.V.; DAVID, D.A.; GUNDRY, R.A.; BALIS, U.J. The LightCycler™: A microvolume multisample fluorimeter with rapid temperature control. **BioTechniques**, v. 22, p.176-181, 1997.

WHITTEMORE, L.A., SONG, K.; LI X.; AGHAJANIAN J.; DAVIES M.; GIRGENRATH S.; et al. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 300, p. 965–71, 2003.

WIGMORE, P.M.; EVANS, D.J.R. Molecular and cellular mechanisms involved in the generation of fiber diversity during myogenesis. **International Reviews of Cytology**, v. 216, p. 175-232, 2002.

ZHOU, Z.; BORNEMANN, A. MRF4 protein expression in regenerating rat muscle. **Journal of muscle research and cell motility**, v. 22, p. 311-316, 2001.

ZIMMERS T.A.; DAVIES M.V.; KONIARIS L.G.; HAYNES P.; ESQUELA A.F.; TOMKINSON K.N.; et al. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. **Science**, v. 296, p. 1486–8, 2002.

ANEXOS

Anexo 1 - Extração de RNA total com Trizol

(TRIzol[®] Reagent - Invitrogen Cat. Nº 15596-026)

- Primeiramente, ligar a centrífuga a 4 °C;
 - Tratar o Almofariz e pistilo, primeiramente AUTOCLAVAR e posteriormente TRATAR com Peróxido de hidrogênio (Água Oxigenada).
1. Macerar o tecido em nitrogênio líquido com auxílio do Almofariz e pistilo, previamente tratado
 2. Para 50-100 mg de tecido, adicionar 1 mL de Trizol (em tubo eppendorf de 1,5 mL);
 3. Incubar a Temperatura Ambiente por 5 minutos;
 4. Acrescentar 200 µL de clorofórmio;
 5. Agitar vigorosamente com as mãos por 15 segundos;
 6. Incubar a Temperatura Ambiente por 5 minutos;

Centrifugar a 11.000 rpm por 15 minutos a 4 °C (**Separa as 3 fases**);

7. Remover fazer aquosa para outro tubo eppendorf limpo;
8. Adicionar 500 µL de Isopropanol 100%. Homogeneizar em vortex (Precipitação do RNA);
9. Incubar a Temperatura Ambiente por 10 minutos;
10. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 minutos a 4 °C;

Descartar o sobrenadante (CUIDADO PARA NÃO PERDER O “PELLET”);

Lavar com 1 mL de Etanol 75% (Preparado com H₂O_{DEPC}). Homogeneizar em vortex (para descolar o “pellet”). OBS.: NESTE PASSO PODE GUARDAR O RNA EM ETANOL 75% EM FREEZER -20°C;

11. Centrifugar a 9.000 rpm por 5 minutos a 4°C;
12. Secar o “pellet” por 15 minutos a Temperatura Ambiente;
13. Ressuspender RNA em H₂O_{DEPC} (20 µL), sempre em gelo;
14. Incubar por 10 minutos a 60°C;
15. Colocar em Gelo;
16. Guardar em Freezer -80 °C.

* TRIZOL contém Isotilcianato de Guanidina, que protege o RNA.

Anexo 2 - Protocolo de Síntese de cDNA

(*Super Script™ III First Strand Synthesis SuperMix – Invitrogen Cat nº 18080-400*)

Até 5µg de RNA	___ µL
Oligo dT	1 µL
Annealing Buffer	1 µL
H ₂ O _{DEPC} q.s.p.	___ µL
VOLUME FINAL	8 µL

1. Incubar a 65°C por 5 minutos*;
2. Gelo por 1 minuto;
3. Adicionar[♦]:
 - 2x First strand reaction mix ----- 10µL
 - SSIII/RNA OUT ----- 2µL
4. Vortex, em seguida, Spin;
5. Incubar 50 minutos a 50°C*;
6. Terminar a Reação a 85°C por 5 minutos;
7. Colocar no gelo;
8. Armazenar em -20°C.

[♦]Para facilitar quanto houver muitas amostras, preparar mix.

Ex. 10 amostras de RNA, lembrando de corrigir o erro da pipeta, fazendo mix para 11 amostras;

	1x	11x
• 2x First strand reaction mix	10µL	110µL
• SSIII/RNA OUT	2µL	22µL

*No termociclador** ou placa aquecedora.

**No termociclador, elaborar dois programas:

Programa 1:

- 1 ciclo de 65°C por 5 minutos

Programa 2 (serão 3 ciclos)

1º ciclo: 50°C por 50 minutos

2º ciclo: 85°C por 5 minutos

3º ciclo: 4°C ∞