



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Raquel Albuquerque Rangel

“Caracterização da expressão da *Miostatina* e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética de galinha (*Gallus gallus*)”

Campinas

2018

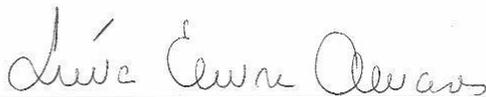
Raquel Albuquerque Rangel

“Caracterização da expressão da *Miostatina* e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética de galinha (*Gallus gallus*)”

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Celular e Estrutural, na área de Biologia Tecidual.

Orientadora: Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares

ESTE ARQUIVO DIGITAL
CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA
DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA
ALUNA RAQUEL ALBUQUERQUE
RANGEL, E ORIENTADA PELA PROFA.
DRA. LÚCIA ELVIRA ALVARES.



Campinas

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 130213/2017-9

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

R163c Rangel, Raquel Albuquerque, 1985-
Caracterização da expressão da *Miostatina* e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética de galinha (*Gallus gallus*) / Raquel Albuquerque Rangel. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Desenvolvimento muscular. 2. *Miostatina*. 3. Marcadores moleculares. I. Alvares, Lúcia Elvira, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of *Myostatin* expression and its regulators throughout skeletal myogenesis of chicken (*Gallus gallus*)

Palavras-chave em inglês:

Muscle development

Myostatin

Molecular markers

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Lúcia Elvira Alvares [Orientador]

Mary Anne Heidi Dolder

Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Data de defesa: 01-08-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 01 de agosto de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares (Orientadora)

Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder

Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin

Os membros da Comissão Examinadora acima assinaram a Ata de Defesa, que se encontra no processo de vida acadêmica da aluna.

“O conceito de embrião é assombroso, e a formação de um embrião é a tarefa mais árdua que alguém haverá de realizar. Para se tornar um embrião, você teve que construir a si mesmo a partir de uma única célula. Teve que respirar antes que tivesse pulmões, digerir alimentos antes que seus órgãos estivessem formados, construir ossos a partir de uma massa e ordenar os neurônios antes mesmo de adquirir a capacidade de pensar. Uma diferença marcante entre você e a máquina é que a máquina nunca é requisitada para uma função antes que esteja terminada. Todo animal tem que estar em funcionamento enquanto se auto-constrói.”

(Scott F. Gilbert, excerto do livro “Biologia do Desenvolvimento”)

“Experimente coisas novas...

*Você certamente conhecerá coisas melhores
e coisas piores do que as já conhecidas,
mas não é isso o que importa.*

*O mais importante é a mudança,
o movimento,
o dinamismo,
a energia.”*

(Clarice Lispector)

*Dedico à minha amada filha Sophia e ao
meu estimado marido Alisson.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, à minha filha, Sophia, e ao meu marido, Alisson, por compartilharem comigo essa grande caminhada. Apesar de todos os obstáculos, vocês se fizeram presentes o tempo inteiro e me deram muita força para lutar e prosseguir. Eu só posso agradecer pela presença de vocês na minha vida! Sinceramente, essas palavras escritas se tornam ínfimas perto da importância que vocês representam, porém, com todo meu carinho e emoção, meu muito obrigada por estarem comigo em todos esses momentos!!!

Agradeço à minha mãe, Cleusa, aos meus irmãos, Marcio e Luciano, e à minha sobrinha, Lígia, por existirem na minha vida e por todo o carinho e incentivo.

A casa que se tornou o meu lar no último ano de mestrado. Agradeço ao Pedro, Fernanda, Fernando, Thiago e Fábio pela convivência e por todo apoio e carinho!

À professora Lúcia Elvira Alvares, minha orientadora, e que me deu a oportunidade de fazer parte do Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, da Unicamp. Muito obrigada por todos os ensinamentos e, principalmente, por acreditar na minha capacidade!

Aos professores que compõem essa banca de defesa de mestrado: Profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, Profa. Dra. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, Prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro e Profa. Dra. Hozana Andrade Castillo. Muito obrigada por aceitarem participar deste momento e pela disponibilidade em avaliar este trabalho.

Agradeço em especial a pessoas muito queridas que conheci: Carolina Mantovani, Viviane Rosa, Bianca Castelucci. Muito obrigada por todos os ensinamentos e conversas! Aprendi muito com vocês, meninas super poderosas!

À colega de laboratório, Renata, por compartilhar todo o seu conhecimento com cultura primária e também pela ajuda na realização da cultura primária de mioblastos para a produção deste trabalho.

A todos os colegas que tive a oportunidade de conhecer, conviver e aprender um pouco mais com cada um deles: Aline Mika, Ângela, Cyro, Daniela, Érico, Fernanda, Leandro, Marina, Monique, Natássia, Ricardo, Thaísa e Valquíria.

Um agradecimento super especial a um grande amigo que fiz na Unicamp, Jhonne, por todo o suporte emocional e também pela ajuda em diversos experimentos. Muito obrigada, meu querido, te levarei para sempre em meu coração!

Ao querido Rafael Rossi, por toda ajuda nos experimentos com o anticorpo da MIOSTATINA e principalmente por toda a paciência e atenção comigo!

Ao prof. Dr. Paulo Pinto Joazeiro e ao prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni pela permissão para usar o Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica (LCI) do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual (DBBT). Agradeço também a esses dois professores maravilhosos, Paulo e Sílvio, sempre solícitos e dispostos a contribuir com conhecimentos tão valiosos e enriquecedores!

À querida profa. Dra. Mary Anne Heidi Dolder, por me abrir as portas do seu laboratório, Laboratório de Biologia da Reprodução, onde pude realizar diversos experimentos para compor este trabalho. Agradeço muito por todo o carinho dessa pessoa incrível e amável, disposta a me atender e tirar as minhas dúvidas a todo o momento. Incluo nesse agradecimento o Jhonne (citado anteriormente), a Livia e a Cristina, que fazem parte desse laboratório maravilhoso!

À profa. Dra. Maria Cristina Cintra Gomes Marcondes, pela doação de materiais que permitiram realizar os ensaios com o anticorpo da MIOSTATINA.

À profa. Dra. Carla Beatriz Collares Buzzato pela atenção e disponibilidade em tirar minhas dúvidas.

Ao prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza por disponibilizar o espaço e os equipamentos do Laboratório de Regulação Gênica Embrionária (LaRGE).

Ao prof. Dr. Hernandez Faustino Carvalho, por disponibilizar a utilização do equipamento para as análises de RT-PCR quantitativo em tempo real, no laboratório de Matriz Extracelular.

Ao prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira, por disponibilizar o uso do microscópio de fluorescência para os ensaios de imunofluorescência deste trabalho.

Ao INCT-INFABiC pela disponibilidade do microscópio confocal e ao físico Vítor que ficou à disposição para eventuais dúvidas na utilização do mesmo.

Às técnicas maravilhosas, competentes, atenciosas e prestativas: Thaís, Cintia e Suzy. Muito obrigada meninas!!!

À secretária Liliam Panaggio, por todo o carinho e atenção!

À Universidade Estadual de Campinas e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela oportunidade e crescimento profissional e pessoal.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

A todos os demais professores, técnicos administrativos e demais funcionários da Unicamp, que contribuíram intelectualmente, com doações de materiais, com espaço físico ou qualquer outro tipo de ajuda: obrigada pelo empenho de vocês!

E com muita satisfação, finalizo homenageando a todos que contribuíram de alguma forma para que este trabalho fosse concluído da melhor forma possível: “Diante da vastidão do tempo e da imensidão do Universo, é um imenso prazer para mim dividir um planeta e uma época com você” (Carl Sagan). Agradeço imensamente a todos vocês que compartilharam seus conhecimentos comigo! Esse é o principal e mais importante legado que levo comigo! Meu muito obrigada!

RESUMO

A miogênese é um processo que envolve mudanças progressivas a partir de células progenitoras localizadas nos somitos dos embriões de vertebrados. Estas células, conhecidas como mioblastos, passam por uma etapa inicial de intensa proliferação celular para, em seguida, diferenciar-se formando miócitos que se fundem para compor fibras musculares contráteis. O sucesso destas diferentes etapas depende de um complexo panorama de expressão gênica, que envolve a atividade de marcadores moleculares com funções bem estabelecidas. Dentre eles, estão marcadores associados com: 1) o comprometimento da linhagem miogênica e proliferação das células progenitoras (*Pax3* e *Myf-5*), 2) início da diferenciação celular (*MyoD*, *Miogenina*, *Miostatina*), 3) diferenciação terminal e formação das fibras musculares contráteis (cadeia pesada da miosina – *MyHC*) e 4) marcadores reguladores do ciclo celular (*p21*), bem como o gene endógeno *GAPDH*. No presente estudo utilizou-se amostras de tecido da musculatura peitoral de embriões de galinha nos estádios 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário e células de cultura primária de mioblastos de galinha. Dada a carência de informações sobre a expressão dos marcadores moleculares clássicos da miogênese, o objetivo deste trabalho foi estabelecer o padrão de expressão gênica da *Miostatina* (*Mstn*), a distribuição espacial e o conteúdo proteico da MSTN, importante regulador do crescimento e desenvolvimento da musculatura esquelética, e dos demais marcadores selecionados nesse estudo ao longo das diferentes etapas da miogênese esquelética. Para tanto, a atividade dos marcadores selecionados foi definida, primeiramente, por RT-PCR e, em seguida, foi feita a quantificação da expressão gênica por qRT-PCR, tanto em tecidos, modelo *in vivo*, quanto em células, modelo *in vitro*. Posteriormente, realizou-se um estudo da distribuição espacial da proteína MSTN, em tecidos e em células, bem como a análise do conteúdo proteico, em tecidos. Além disso, realizou-se uma caracterização morfológica da miogênese fetal em galinha (dias 8, 11, 14 e 17) para observar as modificações que ocorrem ao longo do desenvolvimento. Os resultados confirmaram a expressão gênica da *Mstn* durante todas as etapas da miogênese fetal em galinha, tanto em tecidos (dias de desenvolvimento embrionário 8, 11, 14 e 17) quanto em cultura primária de mioblastos (cinco dias de diferenciação celular). Quanto aos marcadores moleculares, no modelo *in vivo*, ocorreu aumento gradual do *p21* em consonância com o aumento da expressão da *Mstn*; *Pax3* apresentou indução no dia 11 e teve uma queda acentuada no dia 17; *Myf-5* manteve-se constante ao longo dos dias; *Myod* e *Miogenina* apresentaram aumento da expressão no dia 11, precedendo o pico de expressão da *Mstn* no dia 14; *MyHC* aumentou sua expressão nas etapas mais avançadas do desenvolvimento, com destaque para o dia 17. Em contrapartida, no modelo *in vitro*, o *p21* teve aumento progressivo de sua expressão ao longo dos 5 dias de cultura, em oposição à *Mstn*; *Pax3* e *Myf-5* apresentaram maior expressão nos dias 1 e 2 da cultura; *Myod* e *Miogenina* tiveram maior expressão nos primeiros dias de cultura; *MyHC* apresentou-se muito mais expresso nos dias 4 e 5 de cultura celular. Em tecidos, os estudos de expressão gênica corroboraram com os dados obtidos nas etapas seguintes, onde foi observado, por imuno-histoquímica, a distribuição espacial da proteína e a confirmação do conteúdo proteico da MSTN. Enquanto que em células, o resultado obtido por meio da imunocitoquímica não foi conforme o esperado, visto que as células da cultura celular não apresentaram níveis detectáveis da proteína MSTN. O último ensaio produzido neste trabalho, com co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha, revelou que podem ser os fibroblastos, presentes na co-cultura, que parecem expressar a MSTN, contudo, por ser um achado inédito, serão necessários estudos futuros para comprovar essa hipótese levantada.

Palavras-chave: Miogênese esquelética, *Miostatina*, marcadores moleculares.

ABSTRACT

Myogenesis is a process that progressively evolves into the development of progenitor cells in vertebrate embryos. These cells, known as myoblasts, undergo a first stage of cell proliferation and then differentiate into myocytes that fuse together to form contractile muscle fibers. The success of these steps depends on a complex panorama of gene expression, which involves the activity of function markers with well-established functions. Among them, markers associated with: 1) the impairment of myogenic taxation and proliferation of progenitor cells (*Pax3* and *Myf-5*), 2) onset cell differentiation (*MyoD*, *Myogenin*, *Myostatin*), 3) terminal differentiation and formation of fibers (*MyHC*), and 4) markers regulators of the cell cycle (*p21*), as well as the endogenous gene *GAPDH*. Tissue samples from the pectoral muscles of chicken embryos were used in stages 8, 11, 14 and 17 of the embryonic development and primary culture cells of chicken myoblasts. The aim of this study was to establish the gene expression pattern of *Myostatin* (*Mstn*), the spatial distribution and protein content of MSTN, an important regulator of skeletal muscle growth and development, and the lack of information on the expression of classical molecular markers of myogenesis and the other selected markers mentioned above, along the different stages of skeletal myogenesis. The activity of the selected markers was firstly defined by RT-PCR and then the quantification of the gene expression by qRT-PCR, in tissues, *in vivo* model, and in cells, *in vitro* model. Subsequently, a study of the spatial distribution of MSTN protein in tissues and cells, as well as the analysis of the protein content, was carried out in tissues. In addition, a morphological characterization of fetal myogeny in chicken (days 8, 11, 14, and 17) was performed to observe the changes occurring throughout development. The results confirmed the gene expression of *Mstn* during all stages of fetal chicken myogenesis in both tissues (embryonic development days 8, 11, 14 and 17) and in myoblast primary culture (five days of cell differentiation). As for the molecular markers, of the *in vivo* model, there was a gradual increase of *p21* in consonance with the increase of *Mstn* expression; *Pax3* presented induction on day 11 and had a sharp drop on day 17; *Myf-5* remained constant throughout the days; *Myod* and *Myogenin* showed increased expression on day 11, preceding the *Mstn* expression peak on day 14; *MyHC* increased its expression in the more advanced stages of development, especially on day 17. In contrast, in the *in vitro* model, *p21* had progressive increase of its expression during the 5 days of culture, as opposed to *Mstn*; *Pax3* and *Myf-5* showed higher expression on days 1 and 2 of the culture; *Myod* and *Myogenin* had greater expression in the first days of culture; *MyHC* showed much more expression on days 4 and 5 of cell culture. In tissues, gene expression studies corroborated the data obtained in the following steps, where the spatial distribution of the protein and the confirmation of the protein content of MSTN were observed by immunohistochemistry. However in cells, the result evidenced by immunocytochemistry was not as expected, since cells from the cell culture did not have detectable levels of the MSTN protein. The last assay produced in this work, using co-culture of fetal primary myoblasts with organoids of chicken fibroblasts, revealed that the presence of MSTN may be due to the fibroblasts, present in the co-culture, that seem to express MSTN. Since this is an unprecedented finding, future studies should be carried out to prove this hypothesis.

Key words: Skeletal myogenesis, *Myostatin*, molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1.** Corte transversal, na região mediana do embrião de galinha. Observa-se os derivados do mesoderma em ambos os lados do tubo neural, com destaque para o mesoderma paraxial.....20
- Figura 2.** Miogênese esquelética em vertebrados. Representação esquemática dos somitos, mostrando a formação do dermomiótomo e miótomo, onde residem as células precursoras miogênicas, envolvidas na gênese da musculatura esquelética. O esclerótomo, também mostrado, participa da formação do esqueleto axial dos vertebrados.....21
- Figura 3.** Representação esquemática dos eventos que ocorrem no desenvolvimento dos somitos ao longo do eixo anteroposterior de um embrião.....22
- Figura 4.** Etapas envolvidas na miogênese esquelética, a partir das células precursoras mesodérmicas encontradas até a formação das fibras musculares adultas.....23
- Figura 5.** Formação da musculatura esquelética, na fase pós-nascimento, envolvendo o processo de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, uma vez que ocorre a incorporação e adição dos núcleos as fibras musculares pré-existentes, levando ao aumento de massa muscular – hipertrofia- devido a produção e expressão síntese de proteínas específicas.....24
- Figura 6.** Papéis postulados para os fatores miogênicos *MyoD*, *Myf-5*, *Miogenina* e *MRF4*.....26
- Figura 7.** Eventos moleculares envolvidos na diferenciação dos somitos.....32
- Figura 8.** Embriões da galinha, representando as idades utilizadas para a dissecação da musculatura esquelética peitoral: a) Embrião de 8 dias; b) Embrião de 11 dias; c) Embrião de 14 dias; d) Embrião de 17 dias.....39
- Figura 9.** Amostras de RNA total, obtidas a partir da musculatura peitoral da galinha em diferentes dias de desenvolvimento. Observar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8 + 5S, indicativas da integridade das amostras. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.....48
- Figura 10.** Amostras de RNA total, obtidas a partir de células de cultura primária de mioblastos de galinha em diferentes dias de diferenciação. Observar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8 + 5S, indicativas da integridade das amostras. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%.....48
- Figura 11.** Análises de expressão gênica no músculo peitoral de galinha em diferentes dias de desenvolvimento. Foram caracterizadas a expressão da *Mstn* e dos marcadores moleculares *Pax3* e *Myf-5* (proliferação), *MyoD* e *MioG* (diferenciação), *p21* (interrupção de ciclo celular), *MyHC* (diferenciação terminal e maturação das fibras) e *Fst* (antagonista da *Mstn*). O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi empregado para monitorar a integridade das amostras.....50
- Figura 12.** Análise da expressão gênica em diferentes dias de diferenciação da cultura primária de mioblastos de galinha. Foram caracterizadas a expressão da *Mstn* e dos marcadores moleculares *Pax3* e *Myf-5* (proliferação), *MyoD* e *MioG* (diferenciação), *p21*

(interrupção de ciclo celular), *MyHC* (diferenciação terminal e maturação das fibras) e *Fst* (antagonista da *Mstn*). O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi empregado para monitorar a integridade das amostras.....51

Figura 13. Expressão gênica, em tecidos, da *Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *Myod*, *Miogenina* e *MyHC*, por qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) ao longo dos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário. As análises de *One way* ANOVA, seguidas de teste de Tukey com significância (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) são indicadas por comparação entre os dias analisados, sendo o dia 8 considerado o calibrador. Barras representam SEM \pm54

Figura 14. Expressão gênica, em células, da *Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *Myod*, *Miogenina* e *MyHC*, por qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) ao longo de 5 dias de cultura primária de mioblastos. As análises de *One way* ANOVA de medidas repetidas, seguidas de teste de Tukey com significância (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) são indicadas por comparação entre os dias 1-5, sendo o dia 1 considerado o calibrador. Barras representam SEM \pm57

Figura 15. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 8 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; An= Vasos sanguíneos; Seta fina= sarcomerogênese; Seta grossa= Núcleos.....59

Figura 16. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 11 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo.....60

Figura 17. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 14 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; An= Vasos sanguíneos; Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo....61

Figura 18. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 17 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; Seta fina= sarcomerogênese; Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo.....62

Figura 19. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 8 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para a imagem B. A-B= Tecido muscular; C= Controle negativo. Imagens de imunofluorescência utilizando

anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidênciação dos núcleos celulares.....64

Figura 20. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 11 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 µm, com aumento de 200x (com zoom óptico) para a imagem A; de 400x para a imagem B; e de 400x (com zoom óptico) para a imagem C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidênciação dos núcleos celulares.....65

Figura 21. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 14 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 µm, com aumento de 200x (com zoom óptico) para a imagem A; e de 400x para as imagens B e C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidênciação dos núcleos celulares.....65

Figura 22. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 17 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 µm, com aumento de 200x para a imagem A; e de 400x para as imagens B e C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidênciação dos núcleos celulares.....66

Figura 23. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imunocitoquímica, ao longo da miogênese esquelética de galinha *in vivo*. As imagens forma obtidas pelo microscópio de fluorescência. Imagens A-E= dias de cultura, do 1 ao 5, respectivamente. F= Controle negativo. Barras: A-F = 50 µm, com aumento de 200x para todas as imagens. Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidênciação dos núcleos celulares.....67

Figura 24. Quantificação, em tecidos, da MTSN, pela técnica de *Western Blotting*, nos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário. As análises de *One way ANOVA*, com valor de significância (* $p \leq 0,05$;) são indicadas por comparação entre os dias analisados. A- As barras representam SEM \pm do conteúdo proteico da MSTN em relação ao conteúdo de GAPDH. B- Imagens do conteúdo das proteínas MSTN e GAPDH.....68

Figura 25. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imunocitoquímica, ao longo da miogênese esquelética de galinha *in vivo*. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência. Fibroblastos foram colocados no dia 2 de cultura e esperou-se 48 horas para a realização da imunocitoquímica. Para visualização mais detalhada, mostra-se: Imagens A, B, D e E= imagens obtidas separadamente do anticorpo e do DAPI, respectivamente. Imagens C e F= imagens compostas (sobreposição das duas cores). Barras: A-F = 50 µm, com aumento de 100x para as imagens A, B e C; e de 200x para as imagens D, E e F.....69

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Informações sobre os *primers* utilizados para amplificação dos genes investigados nesta dissertação. “D” representa direto e “R” representa reverso.....41
- Tabela 2.** Anticorpo primário utilizado nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos e em cultura de células.....46
- Tabela 3.** Anticorpo secundário utilizado nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos e em cultura de células.....46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BLAST – do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*

Fst – *Foslitatina*

GAPDH – *Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase*

MRFs – Fatores regulatórios miogênicos

Mstn – *Miostatina* (gene)

MSTN – MIOSTATINA (proteína)

} Fontes adotadas para identificar e diferenciar as siglas dos genes e das respectivas proteínas

Myf-5 – *Fator miogênico 5*

MyoD – *Diferenciação miogênica*

MyoG – *Miogenina*

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

Pax3 – *Paired box 3*

PCR – *Polymerase Chain Reaction*

qRT-PCR – *Real Time Quantitative PCR*

TGF- β – Fator de transformação do crescimento beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
2.1 A origem e o desenvolvimento da musculatura esquelética	20
2.2 Fatores regulatórios miogênicos	24
2.3 <i>Miostatina</i>	29
2.4 Outros fatores que atuam no processo miogênico	31
2.5 Os embriões de galinha como modelo de estudo da miogênese	35
3. OBJETIVOS	37
3.1 Objetivo Geral	37
3.2 Objetivos Específicos	37
4. METODOLOGIA	38
4.1 Coleta da musculatura esquelética peitoral de embriões de galinha	38
4.1.1 Aprovação ética.....	38
4.1.2 Incubação dos ovos e coleta dos embriões de galinha.....	38
4.2 Análises de expressão gênica de tecidos e de células	39
4.2.1 Extração de RNA total.....	39
4.2.2 Síntese de cDNA.....	40
4.2.3 Desenho dos <i>primers</i>	41
4.2.4 Reação em cadeia polimerase – PCR (RT-PCR).....	42
4.2.5 RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR).....	43
4.3 Preparações histológicas das amostras de tecidos e análise ao microscópio de luz	44
4.4 Análises da distribuição da proteína MSTN de tecidos e de células	45
4.5 Quantificação da MSTN, por <i>western blot</i>, em tecidos	46
4.6 Ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 Integridade do RNA extraído	48
5.2 Estudo e análise da expressão da <i>Mstn</i> e de seus reguladores na miogênese fetal, em tecidos e <i>in vitro</i>, em galinha (<i>Gallus gallus</i>)	49
5.2.1 Investigação da expressão da <i>Mstn</i> e de marcadores moleculares.....	49
5.2.2 Quantificação da expressão gênica por qRT-PCR.....	51
5.3 Caracterização morfológica da miogênese fetal de galinha	58
5.4 Estudo da distribuição espacial da MIOSTATINA (MSTN) em tecidos e em células	64
5.5 Quantificação e análise do conteúdo proteico da MSTN em tecidos	67
5.6 Ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha	68
6. CONCLUSÕES	71
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	73
8. APÊNDICES	86
9. ANEXOS	92

1. INTRODUÇÃO

O tecido muscular compõe a maior parte do corpo de um animal e a unidade básica que forma este tecido é a fibra muscular esquelética (GILBERT, 2003). Os músculos são importantes porque desempenham várias funções, sendo uma das funções básicas o processo de contração muscular que, ao ocorrer, viabiliza várias tarefas cruciais à sobrevivência dos animais, tais como movimentação e sustentação corporal, respiração (diafragma) e deglutição (língua).

O desenvolvimento da musculatura esquelética ocorre a partir do processo de miogênese 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, 2003; MARCHESIN, 2008). A ontogênese das miofibras ocorre durante a vida embrionária, com o aparecimento de ondas sucessivas de mioblastos que constituem a origem dos diferentes tipos de fibra muscular (HAUSCKA, 1994). Os mioblastos podem ser classificados em populações distintas, sendo designados como mioblastos embrionários, fetais e adultos (STOCKDALE, 1992). A primeira onda de produção e povoamento das miofibras origina-se dos mioblastos embrionários e a segunda onda dos mioblastos fetais dando origem, por sua vez, às fibras musculares primárias e secundárias (KALCHEIM; CINNAMON; KAHANE, 1999, PICARD et al., 2002; ALVES, 2004). Em galinhas, os mioblastos embrionários atingem seu auge aos 5 dias da idade embrionária, os mioblastos fetais são presentes entre os dias 8 e 12 da idade embrionária e os mioblastos adultos surgem nos estádios finais do desenvolvimento embrionário (STOCKDALE, 1992; NINOV, 2010).

Nesse contexto miogênico, a miogênese fetal é a responsável por formar a maior parte da massa de músculos esqueléticos, sendo a *Miostatina (Mstn)*, um dos principais genes reguladores da deposição de músculo esquelético. Dessa forma, o objeto de interesse do presente estudo foi analisar o comportamento da *Mstn*, em tecidos (dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento) e cultura primária de células (cinco dias de diferenciação celular) através de estudos da dinâmica da expressão gênica da *Mstn*, distribuição espacial da proteína MSTN, nas células da linhagem miogênica, bem como o estudo do conteúdo proteico da MSTN em tecidos. Análises de expressão gênica de marcadores moleculares, tanto miogênicos quanto de ciclo celular e de diferenciação, a saber: *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *Miogenina*, *MyHC* e *Fst*

também foram realizadas, em tecidos e em células. Ainda neste estudo, conjuntamente foi feita a análise morfológica dos tecidos (dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento), para observar as modificações ao longo do desenvolvimento fetal em galinha (*Gallus gallus*).

O modelo utilizado, embriões de galinha, são fáceis de serem obtidos e possuem um baixo custo, sendo, portanto, excelentes modelos para pesquisas envolvendo modelos animais (BROWN et al., 2003; STERN, 2005; BURT, 2007). Até o momento existem poucos trabalhos caracterizando de maneira detalhada os padrões de expressão gênica de marcadores moleculares e o padrão proteico que atuam em diferentes etapas da miogênese, a saber, a proliferação, a diferenciação inicial e tardia, assim como a maturação das células da linhagem miogênica em aves.

A galinha, *Gallus gallus*, é um amnioto e supõe-se que há uma semelhança muito grande no desenvolvimento desta espécie com outras espécies de vertebrados, incluindo o ser humano. A compreensão da miogênese fetal em aves é importante para entender as bases celulares e moleculares da musculatura esquelética e também pode contribuir para geração de linhagens mais produtivas e para o melhoramento animal, no que se refere à produção animal e a biotecnologia.

No que concerne à pesquisa básica, este trabalho irá propiciar um conhecimento mais aprofundado sobre o papel do gene da *Mstn* e da proteína MSTN no desenvolvimento da musculatura esquelética de aves. Os trabalhos nesta área visam possibilitar estudos sobre funções gênicas e proteicas, mas também a possibilidade de aplicações práticas futuras nas áreas de avicultura e biotecnologia. Em adição, poderão ser realizados estudos de doenças que comprometem a homeostase da musculatura esquelética, tais como distrofias musculares e caquexia.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A origem e o desenvolvimento da musculatura esquelética

Os músculos esqueléticos compõem a maior parte do corpo humano e de outros vertebrados. A unidade básica que forma este tecido é a fibra muscular esquelética, que se caracteriza por ser uma célula extremamente grande, alongada e por apresentar vários núcleos compartilhando um mesmo citoplasma (GILBERT, 2003). As fibras musculares são responsáveis pela contração muscular que, ao ocorrer, viabiliza tarefas essenciais à sobrevivência dos animais, tais como movimentação e sustentação corporal, respiração (diafragma) e deglutição (língua).

O desenvolvimento da musculatura esquelética ocorre a partir do processo de miogênese 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, 2003; MARCHESIN, 2008). Durante o desenvolvimento embrionário, a maioria dos músculos esqueléticos forma-se a partir dos somitos, condensações temporárias de mesoderma paraxial distribuídas em ambos os lados do tubo neural, segundo observa-se na Figura 1 (revisado em SUMMERBELL; RIGBY, 2000; POURQUIE, 2001; POWNALL et al., 2002).

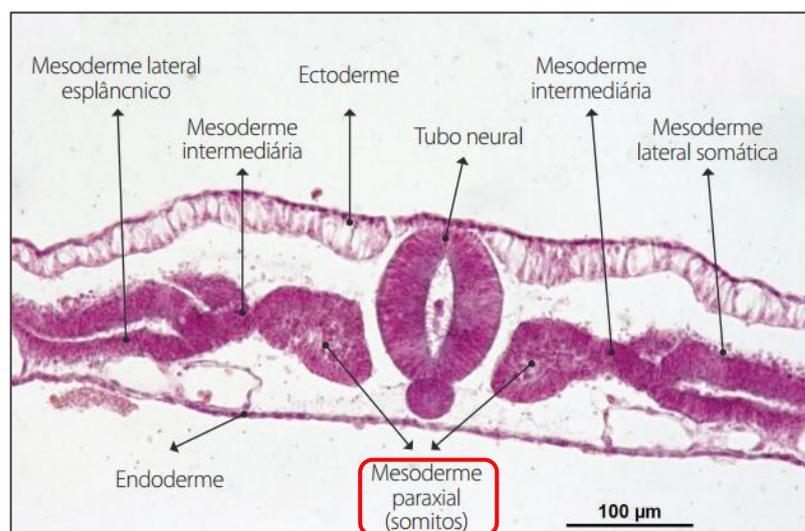


Figura 1. Corte transversal, na região mediana do embrião de galinha (etapa correspondente à finalização da neurulação e continuação do processo de organogênese). Observa-se os derivados do mesoderma em ambos os lados do tubo neural, com destaque para o mesoderma paraxial (Fonte: Rangel, 2015).

Os somitos, conforme amadurecem, sofrem compartimentalização ao longo do eixo dorso-ventral do embrião, originando o dermomiótomo dorsalmente e o esclerótomo ventralmente. O dermomiótomo diferencia-se em dermatômo, que gera a derme, e o miótomo, que origina a musculatura esquelética dos membros e do tronco (Figura 2). Com exceção dos músculos da cabeça e do pescoço, que possivelmente originam-se do mesoderma paraxial anterior aos somitos, todos os demais músculos esqueléticos dos organismos vertebrados derivam dos somitos (CHRIST; ORDAHL, 1995; ALVARES, 2001). Por sua vez, o esclerótomo origina cartilagens e ossos das vértebras e das costelas (DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

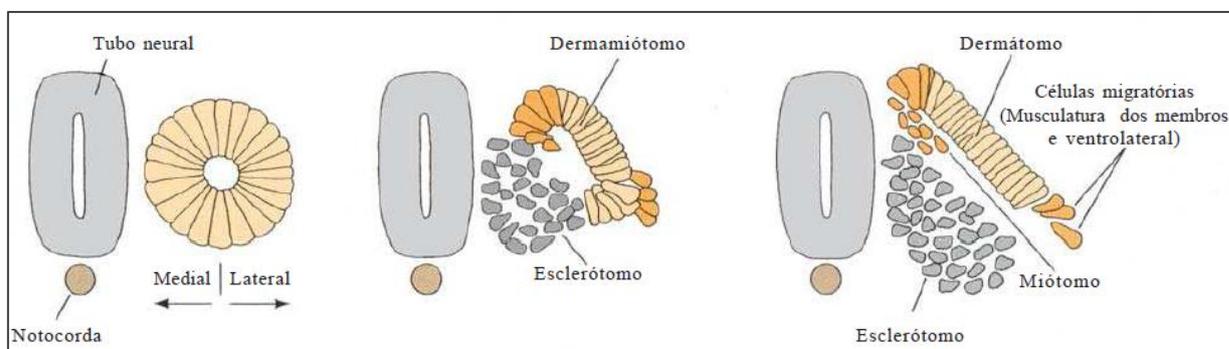


Figura 2. Miogênese esquelética em vertebrados. Representação esquemática dos somitos, mostrando a formação do dermomiótomo e miótomo, onde residem as células precursoras miogênicas, envolvidas na gênese da musculatura esquelética. O esclerótomo, também mostrado, participa da formação do esqueleto axial dos vertebrados (Fonte: Adaptada de Ordahl, 1993. In: Gilbert, 2003).

O dermomiótomo abriga diferentes populações de células precursoras do tecido muscular, que irão formar a musculatura esquelética epaxial e hipaxial (Figura 3). O desenvolvimento da musculatura epaxial inicia-se quando células do lábio dorso-medial (LDM) dos somitos expandem-se sob o dermomiótomo e forma-se um folheto contínuo que origina o miótomo epaxial. Esta expansão possibilita que os mioblastos entrem no miótomo na posição correta para a formação da musculatura epaxial (DENETCLAW et al, 1997; KAHANE et al; 1998; ALVARES, 2001). Por sua vez, o desenvolvimento da musculatura hipaxial origina-se através de dois mecanismos distintos, onde em um dos mecanismos, as porções medial e lateral do miótomo misturam-se, formando uma lâmina contínua de mioblastos, que sob a ativação de genes específicos, irão se diferenciar e originar a musculatura da parede ventral do corpo. Outro mecanismo diferente envolve a desagregação de células do lábio ventro-lateral (LVL) do dermomiótomo, após a separação entre dermomiótomo e esclerótomo. Estas células precursoras miogênicas migram lateralmente em

direção a somatopleura para formar a musculatura (CHRIST; JACOB; JACOB. 1983; DENETCLAW, CRRIST; ORDAHL, 1997; CINNAMON et al; 1999; ALVARES, 2001).

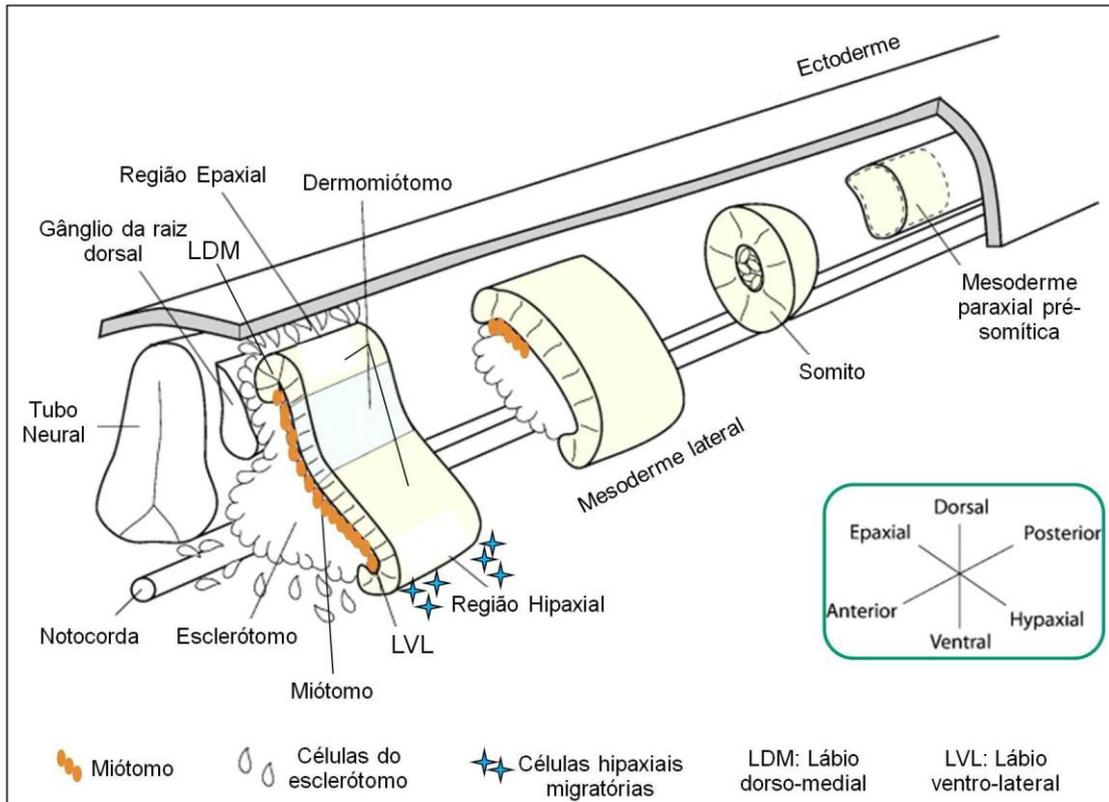


Figura 3. Representação esquemática dos eventos que ocorrem no desenvolvimento dos somitos ao longo do eixo anteroposterior de um embrião (Fonte: Adaptada de Buckingham et al., 2003).

Nos compartimentos miogênicos dos somitos (dermomiótomo e o miótomo), células precursoras mesodérmicas iniciam a miogênese, processo que envolve diferentes etapas, conforme ilustrado na Figura 4. Na determinação, células mesodérmicas dos somitos se comprometem como destino muscular gerando os mioblastos. Estas células proliferam passando por vários ciclos de divisão celular, compondo um *pool* de células precursoras musculares. Em seguida, tem início a diferenciação celular, que ocorre simultaneamente com a interrupção do ciclo celular. Nesta etapa, mioblastos alinham-se com outros mioblastos nas proximidades do tecido conjuntivo, fundindo-se para formar miotubos multinucleados (Fig. 4). Finalmente, a formação das fibras musculares maduras depende da intensa síntese de proteínas miofibrilares, que ocorre com a ativação de proteínas músculos específicas mediadas por fatores transcricionais.

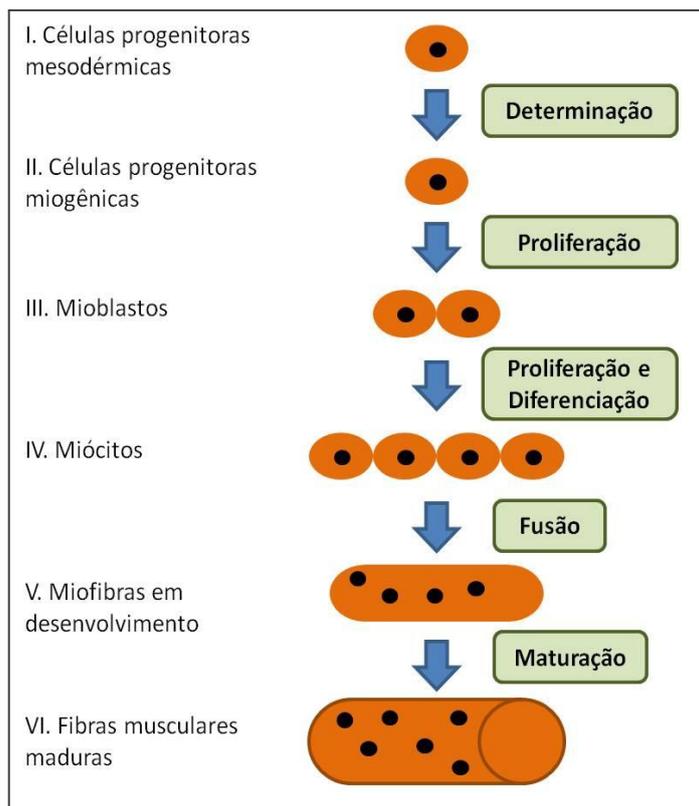


Figura 4. Etapas envolvidas na miogênese esquelética, a partir das células precursoras mesodérmicas encontradas até a formação das fibras musculares adultas (Fonte: Adaptada de Lopes, 2010).

As fibras musculares formadas durante a miogênese embrionária ou primária (Fig.4) geram um arcabouço que será empregado para a diferenciação da população de mioblastos fetais (REHFELDT et al., 2000, PICARD et al., 2002; SOUZA, 2004). Estes mioblastos alinham-se com a rede de fibras musculares primárias, gerando fibras musculares secundárias que conectam a outros miotubos, ocorrendo intensa comunicação célula a célula. Esse período de miogênese secundária, quando ocorre a formação das fibras musculares adicionais, determina o número final das fibras musculares no indivíduo adulto (LOPES, 2010).

Durante o período embrionário e fetal, o crescimento do músculo é caracterizado pelo aumento no número de fibras musculares, processo conhecido como hiperplasia, e, nos vertebrados não ocorre aumento do número de fibras após o nascimento. Na fase de crescimento muscular pós-natal, o aumento na massa muscular ocorre principalmente devido ao aumento do tamanho da fibra muscular, processo conhecido como hipertrofia muscular, cuja síntese é potencializada como resultado da fusão dos núcleos, provenientes das células satélites (Figura 5), às fibras musculares já formadas (LOPES, 2010).

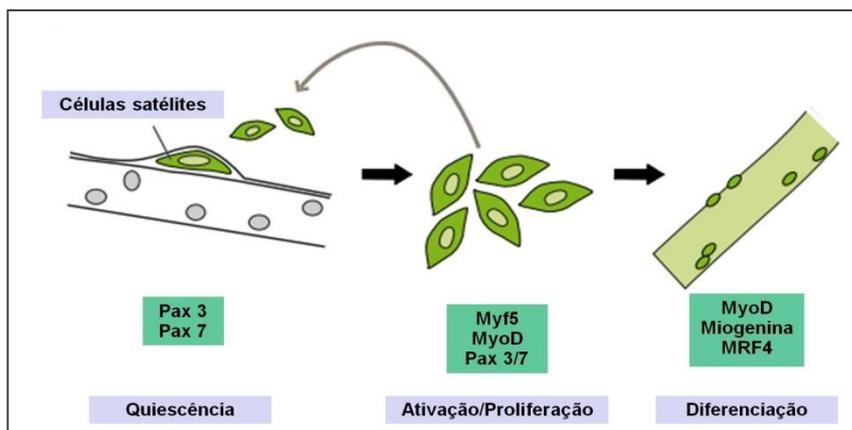


Figura 5. Formação da musculatura esquelética, na fase pós-nascimento, envolvendo o processo de ativação, proliferação e diferenciação das células satélites, uma vez que ocorre a incorporação e adição dos núcleos as fibras musculares pré-existentes, levando ao aumento de massa muscular – hipertrofia- devido a produção e expressão síntese de proteínas específicas (Fonte: Adaptada de Buckingham; Rigby, 2014).

Deste modo, o crescimento muscular ocorre de duas formas: hiperplasia e hipertrofia. As células satélite são as precursoras da musculatura esquelética pós-natal, sendo as únicas células que se proliferam, mantendo o *pool* de células satélites, diferenciam-se e fundem-se com as fibras musculares adjacentes ou ainda com outras células satélites (MAURO, 1961; SEALE et al., 2000). No músculo maduro, as células são quiescentes (adormecidas), mas podem ser ativadas para reparo muscular, caso ocorra alguma injúria. Este processo de reparo envolve a fase de proliferação, a parada do ciclo celular, a diferenciação e, posteriormente, a fusão com os miotubos (KOLEVA et al., 2005). Diversas proteínas são recrutadas tanto nas células satélites em estado quiescente (expressão de *Pax3* e *Pax7*), durante a ativação e proliferação (expressão de *Pax 3/7*, *Myf-5* e *MyoD*) e também na etapa de diferenciação (*MyoD*, *Miogenina* e *MRF4*), conforme fig. 5 (NINOV, 2010; BUCKINGHAM; RIGBY, 2014).

Portanto, durante o desenvolvimento e crescimento dos músculos esqueléticos a formação de células com alto grau de especificidade, como as fibras musculares, necessita da correta combinação da expressão, tanto espacial quanto temporal, de diversos genes reguladores e específicos dos músculos (LUDOLPH; KONIECZNY, 1995; SOUZA, 2004).

2.2. Fatores regulatórios miogênicos

Dentre os genes reguladores da miogênese destacam-se a superfamília *MyoD*, conhecido como fatores regulatórios miogênicos ou MRFs (do inglês, *Miogenic Regulatory Factors*), uma família de fatores de transcrição composta por quatro genes: *MyoD*, *Myf-5*,

Miogenina e *MRF4*. Esses genes possuem dois domínios funcionais: um domínio básico, caracterizado por uma sequência de aminoácidos positivamente carregados, responsável pela interação com o DNA, e um domínio hélice-alça-hélice (HLH, do inglês *helix-loop-helix*), caracterizado por duas α -hélices anfipáticas, 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 (LUDOLPH; KONIECZNY, 1995; SABOURIN; RUDNICKI, 2000; SOUZA, 2004; MARCHESIN, 2008).

Os fatores miogênicos são expressos sequencialmente ao longo do eixo anteroposterior do embrião e apresentam a capacidade de promover a conversão de fibroblastos pluripotentes em fibras musculares *in vitro* (PARKER; SEALE; RUDNICKI, 2003; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; NINOV, 2010). Sendo assim, são responsáveis por promover a determinação e diferenciação das células musculares, a saber: *MyoD* (DAVIS; WEINTRAUB; LASSAR 1987), *Myf-5* (BRAUN et al., 1989), *Miogenina* (EDMONSON; OLSON, 1989; WRIGHT; SASSONN; LIN, 1989) e *MRF4* (RHODES; KONIECZNY, 1989).

A ação dos fatores regulatórios da miogênese (MRFs) já está definida durante o programa miogênico (PURI; SARTORELLI, 2000). *MyoD* e *Myf-5* são considerados fatores miogênicos primários enquanto *miogenina* e *MRF4* são considerados fatores miogênicos secundários (Figura 6). Os MRFs primários são necessários para a etapa de determinação, comprometendo as células proliferativas dos somitos com a linhagem miogênica. Em contrapartida, os MRFs secundários atuam na diferenciação dos miócitos e maturação das miofibras (EMERSON, 1993; ARNOLD; BRAUN, 2000; PURI; SARTORELLI, 2000; SABOURIN; RUDNICKI, 2000; MARCHESIN, 2008).

Estudos evidenciaram que os genes *MyoD* e *Myf-5* apresentam funções redundantes na geração de células precursoras musculares, enquanto a *Miogenina* atua em uma etapa posterior, dirigindo a diferenciação dos mioblastos. O fator *MFR4* é expresso tardiamente durante a embriogênese, bem como em animais adultos (Fig.6) (LUDOLPH; KONIECZNY 1995; NINOV, 2010).

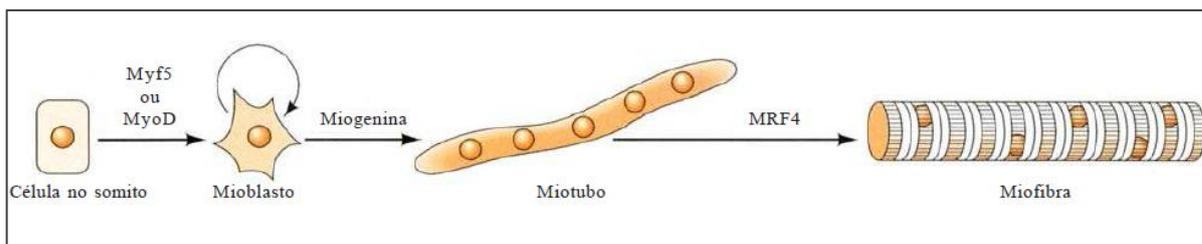


Figura 6. Papéis postulados para os fatores miogênicos *MyoD*, *Myf-5*, *Miogenina* e *MRF4* (Fonte: Gilbert, 2003).

Todos esses fatores de transcrição são reguladores que controlam as etapas da formação muscular e atuam como ativadores da transcrição (LOPES, 2010). Além disso, é relevante destacar que a ativação dos fatores regulatórios miogênicos também possibilita a regulação da expressão de outros genes importantes para a diferenciação miogênica (MANTOVANI, 2015).

a) Fatores Regulatórios Miogênicos Primários: *MyoD* e *Myf-5*

Nas células primárias em cultura e em linhagens de células musculares, constatou-se que os fatores regulatórios da miogênese *MyoD* e *Myf-5* são fortemente expressos em mioblastos durante a etapa de proliferação e continuam presentes, porém em níveis reduzidos, em miócitos diferenciados (ARNOLD; BRAUN, 2000; SOUZA, 2004).

Experimentos demonstraram que o nocaute para o gene *MyoD*, em camundongos homozigotos, não provocou alterações fenotípicas no desenvolvimento, quando comparados com o tipo selvagem (RUDNICKI et al., 1992). Estes resultados revelaram que o gene *MyoD* não é imprescindível para o desenvolvimento dos músculos esqueléticos, assinalando que a expressão de outros genes da superfamília MyoD podem substituir este gene. Assim, níveis elevados de *Myf-5* estariam compensando a ausência de *MyoD*, o que poderia explicar um fenótipo aparentemente normal dos animais mutantes (ALVARES, 2001). Contudo, em experimentos posteriores, executados por Megeney et al. (1996) verificou-se que mutantes adultos apresentavam déficit na regeneração muscular, indicando que este gene atua também no recrutamento de células satélites após a ocorrência de lesões musculares (SOUZA, 2004).

Em experimentos, para o gene *Myf-5*, realizados por Braun et al. (1992) e Tajbakhsh et al. (1996a), alelos mutantes em camundongos, resultaram na formação de uma proteína *Myf-5* não funcional. Nos camundongos mutantes homozigotos, houve a formação incompleta das costelas, entretanto, todos os músculos esqueléticos apresentaram-se morfologicamente normais. De acordo com esse resultado, o gene *Myf-5* parece ser

fundamental para a formação das costelas, mas dispensável para o desenvolvimento muscular esquelético, posto que os animais morrem logo após o nascimento devido a uma severa deficiência respiratória, causada por uma caixa torácica não funcional, justamente pelo comprometimento das costelas (BRAUN et al., 1992, TAJBAKSH et al., 1996a; ARNOLD; BRAUN, 1993; ALVARES, 2001). Visando o entendimento desses resultados obtidos, novos estudos propostos por Tajbaksh et al. (1996b) demonstraram que na ausência de *Myf-5* ocorre uma inibição parcial da somitogênese nos embriões. Observou-se que, nestes animais, ocorre um atraso no desenvolvimento do miótomo, uma vez que as costelas se desenvolvem a partir das células localizadas na região lateral do esqueleto, que ficam em contato direto com o miótomo precoce, ocasionando, conseqüentemente, um comprometimento da caixa torácica. Isto indicaria que sinais produzidos no miótomo são necessários para o completo desenvolvimento das costelas (ALVARES, 2001; SOUZA, 2004).

A inativação concomitante de ambos os genes, *MyoD* e *Myf-5*, impossibilita a formação de mioblastos e, por conseguinte, acarreta uma ausência completa de musculatura esquelética nos mutantes (MUNTONI et al., 2002). Logo, pressupõe-se que os camundongos duplo-nocautes *Myf-5/MyoD* não possuem musculatura esquelética porque são incapazes de diferenciar os precursores em mioblastos. Dessa forma, demonstrou-se que esses fatores regulatórios miogênicos primários são essenciais para o estabelecimento e a manutenção das linhagens miogênicas em todas as partes do corpo (RUDNICKI et al., 1993; ALVARES, 2001; PESSOTTI, 2009).

Além disso, os experimentos com camundongos demonstraram que quando ocorre nocaute para *Myf-5* e *MyoD*, separadamente, os animais possuem musculatura, e assumiu-se que estes dois fatores de determinação muscular atuam em vias separadas ou podem compensar a função um do outro (RUDNICKI et al., 1992; WEINTRAUB, 1993; BRAUN; ARNOLD, 1996; WANG et al., 1996; PESSOTTI, 2009). Ressalta-se também que o *Myf-5* está estruturalmente relacionada à *MyoD* e também atua auxiliando na proliferação das células-satélite na regeneração muscular (HAWKE; GARRY, 2001; OLIVEIRA, 2009). Contudo, embora haja redundância das funções de *MyoD* e *Myf-5*, ambos não se sobrepõem completamente, como, por exemplo, o fato de que *MyoD* é incapaz de reparar o fenótipo deficiente da caixa torácica provocada pela ausência de *Myf-5* (BRAUN et al., 1992). Assume-se, portanto, que existe redundância em funções de maneira parcial, porém, tanto o *MyoD* quanto o *Myf-5* possuem particularidades funcionais (RUDNICKI et al. 1993; ALVARES, 2001).

b) Fatores Regulatórios Miogênicos Secundários: *Miogenina (MyoG)* e *MRF4*

Os mioblastos, que já são células comprometidas, podem proliferar-se, diferenciar-se em miócitos e fundir-se, formando miotubos, e após maturação, miofibras multinucleadas. A *Miogenina* e o *MRF4* aparecem nessa etapa secundária de diferenciação (ARNOLD; BRAUN, 2000). Após esses eventos, genes específicos do músculo começam a ser expressos, como a cadeia pesada de miosina (*MyHC*, *myosin heavy chain*) (LIMA, 2007).

A *Miogenina* está associada principalmente a fusão dos mioblastos mononucleados em miofibras multinucleadas, ou seja, quando seu gene é expresso, as fibras musculares se desenvolvem dos mioblastos que foram previamente formados. Enquanto o fator *MRF4* é expresso principalmente na fase pós-natal (LOPES, 2010). Demonstrou-se que camundongos homozigotos mutantes para a *Miogenina* produzem mioblastos normais, porém a diferenciação destes é inexistente. Estes animais morrem imediatamente após nascimento, apresentando malformação nas costelas e massa muscular reduzida, devido à deficiência na diferenciação dos miócitos, evidenciada por uma drástica redução de fibras musculares (HASTY et al., 1993; NABESHIMA et al., 1993; MARCHESIN, 2008). Nestes animais mutantes, apesar dos somitos se desenvolverem normalmente, formando o dermomiótomo e o esclerótomo, as miofibrilas logo se desintegram devido aos baixos níveis de expressão da cadeia pesada de miosina (ALVARES, 2001).

Logo, estas observações revelam que a *Miogenina* é fundamental para a diferenciação e ativação de genes músculo-específicos, pois embora as células sejam capazes de entrar no programa miogênico na ausência de *Miogenina*, estas são incapazes de se diferenciar e ativar a maior parte dos genes musculares sarcoméricos, sugerindo que a *Miogenina* afeta de forma mais severa a miogênese secundária do que a miogênese primária (ARNOLD; BRAUN, 2000; ALVARES, 2001; SOUZA, 2004). Ainda, presume-se que a *Miogenina* exerça grande influência sobre a ativação do *MRF4*, cuja expressão é reduzida em homozigotos mutantes. Sendo assim, a ausência de células musculares diferenciadas pode não estar relacionada unicamente com a ausência da *Miogenina* nos indivíduos mutantes, mas também com a reduzida expressão de *MRF4* (ARNOLD; BRAUN, 2000; SOUZA, 2004).

No caso do fator de regulação da miogênese *MRF4*, a sua ausência causa um fenótipo muscular muito suave, caracterizado por uma pequena redução na expressão de genes músculos-específicos (PATAPOUTIAN et al., 1995; BRAUN; ARNOLD, 1995;

ZHANG; BEHRINGER; OLSON, 1995). Entretanto, resultados obtidos em diferentes laboratórios elucidaram respostas variáveis.

Experimentos que inativaram o *MRF4*, realizados por Braun; Arnold (1995) demonstrou que a proximidade entre os genes *Myf-5* e *MRF4* afetou a transcrição de *Myf-5* e resultou em mutantes que desenvolveram musculatura esquelética normal e apresentaram apenas moderada redução dos músculos costais. Enquanto o alelo mutante, gerado por Patapoutian et al. (1995), resultou na morte perinatal dos camundongos devido a problemas respiratórios por malformação nas costelas. Por fim, mutantes gerados por Zhang, Behringer e Olson (1995), resultou em camundongos viáveis, porém com múltiplas anormalidades nas costelas. Esses mutantes, na fase adulta, apresentaram músculos relativamente normais, mas expressaram altos níveis de *Miogenina*. Isto sugere que o *MRF4* pode ser requerido para reduzir os níveis de *Miogenina* ou que o aumento dos níveis de *Miogenina* em mutantes poderia estar compensando a ausência de *MRF4* (ALVARES, 2001).

Portanto, os experimentos evidenciados de nocaute gênico sugerem a existência de uma complexa rede regulatória, onde os quatro fatores regulatórios da miogênese desempenham funções distintas, porém com algum papel redundante (ALVARES, 2001).

2.3. *Miostatina*

Além dos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) e de outras moléculas que também são importantes para o processo da miogênese, destaca-se a *Miostatina* (*Mstn*), um importante Fator de Crescimento Transformador β (TGF- β). A *Mstn* é um fator de crescimento secretado com ações autócrinas e parácrinas no tecido muscular que destaca-se como um fator regulatório do crescimento celular (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Essa molécula atua na inibição da proliferação e diferenciação do tecido muscular, uma vez que promove o silenciamento de fatores de transcrição importantes para o desenvolvimento dos músculos (HAWKE; GARRY, 2001). Sendo assim, a *Mstn* atua na determinação da massa muscular esquelética e age como regulador negativo do crescimento muscular (MUNTONI et al., 2002; PESSOTTI, 2009).

- **A *Mstn* na formação da musculatura esquelética**

A *Mstn*, conhecida também como GDF-8, é um potente inibidor da deposição de fibras musculares nos embriões de vertebrados. Esta molécula foi identificada por McPherron;

Lawler e Lee (1997) como um novo membro da superfamília de fatores de crescimento e transformação TGF- β . Consoante ao seu papel de modulador da deposição dos músculos esqueléticos, o gene que codifica a proteína MIOSTATINA (MSTN) é expresso nos somitos durante o desenvolvimento embrionário (AMTHOR et al., 2002a; WU et al., 2003). Esta expressão ocorre nas células precursoras miogênicas localizadas no miótomo em desenvolvimento (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997; MOTT; IVARIE, 2002; CASTELHANO-BARBOSA, 2001; SOUZA, 2004).

A MSTN tem uma estrutura e função altamente conservadas entre os organismos vertebrados (MCPHERRON; LEE, 1997) e seu papel como inibidor da deposição de massa muscular esquelética abrange a miogênese embrionária, fetal, assim como o reparo das fibras musculares na fase pós-natal (MCPHERRON; LAWLER; LEE, 1997; ZIMMERS et al., 2002; WHITTEMORE et al., 2003; MANCEAU et al., 2008; MARCHESIN, 2008). Ressalta-se que a ação da MSTN sobre a regulação da deposição de fibras musculares é possivelmente resultado de sua influência exercida diretamente sobre a proliferação e/ou diferenciação de mioblastos (LEE, 2004).

O gene da *Mstn*, está localizado no cromossomo 7 da galinha e apresenta três exons e dois introns, onde a sua sequência completa, incluindo a região promotora, encontram-se disponíveis no banco de dados do NCBI (SOUZA, 2004). Atualmente, são conhecidas nove mutações que afetam o código sequencial do gene da *Mstn*: seis mutações que inativam a proteína, duas mutações de mudança de sentido e uma mutação conservativa (MIRANDA et al., 2002; GADANHO, 2014). Descrições na literatura demonstram que essas seis mutações nas regiões que codificam o gene da *Mstn*, causam *stop codons* antecipados, onde alteram a estrutura e a função da proteína, inativando-a, e resultam em hipertrofia das fibras musculares (KAMBADUR et al., 1997; MCPHERRON; LEE, 1997; CAPPUCIO; MARCHITELLI; SERRACCHIOLI, 1998; GROBET et al., 1998; TEIXEIRA; OLIVEIRA, 2007; XAVIER, 2014).

Experimentos realizados em camundongos resultaram num aumento de até 300 % na massa de músculos esqueléticos em camundongos mutantes para este gene (MCPHERRON; LEE, 1997). Mais tarde, demonstrou-se que mutações naturais no gene que codifica esta proteína são capazes de promover um ganho formidável de massa muscular em bovinos e em cães da raça Whippet (MOSHER, 2007; SHELTON, 2007). Em adição, estudos em frangos também demonstraram que ocorre um aumento da expressão de *Mstn* em músculos esqueléticos durante a segunda metade do desenvolvimento embrionário e,

posteriormente, ocorre um declínio dessa expressão logo após a eclosão (KOCAMIS et al., 1999; KOCAMIS; KILLEFER, 2002; GUERNEC et al., 2003; MARCHESIN, 2008).

Além dos fenótipos relacionados à mutação no gene da *Mstn* observados em animais, em 2004, foi descrito o primeiro caso de mutação em um ser humano (SCHUELKE, 2004). Salienta-se também que patologias que promovem intenso catabolismo, como câncer (caquexia) e AIDS, apresentam relação com o aumento na expressão de *Mstn* (GONZALEZ-CADAVID et al., 1998; ZIMMERS, 2002). Portanto, infere-se que muitos trabalhos demonstram que a expressão da *Mstn* é regulada em situações, nas quais, são evidenciadas alterações na massa muscular (LEE, 2004; PATEL; AMTHOR, 2005; LEAL; SANTOS; AOKI, 2008).

2.4. Outros fatores que atuam no processo miogênico

Durante o desenvolvimento embrionário, o comprometimento das células somáticas do mesoderma com a linhagem miogênica depende de sinais positivos, sob a influência de Wnts, *Sonic hedgehog* (*Shh*), *Noggin* e de sinais negativos, sob a influência das BMPs (membros da família TGF- β , especificamente as BMP-4). Esses fatores são oriundos de tecidos circundantes, tais como a notocorda, o tubo neural e regiões adjacentes (revisado em CHARGÉ; RUDNICKI, 2004; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

Inicialmente, após a formação do dermomiótomo mediada pela via de sinalização Wnt, as células em seu setor dorsomedial encontram-se expostas a um gradiente de morfógenos sinalizada pela via *Shh* (*Sonic Hedgehog*), proveniente da notocorda, e pela sinalização Wnt, proveniente do tubo neural dorsal e da ectoderme superficial adjacente (Fig.7A), onde estes sinais irão acionar os genes capazes de comprometer as células com a linhagem miogênica (CARLSON, 2014). Nesse momento, as condições para a miogênese são definidas pela inibição da proteína morfogenética óssea (especificamente a BMP-4), produzida na região ectodérmica pela expressão dos genes *noggin*, antagonistas do BMP-4 (Fig.7B). Dessa forma, a fim de possibilitar o início da miogênese, devido aos baixos níveis dos BMPs, as células param de produzir *Pax3* e *Pax7* e começam a expressar os fatores primários de regulação miogênica *MyoD* e *Myf-5* (Fig.7C) (ANDREOTE, 2009; SANTOS, 2012). Ressalta-se que existe um fator de crescimento secretado na região dos brotos dos membros, denominado de fator de dispersão, que liga-se a receptores específicos (c-met) e

estimula as células a migrarem para fora do somito e conseqüentemente para dentro dos brotos dos membros (CARLSON, 2014).

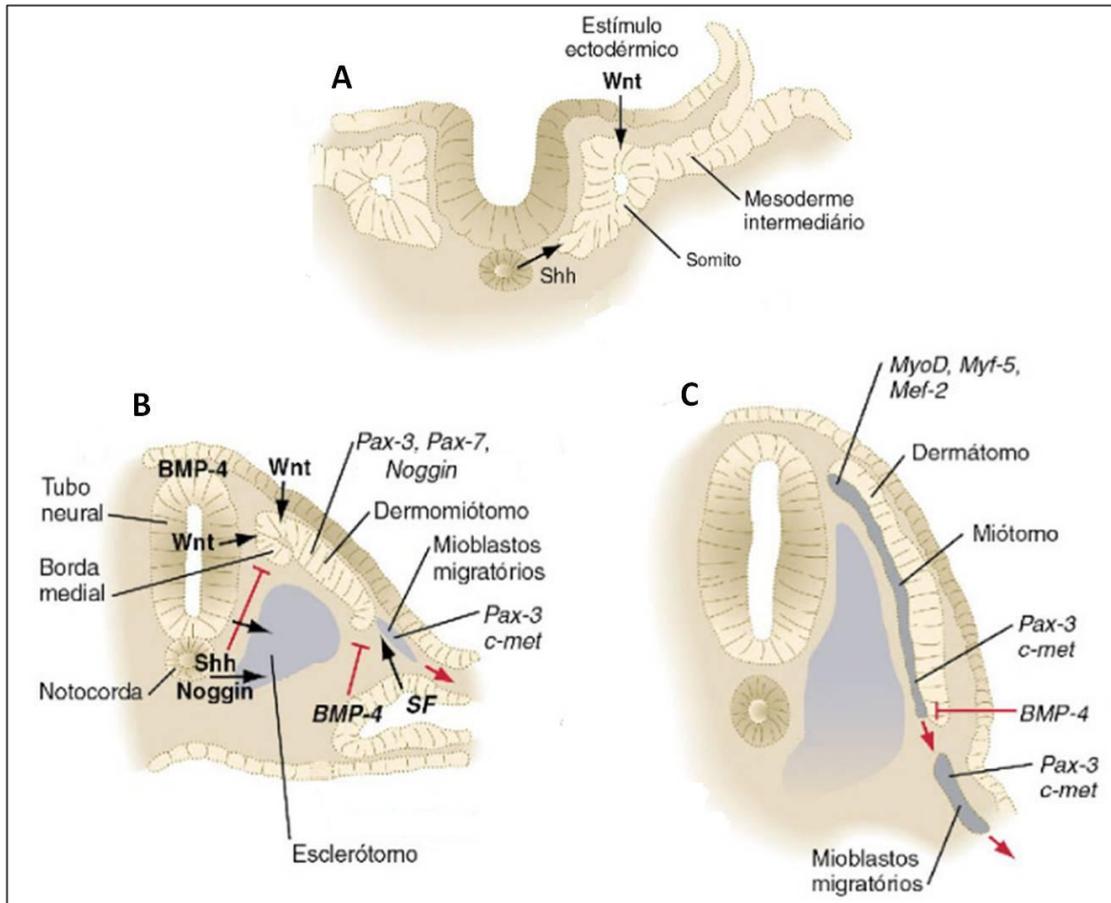


Figura 7. Eventos Moleculares envolvidos na diferenciação dos somitos. Moléculas de sinalização são representadas por setas pretas. Sinais inibitórios são representados por linhas vermelhas. Os genes expressos em tecidos responsivos estão indicados em itálico. BMP- proteína morfogenética óssea; Shh- Sonic Hedgehog; SF- Fator de dispersão. (Fonte: Adaptada de Brand-Saberi et al., 1996. In: Carlson, 2014).

Os genes da família Pax são caracterizados pela presença de um *homeobox* e um *paired Box* e estão implicados na proliferação de várias linhagens de precursores (CHEN; GOLDHAMER, 2003; CHARGE; RUDNICKI, 2004). *Pax3*, um dos nove genes da família *paired Box*, possui um papel importante durante o desenvolvimento do músculo esquelético (HAWKE; GARRY, 2001; CHEN; GOLDHAMER, 2003; CHARGE; RUDNICKI, 2004; MONTEZEL, 2009). As células precursoras somíticas devem ser pré-comprometidas com a linhagem miogênica antes da expressão dos MRFs, embora a identidade dos mioblastos seja definida pelos fatores regulatórios miogênicos primários *MyoD* e *Myf-5*, responsáveis pela determinação da linhagem miogênica. No embrião, esse “pré-comprometimento” é realizado por outros fatores transcricionais, dentre eles, um dos mais importantes é o fator transcricional

Pax3, o qual é expresso em células do mesoderma pré-somítico e dos primeiros somitos epiteliais (GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994; JUNIOR, 2009). A expressão e atuação de *Pax3* estende-se até o final da miogênese. A função deste gene está associada à formação de músculos hipoxiais do tronco e à delaminação e migração de células progenitoras miogênicas (TAJBAKHS; BUCKINGHAM, 2000; MARCHESIN, 2008). Enquanto no dermomiótomo, as células precursoras que apresentam expressão de *Pax3* é induzida por sinais secretados pelo mesoderma da placa lateral e pelo ectoderma superficial e são mantidas como uma população não diferenciada e em proliferação, contribuindo assim para a expansão das células da linhagem miogênica (AMTHOR; CHRIST; PATEL, 1999; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007; JUNIOR, 2009).

Outros importantes eventos moleculares relacionam-se diretamente com ciclo celular e apresentam uma complexa rede de sinalizações fundamentais para o prosseguimento das etapas de proliferação e diferenciação. Em um primeiro momento, as vias de sinalização respondem a fatores extracelulares que, através de uma cascata de sinalização, fornecem o estímulo para que a célula saia da fase G1 e se prepare para entrar na fase S. Posteriormente, o sistema que regula a progressão do ciclo torna-se independente da sinalização extracelular e passa a ser controlado por mecanismos intracelulares que abrangem a ativação da família de proteínas cinases dependentes de ciclinas, as CDKs (PARDEE, 1974). A atividade dessas proteínas é dependente da associação à família das ciclinas, onde formam o complexo ciclina-CDK ativo (SHERR; ROBERTS, 1999). Esses complexos ativos de ciclina e CDK atuam sobre uma macromolécula central do sistema de controle do ciclo celular, a proteína RB (SOUZA, 2011).

A proteína do retinoblastoma (pRb ou RB) é uma fosfoproteína nuclear presente em todas as células, onde é fundamental para o crescimento celular normal. A pRb é uma reguladora do ciclo celular, uma vez que atua no controle da progressão da fase G1 para a fase S. Essa regulação ocorre devido a repressão da atividade do fator de transcrição responsável por promover a proliferação celular (TOLEDO, 2012). A pRb encontra-se ativa, em sua forma hipofosforilada, nas células que estão em G1 ou quiescentes. Nessa forma ativa a pRb sequestra os fatores de transcrição da família E2F e bloqueia a sua atividade em genes cruciais para o prosseguimento da fase G1 e passagem da fase G1 para a fase S. Ao reprimir a transcrição desses genes pela inativação de E2F a pRb possui um forte efeito de supressão do ciclo celular (SOUZA, 2011). Um exemplo de indução da transcrição do gene do retinoblastoma e consequente parada do ciclo celular, é o fator miogênico *MyoD*, onde este é

capaz de induzir a transcrição da pRb, e níveis elevados da proteína RB são essenciais para a parada no ciclo celular, início da diferenciação terminal e sobrevivência dos miócitos pós-mitóticos (MAGENTA et al., 2003; MANTOVANI, 2015).

Dentre diversos genes importantes para o ciclo celular, tem-se também o *p21*, que é considerado uma proteína chave para determinar se a célula irá se proliferar ou se diferenciar (STEINMAN et al., 1994). Este gene codifica uma cinase inibidora dependente de ciclina (CdkI) que atua na regulação do ciclo celular (SCHNEIDER, 2007). O gene *p21* apresenta sítios de ligação para *p53*, indicando que a transcrição do *p21* é diretamente regulada por *p53* (HAENDLER; HOFER-WARBINEK; HOFER, 1987; LEE; REYNISDOTTIR; MASSAGUE, 1995). Em resposta a um dano no DNA, *p53* induz a expressão do *p21* que interrompe o avanço do ciclo celular na transição da fase G1 para a fase S por inibição das Cdk's (EL-DEIRY et al., 1993; EL-DEIRY et al., 1994). Entretanto, diversos outros fatores podem induzir a expressão do *p21* e bloquear o ciclo celular por vias independentes de *p53* (SOMASUNDARAM et al, 1997; SCHNEIDER, 2007).

Além disso, relacionando esses genes com o gene da *Mstn*, experimentos em cultura de mioblastos demonstraram que a *Mstn* atua bloqueando as fases G1 e G2 do ciclo celular, regulando proteínas importantes ao ciclo como Cdk2, p21 e pRb sem afetar o mecanismo de apoptose dos mioblastos. Em resposta à sinalização da *Mstn*, a proteína p21 é hiper-regulada inibindo a atividade ciclina E/Cdk2 causando a hipofosforilação da proteína Rb e parando o ciclo celular na fase G1 (THOMAS et al., 2000; GOTLIEB, 2011).

Um gene considerado inibidor da *Mstn*, a *Folistatina* (*Fst*), é um membro da família TGF- β , assim como a *Mstn*. A FST é uma glicoproteína com função antagonista não só a *Mstn*, mas a diversos outros membros da superfamília TGF- β . Tanto a *Fst* quanto a *Mstn* encontram-se expressos em locais próximos durante o desenvolvimento muscular (AMTHOR et al., 1996, 1999, 2002 a e b). Estudos realizados em camundongos demonstraram que indivíduos com um aumento na expressão da *Fst* apresentaram aumento da massa muscular e, de modo oposto, indivíduos com diminuição na expressão da *Fst* apresentaram diminuição da massa muscular (LEE; MCPHERRON, 2001; AMTHOR et al., 2004; LIMA, 2007; MARCHESIN, 2008).

Pode-se ainda destacar um importante gene estrutural para o desenvolvimento da musculatura estriada esquelética, a cadeia pesada de miosina. A miosina é uma proteína abundante presente no tecido muscular e está envolvida no desenvolvimento dos músculos, no crescimento muscular e na geração de força (contração muscular) (MALTIN et al., 2001; MADEIRA et al., 2008). Logo, a miosina é o componente primário dos miofilamentos e a

principal proteína contrátil da fibra muscular (MADEIRA, 2008). A molécula de miosina é um hexâmero formado por duas cadeias pesadas de miosina (*myosin heavy chain* – *MHC* ou *MyHC*), enroladas em α - hélice, e quatro cadeias leves de miosina (*myosin light chain* – *MLC* ou *MyLC*) (LOWEY; SLAYTER; WEEDS, 1969; WEEDS; LOWEY, 1971; ELLIOT; OFFER, 1978; WARRICK; SPUDICH, 1987). A cadeia pesada de miosina (*MyHC*) pode ser dividida em meromiosina leve (formato de bastão) e meromiosina pesada (porção globosa), onde na região globosa encontra-se o sítio de ligação com a actina e também a região em que a molécula de ATP vai se ligar (HUXLEY, 1969; LOWEY; SLAYTER; WEEDS, 1969; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007).

Estudos mostram que as propriedades de contração do tecido muscular e a intensidade de tensão dependem das cadeias pesadas de miosina presentes nas fibras musculares (BOTTINELLI et al., 1994; MADEIRA, 2008). Sendo assim, a velocidade de contração de uma fibra muscular apresenta relação direta com o tipo de *MyHC* (TALMADGE; ROY; EDGERTON, 1993). A *MyHC* capaz de rápida hidrólise do ATP é característica das fibras do tipo II, que são fibras de contração rápida. Já a *MyHC* de baixa atividade ATPásica é encontrada nas fibras do tipo I, de contração lenta (KELLY; RUBINSTEIN, 1994; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). Foram identificados cinco isoformas (I-V) de miosina de cadeia pesada em músculos de contração rápida de frangos, havendo tendência das *MyHC* I, III e V aparecerem mais em fibras rápidas brancas (IIB), enquanto as *MyHC* II e IV são características de fibras rápidas vermelhas (IIA) (RUSHBROOK et al., 1997; MADEIRA et al., 2011).

2.5. Os embriões de galinha como modelo para estudo da miogênese

As aves frequentemente têm sido utilizadas como um organismo modelo adequado para estudos na área da biologia do desenvolvimento de vertebrados, posto que seus embriões são de fácil acesso, rapidamente obtidos e podem ser manipulados *in vivo* mais facilmente do que embriões de mamíferos (BROWN et al., 2003; STERN, 2005). Adicionalmente, o desenvolvimento embrionário de aves, da fertilização até a eclosão, dura aproximadamente 21 dias, um espaço de desenvolvimento muito menor que a maioria dos mamíferos, permitindo um acelerado acúmulo de informações e, conseqüentemente, maior rapidez na interpretação de dados (LIU; HICKS 2007; NINOV, 2010).

É importante destacar que as aves fazem a ponte evolucionária entre mamíferos e outros vertebrados. Somado a questão evolutiva, especificamente os frangos se constituem como o principal representante de aproximadamente 9.600 espécies de aves (HILLIER et al., 2004). A espécie *Gallus gallus* têm sido amplamente utilizada como um organismo-modelo para estudos de diversos aspectos e sistema biológicos e devido a sua importância biológica e econômica, essa espécie foi a primeira a ter o sequenciamento do seu genoma determinado (HILLIER et al., 2004; JORGE, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Caracterizar o padrão de expressão do gene da *Miostatina* (*Mstn*) e de marcadores moleculares clássicos envolvidos nas diferentes etapas da miogênese, a distribuição espacial e o conteúdo proteico da MIOSTATINA (MSTN), bem como as modificações morfológicas que ocorrem durante a miogênese esquelética fetal de galinha (*Gallus gallus*).

3.2. Objetivos Específicos

3.2.1 Análises na musculatura peitoral de galinha (dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário)

- Coletar amostras de músculo peitoral dos embriões de galinha;
- Estabelecer o perfil de expressão nas diferentes etapas da miogênese, por RT-PCR e qRT-PCR, em tecidos, da *Mstn* e demais marcadores moleculares, a saber: *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *MyoG*, *MyHC*, *Fst*, bem como o gene endógeno *GAPDH*;
- Caracterizar a distribuição espacial da MSTN, por imuno-histoquímica, comparando entre os dias analisados;
- Caracterizar e analisar morfológicamente os dias de desenvolvimento embrionário objetos deste estudo;
- Quantificar o conteúdo proteico, da MSTN, através da técnica de *Western Blot*.

3.2.2 Análises em cultura primária de mioblastos (5 dias de diferenciação celular)

- Estabelecer o perfil de expressão nas diferentes etapas da miogênese, por RT-PCR e qRT-PCR, em células, da *Mstn* e demais marcadores moleculares, a saber: *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *MyoG*, *MyHC*, *Fst*, bem como o gene endógeno *GAPDH*;
- Caracterizar, a distribuição espacial da MSTN, por imunocitoquímica, de forma comparativa ao longo dos dias analisados;
- Analisar os ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha, por imunocitoquímica, da proteína MSTN.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta da musculatura esquelética peitoral de embriões de galinha

4.1.1 Aprovação ética

Todos os experimentos conduzidos nesta dissertação envolvendo os embriões de galinha foram conduzidos de acordo com as normas do Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA) e com aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas (CEUA/UNICAMP), protocolo 4506-1/2017 (Anexos A, B e C).

4.1.2 Incubação dos ovos e coleta dos embriões de galinha

Os ovos fertilizados, provenientes da granja Yamaguishi (Jaguariúna - São Paulo), foram incubados na Unicamp – Laboratório de Biologia do Desenvolvimento, em chocadeira a 38°C e com atmosfera umidificada.

As amostras de tecido muscular peitoral dos embriões de galinha (*Gallus gallus*) foram coletadas nos dias 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário. Estas foram coletadas em tubos falcon (um indivíduo por tubo e em triplicatas para cada dia), previamente identificados, maceradas e colocadas imediatamente no reagente Trizol, onde foram armazenados por até uma semana, no freezer -80°C até o momento da extração do RNA.

A idade de 8 dias foi escolhida como a inicial porque a musculatura peitoral do embrião era possível de ser retirada, visto que já se encontrava formada. No caso da idade de 11 dias, esta foi escolhida porque a cultura celular primária de mioblastos é realizada neste estágio de desenvolvimento, sendo, dessa forma, um importante estágio para comparação. Enquanto os dias 14 e 17 abrangeram diferentes estágios do desenvolvimento da musculatura peitoral das aves em etapas mais avançadas, durante as quais as fibras musculares estão passando pelos processos de diferenciação terminal e maturação. Esses diferentes dias, representados na Figura 8, tiveram o propósito de observar o desenvolvimento da musculatura esquelética em distintos momentos espaço-temporais, visando observar o padrão de expressão de importantes fatores regulatórios e também comparar, em um momento posterior, com o padrão de expressão da cultura celular.

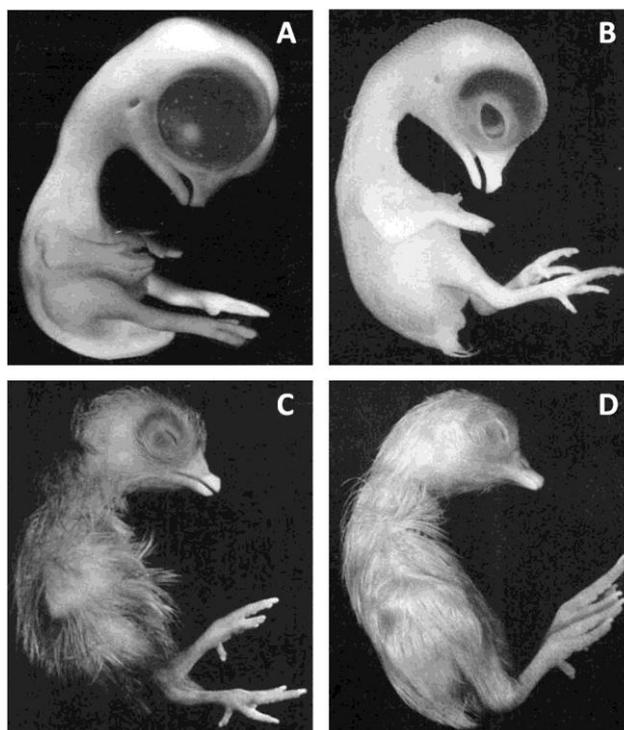


Figura 8. Embriões da galinha, representando as idades utilizadas para a dissecação da musculatura esquelética peitoral: a) Embrião de 8 dias; b) Embrião de 11 dias; c) Embrião de 14 dias; d) Embrião de 17 dias (Fonte: HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

Para a realização da cultura celular de mioblastos, as coletas da musculatura peitoral dos embriões, ocorreram no dia 11 de desenvolvimento embrionário. Dessa forma, produziu-se placas, em triplicatas e em *pool* de indivíduos, referente a 5 dias de cultura para posterior extração de RNA.

4.2. Análises de expressão gênica de tecidos e de células

4.2.1 Extração de RNA total

Realizou-se a extração de RNA em dois momentos: foram coletadas as amostras do tecido (músculos do peito) dos dias 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário para a extração de RNA total e também foram coletadas amostras de células em cultura primária para extração de RNA total após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de diferenciação.

Para a extração de RNA total dos tecidos, estes foram coletados e os músculos peitorais macerados e colocados em tubos falcon livres de RNAses com 1 mL de Trizol® (Invitrogen). Em seguida, o tubo falcon foi agitado para homogeneização da solução de tecido com o Trizol. A amostra foi incubada por 5 min e foi transferido 1 mL dessa solução para

ependorfs. Foi acrescentado 200 μ L de clorofórmio RNase *free*, com uma nova incubação à temperatura ambiente por 3 min. Então foi efetuado uma centrifugação a 12000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e foi adicionado 500 μ L de isopropanol e incubado por 10 min em temperatura ambiente. Após, efetuou-se nova centrifugação a 12000 rpm por 10 min a 4°C e ao *pellet*, foi adicionado 1 mL de etanol 70%. Este foi centrifugado a 7000 rpm por 5 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 30 μ L de água DEPC (água tratada com dietil pirocarbonato) e, em seguida, acondicionado em freezer -80°C.

Para a extração de RNA total das células, estes foram obtidos através de cultura primária, onde a placa de cultura utilizada para extração de RNA foi lavada com PBS 1X, e em seguida, as células foram tripsinizadas com 500 μ L de Tripsina (Gibco) por 1 min a 37°C. Após este processo, foi adicionado ao conteúdo da placa 1 mL do meio de cultura e submetido à centrifugação a 13000 rpm por 5 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 1 mL de Trizol® (Invitrogen), transferido para tubos tipo Eppendorf livre de RNases e incubados por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de clorofórmio RNase *free*, procedendo-se nova incubação à temperatura ambiente por 3 min. Então foi efetuada uma centrifugação a 12000 rpm por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionou-se 500 μ L de isopropanol e incubou-se por 10 min em temperatura ambiente. Após, foi feita nova centrifugação a 12000 rpm por 10 min a 4°C e ao *pellet*, adicionou-se 1 mL de etanol 70%. Este foi centrifugado a 7000 rpm por 5 min a 4°C. O *pellet* foi ressuspensionado em 30 μ L de água DEPC onde, em seguida, foi acondicionado em freezer -80°C.

Em todas as extrações avaliou-se, posteriormente, a integridade do RNA por eletroforese, em gel de agarose 1%, e feita a quantificação da concentração de RNA total, via espectrofotômetro, através do NanoDrop (2000/2000c *spectrophotometer*, Thermo Fischer Scientific).

4.2.2 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o *kit High - Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems™) de acordo com instruções do fabricante. Foi adicionado 500 ng de RNA total e foi completado com água DEPC (livre de RNases) para o volume final de 10 μ L. Em seguida, sucedeu-se a preparação da *mix*, onde adicionou-se 2 μ L de RT-*buffer* (10x), 0,8 μ L de dNTP *mix* (de 10 mM), 2 μ L de RT-*random primers* (10x), 1

μL de multi script reverse transcriptase e completou-se com água DEPC (4,2 μL) para dar um volume de 10 μL do *mix*. Juntou-se o *mix* com a solução de uso de RNA tendo como volume final 20 μL . As amostras foram incubadas no termociclador por 10 min a 25°C, 120 min a 37°C e depois por 5 min a 85°C. Por último, quantificou-se as amostras, via espectrofotômetro, através do NanoDrop (2000/2000c *Spectrophotometer*, Thermo Fischer Scientific), aliquotadas e armazenadas no freezer -80°C.

4.2.3 Desenho dos *primers*

Primers para os genes da *Mstn*, *Pax3*, *p21* e *Fst* foram desenhados a partir das sequências de nucleotídeos de cada gene disponíveis no banco de dados *GenBank* do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), com o auxílio das ferramentas *Primer-BLAST* e *Oligo Analysis Tool*. Os *primers* utilizados para amplificação dos genes *Myf-5*, *MyoD*, *MyoG* e *GAPDH* foram desenhados por Marchesin (2008) e o *primer* da *MyHC* foi obtido através de LUO et al (2015). Na tabela 1 estão listados os *primers* utilizados.

Ressalta-se que, a fim de permitir uma fácil identificação de uma possível contaminação das amostras de cDNA com DNA genômico nas reações de PCR, tomou-se o cuidado de desenhar os *primers* entre éxons intercalados com íntrons. O mesmo cuidado foi utilizado como referência para utilizar os *primers* de outros autores verificando essa mesma condição. A confecção dos *primers* foi solicitada à Invitrogen (Thermo Fischer Scientific). Mais detalhes sobre os *primers* utilizados podem ser encontrados no Apêndice A.

Tabela 1. Informações sobre os *primers* utilizados para amplificação dos genes investigados nesta dissertação. “D” representa direto e “R” representa reverso.

Gene	Gene ID (NCBI)	Localização no gene	Sequência dos <i>primers</i> (5' → 3')	Tamanho do produto (pb)
<i>Mstn</i>	373964	Éxon 2 Éxon 3	D: ACTGGACGAGATCTTGCTGTC R: AATCTCTGCGGGACCGTTTC	106
<i>p21</i>	378914	Éxon 1/2 Éxon 3	D: CCATCAAAGACTTCTACGGCTC R: ACTCGGCATTGCTTCGTACA	164
<i>Pax3</i>	374127	Éxon 2 Éxon 3	D: TCGGGAAGAACTCGCACAAA R: AAACCCTCCTGGGATCAGGT	139

<i>Myf-5</i>	395633	Éxon 2 Éxon 3	D: TTCGAGGCGGGCTACTGC R: AGAGAGGCGGTCCACGAT	105
<i>MyoD</i>	374048	Éxon 2 Éxon 3	D: ATCACCAAATGACCCAAAGC R: GCTTCAGCTGGAGGCAGTAT	123
<i>MioG</i>	374004	Éxon 2 Éxon 3	D: ATCCTGCAGCCCTGAGTG R: ACGATGGAGGAGAGCGAGT	114
<i>MyHC</i>	417306	Éxon 6/7 Éxon 9	D: CTCCTCACGCTTTGGTAA R: TGATAGTCGTATGGGTTGGT	213
<i>Fst</i>	395349	Éxon 5 Éxon 6	D: ACCAGTCGGATAGGGACGAG R: TCCAGGCGAGAATCGTCATC	148
<i>GAPDH</i>	374193	Éxon 7 Éxon 8	D: TGGAGAGATGGCAGAGGTG R: AACAGAGACATTGGGGGTTG	141

4.2.4 Reação em cadeia polimerase – PCR (RT-PCR)

Foram feitas as PCRs de acordo com as especificações do fabricante (Thermo Fischer Scientific). Primeiramente, realizou-se um *mix* contendo 1,50 µL de MgCl₂ (25 mM), 0,50 µL de dNTPs (10 mM), 2,50 µL de Taq *buffer* + KCl (10x), 1,25 µL de DMSO, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase (fornecido pelo fabricante) e completou-se o mix com 15 µL de água DEPC, totalizando 21 µL para cada reação. Acrescentou-se 1 µL do primer F (do inglês *forward*), 1 µL do primer R (do inglês *reverse*) e 2 µL de cDNA (à 250 ng/ µL). Toda a reação totalizou 25 µL por reação. A amplificação do fragmento desejado foi realizada no Termociclador *Eppendorf Mastercycler Pro* (vapo.protect) nas seguintes condições:

- Pré-desnaturação:
 - 95°C, 1 minuto
- Amplificação (35 ciclos):
 - 95°C, 1 minuto
 - 65°C, 30 segundos

- 72°C, 1 minuto
- Extensão final:
 - 72°C, 10 minutos

A verificação das reações de amplificação foi feita em gel de agarose 2,0%. Para checagem do tamanho do fragmento, foi utilizado o marcador de peso molecular *O'GeneRuler 100bp DNA Ladder* (0,5 µg/µL, Thermo Fischer Scientific). As corridas de eletroforese foram realizadas a 50 V, na cuba eletroforética (*GE 100, Minirun Gel Electrophoresis System*) por aproximadamente de 1 hora.

4.2.5 RT-PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR)

Essa técnica foi utilizada para quantificar a expressão de fatores que participam do processo miogênico: *Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *MyoG*, *MyHC*, *Fst* e o gene endógeno *GAPDH*. Os genes foram analisados tanto em tecidos (dias 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário) quanto em células (5 dias de cultura primária de mioblastos).

Para a análise utilizou-se o termociclador Applied Biosystems 7500, onde cada reação continha 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA (para células a concentração utilizada foi de 500 ng/uL e para tecidos foi de 200 ng/uL), 3,5 µL de água DEPC, 1 µL de *primer F+R* (3 mM). O equipamento utilizado foi programado com as seguintes especificações: (1 ciclo: 50°C – 2 min, 95°C – 10 min), seguidos de (45 ciclos: 95°C – 15s, 60°C – 1 min). As reações foram feitas em *pool* para as triplicatas biológicas e em cada placa foram colocadas as amostras em triplicatas técnicas, utilizando-se placas *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems), compatível com o termociclador utilizado.

A produção do cDNA para o PCR em tempo real foi gerado a partir de um *pool* de RNA, tanto para as células (cada dia e suas respectivas triplicatas), quanto para tecido (cada dia e suas respectivas triplicatas). Após o *pool* de RNA, obteve-se o cuidado de utilizar a mesma quantidade de amostra de RNA (500 ng) para cada produção do cDNA à partir desse *pool*. O experimento incluiu uma amostra como controle negativo (sem cDNA) para cada gene estudado.

A expressão gênica relativa foi quantificada utilizando-se o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Para validar os ensaios de PCR em tempo real foram efetuados ajustes de concentração de cDNA e *primers*.

- **Normalização dos dados**

Utilizou-se um gene normalizador, que foi a amplificação de um gene de expressão constitutiva, o GAPDH.

- **Eficiência de amplificação**

Realizaram-se, previamente, as curvas de eficiência e de dissociação. A curva de eficiência foi calculada por meio da equação $E = 10(-1/\text{slope})$, com valores resultantes acima de 0,90 para todos os genes.

- **Análise estatística**

Utilizou-se o ranqueamento de dados para, posteriormente, realizar uma análise semiparamétrica. As análises estatísticas foram realizadas com base nos trabalhos de Conover; Iman (1981) e Montgomery (1991). As análises da expressão gênica foram feitas para os genes analisados neste estudo (*Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *MyoG*, *MyHC*, *Fst* e *GAPDH*), através das análises de *One Way* ANOVA, para tecidos, e *One way* ANOVA de medidas repetidas, para as células, seguido do teste de Tukey e com significância de (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$). Apresentaram-se os dados como média \pm erro-padrão da média (SEM \pm).

4.3. Preparações histológicas das amostras de tecidos e análise ao microscópio de luz

Amostras de tecido muscular peitoral dos embriões de galinha foram preparados em historesina para análise morfológica, nos dias de desenvolvimento 8, 11, 14 e 17. Em seguida, foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em solução-tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), *overnight* a 4° C. No dia seguinte, foi realizado o processamento por técnicas histológicas convencionais para embebição em resina Glicol-metracrilato (Historresina–Leica). Os cortes dos materiais foram feitos na espessura de 3 μm , no micrótomo, e colocados em lâminas para posteriores análises histológicas. Foram empregados técnicas histológicas básicas de coloração dos tecidos (CONSONNI et al., 2012). A coloração utilizada para essa análise foi o Azul de Toluidina (pH 7). Por último, as lâminas com as amostras de tecidos foram documentados em fotomicroscópio Olympus BX40 com câmera acoplada, nas objetivas de 20x e 40x.

4.4. Análises da distribuição da proteína MSTN de tecidos e de células

Para as análises dos tecidos, coletou-se fragmentos do músculo do peito das aves, nos estádios do desenvolvimento embrionário 8, 11, 14 e 17. Estes foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% em solução-tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), *overnight* a 4° C. No dia seguinte realizou-se o processamento através de técnicas histológicas convencionais por embebição em parafina (Paraplast-Sigma), onde fez-se a inclusão em parafina. Os cortes dos materiais foram feitos na espessura de 5 µm, no micrótomo, e colocados em lâminas *Starfrost* para posteriores análises de imuno-histoquímica.

Em seguida, as lâminas, contendo os cortes, foram desparafinizadas, primeiramente com as técnicas convencionais de desparafinização, comumente usadas na histologia, e depois em solução de desparafinização à base de TRIS-HCl, onde colocou-se as lâminas dentro dessa solução para exposição de epítipo na panela (Celerus RIPTIDE – Celerus Diagnostics) à 120°C por 30 segundos e 90°C por 10 segundos. Após essas etapas, as amostras foram lavadas em PBS 0,1M, pH 7,4 permeabilizadas com PBS contendo 0,3% de Triton X-100 e 0,1M de glicina por 30 min a temperatura ambiente. As amostras foram então incubadas com anticorpo primário (diluição 1:200) *overnight* a 4°C, lavadas três vezes com PBS, seguida da incubação do anticorpo secundário (diluição 1:500) por 2 horas a temperatura ambiente. Os anticorpos primários e secundários foram diluídos em solução de bloqueio contendo 1% BSA e 0,1% Tween. As amostras foram incubadas em DAPI (SC3598/Santa Cruz), na diluição de 1:1000 e lavadas três vezes com PBS. Por último, pingou-se uma gota de glicerol nas lâminas, colocou-se as lamínulas, e após 30 min as amostras foram guardadas em geladeira até o momento das análises. Para esta análise de imuno-histoquímica, as lâminas foram documentadas em Microscópio Confocal Upright LSM780-NLO, nas objetivas de 20x e 40x.

Para as análises em células, realizou-se a cultura primária de mioblastos em placas de 24 *Wells*. As lamínulas foram coletadas e fixadas em acetona 100%, por 3 min, em gelo, e lavadas em seguida com 0,1M de PBS, pH 7,4, e armazenadas a 4°C até o momento da realização das próximas etapas. As etapas posteriores de imunofluorescência seguiram o mesmo protocolo descrito para os tecidos. Para esta análise de imunocitoquímica, os materiais foram documentados em microscópio de fluorescência Leica DM5500B, nas objetivas de 10x e 20x.

Os anticorpos utilizados nas análises de imunofluorescência, tanto para tecidos quanto para células, estão representados nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2. Anticorpo primário utilizado nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos e em cultura de células.

Anticorpo primário	Descrição	Diluição
MYOSTATIN (AB3239-I) Millipore	Anticorpo policlonal obtido em coelho que reconhece a proteína MSTN	1:200

Tabela 3. Anticorpo secundário utilizado nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos e em cultura de células.

Anticorpo secundário	Descrição	Diluição
Alexa Fluor™ (A31572) Invitrogen, Thermo Fisher Scientific	Anti-imunoglobulina G de coelho: obtido em burro conjugado com Alexa Fluor™ 555	1:500

4.5. Quantificação da MSTN, por *western blot*, em tecidos

Amostras de tecido muscular peitoral do embrião de galinha (dias 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário) foram obtidas e mantidas no freezer -80°C para extração de proteínas pela técnica de *Western Blot*. Essas amostras foram homogeneizadas em tampão RIPA 50 mM de Tris-HCl (pH 7,4) contendo 150 mM de NaCl; 1 mM de EDTA; 1% de Triton X-100; 0,1% de SDS; 5 µg/ml de aprotinina; 1 mM de PMSF; 10 mM de ortovanadato de sódio; 100 mM de NaF; 10 mM de pirofosfato de sódio. O homogenato foi centrifugado a 17.000 g por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi separado para a realização da eletroforese e dosagem de proteínas pelo método de Lowry (LOWRY et al., 1951). Aos homogenatos adicionou-se tampão da amostra (20% de glicerol, 125 mM de Tris-HCl, 4% de SDS, 100 mM de ditiotreitol, 0,02% de azul de bromofenol, pH 6,8) na proporção 1:4. As amostras foram fervidas a 100°C por 5 min para a desnaturação das proteínas e, em seguida, realizou-se a eletroforese.

Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas do gel para membrana de nitrocelulose utilizando tampão (48 mM de Tris, 390 mM de glicina, SDS 0,01% e 20% de metanol) em um sistema úmido por 2 horas sob a voltagem fixa de 100 volts, à temperatura ambiente (BioRad Trans-Blot SD Cell, EUA) (TOWBIN; STAEHELIN; GORDON, 1979).

Após o término da transferência, a membrana foi submetida à imunoblot. O bloqueio da membrana foi feito pela incubação por 1 hora, sob agitação, à temperatura ambiente em solução de leite desnatado em pó 5%, diluído em solução TBS-T (20 mM Tris-HCl; 160 mM de NaCl e 0,1% Tween 20). A membrana foi então incubada *overnight* a 4°C sob agitação com os anticorpos primários da MSTN (MYOSTATIN/AB3239-I/Millipore) e (GAPDH/SC25778/Santa Cruz) diluídos em solução de TBS-T contendo 2,5% de albumina bovina e 0,01% de azida sódica. No dia seguinte, a incubação com o anticorpo secundário (SC 2768/Santa Cruz) foi feita por 1 hora à temperatura ambiente. As membranas foram reveladas em fotodocumentador (Uvitec) utilizando kit de quimiluminescência amplificada (ECL, Amersham). As bandas reveladas foram fotografadas e quantificadas por densitometria utilizando o software Uvitec Capture (Uvitec). Após a quantificação densitométrica das proteínas. Os resultados foram expressos pela relação entre as densidades obtidas para a proteína de interesse, a MSTN, e da proteína normalizadora, o GAPDH, utilizada como controle de carregamento.

4.6. Ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha

Fibroblastos de músculo fetal de galinha no dia 11,5 de desenvolvimento foram coletados por meio de pré-plaqueamento das células extraídas da musculatura peitoral em placas de Petri. Após 2 h de cultivo, estas células foram tripsinizadas e ressuspensas em meio de cultura DMEM para preparação de organoides tridimensionais segundo o protocolo descrito por Foty (2011). Após 48 h de cultivo, entre 2-3 organoides compostos por fibroblastos foram transferidos para lamínulas onde estavam sendo cultivados mioblastos primários fetais de galinha, com o intuito de avaliar uma possível indução da expressão da *Mstn* nas células miogênicas em cultura. Após 48 h de co-cultivo, as lamínulas contendo tanto os organoides como os mioblastos fetais foram submetidas à imunocitoquímica para a detecção da distribuição espacial da proteína MSTN.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Integridade do RNA extraído

Amostras de RNA total foram extraídas do músculo peitoral de embriões de galinha (*Gallus gallus*) nos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento, bem como de células de cultura primária de mioblastos. Após a obtenção do RNA total, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da integridade das mesmas, tanto das obtidas a partir de tecido, quanto de células miogênicas (Figuras 9 e 10).

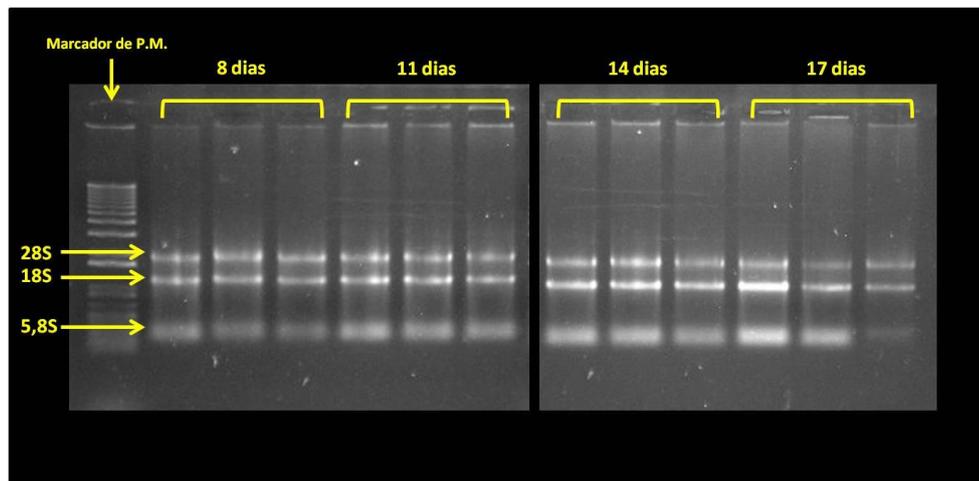


Figura 9. Amostras de RNA total, obtidas a partir da musculatura peitoral da galinha em diferentes dias de desenvolvimento. Observar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S, 18S e 5,8 + 5S, indicativas da integridade das amostras. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Legendas – Marcador de P.M. (peso molecular): *GeneRuler* 1kb *Ladder* (Fermentas); Triplicatas de cada dia (8, 11, 14 e 17) de desenvolvimento embrionário.

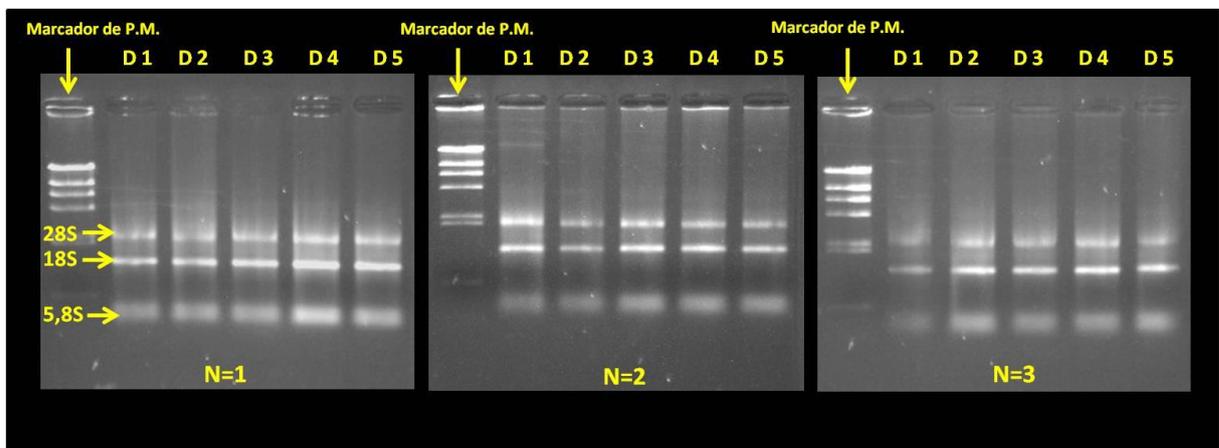


Figura 10. Amostras de RNA total, obtidas a partir de células de cultura primária de mioblastos de galinha em diferentes dias de diferenciação. Observar a presença das bandas correspondentes aos RNAs ribossomais 28S,

18S e 5,8 + 5S, indicativas da integridade das amostras. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1%. Legendas: Marcador de P.M. (peso molecular): DNA λ -*Hind* (Thermo Fisher Scientific); D1 ao D5: dias da cultura de mioblastos; N1 ao N3: referente as triplicatas da cultura primária.

Após a verificação da integridade dos RNAs totais, preparados a partir das amostras de músculo peitoral e células miogênicas de galinha, as alíquotas obtidas foram armazenadas em freezer -80°C para utilização na etapa de síntese do cDNA e, em um momento posterior, esse cDNA foi utilizado para a análise da expressão gênica por RT-PCR e qRT-PCR.

5.2. Estudo e análise da expressão da *Mstn* e de seus reguladores na miogênese fetal, em tecidos e *in vitro*, em galinha (*Gallus gallus*)

5.2.1 Investigação da expressão da *Mstn* e de marcadores moleculares

Sabe-se que a proteína codificada pelo gene *Mstn* atua como uma molécula sinalizadora com funções parácrinas, regulando o crescimento e desenvolvimento da musculatura esquelética (CHARGÉ; RUDNICKI, 2004). Além da *Mstn*, outros genes participam do desenvolvimento dos músculos esqueléticos e estão envolvidos no processo miogênico, conforme descrito a seguir. Os fatores de transcrição codificados pelos genes *Pax3* e *Myf-5* são marcadores moleculares que atuam na etapa de proliferação dos mioblastos, enquanto estas células ainda estão se multiplicando para compor um *pool* de células progenitoras musculares. Por sua vez, *MyoD* e *MyoG* são marcadores bem estabelecidos da etapa de diferenciação dos mioblastos, fase em que estas células iniciam a ativação de proteínas músculo-específicas e iniciam modificações estruturais e bioquímicas para formar miócitos e, a seguir, miofibras. Em paralelo, a diferenciação celular é acompanhada por aumento nos níveis de expressão e atividade da proteína p21, a qual inibe vários complexos ciclinas-Cdk levando à interrupção do ciclo celular. É importante mencionar que p21 é um alvo bem estabelecido da proteína MSTN, que é capaz de ativar esta proteína (MANCEAU et al., 2008). A diferenciação terminal e maturação das fibras musculares ocorre concomitantemente à expressão da proteína codificada pelo gene *MyHC* (cadeia pesada da miosina), com papel estrutural e funcional na contração muscular. Finalmente, outra molécula importante na miogênese esquelética é a *Fst*, molécula que inibe a função da *Mstn* no músculo esquelético. Este amplo painel de genes teve sua atividade estabelecida no presente

estudo para possibilitar identificar os momentos de atividade gênica da *Mstn* e estabelecer uma possível associação com etapas bem definidas da miogênese. Em resumo, os marcadores moleculares empregados permitiram uma associação com etapas da miogênese, a saber: a) proliferação dos mioblastos (*Pax3* e *Myf-5*); b) interrupção do ciclo celular (*p21*) e diferenciação dos mioblastos (*MyoD* e *MyoG*); c) diferenciação terminal e maturação das fibras musculares (*MyHC*). Também foi acompanhada a cinética de expressão da *Fst*, que codifica a principal proteína envolvida na inibição da atividade da *Mstn* em vertebrados.

Como primeiro passo para investigar a participação da *Mstn* na miogênese fetal, a sua expressão gênica e dos marcadores moleculares mencionados acima foi estabelecida por RT-PCR convencional em amostras de músculo peitoral e de mioblastos primários de galinha. Nos ensaios realizados observou-se a expressão da *Mstn* e de todos os demais genes analisados, tanto em tecido muscular peitoral (dias de desenvolvimento 8, 11, 14 e 17) quanto em cultura primária de mioblastos (dias de diferenciação 1, 2, 3, 4 e 5) (Figuras 11 e 12), respectivamente. Portanto, nossos resultados revelaram que os genes analisados neste estudo são expressos tanto *in vivo* (em tecido muscular) como *in vitro* (células miogênicas em cultura) ao longo das diferentes etapas da miogênese esquelética. Dessa forma, infere-se que a *Mstn* e os demais marcadores moleculares participam da miogênese fetal em galinha (*Gallus gallus*) em ambos os contextos.

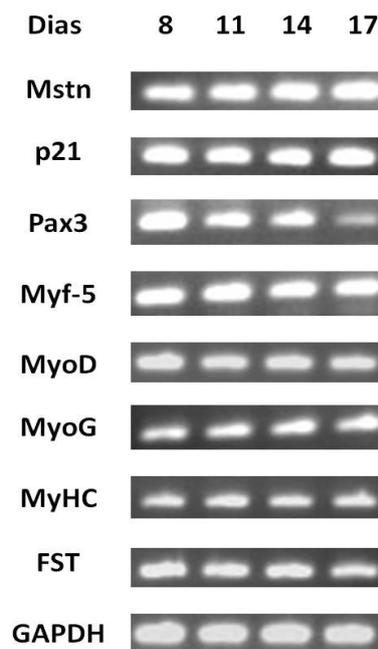


Figura 11. Análises de expressão gênica no músculo peitoral de galinha em diferentes dias de desenvolvimento. Foram caracterizadas a expressão da *Mstn* e dos marcadores moleculares *Pax3* e *Myf-5* (proliferação), *MyoD* e *MioG* (diferenciação), *p21* (interrupção de ciclo celular), *MyHC* (diferenciação terminal e maturação das fibras)

e *Fst* (antagonista da *Mstn*). O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi empregado para monitorar a integridade das amostras.

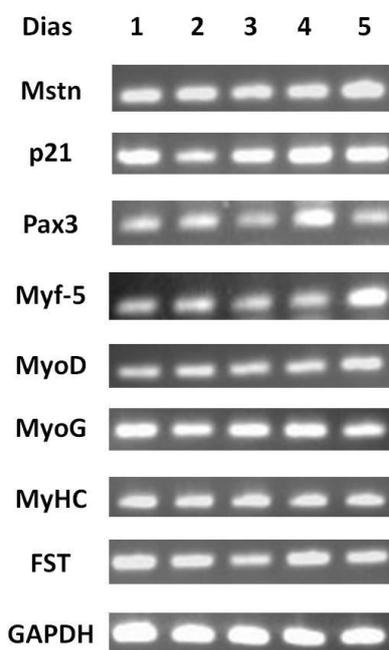


Figura 12. Análise da expressão gênica em diferentes dias de diferenciação da cultura primária de mioblastos de galinha. Foram caracterizadas a expressão da *Mstn* e dos marcadores moleculares *Pax3* e *Myf-5* (proliferação), *MyoD* e *MioG* (diferenciação), *p21* (interrupção de ciclo celular), *MyHC* (diferenciação terminal e maturação das fibras) e *Fst* (antagonista da *Mstn*). O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi empregado para monitorar a integridade das amostras.

5.2.2 Quantificação da expressão gênica por qRT-PCR

Os genes investigados no item anterior tiveram sua expressão quantificada por PCR quantitativo (qRT-PCR) visando identificar possíveis modulações da sua expressão ao longo da miogênese fetal de galinha. Nestes ensaios, optamos por realizar uma quantificação relativa da expressão gênica para evidenciar modificações na atividade gênica ao longo do processo de diferenciação das fibras musculares tanto *in vivo* (no músculo peitoral) quanto *in vitro* (mioblastos primários em diferenciação). Para tanto, foi utilizado como gene endógeno normalizador o *GAPDH* (*gliceraldeído-3-fostato desidrogenase*), uma vez que este é considerado uma enzima chave na via glicolítica e faz parte do metabolismo comum entre todos os organismos que utilizam a glicose como energia, além de exercer outras funções conhecidamente importantes para as células e tecidos (NICHOLLS et al., 2012). Sendo assim, a análise foi feita em tecidos, dias 8, 11, 14 e 17 do desenvolvimento embrionário, e em células, dias 1 a 5 de cultura primária de mioblastos.

Nossos resultados em tecido mostraram que há um aumento progressivo da expressão gênica da *Mstn* conforme avança a miogênese esquelética fetal (Figura 13 A). Conforme se observa na Figura 13 A, no dia 11 há uma tendência de aumento da expressão gênica da *Mstn* e nos dias 14 e 17 ocorre uma efetiva indução da expressão deste gene ($p \leq 0,01$ e $p \leq 0,001$, respectivamente). De maneira semelhante, ocorre uma elevação gradual na expressão de *p21* (Figura 13 B), que atinge níveis significativamente mais elevados de expressão nos dias 14 e 17 ($p \leq 0,001$). Esta semelhança entre os perfis de expressão da *Mstn* e *p21* era esperada, pois conforme destacado acima *p21* é um gene alvo direto da sinalização mediada pela *Mstn*, que aumenta os níveis de transcrição e a atividade desta proteína. De fato, o trabalho de Thomas et al. (2000) evidenciou que em resposta à sinalização da *Mstn* há um aumento de *p21* e uma diminuição da expressão e da atividade de Cdk2, o que repercute na interrupção do ciclo celular dos mioblastos para dar início ao processo de diferenciação miogênica.

A quantificação dos níveis de expressão dos marcadores miogênicos exibiu um padrão coerente com a função conhecida destas moléculas e sua expressão ao longo dos dias de desenvolvimento do tecido muscular nos embriões de galinha. O gene *Pax3*, um marcador clássico dos mioblastos proliferativos, apresentou uma indução da expressão gênica no dia 11 ($p \leq 0,05$) e uma queda acentuada no dia 17 de desenvolvimento ($p \leq 0,05$) (Figura 13 C). Portanto, a expressão de *Pax3* reflete a intensa proliferação dos mioblastos durante o início da miogênese fetal (dias 8 e 11), havendo um declínio progressivo nos dias mais avançados (dias 14 e 17). Interessantemente, no caso do gene *Myf-5*, um fator de transcrição normalmente associado às fases iniciais da miogênese, observou-se uma expressão constante ao longo dos dias (Figura 13 D). O motivo para esta estabilidade de expressão permanece por ser determinado.

Os fatores miogênicos *MyoD* e *Miogenina* apresentaram comportamentos distintos dos marcadores de miogênese inicial (*Pax3* e *Myf-5*). Ambos os fatores de transcrição tem sua expressão aumentada no dia 11 de desenvolvimento ($p \leq 0,05$), precedendo o pico de expressão da *Mstn* no dia 14 (Figura 13 E e F). Experimentos realizados por Spiller et al. (2002) demonstraram que *MyoD* regula a expressão da *Mstn* por meio de interação física com a região promotora da *Mstn*. Portanto, é possível que níveis mais elevados de expressão de *MyoD* sejam necessários para aumentar a taxa de ligação desta proteína aos E-BOXES, que correspondem à sítios de ligação para *MyoD* e outros fatores miogênicos ao DNA de elementos reguladores da transcrição. Vários destes sítios foram localizados *upstream* à região promotora da *Mstn*. Portanto, nossos dados corroboram dados

da literatura sobre o papel de *MyoD* e, possivelmente de outros fatores miogênicos (*Miogenina*), na modulação da expressão da *Mstn*. Outro fato que deve ser destacado é a diminuição da expressão da *Miogenina*, nos dias 14 e 17 de desenvolvimento ($p \leq 0,05$ e $p \leq 0,01$, respectivamente). É possível que esta diminuição esteja relacionada com uma ativação transiente desta proteína nos mioblastos durante a diferenciação, havendo uma redução quando estas células se tornam miócitos e/ou miofibras conforme avança o programa de diferenciação terminal das fibras musculares.

Finalmente, conforme esperado, observou-se uma indução da expressão gênica de *MyHC* nas últimas etapas de desenvolvimento embrionário, principalmente no dia 17 de desenvolvimento (Figura 13 G). Por codificar uma proteína estrutural, a quantificação gênica revelou uma indução muito mais acentuada que aquela observada para a *Mstn*, que é um fator parácrino, bem como para os demais genes, que são fatores de transcrição e atuam de maneira efetiva mesmo em baixas concentrações em contextos celulares apropriados. Logo, este resultado é considerado esperado, ou seja, nas etapas finais de diferenciação terminal e maturação das fibras musculares, genes estruturais músculo específicos são expressos abundantemente.

O processo de ontogênese das miofibras ocorre muito cedo durante a vida embrionária, com o aparecimento de ondas sucessivas de mioblastos que constituem a origem dos diferentes tipos de fibra muscular (HAUSCKA, 1994). A primeira onda de produção e povoamento das miofibras origina-se dos mioblastos embrionários e a segunda onda dos mioblastos fetais dando origem, por sua vez, às fibras musculares primárias e secundárias (KALCHEIM; CINNAMON; KAHANE, 1999, PICARD et al., 2002; ALVES, 2004). Estudos demonstram que, em galinhas, os mioblastos embrionários atingem seu auge aos 5 dias da idade embrionária e os mioblastos fetais são presentes entre os dias 8 e 12 da idade embrionária. De maneira geral, as análises corroboram com a literatura, onde verifica-se que, em aves, os mioblastos fetais são mais abundantes de E8 a E12, e passam por uma diferenciação massiva entre E16 a E18 (HARTLEY; BANDMAN; YABLONKA-REUVENI, 1992; STOCKDALE, 1992). Durante o desenvolvimento do embrião de galinha, as células progenitoras, que apresentam forte expressão de genes ligados a proliferação, como o *Pax3* e *Myf-5*, migram para o seu destino final aproximadamente em E11, e depois rapidamente começam a se diferenciar pela ativação dos fatores de diferenciação como *MyoD* e *Miogenina* (BISMUTH; RELAIX, 2010), além da expressão de outros fatores músculos específicos, como o *MyHC*, envolvidos na maturação das fibras musculares. Quanto a expressão gênica da *Mstn*, esta tem sido detectada desde o estágio de blastoderma permanecendo constante até o estágio

E1 (dia 1 de desenvolvimento embrionário). Em seguida, ocorre um aumento significativo no estágio E7 e atinge um pico de expressão no estágio E16, onde se mantém alto até o estágio E19, diminuindo antes da eclosão (KOCAMIS et al., 1999; ALVES; 2004). Associada ao aumento da *Mstn* tem-se o *p21* que é ativado após a superexpressão da *Mstn* (MANCEAU et al., 2008). Dessa forma, a figura 13 expressa de modo contundente a nossa análise realizada em tecidos.

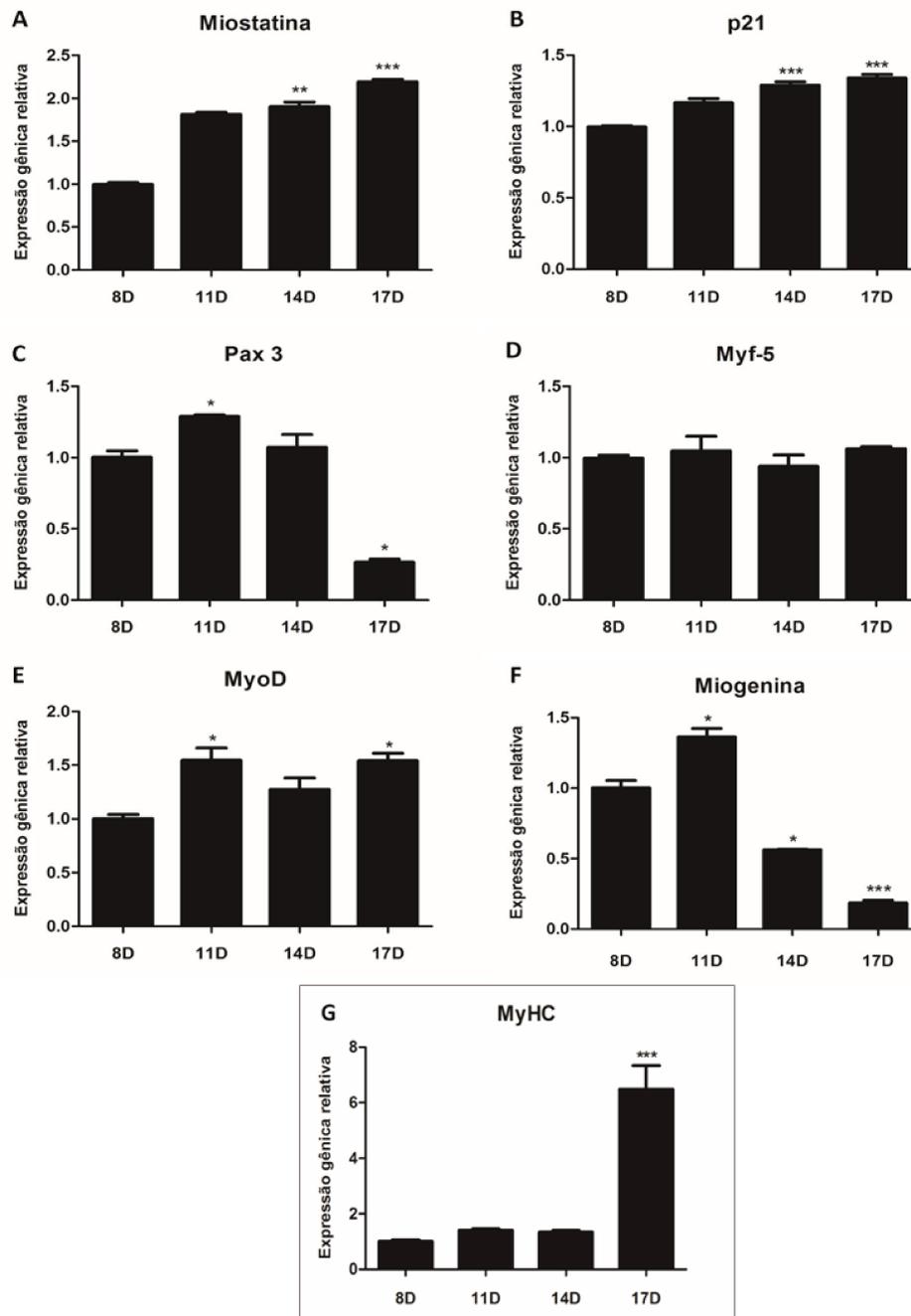


Figura 13. Expressão gênica, em tecidos, da *Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *Myod*, *Miogenina* e *MyHC*, por qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) ao longo dos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário. As análises de *One way* ANOVA, seguidas de teste de Tukey com significância (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) são

indicadas por comparação entre os dias analisados, sendo o dia 8 considerado o calibrador. Barras representam SEM \pm .

A segunda análise quantitativa de expressão gênica foi realizada em células de cultura primária de mioblastos em diferentes dias de diferenciação, envolvendo os mesmos genes analisados em tecido muscular peitoral (Figura 14). Em células em cultura, a expressão da *Mstn* apresenta uma diminuição significativa nos três últimos dias de diferenciação (D3 e D4 x D1 $p \leq 0,01$; D5 x D1 $p \leq 0,001$) (Figura 14 A), em oposição ao aumento observado em tecido muscular ao longo da miogênese. Em contraste, *p21* aumenta de modo progressivo ao longo dos dias de cultura celular (Figura 14 B). Estes resultados revelaram que o comportamento da *Mstn* diverge do esperado. Contudo, esse gene poderia necessitar de algum tipo de modulação por outros fatores (moléculas sinalizadoras) ou tipos celulares que não estavam presentes na cultura, pois no tecido muscular em formação a *Mstn* apresentou aumento da expressão ao longo da miogênese esquelética. Quanto ao *p21*, este apresentou um padrão de expressão bastante semelhante ao observado em tecidos, com um aumento progressivo ao longo dos dias de cultura celular (D2, D3, D4 e D5 x D1 $p \leq 0,001$). Uma hipótese para este resultado é de uma possível dependência do *p21* com o *p53*, onde o *p53* parece agir como um fator de transcrição envolvido em pontos de verificação do ciclo celular e atuando na ativação transcricional do *p21* (CARVALHO; RECCO-PIMENTEL; 2013). Além disso, um estudo bastante interessante realizado por Manceau et al., (2008) sugere que quando a *Mstn* é pouco expressa, o *p21* reproduz o fenótipo da *Mstn* para modular e regular as vias de crescimento muscular. Contudo, as vias normais de sinalização mostram que o *p21* é alvo de sinalização da *Mstn* durante o desenvolvimento normal. Experimentos demonstraram que outro inibidor de Cdk, o *p57*, controla redundantemente a diferenciação do músculo esquelético junto com *p21* (ZHANG et al. 1999), sendo possível que ambas as moléculas estejam envolvidas nas vias de sinalização mediadas pela *Mstn*.

Quanto aos marcadores moleculares, foi possível estabelecer que a expressão de *Pax3* e *Myf-5* é maior nos dias 1 e 2 de cultura, havendo uma diminuição ao longo dos demais dias, tanto para *Pax3* quanto para *Myf-5* (Figuras 14 C e D). Sabe-se que estes genes são relacionados às etapas de proliferação celular, havendo uma maior expressão gênica destas moléculas no dia em que há mais mioblastos proliferativos em relação às células já em fase de diferenciação. É importante ressaltar que em tecidos o comportamento foi diferente do obtido em células e, possivelmente, algum fator atuante, em tecidos, pode ter influenciado no resultado. Para os fatores miogênicos *MyoD* e *Miogenina* observou-se uma maior expressão

nos primeiros dias de cultura, que decaí significativamente nos últimos dois dias de diferenciação (D4 x D1 $p \leq 0,01$; D5 x D1 $p \leq 0,05$, para *MyoD*; D2 e D5 x D1 $p \leq 0,01$; D4 x D1 $p \leq 0,001$, para *Miogenina*) (Figura 14 E e F). Estudos sugerem que o primeiro gene a ser ativado em aves é o *MyoD* seguido por *Myf-5* (COUTINHO et al., 1993). Partindo desse pressuposto, o *MyoD* está mais expresso do que o *Myf-5* nos dias 2 e 3 de cultura e supostamente corrobora com este estudo. Quanto ao gene da *Miogenina*, a expressão não foi conforme o esperado, pois a literatura descreve a *Miogenina* presente mais intensamente na diferenciação muscular e a expressão da mesma não aumentou com o passar dos dias de cultura. Além disso, diversos estudos sugerem a inibição de *Miogenina* por *MRF4*, uma vez que quando há aumento da expressão de *MRF4* ocorre um declínio da *Miogenina* (ZHANG; BEHRINGER; OLSON, 1995; FERRI et al., 2009; NINOV; 2010).

O perfil de expressão da *MyHC* revelou que este gene apresentou-se muito mais expresso nos dias 4 e 5 de cultura (Figura 14 G). Nestes dias há um predomínio de fibras musculares nas fases de diferenciação terminal e maturação e esse resultado está em concordância com o descrito na literatura. No caso do gene *MyHC* o padrão de expressão foi similar tanto em células quanto em tecidos.

Além de toda a análise citada e discutida, verificou-se que a expressão gênica da *Fst* (*Folistatina*) não teve aumento ou diminuição significativo, se mantendo constante, tanto para tecidos quanto para células, e por isso, não foi alvo mais detalhado do nosso estudo neste trabalho.

Em suma, quando comparamos tecidos e células, cabe ressaltar que existem diferenças significativas no padrão de expressão, posto que o tecido se comporta a nível sistêmico, envolvendo outros fatores e funcionando como um mecanismo associado aos demais fatores e tipos celulares presente no tecido muscular em formação como um todo. Por sua vez, em cultura, o nível de interação molecular e celular é distinto por se tratar de um sistema isolado (não sistêmico) e, portanto, o comportamento, muitas vezes, torna-se diferente daquele observado em tecidos.

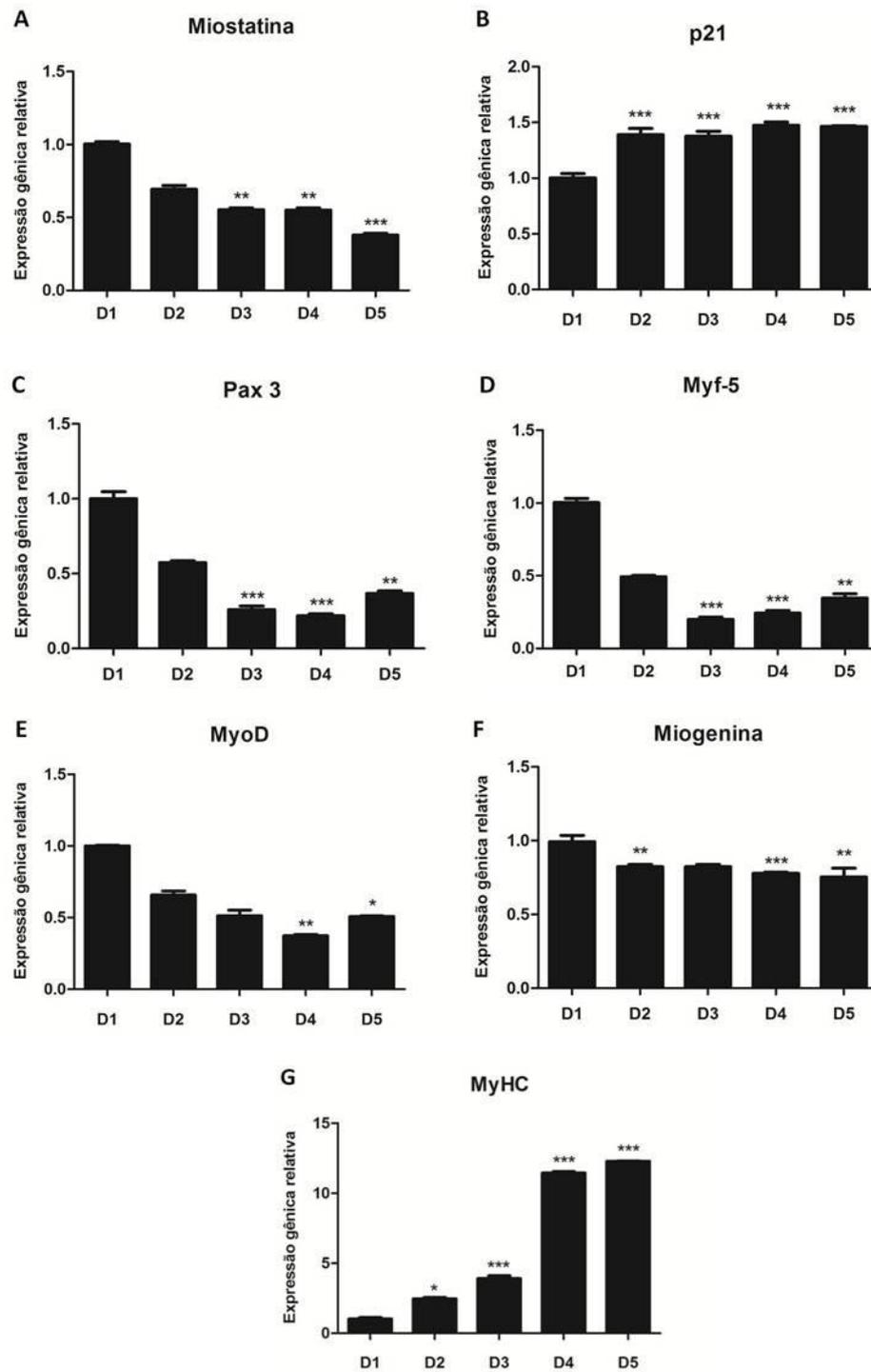


Figura 14. Expressão gênica, em células, da *Mstn*, *p21*, *Pax3*, *Myf-5*, *MyoD*, *Miogenina* e *MyHC*, por qRT-PCR (PCR quantitativo em tempo real) ao longo de 5 dias de cultura primária de mioblastos. As análises de *One way* ANOVA de medidas repetidas, seguidas de teste de Tukey com significância (* $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$) são indicadas por comparação entre os dias 1-5, sendo o dia 1 considerado o calibrador. Barras representam SEM \pm .

5.3. Caracterização morfológica da miogênese fetal de galinha

Com o intuito de correlacionar o perfil de expressão gênica da *Mstn* e dos marcadores moleculares investigados com as modificações estruturais que ocorrem durante a histogênese do músculo esquelético foram realizadas análises morfológicas detalhadas ao longo da miogênese fetal de galinha. Para tanto, foi empregada a coloração com azul de toluidina, que permitiu a identificação dos elementos que compõem o tecido muscular em desenvolvimento entre os dias 8, 11, 14 e 17 dias de desenvolvimento.

Com 8 dias de desenvolvimento, a organização do músculo esquelético apresenta um aspecto frouxo, com mioblastos e outros tipos de células progenitoras com aspecto de fibroblastos distribuídas entre miócitos e miofibras nascentes, envoltos em abundante matriz extra-celular (Figura 15). Observa-se também o início da inervação do músculo esquelético (Figura 15 A e D, indicado pela letra N), bem como a formação de vasos sanguíneos (Figura 15 C, indicado pela sigla An). Nas fibras musculares em formação nota-se o núcleo central, muitas células em divisão e com densa cromatina (Figura 15 B e D, setas grossas), bem como o começo da organização do citoesqueleto e início da sarcomerogênese (Figura 15 B e D, setas finas). Ainda não é possível observar a presença de tecido conjuntivo e verifica-se que as fibras musculares estão em formação, onde os mioblastos estão se fundindo para a formação da fibra muscular.

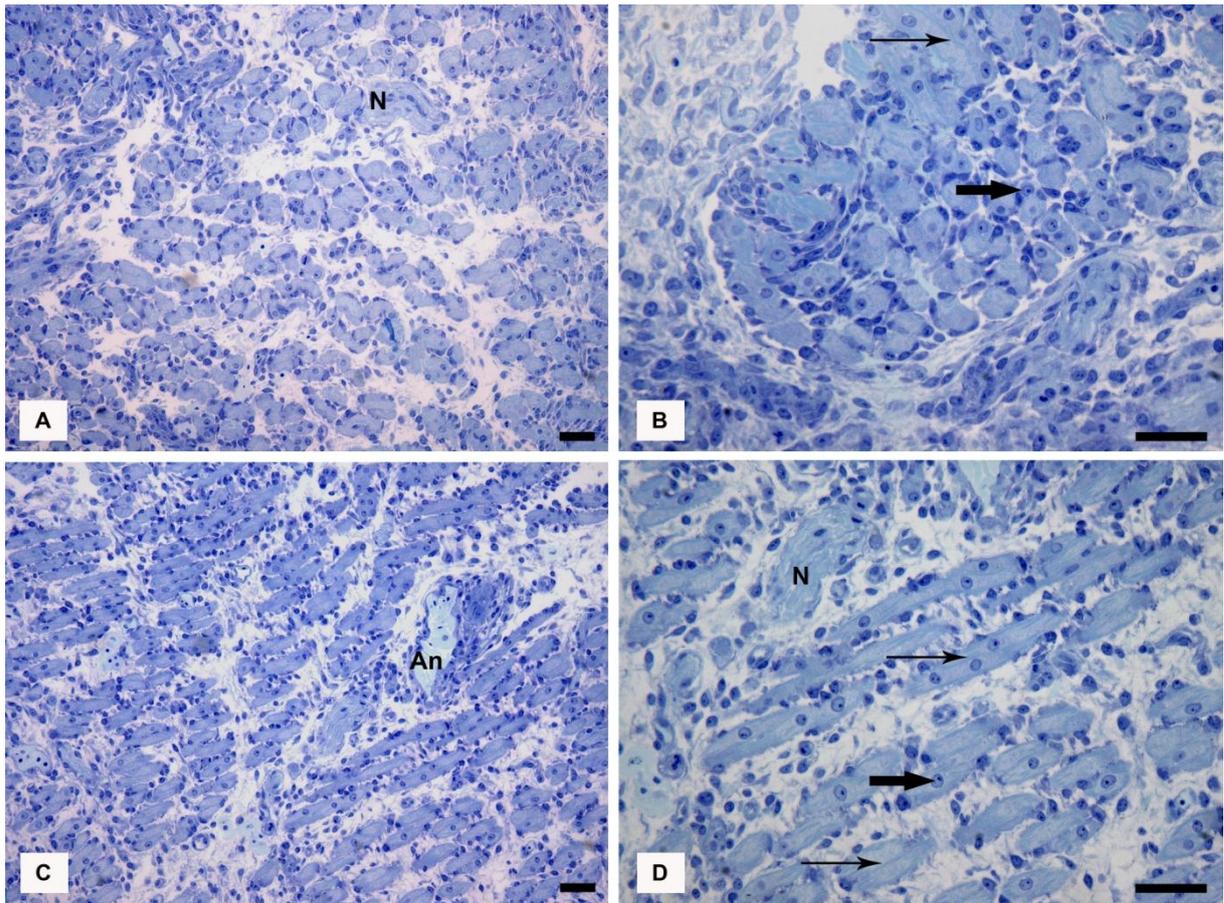


Figura 15. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 8 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μ m, com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; An= Vasos sanguíneos; Seta fina= sarcomerogênese; Seta grossa= Núcleos.

Com 11 dias de desenvolvimento, o tecido muscular encontra-se mais organizado, com as células da linhagem miogênica distribuindo-se em pequenos feixes envoltos por células do tecido conjuntivo, sendo possível observar o perimísio em formação (Figura 16 A e B, asteriscos) e, de modo mais sutil, o endomísio revestindo delicadamente cada fibra muscular. As fibras musculares em desenvolvimento apresentam-se mais alongadas, contudo observar-se núcleos ainda centrais (Figura 16 B, C e D, seta). No entorno das fibras em crescimento, é possível identificar células menores, de aspecto achatado, com núcleos intensamente corados, que provavelmente correspondem a mioblastos em processo de fusão com miócitos ou fibras em alongação.

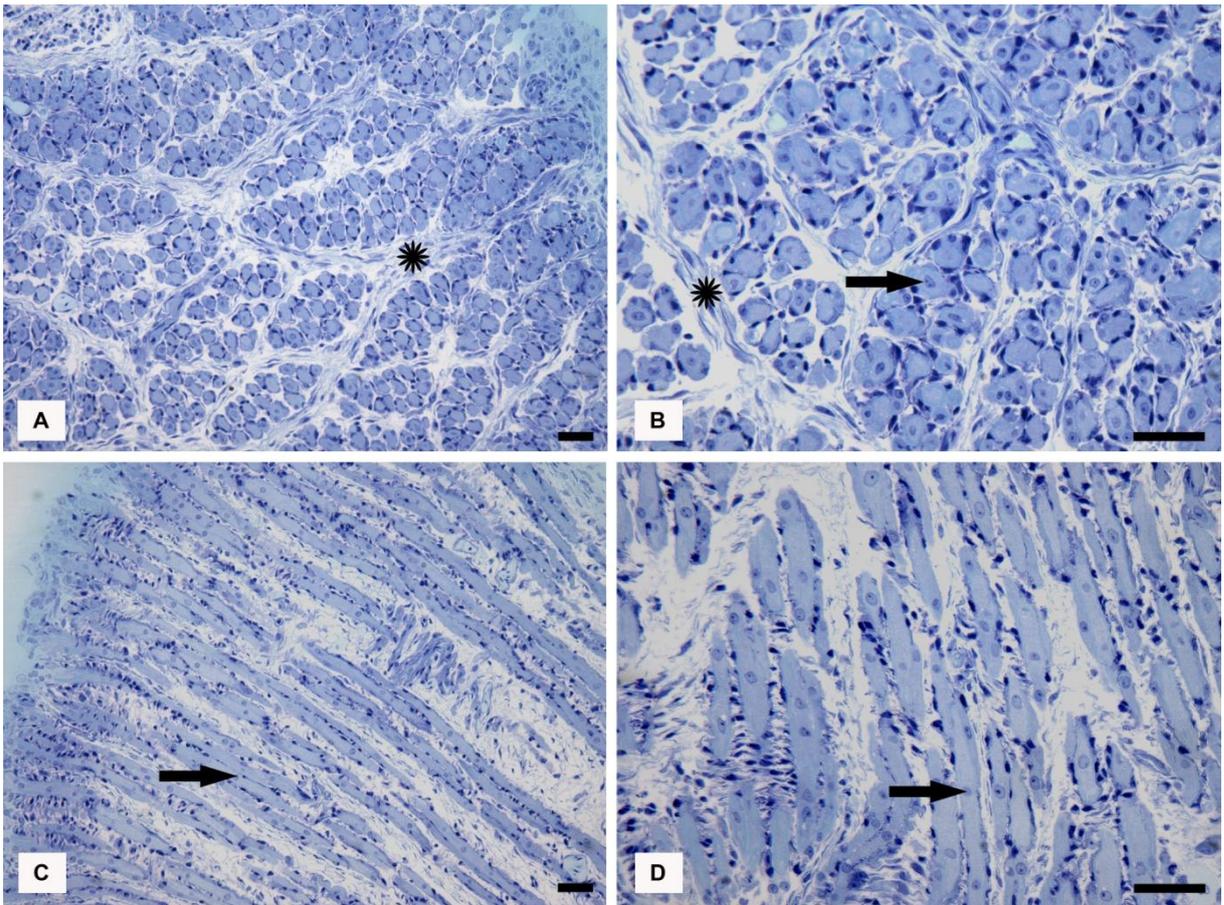


Figura 16. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 11 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μ m, com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo.

Com 14 dias de desenvolvimento, o tecido muscular apresenta-se mais compactado, havendo um menor espaçamento entre as fibras musculares já bastante alongadas, que se organizam em feixes envoltas pelo tecido conjuntivo (endomísio e perimísio) (Figura 17 A, B e D, asteriscos). Observa-se ainda uma inervação e vascularização mais intensa do músculo em formação nesta fase (Figura 17 A e C).

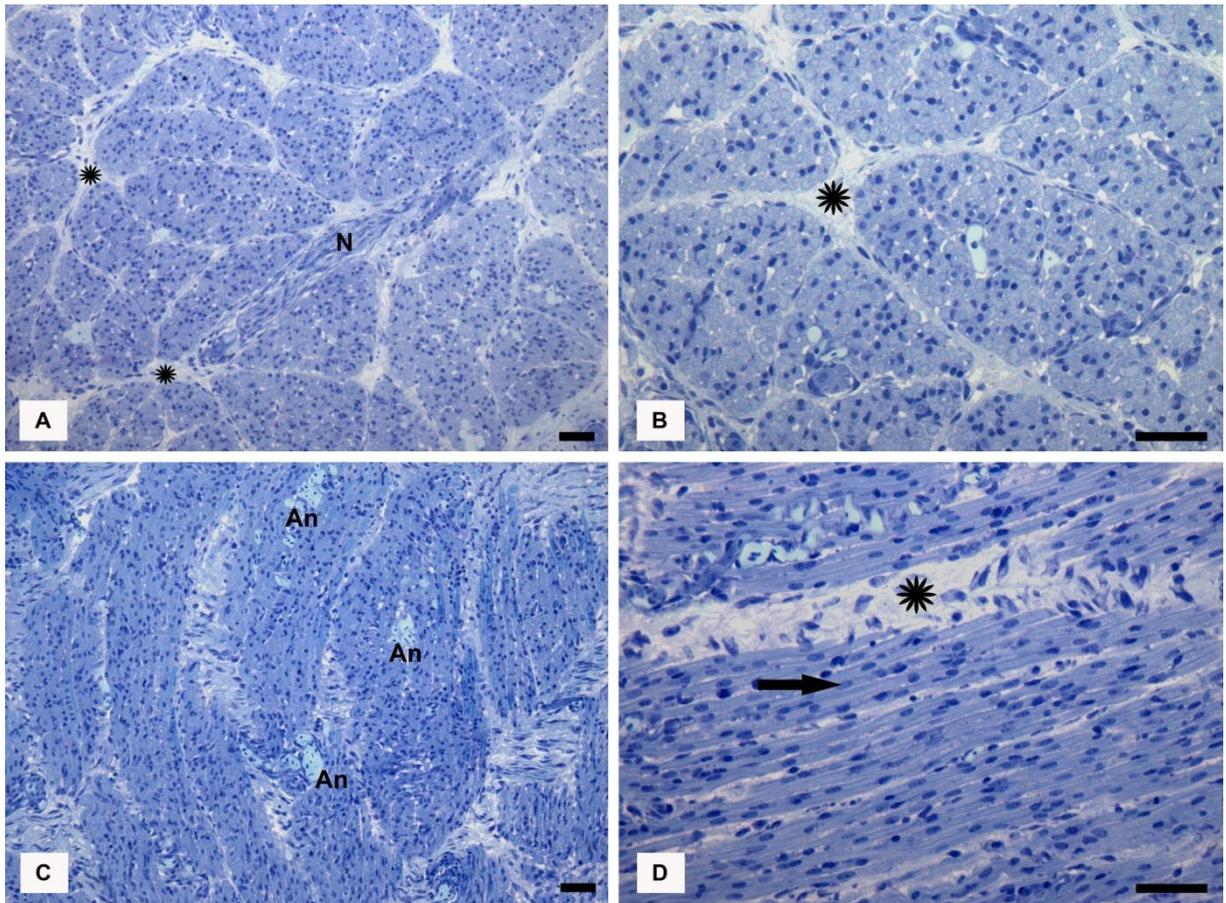


Figura 17. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 14 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 µm, com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; An= Vasos sanguíneos; Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo.

No dia 17 de desenvolvimento embrionário, observa-se uma organização bem maior do tecido muscular do que nos dias anteriores (Figura 18). A presença das estriações, característica importante do músculo estriado esquelético é bastante proeminente (indicado pelas setas de pontas finas), uma vez que mostra o processo de sarcomerogênese em estado avançado. Um fato marcante é o tecido conjuntivo (representado pelos asteriscos) que encontram-se muito bem organizados e nessa etapa já é possível observar o epimísio (Figura 18 D, asterisco) bastante evidente e espesso.

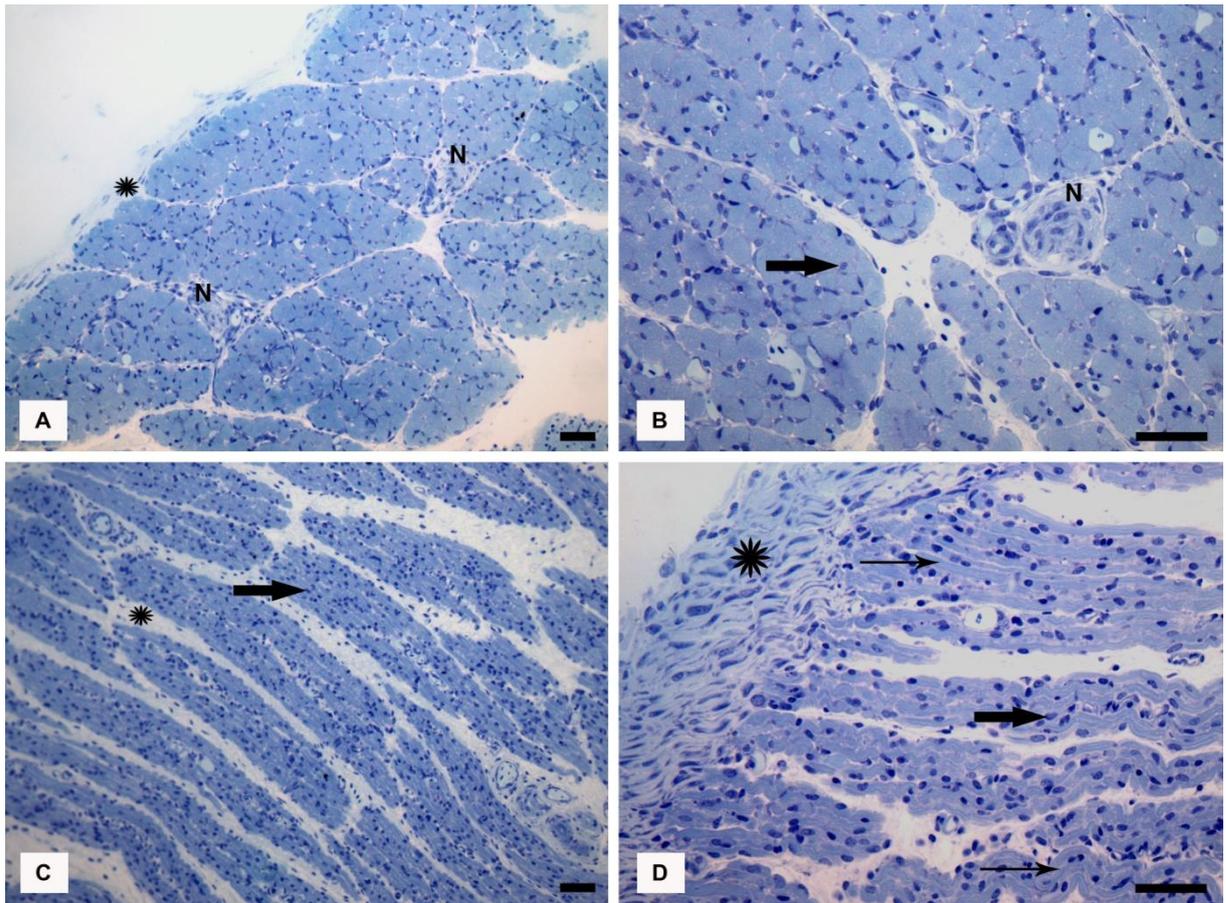


Figura 18. Microscopia de luz, do tecido muscular peitoral, retirado do embrião de galinha com 17 dias de desenvolvimento. Os tecidos foram processados em historesina e corados com Azul de Toluidina. Imagens A e B representam o corte transversal e as imagens C e D representam o corte longitudinal. Barras: A, B, C, D = 25 μm , com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para as imagens B e D. Legenda: N= Nervos; Seta fina= sarcomerogênese; Seta grossa= Núcleos da fibra muscular; Asterisco (*)= Tecido conjuntivo.

De modo geral, nota-se uma transição entre um tecido mesenquimal, nos primeiros dias analisados (dias 8 e 11) para um tecido mais diferenciado (dias 14 e 17). Nos dois primeiros estádios do desenvolvimento (8 e 11 dias) as células em formação, os mioblastos, ainda são mononucleados. Nos dois estágios seguintes analisados (dias 14 e 17) é possível notar uma maior organização do tecido muscular bem como as bainhas de tecido conjuntivo mais espessas, mostrando, desse modo, uma intensa relação entre o tecido muscular e os tecidos conjuntivos que envolvem esses músculos, pois quanto maior é a organização, mais evidente é o tecido conjuntivo.

No período fetal, as fibras musculares se originam pela fusão de células progenitoras denominadas mioblastos. No decorrer do processo de miogênese no embrião, esses mioblastos se alongam formando miócitos, que em seguida se fundem e formam as miofibras pela adição de vários núcleos adicionais provenientes de mioblastos circundantes. Assim, as miofibras apresentam numerosos núcleos, que se localizam na periferia das fibras,

sendo esta uma característica importante e que diferencia o tecido muscular esquelético dos demais tecidos musculares (esquelético cardíaco e liso) (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

As fibras musculares estão envoltas por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas e que constituem o tecido conjuntivo do músculo (SANES, 2003; KJAER, 2004; DAL PAI-SILVA; CARVALHO, 2007). Sendo assim, o tecido conjuntivo que envolve o músculo está organizado em três bainhas distintas: o epimísio, que recobre todo o músculo; o perimísio, que divide o músculo em fascículos e o endomísio, que circunda cada fibra muscular (CRAIG, 1994; JUNIOR, 2009).

O epimísio é constituído por tecido conjuntivo denso não modelado e envolve todo o tecido muscular. Este envia septos formados por tecido conjuntivo frouxo, constituindo o perimísio, que divide as fibras musculares em fascículos. Cada célula muscular é envolta por lâmina basal, fibras reticulares e uma pequena quantidade de tecido conjuntivo frouxo, que constituem o endomísio, onde este ancora as fibras musculares entre si (MONTANARI, 2016). Sob o ponto de vista funcional, o tecido conjuntivo é muito importante para o tecido muscular, pois mantém as fibras musculares unidas e permite que a força de contração gerada por cada fibra individualmente exerça uma ação no músculo como um todo. Além disso, todas essas diferentes camadas de tecido conjuntivo (epimísio, perimísio e endomísio) que envolvem o tecido muscular possibilita que a força de contração do músculo seja transmitida a outras estruturas, como no caso dos ossos e dos tendões (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

Dessa forma, pode-se concluir que as análises morfológicas realizadas possibilitaram evidenciar a presença de nervos, o processo de angiogênese e um aumento gradativo na quantidade e na organização de tecido conjuntivo, em paralelo a série de desenvolvimento da linhagem miogênica: mioblastos (8 dias) → miócitos (11 dias) → miofibras jovens (14 dias) → miofibras maduras (17 dias). Ressalta-se, portanto, que as células em formação são mononucleadas, vão se fundindo, ficando alongadas e, por fim, tornam-se multinucleadas, originando as fibras musculares do tecido muscular esquelético. Neste processo há uma íntima associação com as células do tecido conjuntivo, que se desenvolve de maneira coordenada e sincrônica com a linhagem miogênica.

5.4. Estudo da distribuição espacial da MIOSTATINA (MSTN) em tecidos e em células

Para investigar se os aumentos nos níveis de expressão gênica da *Mstn* são acompanhados por uma elevação correspondente na concentração da proteína no músculo peitoral de galinha, foi realizada uma análise da distribuição espacial da MSTN pela técnica de imuno-histoquímica. Estas análises foram realizadas nos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento.

No tecido muscular do embrião de 8 dias observa-se uma marcação moderada mas consistente da proteína MSTN no músculo em formação (Figura 19). Em algumas regiões do corte observou-se uma distribuição da MSTN em formato de faixas, sugerindo que a distribuição desta proteína acompanha o observado na morfologia (um conjunto de mioblastos se fundindo e formando uma fibra muscular jovem). Além disso, verifica-se uma estrutura muito bem marcada pelo anticorpo da MSTN (Figura 19 A, seta fina) que é semelhante a um brotamento epitelial. Essa faixa que ficou marcada e envolve esse brotamento epitelial possivelmente representa células mioepiteliais ou uma camada de tecido muscular liso e provavelmente em volta dessa faixa tem-se o envolvimento por mesênquima. A marcação sugere que a MSTN está ao redor desse mesênquima e das células mioepiteliais ou da camada de tecido muscular liso.

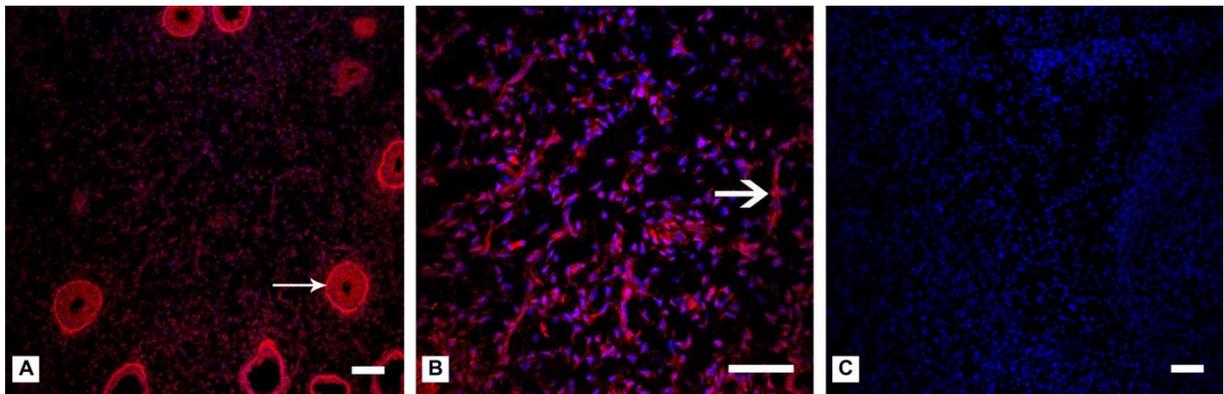


Figura 19. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 8 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 μ m, com aumento de 200x para as imagens A e C; e de 400x para a imagem B. A-B= Tecido muscular; C= Controle negativo. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa FluorTM 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidenciação dos núcleos celulares.

No tecido muscular do embrião de 11 dias denota-se uma maior concentração da proteína MSTN (Figura 20). O tecido muscular está em estágio mais avançado de desenvolvimento e isso é corroborado pela histologia do tecido já analisado neste trabalho. As

setas (Figura 20 B) indicam que a distribuição da MSTN está mais intensa no entorno do tecido muscular em desenvolvimento.

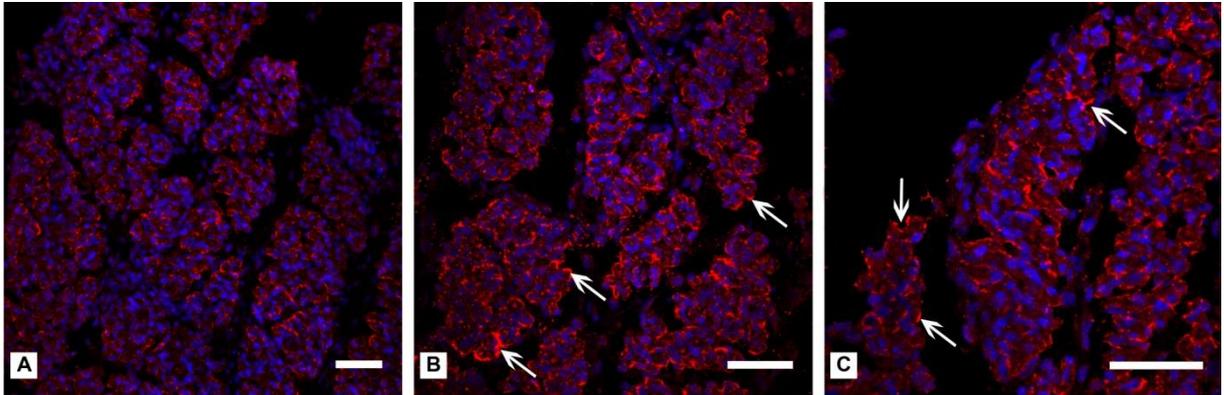


Figura 20. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 11 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 µm, com aumento de 200x (com zoom óptico) para a imagem A; de 400x para a imagem B; e de 400x (com zoom óptico) para a imagem C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidenciação dos núcleos celulares.

No tecido muscular do embrião de 14 dias, o tecido muscular está ainda mais diferenciado e organizado, conforme demonstrado pelas análises histológicas neste estágio. Nesta fase observa-se uma ampla e intensa distribuição da proteína MSTN nas fibras em formação (Figura 21). As setas (Figura 21 B) mostram o mesmo padrão de distribuição observado no estágio anterior (estágio 11), mostrando que ao redor do tecido muscular em desenvolvimento tem-se uma maior concentração da proteína MSTN.

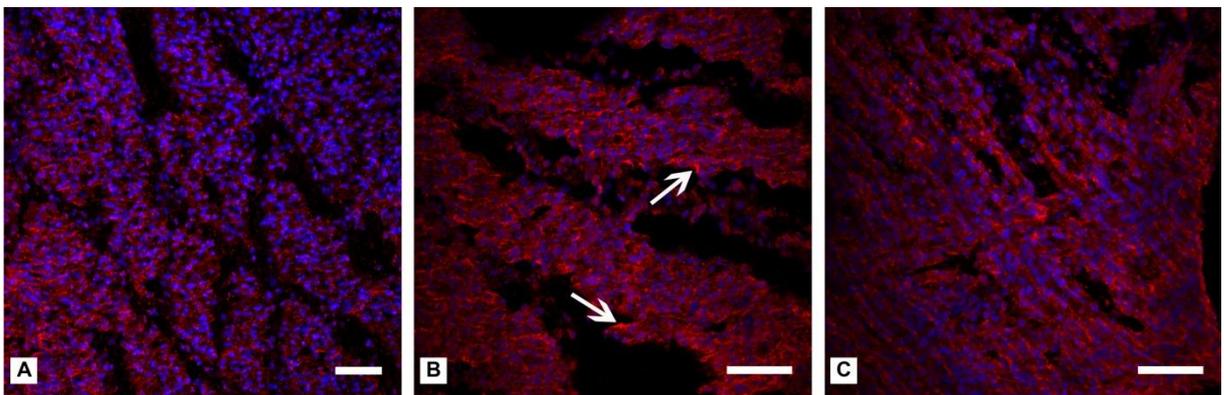


Figura 21. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 14 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 µm, com aumento de 200x (com zoom óptico) para a imagem A; e de 400x para as imagens B e C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidenciação dos núcleos celulares.

No tecido muscular do embrião de 17 dias observa-se um tecido altamente organizado, que apresenta a MSTN distribuída de maneira conspícua ao redor das fibras musculares em desenvolvimento, compondo um halo ao redor destas células. Desse modo, demonstrou-se que a marcação para o anticorpo da MSTN distribui-se de modo pericelular (no entorno), como pode ser observado pelas indicações das setas (Figura 22 B e C).

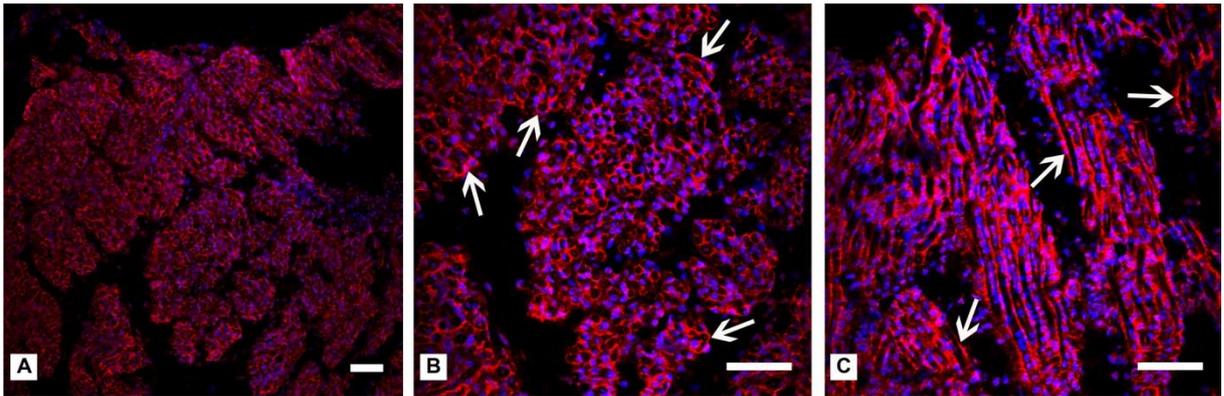


Figura 22. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imuno-histoquímica em parafina, do tecido muscular peitoral, no estágio de 17 dias de desenvolvimento embrionário. As imagens foram obtidas pelo microscópio confocal. Barras: A, B, C = 50 μ m, com aumento de 200x para a imagem A; e de 400x para as imagens B e C. A-C= Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa FluorTM 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidenciação dos núcleos celulares.

Portanto, pode-se inferir a proteína MSTN está presente no tecido muscular em todos os dias analisados do desenvolvimento embrionário de galinha (dias 8, 11, 14 e 17). Sugestivamente, parece haver um aumento progressivo da expressão dessa proteína, onde os animais em estádios mais avançados do desenvolvimento embrionário estão com uma expressão proteica mais acentuada, fato corroborado pela expressão gênica, objeto anterior de estudo deste trabalho. Uma análise bastante interessante que foi observada se refere ao padrão de distribuição da proteína MSTN, pois verificou-se uma distribuição mais associada a região do entorno (pericelular). Esse resultado pode estar associado ao fato de que a MSTN é produzida, secretada e precisa ficar no local onde ela consegue agir, sendo, no caso, a sua atuação na matriz extracelular, uma vez que a MSTN atua como um fator parácrino.

Para verificar se ao serem cultivados os mioblastos primários de galinha e as células da linhagem miogênica geradas ao longo do processo de diferenciação celular mantiveriam o mesmo padrão de distribuição da proteína MSTN, foram realizadas análises de imunocitoquímica nos diferentes dias de diferenciação (dias 1 a 5). Interessantemente, estes ensaios revelaram que as células da cultura celular primária de mioblastos não apresentam a

proteína MSTN sendo expressa. Estes dados indicam que apesar de ter sido detectada a expressão gênica, possivelmente os níveis de expressão da *Mstn* são baixos ou não ocorre a tradução dos RNAs mensageiros da *Mstn* para gerar a proteína correspondente. Nossos dados mostram que o dia que demonstrou expressar um pouco da proteína foi o dia 4 de cultura celular e em menor grau ainda o dia 5 de cultura celular. Os demais dias não apresentaram níveis detectáveis da proteína MSTN. Esses resultados podem ser vistos na Figura 23.

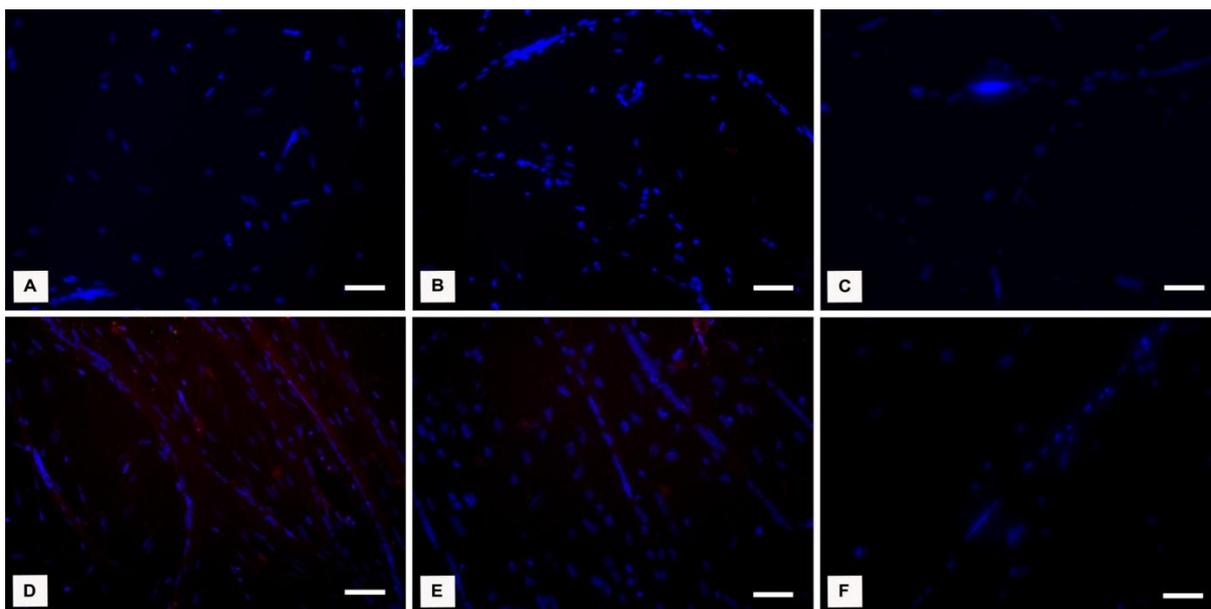


Figura 23. Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imunocitoquímica, ao longo da miogênese esquelética de galinha *in vivo*. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência. Imagens A-E= dias de cultura, do 1 ao 5, respectivamente. F= Controle negativo. Barras: A-F = 50 μ m, com aumento de 200x para todas as imagens. Tecido muscular. Imagens de imunofluorescência utilizando anticorpo primário anti-MSTN e anticorpo secundário conjugado com Alexa Fluor™ 555 para detecção da proteína MSTN e DAPI para evidenciação dos núcleos celulares.

5.5. Quantificação e análise do conteúdo proteico da MSTN em tecidos

Observa-se, no estudo realizado, que a expressão da proteína MSTN aumenta no estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário (estágio de 17 dias) em *Gallus gallus*. As análises demonstraram que os dias anteriores não apresentaram diferenças significativas na expressão proteica, mas no último dia ocorre um aumento na expressão da MSTN. De modo geral, esse estudo corroborou com o observado nas análises de expressão gênica, visto que o último dia analisado se trata do animal em fase mais avançada de desenvolvimento embrionário e todas as análises feitas em tecidos, neste trabalho, evidenciaram uma expressão mais acentuada neste último estágio de desenvolvimento estudado. Na Figura 24 verifica-se esse padrão de expressão do conteúdo proteico da MSTN.

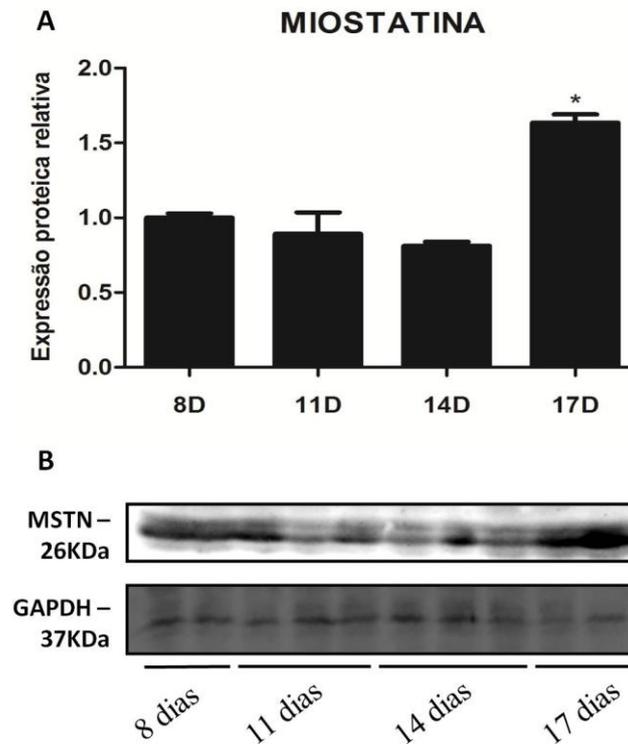


Figura 24. Quantificação, em tecidos, da MTSN, pela técnica de *Western Blotting*, nos dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário. As análises de *One way ANOVA*, com valor de significância ($*p \leq 0,05$;) são indicadas por comparação entre os dias analisados. A- As barras representam SEM \pm do conteúdo proteico da MSTN em relação ao conteúdo de GAPDH. B- Imagens do conteúdo das proteínas MSTN e GAPDH.

5.6. Ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha

Para compreender os motivos pelos quais houve uma diferença tão importante na distribuição e concentração da proteína MSTN entre o músculo peitoral e a cultura primária de mioblastos em diferenciação, foi desenhado um experimento visando restituir às células da linhagem miogênica o contato com células do tecido conjuntivo, que se desenvolvem de maneira tão próxima e interdependente durante a histogênese do músculo esquelético. Para tanto, foi realizado um ensaio de co-cultura das células miogênicas presentes na cultura primária de mioblastos e corpos organoides de fibroblastos. Para obtenção dos organoides foram empregados fibroblastos extraídos do músculo peitoral durante a preparação da cultura, um tipo celular bastante abundante e que faz parte do tecido conjuntivo e irá participar da formação dos envoltórios do músculo esquelético (endomísio, perimísio e epimísio). Como há uma grande concentração de fibroblastos no dia 11,5 de desenvolvimento, quando é feita a

coleta das células para a cultura, é realizado um pré-plaqueamento, que elimina a maior parte destas células. Isto ocorre porque estes fibroblastos aderem rapidamente à placa de cultivo, enquanto os mioblastos não o fazem. Estas células foram tripsinizadas e cultivadas em *hanging-drops* para formar estruturas esféricas que pudessem ser facilmente co-cultivadas com as células da cultura primária de mioblastos. O propósito deste ensaio foi evidenciar uma possível modificação na concentração da proteína MSTN nas células miogênicas em diferenciação na cultura primária.

Nossos resultados mostraram não haver qualquer alteração nos níveis da proteína MSTN nas células da linhagem muscular, mas surpreendentemente os próprios organoides contêm altos níveis da proteína MSTN (Figura 25). Portanto, nossos dados sugerem que ao removermos os fibroblastos da cultura primária de mioblastos pelo processo de pré-plaqueamento, removemos também as células que expressam a proteína MSTN.

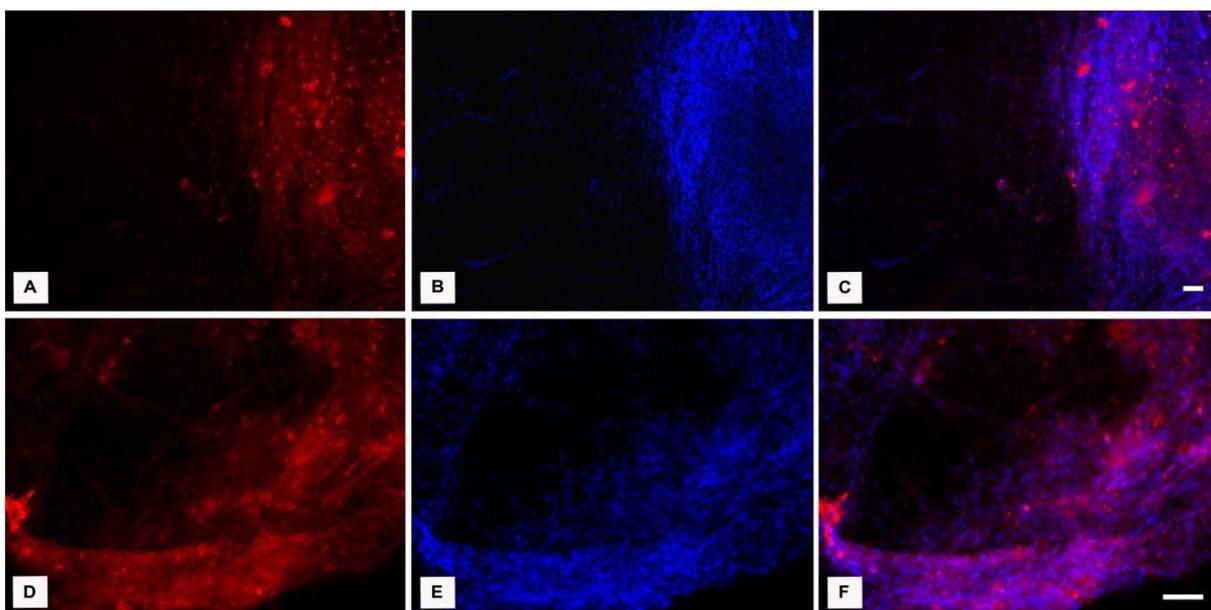


Figura 25: Distribuição espacial da MSTN, pela técnica de imunocitoquímica, ao longo da miogênese esquelética de galinha *in vitro*. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência. Fibroblastos foram colocados no dia 2 de cultura e esperou-se 48 horas para a realização da imunocitoquímica. Para visualização mais detalhada, mostra-se: Imagens A, B, D e E= imagens obtidas separadamente do anticorpo e do DAPI, respectivamente. Imagens C e F= imagens compostas (sobreposição das duas cores). Barras: A-F = 50 μ m, com aumento de 100x para as imagens A, B e C; e de 200x para as imagens D, E e F.

O músculo esquelético é um sistema composto não somente de miofibras, mas também de nervos, células sensoriais, vasos sanguíneos e tecido conjuntivo. O tecido conjuntivo ou conectivo desempenha um papel funcional fundamental uma vez que este tecido atua na transferência de tensão da contração gerada pelas miofibras aos elementos

musculares esqueléticos gerando uma ação no músculo inteiro (ELASHRY et al., 2012; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). Acredita-se também que o padrão muscular, como o tamanho e a forma, é controlado pelo tecido conjuntivo circundante (KARDON et al., 2003; VALASEK et al., 2011).

A maioria dos experimentos que investigam a *Mstn* tem focado no componente da fibra muscular do músculo esquelético. Entretanto, os estudos realizados por Elashry et al. (2012) apontaram que a deleção da *Mstn*, em ratos, resulta na diminuição da densidade do tecido conjuntivo do perimísio e do endomísio, principalmente pela redução da quantidade de laminina e dos colágenos do tipo I, III e IV. Assim como, em oposição, a presença da *Mstn* possibilita um tecido conjuntivo mais espesso pelo aumento da quantidade desses componentes presentes do tecido conjuntivo. Ainda de acordo com Elashry et al. (2012), experimentos anteriores realizados por Mcpherron et al. (1997) e Mendias et al. (2006) relataram uma redução de colágeno, presentes no tecido conjuntivo, nos músculos esqueléticos de ratos com deleção da *Mstn*. Essas descobertas foram complementadas por estudos mostrando que a *Mstn* parece atuar em fibroblastos e também na proliferação de fibroblastos tendíneos (MENDIAS et al., 2006; ZHU et al., 2007; FULZELE et al., 2010).

Para gerar um sistema eficiente de trabalho, o tecido muscular deve ser desenvolver de maneira coordenada e esse papel é exercido, em grande parte, pela atuação do tecido conjuntivo que permeia o tecido muscular estriado esquelético.

Em suma, nossos dados podem sugerir que a MSTN estaria mais relacionada ao tecido conjuntivo, visto que o tecido muscular é dependente do tecido conjuntivo e os nossos dados apontaram para uma relação contundente entre a MSTN e o tecido conjuntivo presente no músculo estriado esquelético. Este achado é inédito e relevante para as pesquisas que são feitas visando desenvolver maneiras de modular a atividade da MSTN para fins terapêuticos. Contudo, mais experimentos precisam ser realizados para se obter uma resposta precisa quanto as relações específicas envolvendo a MSTN, o tecido conjuntivo e o tecido muscular.

6. CONCLUSÕES

- A *Mstn* é expressa durante todas as etapas da miogênese fetal de galinha, segundo verifica-se nos estudos de expressão gênica, tanto nos tecidos (dias 8, 11, 14 e 17 de desenvolvimento embrionário), quanto em cultura de células (cinco dias de diferenciação celular).
- O padrão de expressão gênica da *Mstn* em tecidos foi diferente do que ocorreu em células, pois em tecidos a *Mstn* se comportou conforme o encontrado na literatura e foi aumentando progressivamente ao longo dos dias de desenvolvimento embrionário analisados (dias 8, 11, 14 e 17 dias), porém, em células, a *Mstn* apresentou diminuição da sua expressão ao longo dos 5 dias de diferenciação celular.
- Durante a miogênese fetal há um aumento gradual da expressão da *Mstn*, concomitante com a elevação dos níveis de *p21*; *Pax3* sofre indução no dia 11 e queda acentuada no dia 17 da miogênese fetal; não há modulação da expressão de *Myf-5* ao longo dos dias de miogênese fetal; *Myod* e *Miogenina* são expressos mais intensamente no dia 11, precedendo o pico de transcrição da *Mstn* no dia 14; há indução da expressão da *MyHC* nas etapas mais avançadas da miogênese fetal, com destaque para o dia 17.
- Na miogênese *in vitro* ocorre um aumento da expressão de *p21* ao longo dos 5 dias de cultura primária de mioblastos, em oposição à expressão da *Mstn* que se mantém reduzida ou ausente neste sistema; *Pax3* e *Myf-5* são mais expressos nos dias 1 e 2 da cultura; há maior transcrição de *Myod* e *Miogenina* nos primeiros dias de cultura; *MyHC* apresenta forte indução nos dias 4 e 5 de cultura celular.
- O gene da *Fst* não teve diferenças significativas, tanto em tecidos quanto em células, neste trabalho.
- A distribuição espacial da proteína MSTN acompanhou o padrão expresso do gene da *Mstn* em tecidos, mas em células o comportamento não foi conforme o esperado, pois a proteína MSTN não apresentou níveis detectáveis e possivelmente estes dados indicam que os níveis de expressão gênica da *Mstn* são basais ou não ocorre a tradução dos RNAs mensageiros deste gene para gerar a proteína correspondente, em células.
- Em tecidos, o conteúdo proteico da MSTN também apresentou concordância com a expressão gênica e com os dados da distribuição espacial, sendo que a expressão da

proteína MSTN aumenta no estágio mais avançado do desenvolvimento embrionário (estádio de 17 dias) em *Gallus gallus*.

- Os ensaios de co-cultura de mioblastos primários fetais com organoides de fibroblastos de galinha revelaram que não há expressão da proteína MSTN nas células da linhagem muscular, mas os organoides de fibroblastos apresentam altos níveis da proteína MSTN. Esses dados sugerem que ao removermos os fibroblastos da cultura primária de mioblastos pelo processo de pré-plaqueamento, removemos também as células que expressam a MSTN.
- A comparação feita entre tecidos e células nos revelou que existem diferenças significativas na expressão gênica e proteica da *Mstn*, visto que o tecido se comporta à nível sistêmico e, as células, provenientes da cultura celular, correspondem a um sistema de estudos isolado (não sistêmico).

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, M. R. *Análise de genes de referência para estudos de expressão gênica em Eucalyptus globulus Labill durante o processo de enraizamento adventício através da técnica de PCR Quantitativo em Tempo Real*. Trabalho de Conclusão de Curso. 2009. 43f. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Instituto de Biociências. Porto Alegre. 2009.

ALVARES, L. E. *Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de Pax-3 durante o desenvolvimento embrionário de aves*. 2001. 143p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2001.

ALVES, H. J. *Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte*. Tese de doutorado. 2004. 114f. Programa de Pós-Graduação em Agronomia - área de concentração em Ciências Animal e Pastagens – pela 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.

ANDREOTE, A. P. D. *Identificação de micro RNAs na musculatura esquelética de Gallus gallus*. 2009. 88f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Ciências pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2009.

ARNOLD, H. H.; BRAUN, T. The role of Myf-5 in somitogenesis and the development of skeletal muscles in vertebrates. *J. Cell Science*, 104: 957-960, 1993.

ARNOLD, H. H.; BRAUN, T. Genetics of muscle determination and development. *Current Topics in Developmental Biology*, v. 48, p. 129- 164, 2000.

BERKES C. A.; TAPSCOTT S. J. MyoD and the transcriptional control of myogenesis. *Semin Cell Dev Biol*; 16(4-5):585-95. 2005.

BISMUTH, K.; RELAIX, F. Genetic regulation of skeletal muscle development. *Exp. Cell Res.* 316, 3081–3086. 2010.

BOTTINELLI, R.; BETTO, R.; SCHIAFFINO, S.; REGGIANI, C. Maximum shortening velocity and coexistence of myosin heavy chain isoforms in single skinned fast fibers of rat skeletal muscle. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, London, v. 15, p. 413-419, 1994.

BRAND-SABERI, B.; WILTING, J.; EBENSPERGER, C.; AND CHRIST, B. The formation of somite compartments in avian embryos. *Int. J Dev. Biol.*, 40, 411 –420. 1996.

BRAUN, T.; BUSHHAUSEN-DENKER, G.; BOBER, E.; TANNICH, E.; ARNOLD, H. H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T ½ fibroblasts. *European Molecular Biology Organization Journal*, v.8, p. 701-709, 1989.

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. *European Molecular Biology Organization Journal*, v.14, p.1176-1186, 1995.

BRAUN, T. E.; ARNOLD, H. H. Myf-5 and myoD genes are activated in distinct mesenchymal stem cells and determine different skeletal muscle cell lineages. *Embo J* 15(2): 310-18, 1996.

BROWN, W. R.; HUBBARD, S. J.; TICKLE, C.; WILSON, S. A. The chicken as a model for large-scale analysis of vertebrate gene function. *Nature Reviews Genetics*, London v. 4, n. 2, p. 87-98, 2003.

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. REVIEW: *J. Anat.* 202, pp59–68. 2003.

BUCKINGHAM, M.; RIGBY, P. W. Gene regulatory networks and transcriptional mechanisms that control myogenesis. *Developmental Cell*; 28(3):225-238 2014.

BURT, D. W. Emergence of the chicken as a model organism: implications for agriculture and biology. *Poultry science*, v. 86, n. 7, p. 1460-1471, 2007.

CAPPUCCIO, L.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A. A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. *Animal Genetics*, p.29-51, 1998.

CARLSON, B. M. *Embriologia humana e biologia do desenvolvimento*. Elsevier Brasil: 5ª Ed. 2014.

CARVALHO, H. F.; RECCO-PIMENTEL, S. M. *A Célula*. 3ª ed. São Paulo: Manole, 2013.

CASTELHANO-BARBOSA, E. C. *Estudo da expressão espacial e temporal do gene da miostatina durante o desenvolvimento embrinário da galinha (Gallus gallus)*. Piracicaba, 2001. 78p. Dissertação (Mestrado) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo. 2001.

CHARGÉ, S. B. P.; RUDNICKI, M. A. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiological Reviews.*, v.84, n.1, p.209-238, 2004.

CHEN, J. C. J.; GOLDHAMER, D. J. Skeletal muscle stem cells. *Reproductive Biology and Endocrinology*, Storrs, v. 1, p. 101-108, Nov. 2003.

CHRIST, B.; JACOB, M.; JACOB, H. J. On the origin and development of the ventrolateral abdominal muscles I the avian embryo. An experimental and ultrastructural study. *Anat. Embryol.*, 166: 87-101, 1983.

CHRIST, B.; ORDAHL, C. P. Early stages of chick somite development. *Anal. Embryol.* 191:381-396, 1995.

CINNAMON, Y.; KAHANE, N; ventrolateral myotome. *Development*. 126:4305- 4315, 1999.

CONOVER W. J.; IMAN, R. L. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35, 124-129. 1981.

CONSONNI, S. R.; ROSA, R. G.; NASCIMENTO, M. A.; VINAGRE, C. M.; TOLEDO, O. M.; JOAZEIRO, P. P. Recovery of the pubic symphysis on primiparous young and multiparous senescent mice at postpartum. *Histol Histopathol* 27, 885- 896. 2012.

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*, Cambridge, v.117, n. 2, p. 563-569, 1993.

CRAIG, C. The structure of the contractile filaments. In: Engel AG, editor. *Myology*. New York: McGraw-Hill: 134-75p. 1994.

DAL PAI-SILVA, M.; CARVALHO, R. F. Mecanismos celulares e moleculares que controlam o desenvolvimento e o crescimento muscular. *Revista Brasileira de Zootecnia / Brazilian Journal of Animal Science*, v. 36, p. 21-31, 2007.

DAVIS, R. L.; WEINTRAUB, H.; LASSAR, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell*, v.51, p.987-1000, 1987.

DENETCLAW, W.; CHRIST, B.; ORDAHL, C. P. Location and growth of epaxial myotome precursor cells. *Development*. 124:1601-1610, 1997.

EDMONSON, D. G.; OLSON, E. N. A gene with homology to the myc similarity region of MyoD is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle differentiation program. *Genes Development*, v.3, p. 628-640, 1989.

ELASHRY, M. I.; COLLINS-HOOPER, H.; VAIYAPURI, S.; PATEL, K. Characterisation of connective tissue from the hypertrophic skeletal muscle of myostatin null mice. *Journal of anatomy*, v. 220, n. 6, p. 603-611, 2012.

EL-DEIRY, W. S.; HARPER, J. W.; O'CONNOR, P. M.; VELCULESCU, V. E.; CANMAN, C. E.; JACKMAN, J.; PIETENPOL, J. A.; BURRELL, M.; HILL, D. E.; WANG, Y.; WILMAN, G. W.; MERCER, E.; KASTAN, B. K.; KOHN, K. W.; ELLEDGE, S. J.; KINZLER, K. W.; VOGELSTEIN, B. *WAF1/CIP1* is induced in *p53*-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res* 54(5): 1169- 74. 1994.

EL-DEIRY, W. S.; TOKINO, T.; VELCULESCU, V. E.; LEVY, D. B.; PARSONS, R.; TRENT, J. M.; LIN, D.; MERCER, W. E.; KINZLER, K. W. A.; VOGELSTEIN, B. *WAF1*, a potential mediator of *p53* tumor suppression. *Cell* 75(4): 817-25. 1993.

ELLIOTT, A.; OFFER, G. Shape and flexibility of the myosin molecule. *J Mol Biol*, v.123, n.4, p.505-519, 1978.

EMERSON, C. P. Skeletal myogenesis: genetics and embryology to the fore. *Current Opinion in Genetics and Development*, v. 3, p. 265-274, 1993.

FERRI, P.; BARBIERI, E.; BURATTINI, S.; GUESCINI, M.; D'EMILIO, A.; BIAGIOTTI, L.; DEL GRANDE, P.; DE LUCA, A.; STOCCHI, V.; FALCIERI, E. Expression and subcellular localization of myogenic regulatory factors during the differentiation of skeletal muscle C2C12 myoblasts. *Journal of Cellular Biochemistry*, New York, v. 108, p. 1302-1317, 2009.

FOTY, R. A Simple Hanging Drop Cell Culture Protocol for Generation of 3D Spheroids. *J. Vis. Exp.* (51), e2720, 2011.

FULZELE, S.; AROUNLEUT, P.; CAIN, M.; HERBERG, S.; HUNTER, M.; WENGER, K.; HAMRICK, M. W. Role of myostatin (GDF-8) signaling in the human anterior cruciate ligament. *J Orthop Res*, 28, 1113–1118. 2010.

GADANHO, A. M. F. *Mutações no gene da Miostatina na raça bovina Limousine*. 2014. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção Animal). Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, 2014.

GILBERT, S. F. *Biologia do desenvolvimento*. 5ª ed. Ribeirão Preto: Funpec, 2003, p. 918.

GONZALEZ-CADAVID, N. F.; TAYLOR, W. E.; YARASHESKI, K.; SINHA-HIKIM, I.; MA, K.; EZZAT, S.; SHEN, R.; LALANI, R.; ASA, S.; MAMITA, M.; NAIR, G.; ARVER, S.; BHASIN, S. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 25, p. 14938-43, 1998.

- GOTLIEB, D. Z. *Estudo da expressão da miostatina em modelos murinos para doenças neuromusculares*. Dissertação de mestrado. 2011. 75f. Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. 2011.
- GOULDING M, LUMSDEN A, PAQUETTE A. J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. *Development*;120(4):957- 71. 1994.
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L. J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MÉNISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mammalian Genome*, v.9, p.210-213, 1998.
- 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.
- HAENDLER, B.; HOFER-WARBINEK, R.; HOFER, E. Complementary DNA for human T-cell cyclophilin. *Embo J* 6(4): 947-50. 1987.
- HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology*, v.88, p.49-92, 1951.
- HARTLEY, R. S.; BANDMAN, E.; AND YABLONKA-REUVENI, Z. Skeletal muscle satellite cells appear during late chicken embryogenesis. *Dev. Biol.* 153, 206–216. 1992.
- 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.
- HAWKE, T. J. E.; GARRY, D. J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, Bethesda, v. 91, p. 534-551, 2001.
- HILLIER, L. W. et al. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature*, London, v. 432, n. 7018, p. 695-716, 2004.
- HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science*, v.164, n.886, p.1356-65, 1969.
- JORGE, E. C. *Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (Gallus gallus)*. 2006. 152f. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação em agronomia pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2006.
- JUNIOR, E. R. S. *Expressão e localização de fatores regulatórios miogênicos (MyoD e miogenina) em músculos somáticos de ratos reinervados pela técnica de tubulização*. Dissertação de mestrado. 2009. 92f. Programa de Pós-graduação em Odontologia– Faculdade de Odontologia de Bauru, da Universidade de São Paulo – USP, Bauru, 2009.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. C. *Histologia Básica: texto e atlas*, 12^a edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Rio de Janeiro. 2013. 538p.

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

KALCHEIM, C.; CINNAMON, Y.; KAHANE, N. Myotome formation: a multistage process. *Cell and Tissue Research*, v.296, p.161-173, 1999.

KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T. P. L.; BASS, J. J. Mutations in myostatin (GDF8) in double-musled Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, v.7, p.910-915, 1997.

KARDON, G.; HARFE, B. D.; TABIN, C. J. A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning. *Dev Cell*, 5, 937–944. 2011.

KELLY, A. M.; RUBINSTEIN, N. A. The diversity of muscle fiber types and its origin during development. In: ENGEL, A.G.; FRANZINI-ARMSTRONG, C. (Eds) *Myology*, 2ed. McGraw-Hill: London, 1994. p.119-133.

KJAER, M. Role of extracellular matrix in adaptation of tendon and skeletal muscle to mechanical loading. *Physiol Rev*, v.84, n.2, p.649-698, 2004.

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.; KILLEFER, J. Myostatin expression and possible functions in animal muscle growth. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 447–54, 2002.

KOLEVA, M.; KAPPLER, R.; VOGLER, M.; HERWIG, A.; FULDA, S.; HAHN, H.; Pleiotropic effects of sonic hedgehog on muscle satellite cells. *Cellular and Molecular Life Sciences*, Boston, v. 62, p. 1863–1870, 2005.

LEAL, M. L.; SANTOS, A. R. ; AOKI, M. S. Adaptações moleculares ao treinamento de força: recentes descobertas sobre o papel da miostatina. *Revista Mackenzie de Educação Física e Esporte*, v. 7, p. 161-167, 2008.

LEE, M. H.; REYNISDOTTIR, I.; MASSAGUE, J. Cloning of p57KIP2, a cyclindependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9(6): 639-49. 1995.

LEE S. J.; MCPHERRON A. C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. *PNAS*. 98(16): 9306–9311. 2001.

LEE, S. J. Regulation of muscle mass by myostatin. *Annual review of cell and developmental biology*, 20, pp.61–86. 2004.

LIMA, S. C. *A estimulação elétrica na expressão gênica do myoD, miostatina e atrogina-1 do músculo gastrocnêmio desnervado de ratos*. 2007. 60f. Dissertação de mestrado. Programa

de Pós-graduação em Fisioterapia – Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Metodista de Piracicaba – UNIMEP. Piracicaba, 2007.

LIU, H. C.; HICKS, J. A. Using proteomics to understand avian systems biology and infectious disease. *Poultry Science*, Menasha, v. 86, p. 1523-1529, 2007.

LOPES, L. S. Aspectos fisiológicos e estruturais que influenciam o desenvolvimento do tecido muscular. *PUBVET*, Londrina, v. 4, n. 18, Ed. 123, p. 25, 2010.

LOWEY, S.; SLAYTER, H. S.; WEEDS, A. G.; BAKER, H. Substructure of the myosin molecule. I. Subfragments of myosin by enzymic degradation. *J Mol Biol*, v.42, n.1, p.1-29, 1969.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p; 265-276, 1951.

LUDOLPH, D. C.; KONIECZNY, S. F. Transcription factors families: muscling in on the myogenic program. *FASEB Journal*, v.9, p.1595-1604, 1995.

LUO, W.; LI, E.; NIE, Q.; ZHANG, X. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(11), 26186-26201, 2015.

MADEIRA, L. A. *Sistemas de criação e linhagens de frangos de corte: desempenho, rendimento, qualidade de carne e perfil de miosinas de cadeia pesada no músculo esquelético*. Tese de doutorado. 2008. 83f. Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. Universidade Estadual Paulista - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia - Campus de Botucatu. 2008.

MADEIRA, L. A., SARTORI, J. R., PIZZOLANTE, C. C., SALDANHA, É. S. P. B., SILVA, M. D. P.; CARANI, F. R. Tipos de miosinas de linhagens de frangos de corte criados em sistemas de confinamento e semiconfinamento1. *R. Bras. Zootec*, 40(9), 1961-1967. 2011.

MAGENTA, A., CENCIARELLI, C., DE SANTA, F., FUSCHI, P., MARTELLI, F., CARUSO, M., FELSANI, A. MyoD stimulates RB promoter activity via the CREB/p300 nuclear transduction pathway. *Molecular and Cellular Biology*. 23(8):2893-2906. 2003.

MALTIN, C. A.; DELDAY, M. I.; SINCLAIR, K. D.; STEVEN, J.; SNEDDON, A. A. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. *Reproduction*, v. 122, n. 3, p. 359-374, 2001.

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, n. 5, p. 668-681, 2008.

MANTOVANI, C. S. *Estudo de regiões evolutivamente conservadas e de fatores de transcrição possivelmente envolvidos na regulação da expressão do gene da Miostatina em vertebrados*. 2015. 195f. Dissertação de mestrado. Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Estrutural pela Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP. Campinas, 2015.

MARCHESIN, M. L. 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). 2008. 61f. Dissertação (mestrado em Ciências Biológicas). Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular pela Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Instituto de Biociências. Rio Claro, 2008.

MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, Baltimore, v. 9, p. 493-495, 1961.

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 (6628), p. 83-90, 1997.

MCPHERRON, A. C.; LEE, S. -J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*, v.94, p.12457-12461, 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.

MENDIAS, C. L.; MARCIN, J. E.; CALERDON, D. R.; FAULKNER, J. A. Contractile properties of EDL and soleus muscles of myostatin-deficient mice. *J Appl Physiol*, 101, 898–905. 2006.

MIRANDA, M. E.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M. Y.; MÉNISSIER, F.; CORTÉS, O.; DUNNER, S. Simultaneous genotyping to detect myostatin gene polymorphism in beef cattle breeds. *J Anim Breed Genet.*, v.119, supl.6, p.361-366, 2002.

MONTANARI, T. *Histologia- Texto, atlas e roteiro de aulas práticas*. 3ª edição, Porto Alegre, 2016. 229 p.

MONTEZEL, M. S. *Células satélite e regeneração muscular*. 2009, 41f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, Rio Claro, 2009.

MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, 3 ed. 1991.

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*, v. 3, n. 5, p.79, 2007.

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.

MUNTONI, F.; BROWN, S.; SEWRY, C.; PATEL, K. Muscle development genes: their relevance in neuromuscular disorders. *Neuromuscular Disorders*, 12(5), 438-446. 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.

NICHOLLS, C.; LI, H.; LIU, J. P. GAPDH: a common enzyme with uncommon functions. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 39, n. 8, p. 674-679, 2012.

NINOV, K. *Expressão de genes envolvidos no controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética em galinhas*. 2010. 85f. Tese (doutorado em Ciências). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal e Pastagens pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2010.

OLIVEIRA, P. C. G. Avaliação do padrão de degeneração e regeneração muscular em diferentes modelos murinos para distrofias musculares progressiva. Dissertação de mestrado. 2009. 82f. Programa de Pós-graduação em Ciências na área de Genética. Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo – USP. 2009.

ORDAHL, C. P. Myogenic lineages within the developing somite. In M. Bernfield (ed.), *Molecular Basis of Morphogenesis*. Wiley-Liss, New York, pp. 165-170. 1993.

PARDEE A. B. A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc Nat Acad Sci*. 71:1286-1290. 1974.

PARKER, M. H; SEALE, P; RUDNICKI, M. A. Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics*, London, v. 4, p. 497-507, 2003.

PATAPOUTIAN, A.; YOON, J. K.; MINER, J. H.; WANG, S.; STARK, K.; WOLD, B. Disruption of the mouse MRF4 gene identifies multiple waves of myogenesis in the myotome. *Development*, v.121, n.10, p.3347-3358, 1995.

PATEL, K.; AMTHOR, H. The function of Myostatin and strategies of Myostatin blockade- new hope for therapies aimed at promoting growth of skeletal muscle. *Neuromuscular Disorders*, v. 15, n. 2, p. 117-26, 2005.

PESSOTTI, N. S. *Diferenciação miogênica “in vitro” de células tronco mesenquimais murinas de diferentes origens*. 2009. 60f. Trabalho de Conclusão de Curso. Graduação em Ciências Biológicas. Universidade Estadual Paulista – UNESP – Instituto de Biociências de Botucatu, 2009.

PICARD, B.; LEFAUCHEUR, L.; BERRI, C.; DUCLOS, M. J. Muscle fibre ontogenesis in farm animal species. *Reproduction Nutrition and Development*, v.42, p.415-431, 2002..

POURQUIE, O. Vertebrate somitogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.17, p.311-350, 2001.

POWNALL, M. E.; GUSTAFSSON, M. K.; EMERSON, C. P. Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v.8, 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.

RANGEL, R. A. *Embriologia no ensino universitário: desafios, dificuldades apresentadas pelos discentes e possibilidades de superação*. 2015. 116f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de São Carlos - Campus Sorocaba, 2015.

REHFELDT, C.; FIEDLER, I.; DIETL, G.; ENDER, K. Myogenesis and postnatal skeletal muscle cell growth as influenced by selection. *Livestock Production Science*, v.66, p.177-188, 2000.

RHODES, S.; KONIECZNY, S. F. Identification of MRF4: a new member of the muscle regulatory factor gene family. *Genes Development*, v.3, p.2050-2061, 1989.

RUDNICKI, M. A.; BRAUN, T., HINUMA, S., JAENISCH, R. Inactivation of MyoD in mice leads to up-regulation of the myogenic LHL gene Myf-5 and results in apparently normal development. *Cell*, 71:383-390, 1992.

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.

RUSHBROOK J. I.; HUANG, J.; WEISS, C.; SICONOLFI-BAEZ, L.; YAO, T. T.; BECKER, E.; FEUERMAN, M. Characterization of the myosin heavy chains of avian adult fast muscles at the protein and mRNA levels. *Journal of Muscle Research and Cell Motility*, London, v. 18, n. 4, p. 449-463, 1997.

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

SANES, J. R. The basement membrane/basal lamina of skeletal muscle. *J Biol Chem*, v.278, n.15, p.12601-12604, 2003.

SANTOS, A. L. F. *Efeitos dos hormônios esteróides na regeneração muscular e no fenótipo distrófico em camundongo modelo para distrofia muscular congênita*. 2012. 127f. Tese de doutorado. Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia, da Universidade de São Paulo – USP. São Paulo, 2012.

SCHNEIDER, L. *Expressão gênica e protéica de p53 e p21 em fibroadenoma e tecido mamário normal adjacente*. *Dissertação de mestrado*. 2007. 63f. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS. Porto Alegre. 2007.

SCHUELKE, M.; WAGNER, K. R.; STOLZ, L. E.; HUBNER, C.; RIEBEL, T.; KOMEN, W.; BRAUN, T.; TOBIN, J. F.; LEE, S. J. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *The New England Journal of Medicine*, v. 350, n. 26, p. 2682-8, 2004.

SEALE, P.; SABOURIN, L.A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDNICKI, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*, Cambridge, v. 102, p. 777–786, 2000.

SHELTON, G. D. AND ENGVALL, E. Gross muscle hypertrophy in whippet dogs is caused by a mutation in the myostatin gene. *Neuromuscular Disorders*, v. 17, n. 9-10, p. 721-2, 2007.

SHERR, C. J., ROBERTS, J. M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* v. 13, p. 1501-1512. 1999.

SOMASUNDARAM, K.; ZHANG, H.; ZENG, Y. X.; HOUVRAS, Y.; PENG, Y.; ZHANG, H.; WU, G. S.; LICHT, J. D.; WEBER, B. L.; EL-DEIRY, W. S. Arrest of the cell cycle by the tumour-suppressor BRCA1 requires the CDK-inhibitor p21WAF1/Cip1. *Nature*, v. 389, n. 6647, p. 187-90. 1997.

SOUZA, C. A. *Investigação de polimorfismos nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em Gallus gallus*. 2004. 127f. Dissertação (mestrado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo. Piracicaba, 2004.

SOUZA, F. C. *Geração e caracterização de linhagens isogênicas portadoras de mutantes de p53: Modelo para avaliar a estratégia de reparação dos genes p53 e p16^{INK4A} na presença dos mutantes p53R175H e p53R248Q*. Dissertação de Mestrado. 2011. 105f. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Tecidual do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2011.

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*, v. 22, n. 20, p. 7066-7082, 2002.

STEINMAN, R. A., HOFFMAN, B., IRO, A., GUILLOUF, C., LIEBERMANN, D. A., EL-HOUSEINI, M. E. Induction of p21 (WAF-1/CIP1) during differentiation. *Oncogene* v. 9, n. 11, p. 3389-96. 1994.

STERN, C. D. The chick; a great model system becomes even greater. *Developmental Cell*, Cambridge, v. 8, p. 9-17, 2005.

STOCKDALE, F.E. Myogenic cell lineages. *Developmental Biology*, New York, v.154, n. 2, p. 284-298, 1992.

SUMMERBELL, D.; RIGBY, P. W. Transcriptional regulation during somitogenesis. *Curr Top Dev Biol*, v.48, p.301-318, 2000.

TAJBAKSH, S.; BOBER, E.; BABINET, C.; POURNIN, S.; ARNOLD, H. H.; BUCKINGHAM, M. Gene targeting the myf-5 locus with lacZ 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, 1996a.

TAJBAKSH, S.; RONCANCOURT, D.; BUCKINGHAM, M. Muscle progenitor cells failing to respond to positional cues adopt non myogenic fates in Myf-5 null mice. *Nature*, 384: 266-270, 1996b.

TAJBAKSH, 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.

TALMADGE, R. J.; ROY, R.R.; EDGERTON, V. R. Muscle fiber types and function. *Curr Opin Rheumatol*, v.5, n.6, p.695- 705, 1993.

TEIXEIRA, C. S.; OLIVEIRA, D. A. A. Frequência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.59, n°.3, p.805-809, 2007.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M., KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, A Negative Regulator Of Muscle Growth, Functions By Inhibiting Myoblast Proliferation. *J Biol Chem*. v. 275, n. 51, p. 40235-43. 2000.

TOLEDO, D. C. *Fatores genéticos e moleculares relacionados ao melanoma*. Universidade Federal de Goiás - Escola de Veterinária e Zootecnia. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. 35f. Goiânia, 2012.

TOWBIN, H.; STAHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

VALASEK, P.; THEIS, S.; DELAURIER, A.; HINITS, Y.; LUKE, G. N.; OTTO, A. M.; MINCHIN, J.; HE, L.; CHRIST, B.; BROOKS, G.; SANG, H.; EVANS, D. J.; LOGAN, M.; HUANG, R.; PATEL, K. Cellular and molecular investigations into the development of the pectoral girdle. *Dev Biol*, 357, 108–116. 2011.

WANG, Y., SCHNEGELSBERG, P. N., DAUSMAN, J.; JAENISCH, R. Functional redundancy of the muscle-specific transcription factors Myf5 and myogenin. *Nature*, v. 379, n. 6568, p. 823. 1996.

WARRICK, H.M.; SPUDICH, J.A. Myosin structure and function in cell motility. *Annu Rev Cell Biol*, v.3, p.379- 421, 1987.

WEEDS, A.G.; LOWEY, S. Substructure of the myosin molecule. II. The light chains of myosin. *J Mol Biol*, v.61, n.3, p.701-725, 1971.

WEINTRAUB, H. The MyoD family and myogenesis: redundancy, networks, and thresholds. *Cell*, v. 75, n. 7, p. 1241-4, 1993.

WHITTEMORE, L. A.; SONG, K.; LI, X.; AGHAJANIAN, J.; DAVIES, M.; GIRGENRATH, S.; HILL, J. J.; JALENAK, M.; KELLEY, P.; KNIGHT, A.; MAYLOR, R.; O'HARA D.; PEARSON, A.; QUAZI, A.; RYERSON, S.; TAN, X. Y.; TOMKINSON, K. N.; VELDMAN, G. M.; WIDOM, A.; WRIGTH, J. F.; WUDYKA, S.; ZHAO, L.;

WOLFMAN, N. M. Inhibition of myostatin in adult mice increases skeletal muscle mass and strength. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 300, p. 965–71, 2003.

WILLIAMS, B. A.; ORDAHL, C. P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cell specification. *Development*;v, v. 120, n. 4, p. 785-96. 1994.

WRIGHT, W. E.; SASSOON, D. A.; LIN, V. K. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell*, v.56, p. 607-617, 1989.

WU, H. H., IVKOVIC, S., MURRAY, R. C., JARAMILLO, S., LYONS, K. M., JOHNSON, J. E.; CALOF, A. L. Autoregulation of neurogenesis by GDF11. *Neuron*, v. 37, n. 2, p.197–207. 2003.

XAVIER, S. R. *Prospecção de polimorfismos no gene da Miostatina em bovinos da raça Senepol*. 2014. 60f. Dissertação (mestrado em Ciência Animal). Programa de Pós-graduação em Ciência Animal - área de concentração em Produção Animal - pela Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, MS, 2014.

ZHANG, W.; BEHRINGER, R. R.; OLSON, E. N. Inactivation of the myogenic bHLH gene MRF4 results in up-regulation of myogenin and rib anomalies. *Genes & development*, New York, v. 9, n. 11, p.1388-1399, 1995.

ZHANG, P.; WONG, C.; LIU, D.; FINEGOLD, M.; HARPER, J. W.; ELLEDGE, S. J. p21(CIP1) and p57(KIP2) control muscle differentiation at the myogenin step. *Genes & Dev*. V. 13, p. 213– 224. 1999.

ZHU, J.; LI, Y.; SHEN, W.; QIAO, C.; AMBROSIO, F.; LAVASANI, M.; NOZAKI, M.; BRANCA, M. F.; HUARD, J. Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*, 282, 25 852–25 863. 2007.

ZIMMERS, T. A.; DAVIES, M. V.; KONIARIS, L. G.; HAYNES, P.; ESQUELA, A. F.; TOMKINSON, K. N.; MCPHERRON, A. C.; WOLFMAN, N. M.; LEE, S. J. Induction of cachexia in mice by systemically administered myostatin. *Science*, v. 296, n. 5572, p. 1486-8, 2002.

8. APÊNDICES

APÊNDICE A- Detalhes dos *primers* utilizados

LEGENDAS:

- Início e fim do mRNA (start= ATG e de parada= TGA; TAA; TAG): em vermelho
 - Éxons intercalados: Azul e cinza
 - *Primers* desenhados: em negrito e sublinhado
-

1- Chicken *Miostatina primers* [Gene ID: 373964; Fragmento amplificado – 106bp]

Direto: 5' - ACTGGACGAGATCTTGCTGTC - 3'

Reverso: 5'- AATCTCTGCGGGACCGTTTC - 3'

>NM_001001461.1 Gallus gallus myostatin (MSTN), mRNA

ATG CAAAAGCTAGCAGTCTATGTTTATATTTACCTGTTTCATGCAGATCGCGGTTGATCCAGTGGCTCTGGATGGC
 AGTAGTCAGCCCACAGAGAACGCTGAAAAAGACGGACTGTGCAATGCTTGTACGTGGAGACAGAATACAAAATCC
 TCCAGAATAGAAGCCATAAAAAATCAAAATCCTCAGCAAACCTGCGCCTGGAACAAGCACCTAACATTAGCAGGGAC
 GTTATTAAGCAGCTTTTACCCAAAAGCTCCTCCACTGCAGGAACTGATTGATCAGTATGATGTCCAGAGGGACGAC
 AGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAGACGATTATCACAATGCCTACGGAGTCT
 GATTTTCTTGTACAAAATGGAGGGAAAAACCAAAATGTTGCTTCTTTAAGTTTAGCTCTAAAATACAATATAACAAA
 GTAGTAAAGGCACAATTATGGATATACTTGAGGCAAGTCCAAAAACCTACAACGGTGTTTGTGCAGATCCTGAGA
 CTCATTAAGCCCATGAAAGACGGTACAAGATATACTGGAATTCGATCTTTGAAACTTGACATGAACCCAGGCCACT
 GGTATCTGGCAGAGTATTGATGTGAAGACAGTGTGCAAAAATTTGGCTCAAACAGCCTGAATCCAATTTAGGCATC
 GAAATAAAAGCTTTTGGATGAGACTGGACGAGATCTTGCTGTCACATTTCCAGGACCGGGTGAAGATGGATTGAAC
 CCATTTTGTAGAGGTACAGATTACAGACACACC GAAACGGTCCCGCAGAGATT TTGGCCTTGACTGTGATGAGCAC
 TCAACGGAATCCCGATGTTGTCGCTACCCGCTGACAGTGGATTTTCAAGCTTTTGGATGGGACTGGATTATAGCA
 CCTAAAAGATACAAAGCCAATTACTGCTCCGGAGAATGTGAATTTGTGTTTCTACAGAAATACCCGCACACTCAC
 CTGGTACACCAAGCAAATCCAGAGGCTCAGCAGGCCCTTGCTGCACACCACCAAGATGTCCCTATAAACATG
 CTGTATTTCAATGAAAAGAACAATAATATATGAAAGATACCAGCCATGGTTGTAGATCGTTGCGGGTGTCTCA
 TGA

2- Chicken *p21 primers* [Gene ID: 378914; Fragmento amplificado – 164 pb]

Direto: 5'- CCATCAAAGACTTCTACGGCTC -3'

Reverso: 5'- ACTCGGCATTGCTTTCGTACA -3'

>NM_204396.1 Gallus gallus cyclin dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A), mRNA

GCACGAGGCGGGCCGCAATG CCGCTGTCGCAGAGCAGGGCCGGCCCGATGCCGTGCAGCAGCAAAGCGTGCAGGA
 ACCTCTTCGGCCCCGTAGACCAGCAGATCCAGAACGACTTTGAGCAGCTGTTGAGGCAGCAGCTGGAAGAAG
 CTCAGCGGCGCTGGAACCTTCAACTTCGAGACCGAGACGCCCTGGAAGGGCACTTCAAGTGGGAGAGGGTCCCTGC
 TGGCCGAGCAGCCCCCTGGGAGGCCTTCAGCCTGGCCAAGGCCACCAGCGGCGGTGACAACGGGAGCTCAGCGC
 CCCACCGGGTCCCCCAGGGATGGTGTGCGGTGGGGCTCATCGTGGGGCAGCCAGCAGAGCTCAGAGCTCGCCG
 GGGTTCGGTTCTCCCGAGCCTTGAACCGGGGACAGCA CCATCAAAGACTTCTACGGCTC CAAGAGAAGAGTTG
 TCCACGATAAGCCCAAGCTGTGACTGCTGCTGAGGATGGGTGCTGATGCTGACGTGCCCTGTGGGCGCCGTG
 GCTCTTCCCTGCCCTGACTGTCTAAGCTGTCT TGTACGAAGCAATGCCGAGT CTGTAGTTCCTATTTATGAGT
 AGCTCTGGGGTCTGAGGGGCCACACTGTGCAATGTATAGGAAGAGCCACGCTGAAGACCACGGAAGGGACTG

AGGAGGACTGGAATGGGGCAGGTGGGGCTGAGGGTGTCCCTGCCCGTGTGCTGTGGCCAGCACCGTCCCTG
 CAGCATCTGGTGGCCGCTGTGGTCCGTCACCGTCTGCTGCCCTGCATGGAGCAGCTCCAGAACCCTCAGAGCC
 TACTGGTGTGGATCACAGCTGGGTGTGAGCCCTGCGTGGAGCTGCTCCAGTGACTCAGCGATGCATTTGTCAC
 AGAGCGGTGACAAATGTGCTGAAGGTGCCCGTGGGGCCAGCACTGCTCGGGAGGTTTTGGGCTTGTCCGGGCT
 TCTGTTGACCCATGGCTGGCTGTGTTCTGGTGTGGCGTTGGCTCGCTGTGCCTCATTCAATGCTGACACTAAGC
 TGGATGAAGAGCTGCTGCTGCTTGGCACTGCCAGGCTGCTCCAGGGGCGGAGCGCTGCTCAGCAGCAGCTGGAAG
 AAGTGACAGCCCTCTCCTGGACTGTTTCTGCTTTGGGGCTGGGGGAGAGGACCCTGGCCTGGCTCTGCAGAGCA
 GCTGCTGTTGCTCTGTGACCCAGGGGTGCTCTGTAGGATGCAGCCCTGCTCTCGAGGCTCTCCACGCTGTTGGG
 TCTCAGCACTTCACTGGGTCCCCTCTGCCCTCTGTGCTGGGACTCGAAGCGGCACAGGGTGGTCCCAGGCA
 GAGGAGGTGGGCGCTGCTCCAGCTCATCCGTGATGCACTTTGTGTTGGAGATGCTGGCAAGTGCCAGCACT
 ACGTGTATTATGAGAATGCTATTTGGGGCTTCTTGAAGGGGAAATAACCTGTTTGTCTGTGTG **TAA**CTGA
 AATAAACTCGTTTCATGAAA

3- Chicken *Pax3* primers [Gene ID: 374127; Fragmento amplificado – 139bp]

Direto: 5'- TCGGGAAGAACTCGCACAAA -3'

Reverso: 5'- AAACCCTCCTGGGATCAGGT -3'

>NM 204269.1 Gallus gallus paired box 3 (PAX3), mRNA

ATGGCCTGCCGNGCCGGCGGGGAGCGGCTCACAGCCCGCACTCCCCCGAAGTGAGCTCCATCAGCCGCAT
 CCTGCGGAGCAAGTTTCGGGAAAGCGAGGAGGAGGAGGCCGAGCTGGAGAGGAAGGAGGCGGAGGAAGGAGACAA
 GAAGGCGAAGCACAGCATCGACGGCATCCTCAGCGAGAGAGCATCAGCAGCCCAGTCTGATGAAGGCTCTGATAT
 CGATTCTGAACCAGACTTACCCTTAAAAAGAAAGCAGCGTCCGAGCAGGACAACCTTCACAGCAGAGCAACTGGA
 AGAGCTGGAAGAGCTTTTGGAGAGGACACACTACCCTGACATTTATAC **TCGGGAAGAACTCGCACAAA**GAGCCAA
 ACTCACGGAAGCTCGAGTTCAGGTCTGGTTTAGCAACCGCCGTGCTAGATGGAGGAAGCAGGCAGGAGCCAACCA
 ACTGATGGCTTTCAACC **ACCTGATCCCAGGAGGGTTT**CCACCAGCGCCATGCCGACTCTGCCGACATACCAGCT
 CTCTGAGCCATCCTATCAGCCACCTCCATACC **GCAAG**CCGTGTCTGATCCAAGCAGTACAGTCCATAGACCTCA
 GCCTCTCCCTCCAAGCACTGTACACCAAAGCAGCTCCCTTCAAACCCAGAGAGCAGCTCTGCCTATTGCCTACC
 CAGCACCAGGCATGGATTTTCCAGCTATACAGACAGCTTTGTGCCCTCCGTCCGGGCCCTCAAATCCCATGAACCC
 TGCCATTGGCAATGGCCTTTACCTCAG **GTAATGGGACTCTTGACTA**ACCATGGTGGTGTGCCCTACCAGCCCCA
 AACTGATTATGCCCTGTCCCCTTTGACTGGAGGTCTGGAGCCCACCACCCTGTCTCAGCCAGCTGCAGTCAGCG
 GCTAGATCACATGAAGAGTTTACAGCCTGCCTACATCACAGTCTACTGCCACCAGCCTATAGCACCACCGG
 CTACAGCATGGACCCTGTACAGGCTACCAGTATGGACAGTATGGACAAA **GTGCCTTT**CATTATCTGAAGCCAGA
 TATCGCA **TAA**

4- Chicken *Myf-5* primers [Gene ID: 395633; Fragmento amplificado – 105bp]

Direto: 5'- TTCGAGGCGGGCTACTGC -3'

Reverso: 5'- AGAGAGGCGGTCCACGAT -3'

>NM 001030363.1 Gallus gallus myogenic factor 5 (MYF5), mRNA

ATGGAGGTGATGGACAGCTGCCAGTTCTCCCATCCGAGCTCTTCTATGACAGCTCCTGCCTGTCGTCCCCTGAG
 GGCGAGTTCCCTGAGGATTTTCGAGCCCAGGGAGCTGCCTCCCTTTGGAGCCCTGCGCCCACTGAGCCTGCCTGC
 CCTGAGGAAGAGGAACACGTCCGGGCCCCAGTGGGCACCACCAGGCCGCCACTGCCTCATGTGGGCTTGCAA
 GCCTGCAAGAGGAAATCCACCACCATGGACCGGCGGAAGGCAGCCACTATGAGGGAGAGGAGGCTGAAGAAA
 GTGAACCAAGCATTCGAGACCTTGAAGAGGTGCACCACGGCCAACCCCAACCAGAGACTCCCCAAAGTGGAGATC
 CTGAGGAACGCCATCAGGTACATCGAAAAGCCTCCAGGAGCTCTTGAGGGAACAGGTGGAGAATACTATCACCTG
 CCGGACAGAGCTGCTCCGAGCCCACCAGCCCAGCTCCAGCTGCTCCGATGTGATG **GCGGACTCGCGCAGCCCCG**
 GTCTGGCCGGCGAGAGGCAGCAGCT **TTCGAGGCGGGCTACTGC**CGCGAGATGCCCCACGGCTACGCGACGGAGCAG
 AGTGGCGCGCTGTCCAGCTGACTGCCTCTCCAGC **ATCGTGGACCGCCTCTCT**CCGGCGGAGGAGCCGGGGCTG
 CCCCTCCGTACGCCGGCTCCCTCTCGCCAGGCGCCAGCATCGACTCGGGGCCCGGGACGCCCGGCTCGCCGCC
 CCCCAGCGACCTACCAGGCGTA **TGA**

5- Chicken *MyoD* primers [Gene ID: 374048; Fragmento amplificado – 123 pb]

Direto: 5'- ATCACCAAATGACCCAAAGC - 3'

Reverso: 5'- GCTTCAGCTGGAGGCAGTAT - 3'

>NM_204214.2 Gallus gallus myogenic differentiation 1 (MYOD1), mRNA
 GTCGGCGGTGGTGGCAGCAGCAACCCGCGCCGGTGGCCTCGCCTGGGACAGGGTGGCAGGGGCCCGCTCCGTGCC
 CACCTCGCACAGCCACCTCTGGACCCCGTGCCTCCGACAGGATCTCACCCACTCCGACGTTCCAGTCGC
 CCCCATCGACTTACTGGGCCCCATGGAAATGACGGAGGGCTCCCTCTGCTCCTTACGGCCGCGATGACTTCTA
 TGACGACCCGTGCTTCAACACGTCGGACATGCACCTTCTTCGAGGACCTGGACCCCGGCTGGTGCACGTGGGCGG
 GCTGCTGAAAAGCCGAGGAGCACCACGACCCACGGGCACCACCACGGGAACCCACACGAGGAGGAGCAGTGC
 GCGCCAGTGGGCACCACCAGGCCGGCCGCTGCCCTGCTGTGGGCGTGCAAGGCCGTGCAAGAGGAAGACCACAA
 CGCTGACCGCCGCAAAGCCGCCACCATGAGGGAACGGCGGGCTCAGCAAGGTCAACGAGGCCTTTGAGACCT
 CAAGCGCTGACTTCCACCAACCCCAACGAGCCTGCCAAGGTGGAGATCCTGCGCAACGCCATCCGCTACAT
 CGAGAGCTGCAGCCCTGCTGCGTGAGCAGGAGGATGCATACTACCCAGTGCCTGGAGCCTACAGCGGGGAGTC
 AGATGCCTCCAGCCCTCGCTCCAACCTGCTCCGACGGCATGATGGAGTACAGCGGGCCGCCCTGTAGCTCTCGCAG
 GAGAAAACAGCTACGACAGCAGCTACTACACGGAAATCACCAAATGACCCAAAGCATGGGAAGAGTTCTGTTGTTT
 CAGCCTCGACTGCCCTCTCAAGCATTTGTGGAGAGGATTTCCACAGACAACCTCCACATGTCCCATACTGCCTCCAGC
 TGAAGCTGTAGCTGAAAGGAGTCCCTGTTCACCCAGGAAAGGAGGAAACCTGAGTGACAGTGGAGCCAGATTCC
 TTCCCCACCAACTGCACCCCTCTTCACCCAGGAAAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAATCCAATCTACCAAGTGCT
 ATAAAGGCAGGTCCAGCCGACTGCACCCGAGAACAATTTGCTCCGTTCCAGCAAGCTCCAAGACCTGCCTTCTAA
 AAGAGGAAGGACTTCAAGACTTGTTCAGTTTTAAATATCATGCAAAATTCCTTCTATAACTTTCAAACCTGT
 ATTACTACAAAATACACCTAGTTATTTATTTGTTGCTAAACTAAAGTTATTTAATATGTCTAGAAAATAAAGCGT
 ATACGGGAAATGGCAATGTTAATTTGGGCTTTGGAGAATAGGGAACCTGGCTCTTGAATACGGAGGAGAAAA
 GAAATCTACAACAGCAGTGGTGTGACAGATCCTTCTCCTTATTACCCCTGTTCTGCCAAAATAAGGTTGTGGACC
 ATTTTTTATAAACTTTTGTATAATTTATAATAAGAGTTGCTTTGCAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA
 AGAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAA

6- Chicken *Miogenina* primers [Gene ID: 374004; Fragmento amplificado – 114 pb]

Direto: 5'- ATCCTGCAGCCCTGAGTG-3'

Reverso: 5'- ACGATGGAGGAGAGCGAGT -3'

>NM_204184.1 Gallus gallus myogenin (MYOG), mRNA
 GAGCCGTGCACAGTCCCTCCCATCGAGCTCTTTGAGACCAACCCTTACTTTTTCCCGGAGCAGAGGTTTTACGATG
 GGGAAAACCTTCTGGGCTCCCGCTTGCAGGGCTACGAGGCGGCCGCGTTTTCTGAGCGTCCCGAGGTGACCCTGT
 GCCCTGAAAGCAGAGGGGCTTTGGAGGAGAAGGACTCGACGCTGCCCGAGCACTGCCCGGGCAATGCTTGCCAT
 GGGCTTGCAAAATCTGCAAGCGCAAAACCGTGTCCATCGACCGGCTCGGGCGGCCACGCTGCGGGAGAAGCGGA
 GGCTGAAGAAGGTGAACGAAGCCTTCGAGGCTCTGAAACGCAGCACCTGCTCAACCCCAACCAGCGGCTGCCCA
 AGGTGGAGATCCTGCGCAGCGCCATCCAGTACATCGAGCGCCTGCAGAGCCTGCTCAGCAGCCTCAACCAGCAGG
 AGCGTGAGCAGAGGAGCTGCGTACCGCCCGCTGCACCACAACCTGCTGCACCCAGCGAGTGGCGCTCTGGCA
 GCTCATCCTGCAGCCCTGAGTGGAGCACCCAGCTGGAGTTTGGCACCAACCCCGCAGATCACCTCCTGAGCGATG
 ACCAGGCAGAGGACCGCAACCTCCACTCGCTCTCCCTCCATCGTGGAGAGCATCGCCGTGGAGGACGTGGCCGTGA
 CGTTCCAGAGGAGCGGGTCCAAAACCTGAGCTGGCGCAAAGCCCGCGGCTCTCTGAGCTGGAAACGGGGTGGGA
 TGGTGTGCTGGAAGGATCCAGCAGCTGGAAATCATAATTACCCCTCCGACACTGTGGACTGCAGCGCTGAACCC
 GCCAAATCCTTTCCCACTCCTCTCCAAACGTTCCACCGGTGGAAAAAAGAAAAGGGGAGAAGTGTGATGGCGG
 TGGCTGGCGGTGGCCCTGGGTCCCCAGGCCGGGGGCTTTCCCTTCTTGGGGGCCAACACGTGTGCCACAGCCAA
 TGTGGCTGTTTCAAGTTGCTCTTCGACCAAGGTCTCTCTCCGGCGGGCTGCCTTCGCCGGCTTTCTACTGACC
 CTTGTGTGAGTTGCCATTTGTTT

7- Chicken *MyHC* primers [Gene ID: 417306; Fragmento amplificado – 213bp]

Direto: 5'- CTCCTCACGCTTTGGTAA -3'

Reverso: 5'- TGATAGTCGTATGGGTTGGT -3'

>NM_001319304.1 Gallus gallus myosin, heavy chain 1D, skeletal muscle (MYH1D), mRNA

ATCGCTACAGATGCTGATATGGCCATATTTGGGGAGGCAGCCCCTTACCTCCGAAAGTCAGAAAAGGAGAGGATT
 GAGGCCCAAGAACGCTTTTGGATGCCAAGTCATCAGTCTTTGTGGTACATGCTAAAGAATCCTATGTGAAAAGT
 ACAATCCAGAGTAAAGAATCGGGGAAGGTCACCTGTCAAGACTGAAGGTGGTAACTCTAACCGTGAAGGAAGAT
 CAAATCTTCTCCATGAACCCCTCCAAGTACGATAAAAATTGAGGACATGGCCATGATGACCCACCTCCACGAACCC
 GCTGTGCTGTACAACCTCAAAGAGCGTTATGCAGCCTGGATGATCTACACCTACTCGGGCCTCTTCTGTGTCACT
 GTCAACCCCTACAAGTGGCTGCCAGTGTACAACCCGGAGGTGGTGTGGCCCTACCGAGGCCAAAAGCGCCAGGAG
 GCCCTCCACACATCTTCTCCATCTCTGACAACGCCATCAGTTCATGCTGACTGACCGCGAGAATCAGTTCGATC
 CTGATCACCGGAGAATCCGGTGCAGGGAAGACTGTGAACACGAAACGTGTATCCAGTACTTTGCACAATTGCAG
 CTAGTGGAGATAAGAAGAAGGAGGAGCAGCCAGCGGCAAAATGCAGGGACACTTGAGGATCAAATCATCAGTG
 CCAACCCCTCTGTTGGAGGCTTTTGGGAATGCCAAGACTGTGAGGAATGACAACTCCTCACGCTTTGGTAAATCA
 TCAGAATCCACTTTGGGGCCACAGGCAACTGGCTTCTGTGACATTGAAACATATCTGCTGGAGAAGTCTAGGG
 TCACTTTCCAGCTCAAGGCTGAAAGAAGCTACCACATCTTTTATCAGATCATGTCCAACAAGAAGCCAGAGCTAA
 TTGAGATGCTGCTGATCACCAACCCATACGACTATCAGTACGTGAGTCAAGGCGAGATCACAGTACCCAGCA
 TTAATGACCAGGAGGAGCTGATGGCCACCGACAGTGCCATTGACATCCTGGGCTTCACTCCTGATGAAAAAACAG
 CCATTTACAAGCTGACGGGGCTGTGCATGCACATATGGCAACCTGAAGTCAAGCAGAAGCAGCGTGAAGAGCAGG
 CAGAGCCCAGTGGCACAGAAGTTGCAGACAAGGCTGCCACCTGATGGGTCTGAACCTCAGCAGACCTGCTCAAGG
 CCTTGTGTTACCCCGTGTCAAGGTTGGAAATGAGTATGTGACCAAGGTCAAACCGTGCAGCAGGTATAACAATT
 CAGTGGGTGCCCTAGCAAAAATCTGTCTTTGAGAAGATGTTCCCTGTGGATGGTGTTCGCATCAACCAACAGCTGG
 ATACCAAGCAGCCAGGCACTTTCATTGGTGTCTGGACATCGCTGGCTTTGAGATCTTTGATTTCAACAGCC
 TGGAGCAGCTGTGCATCAACTTCACCAATGAGAACTGCAACAGTTCCTTCAACCACCATGTTTCGTTCTGGAGC
 AAGAGGAGTACAAGAAGGAAGGCATTGAATGGGAGTTCATTGATTTTGGGATGGACCTGGCTGCCTGCATTGAGC
 TCATTGAAAAAGCCCATGGGCATCTTCTCCATCCTGGAAGAGGAGTGCATGTTCCCAAGGCAACTGACACCTCTT
 TCAAGAACAAGCTCTATGACCAGCATCTGGGCAAGTCCAACAACCTCCAGAAGCCTAAACCTGGCAAAGGCAAGG
 CTGAGGCCCACTTCTCCCTGGTGCACATATGCTGGCACAGTGGACTACAACATCACCAGGCTGGCTTGAGAAGAACA
 AGGATCCCCTGAATGAAACTGTTGTGGGGCTGTACCAGAAATCATCCCTGAAGACACTGGCCTTACTGTTTGCCT
 CTGTTGGTGGGGCAGAAGCAGAGAGTGGTGCCGGTGGCAAGAAGGGAGGCAAGAAGAAGGGGTCTTCTTCCAGA
 CTGTCTCAGCTCTTTTCCGGGAAAAATTTAAACAAACTGATGACCAACCTGCGAAGCACACATCCCCATTTTGTGC
 GATGCCCTCATTTCCCAATGAAACAAAAACACCTGTGCCATGGAGCATGAACTGGTGTGCACCAGTTGCGCTGTA
 ACGGCGTGTGGAAGGGATCAGGATTTGCGAGGAAAGGATTTCCCAAGCAGAATACCTTTATGCAGACTTTAAACAGA
 GATACAAGGTGCTTAATGCCAGTGCCATCCTGAGGGACAGTTCATTGACAGCAAGAAAGCTTCTGAGAAACTCC
 TTGGGTCAATCGATGTGGACCACACCCAGTACAAATTTGGTTCACACCAAGGTGTTCTTCAAAGCTGGGCTGCTGG
 GACTCCTGGAGGAGATGAGAGATGAGAAGCTGGCACAGCTCATCCTCGCACACAGGCCAGGTGCAGGGGCTTCC
 TGATGAGAGTGGAGTTCAAGAAAAATGATGGAAAGAAAGGAATCTATCTTCTGTATCCAGTACAATGTTTCGTGCAT
 TCATGAATGTCAAGCACTGGCCCTGGATGAAGCTGTTCTTCAAGATCAAGCCCCCTGCTGAAGAGTGCAGAATCTG
 AGAAGGAAATGGCCAACATGAAGGAAGAGTTTGAAGAAGCAAGGAAGAGCTTGCAAAGTCTGAGGCAAAGAGGA
 AGGAGCTGGAGGAGAAAATGGTGTCCCTGCTGCAAGAGAAAAATGATCTGCAACTCCAAGTGCAGGCTGAAGCAG
 ATGGTTTGGCTGATGCTGAGGAAAGGTGTGACCAGCTCATCAAAACCAAAATCCAGCTGGAAGCCAAAATTAAGG
 AGCTTACAGAGAGAGCAGAAGATGAGGAAGAGATGAATGCTGAGCTGACAGCCAAGAAGAGGAAACTGGAGGATG
 AATGTTACAGACTGAAGAAAAGACATAGATGACCTGGAGTTAACATTTGGCCAAGGTTGAGAAGGAAAAGCATGCCA
 CTGAAAAACAAGGTGAAAAACCTCACAGAAGAGATGGCAGCCCTGGACGAGACAATTGCCAAGCTGACAAAAGAGA
 AGAAAGCCCTCCAAGAGGCCCATCAGCAGACACTGGATGACCTGCAGGCTGAAGAGGACAAAGTCAATACGCTGA
 CCAAAGCTAAAACCAAGCTGGAGCAGCAAGTAGACGATGTAAGCAAAATGCATACACTGGAAGGGTCCCTGGAGC
 AAGAGAAGAAGCTGCGCATGGACCTTGAGAGAAGCCGATTTGAGGAACGGAGGAGGAAATCGAGGCAGAGCGAA
 CCTCTCGGGCAAAAAGCAGAGAAGCACCGAGCTGACCTCTCCAGGAGCTGGAGGAGATCAGTGAAGCTGGAGG
 AAGCAGGAGGGGTACAGCAGCTCAGATTTGATATGAACAAGAAGCGTGAGGCAAGAAATTCAGAAGATGCGCCGTG
 ACCTCGAAGAGGCCACGCTGCAGCACGAAGCCAGGCTGCTGCCCTGCGGAAGAAGCATGCGGACAGCACAGCGG
 AGCTTGGGGAGCAGATTGACAACCTGCAACGAGTCAAGCAGAAGCTGGAGAAGGAGAAGAGTGAAGATGG
 AGATTGATGACTTGGCCAGCAACATGGAGTCTGTCTCCAAAGCCAAGGCAAATTTAGAGAAGATGTGTGCTTCCC
 TGGAAGATCAACTCAGTGAATTAAGACAAAGGAAGAGGAGCAACAGCGCACCATTAATGACATCAGTGCACAGA
 AAGCTCGTCTACAAACAGAGTCAGGTGAATATTCACGCCAGGTGGAGGAGAAAGATGCTCTGATTTCTCAGCTGT
 CTAGAGGCAAGCAGGCATTCACCCAACAGATTTGAGGAACCTCAAGAGGCACCTTAGAGGAGGAGATAAAGGCCAAGA
 ATGCCCTGGCCATGCCTTGCAGTCAGCCGCCATGACTGTGACTTGTCTCCGGGAACAATATGAGGAAGAGCAGG
 AAGCCAAGGGTGAAGTGCAGCGTGCCTGTCCAAGGCCAACAGCGAAGTGGCCAGTGGAGAACCAAAATATGAGA
 CGGATGCTATTACAGCACAGAGGAGCTGGAGGAGGCCAAGAAGAAGCTGGCACAGCGCCTGCAGGATGCCGAGG
 AACACGTCGAAGCCGTGAACTCCAAATGTGCTTCCCTGGAAAAGACAAAGCAGAGGCTGCAGAATGAGGTGGAGG
 ACCTGATGATTGACGTGGAGCGATCAAATGCTGCCTGCGCAGCTCTGGACAAGAAGCAGAAGAATTTGACAAGA
 TCCTGTGCGGAGTGGAAAGCAGAAGTACGAGGAAACGCAGGCTGAGCTGGAGGCCCTCCAGAAGGAGTCTCGCTCCC
 TCAAGGAGATTTCTGACCTCACGGAGCAGATTTGCAGAGGGAGGAAAGGCTATTCATGAGCTGGAGAAAGTCAAGA
 AGCAGATTTGAGCAGGAGAAAATCTGAACCTCAGGCAGCTCTAGAGGAAGCTGAGGCCTCTTAGAACATGAAGAGG

GGAAGATCCTTCGTGTCCAGTTGGAACCTCAACCAGGTCAAGTCTGACATTGACAGGAAAATAGCAGAGAAAGATG
 AGGAAATTGACCAGCTGAAGAGAAACCATCTCAGAGTTGTAGATTCCATGCAGAGCACCTTGGATGCGGAGATCA
 GGAGCAGAAATGAAGCTCTGCGGCTGAAGAAGAAGATGGAGGGAGACCTGAATGAAATAGAGATCCAGCTGAGCC
 ATGCCAACCCAGGCTGCAGAAGCACAGAAGAACCTGAGAAACACACAAGGAGTGCCTCAAGGATACCCAGATAC
 ACTTGGACGATGCTCTCAGGTCACAGGAGGACCTGAAGGAGCAGGTGGCCATGGTGGAGCGCAGAGCAAACCTGT
 TGCAGGCTGAGATTGAGGAGCTACGAGCAGCCCTGGAACAGACAGAGCGCTCGAGGAAAAGTGGCTGAGCAGGAGC
 TTCTGGATGCAAGTGAACGTGTGCAGCTCCTCCATACCCAGAACACCAGCTTGATCAACACCAAGAAGAAGCTAG
 AATCAGACATTTCCCAAATTCAGAGTGAAATGGAGGATACCATCCAGGAAGCCCGCAATGCTGAGGAGAAGGCCA
 AGAAGGCCATCACTGATGCAGCCATGATGGCAGAAGAGCTGAAGAAGGAGCAGGACACCAGTGCACCCCTGGAGA
 GGATGAAGAAGAACCTGGACCAGACGGTGAAGGACCTGCAGCACCCGCTGGATGAGGCAGAGCAGCTGGCCCTGA
 AGGGAGGCAAGAAGCAAATCCAGAAGCTGGAGGCCAGGTGTCGGGAGCTGGAAGGGGAGGTGTGATGCTGAGCAGA
 AGCGCAGCGCTGAAGCCGTGAAGGGTGTGCGCAAGTACGAGAGGAGGGTGAAGGAGCTGACCTACCAGTCTGAAG
 AAGACCGAAGAATGTTCTCAGGCTCCAGGACCTGGTGGACAAGCTGCAGATGAAGGTGAAATCCTACAAGAGGC
 AAGCTGAGGAGGCTGAGGAGCTGTCCAATGTCAACCTCTCCAAGTTCGCAAGATCCAGCATGAGCTGGAGGAAG
 CCGAGGAGCGGGCTGACATTGCAGAGTCGCAAGTCAACAAGCTCCAGCAAAGAGCCGTGAAATAGGCAAGAAGG
 CAGAAAGTGAAGAGTAG

8- Chicken *Folistatina primers* [GENE ID: 395349; Fragmento amplificado – 148bp]

Direto: 5'- ACCAGTCGGATAGGGACGAG - 3'

Reverso: 5'- TCCAGGCGAGAATCGTCATC - 3'

>NM_204638.2 Gallus gallus follistatin like 1 (FSTL1), mRNA

AATTCGAGATCCGGGTACCATGGGGCGCCTGTGCAACTCCTCGTGCCTCGCCGGTTCCGCCAGCCCGCAGC
 TCTGAAAACTCTCCCGCTGCTCTGTGCCCTGCTGGCCGCTCGCCCGGCTGCGAGCGGAGGAAGAGCCAAGGAGCA
 AATCCAAAATCTGTGCCAACGTTTTCTGCGGAGCTGGGCGGGAATGTGCAGTGACTGAGAAGGGAGAGCCAACCT
 GCCTCTGCATTGAGCAATGCAAACCTCACAAGAGGCCTGTGTGTGGTAGCAATGGCAAGACGTACCTGAACCATT
 GTGAGCTGCACCGAGATGCCTGCCTCACTGGCTCCAAGATCCAAGTGGATTACGATGGCCACTGTAAAGAGAAGA
 AGTCTGAGAATCCAGCTGCGAGTCCAGTTGTCTGTTACCAGTCGGATAGGGACGAGCTTCGTCGCCGTGTCATCC
 AGTGGCTGGAAGCAGAGATTATCCAGACGGCTGGTTTTTCCAAGGGCAGCAACTACAGTGATGTCTGGACAAGT
 ACTTCAAGAACTTTGATGACGATTTCTCGCCTGGACTCCACTGAATTCCTGAAATTTGTGGAGCAGAACGAGACTG
 CTGTTCCAACCATCACAACCTACGTGGACCAGGAGACCAACAAGCTGCTCAGGGGACTCTGCGTAGATGCCCTCA
 TCGAGCTGTGAGATGAAAACGCTGACTGGAAGCTCAGCTTCAATGAATTTCTCAAGTGCCCTCAGCCCATCCTTCA
 ACCACCAGAGAAAAAGTGTGCCTTGGAAAGATGAAACCTATGAGGATGGAGCAGAGACCCAGGTGGAGTGAACC
 GCTGCGTCTGTGCTGTGGGAACTGGGTGTGCACTGCGATGACATGTGAAGGGAAGAATGAGAAGATGACTGCTC
 ACAGACAGCAACCTGGTCAAGACTTGACTGAGGAGGAGCTAGCTAGATATGTTTCAGGAGCTGCAGAAACATCAGG
 AGACGGCTGAGAAGACCAAGAAGATGAGCACCAAGGAGATGTAAGGGGCCCCACATCGGAGGAGCCCGGGAGGA
 TGGGCCCAACCTGCTGCCCTGTCTCCAGTGTGATCTCAGTATGCACAAGTGTCTGCTACAGTTGCCAGTCAC
 AGATATTTACATTTGATATAGCGATGGGTTATTTGTTTGTAAATACACAGAGAATGGGGCCAGAAAGGGGAGCAGA
 GCCCACCAGGTCAGGAGCTTCATTGCTGGGGCCTTGGAAAGCTGGGGGAAACTACAGCAGCCCTGGGACCCT
 TCCCCAGGGCGACAGTGGTTTCTCCCGGAGCTCATGGGGATTTCTTGTTCCTTAGATCTGGGGAAAGGATGGA
 GGTGAGTGTGGATAGAAGAGGGGGTCTTCAATTCACAGTTGTGACACCAGCACAGGCCCTGGCAGTTTTTTGGC
 CGAGTGTCTCAGGGCATCATTAGCCAAGGGCATGACCCCGCTTACCTCCACTTTGTTTCGAGCTCCTCAAAGCT
 GGTGAGCCTCATGTGACACCTGGAAGTCATGGTGCCGTGCTGCTGGCAGGAGTCCAGCACATTCCTCCTTGCTTT
 CTACCGGACTGTCCCAGCAGCTCCTCCAGTACATTTGTGGGCTACAACACAACACGGTTCCTTTTGACCACATCT
 CACTCTTACTCTCCTTGCCCCCTCTTAAAGGTGCTATCGTATTTTTTTCTTATCACATTCACATGCTGACCCCC
 CCTTTTGTGTTTGTGTTTTTTATTACTTTATTTCTTATGGTAGTAATTCAGCGTTTGTATGTTTTGTAGCTCT
 AGATCTTTCAAGAAAACCTCAGCCTATGGGTTTTTGTATCAACAGTGTGTAATACCCCGTGCACAATTTCTATC
 AACTGCACCTCAGTCAACACAAGCAAGCGACTTGTGAGCCCTATGCTACAGGGTATTTCTCACTTGGGGATTGCA
 GCATCCCTCATTGAACAAAAGAGGCAGGGCTGGATGTAATGAGTTCTGCTAGACACAGGTTGACATTCAGCGCTC
 TCTGGCTTTTGTCTCCCTGGCTAGCACTGACCATGTGCTCAGTCTTAAGTTGCCAGAGGGACCTGCTAGGTAGT
 CTAGAGACAGAGGGACGAGGCATCCCATTAATAGATTAACACATAAAAAACTGTTCAATGAAGTTGAGCTGT
 TAGCCATCATCTGGATTTTCCATCTCTGGTATAAGGCAGGAGCAGTCACTTTAATTCAGGTGTGTGTTTTCAGA
 GTCAGGGCTAGAACCCTTATGCTGACACAATTTTCAAGTGTCTGTGATCAGACCATTTTTTAATACCCCTTGGCG
 GTCATTTTCAAGTATCCCTGTTTCTCAGCGCATTTGGTCCCAGTTAAAAATGAAAAGCTGTTTTTGTGACCTTACC
 TCTTAGCTCAGTCCAGCTGATTTTCTCCTGAGTGTCTAGTGTACTTACATATACCTTACACCTAAGCATC
 CTCTGTCCACATTTCCCTTCATGTCCCTGCTGTCATCCCAAGCAGTTGCACATCCCTGAATCAAGAGGACTGCCT
 TTGAGTTCTATCTTCTGTTTCTGAACAACCTCAGCAATTTGTTGCCAGGTGTCTTGCAGTCTATAGTGTACTC
 AAGCGAAAACAGCCTGCATCAGCAGAAGCATGTTCTGCTTGGATCAGCAGGGCTTGGATCTCTGCCTTCCCTTGC

TGGCACAATGCTTTCTTGAAGAAGACTGAGCTAGTGCCTTGCAAGCGTAGGAAAGGAAGAGAGCTTGATCCCTC
 CTGTGGTCTTGCCTGAGAAGCATGATTATTTCAAAGTTGTCTGGTCTTTGAGCTGTGTCCCTGATGTGAATCCAGA
 GGTCTTCCGTTGACTGATGCAGTGCCACATCTGCTGAGGGAATCATAACTTACTGTGCCACGTTTGGATGTTTTA
 GCACAGTAAGTACAGAAGGGGGCTGGTTCTTGCAGGGTCTTCTCCCATGAAGATCCAGATCTGAGAAGCTAGG
 ACCTGTGATGTGAGTGAATGAGTCCATAGGAGCTGCAGATAATGCAGGAGTACACTGCGAGTTACTGTGTTCTGG
 TGGCCCTGAAGGAAGTGTGGTGGGACAGGAGTACTCATTAGACATCTCCTAGCTCTTCCCTAGAGAGGGGCA
 AAACAGCATCATGTGCTGGTCTGGAGTACAGGAACATAGTTAATAGATGTTTTGCTTTATTCTGCTCCAACCTC
 TGAAGGGTAGTTTCATGCCTCCCAGCTCACTTCCCTTGCAGCTTGGATCATTGAAGTGCCTTAGAAAAAACACAAC
 AGCTTGCCTTAAAGGCTTTCCTTGGATGGGAAGAACATCTTATTGTCCAGGCAGGAAGATCTCCAACCTGGGAGAA
 GCAAAGCATGATGCAGGAAGGAGACACTTATCCATGCAGGAGGGCTTCTGTAGGCTTCATTCTCCAGTCCCTTTC
 CTGCTTCTGCGGATGTTGCAGTCTGTGAGGATGGCTGCTGGGGTAGGCTGGGGAGTTCTATGCTAGCACCCAAG
 ATTCACAGAGCTTGCAGTGGACTGAGGCTGGGGTGGGCTGCTCCTTCCAGGCAAGGCAAGCTAAGCTCTCTAA
 CAAGCCGTTTAAACATCTTAGGACAGCATGGTGTAGGGGTGCAGTGAATGTGCCCTATGGAAAGAGCTGCTAC
 CAGTGTAGCTTTTCCCTCCTTGTACCCCTCAAAGGGAATATGTGACTGTGGAGAATGACGGTGGTTGGAAGGGCTT
 ACTTACCACACGAGACCTGCCTTGAATATCCTTGGAGATTCTCGTCTCGCCTCTCCGCACTGAGGGGAAGGGCAG
 CCTTTTGGCGAGCAGAGCCCGGACTGTGCCCCACAACAGGCAAGAGGGTCACTGTCATCTGCAGGGTACTTGGC
 TATTGAGGAAGGGAGTGTGAGTTCAGGTGTTGCCCTCTGGGACAATTGCTGTAGAGACTGCAAGTGGCAGGGA
 AGGCATTATTTTAAAAAGACAAATGTAAGCAACAAACAAAGAAGTCCCACTCCTCCCTCTGTATTCCTCCTGTA
 CGTGTGTGAAATTTATCAGTATCTGTAGGTTTCTTAGTGCACCTATTTTACTTGATTTTGTAAATATTTTGAAG
 CGGGGGCGGGAGGGGGGGTGGATATTACTGCCAAATAAAATAAAATTTACAAAATAA

9- Chicken *GAPDH* primers [Gene ID: 374193; Fragmento amplificado – 141bp]

Direto: 5'- TGGAGAGATGGCAGAGGTG -3'

Reverso: 5'- AACAGAGACATTGGGGGTTG -3'

>M11213.1 Chicken glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene, complete cds

ATGTGAAAGTCGGAGTCAACCGAATTTGGCCGTATTGGCCGCTGGTCACCAGGGCTGCCGTCCTCTCTGGCAA
 GTCCAAGTGGTGGCCATCAATGATCCCTTCATCGATCTGAACTACATGGTTTACATGTTCAAATATGATTCTACA
 CACGGACACTTCAAGGGCACTGTCAAGGCTGAGAACGGGAAACTTGTGATCAATGGGCACGCCATCACTATCTTC
 CAGGA GCGTGACCCAGCAACATCAAATGGGCGGATGCAGGTGCTGAGTATGTTGTGGAGTCCACTGGTGTCTTC
 ACCACCATGGAGAAGGCTGGG GCTCATCTGAAGGGTGGTGTAAAGCGTGTATCATCTCAGCTCCCTCAGCTGAT
 GCCCCATGTTTGTGATGGGTGTCAACCATGAGAAATATGACAAGTCCCTGAAAATTGTCAGCAATGCATCGTGC
 ACCACCAACTGCCTGGCACCCCTTGGCCAAGGTCATCCATGACAACCTTGGCATTGTGGAGGGTCTTATGACCACT
 GTCCATGCCATCACAGCCACACAGAAGACGGTGGATGGCCCTCTGGGAAGCTGTGGAGAGATGGCAGAGGTGCT
 GCCCAGAACATCATCCAGCGTCCACTGGGGTGTGTAAGGCTGTGGGGAAAGTCATCCCTGAGCTGAATGGGAAG
 CTTACTGGAATGGCTTTCCGTGTGC CAACCCCAATGTCTCTGTTGTTGACCTGACCTGCCGTCTGGAGAAACCA
 GCCAAGTATGATGATATCAAGAGGGTAGTGAAGGCTGCTGCTGATGGGCCCTGAAGGGCATCCTAGGATACACA
 GAGGACCAGGTTGTCTCTGTGACTTCAATGGTGACAGCCATTCCTCCACCTTTGATGCGGGTGTGGCATTGCA
 CTGAATGACCATTCGTCAAGCTTGTTCCTG GTATGACAATGAGTTTGGATATAGCAACCGTGTGTGGACTTG
 ATGGTCCACATGGCATCCAAGGAGTGAGCCAGGCACACAGCCCCCTGCTGCCCTAGGGAAGCAGGACCCCTTGT
 GGAGCCCTGCTCTTACCACCGCTCAGTTCTGCATCCTGCAGTGAGAGGCCAGTTCTGTTCCTTCTGTCTCCC
 CCACTCCTCAATTTCTTCTCAGCCTGGGGGAGGTGGGAGAGGCTGATAGAAATGATCTGTTTGTGTACCACC
 TTACATCAATAAAAAGTGTTCACCATCTGAAG

9. ANEXOS

ANEXO A – Certificado CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Nocaute do gene da Miostatina em mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) utilizando a técnica de edição genômica CRISPR-Cas9**, registrada com o nº **4506-1/2017**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares e Raquel Albuquerque Rangel**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem) para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, do **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**, e com as normas editadas pelo **Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA)**, tendo sido aprovada pela **Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP**, em **16 de maio de 2017**.

Finalidade:	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	22/05/2017-30/06/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	22/05/2017-30/06/2018
Espécie / linhagem/ raça:	Ave/não definida (embriões)
No. de animais:	40
Peso / Idade:	11 dias / 02g
Sexo:	20 machos / 20 fêmeas
Origem:	CEMIB/UNICAMP

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao **IBAMA**, **SISBIO** ou **CIBio** e é **restrita** a protocolos desenvolvidos em biotérios e laboratórios da Universidade Estadual de Campinas.

Campinas, 16 de maio de 2017.

Profa. Dra. Liana Maria Cardoso Verinaud
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

IMPORTANTE: Pedimos atenção ao prazo para envio do relatório final de atividades referente a este protocolo: até 30 dias após o encerramento de sua vigência. O formulário encontra-se disponível na página da CEUA/UNICAMP, área do pesquisador responsável. A não apresentação de relatório no prazo estabelecido impedirá que novos protocolos sejam submetidos.

ANEXO B – Certificado CEUA atestando mudança de título do projeto inicial

CEUA/Unicamp

**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp****CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Nocaute do gene da Miostatina em mioblastos de galinha (Gallus gallus) utilizando a técnica de edição genômica CRISPR-Cas9** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4506-1/2017**, de responsabilidade do **Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares e Raquel Albuquerque Rangel**, teve o título alterado para **Caracterização da expressão da miostatina e de seus reguladores ao longo da mioqênese esquelética**.

Campinas, 28 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO C – Certificado CEUA atestando correção do título em última versão



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado **Nocaute do gene da Miostatina em mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) utilizando a técnica de edição genômica CRISPR-Cas9 / Caracterização da expressão da miostatina e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética** (protocolo CEUA/UNICAMP nº **4506-1/2017**, de responsabilidade do **Profa. Dra. Lucia Elvira Alvares e Raquel Albuquerque Rangel**, teve o título alterado para **Caracterização da expressão da miostatina e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética de galinha (*Gallus gallus*)**.

Este documento é válido apenas se apresentado junto com os certificados emitido originalmente pela CEUA/UNICAMP em 16/05/2017 e 28/08/2017.

Campinas, 25 de maio de 2018.


Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Coordenador
Fátima Alonso
Secretária Executiva

ANEXO D – Declaração: dissertação não infringe dispositivos da lei n.º 9.610/98**Declaração**

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congressos sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**Caracterização da expressão da *Miostatina* e de seus reguladores ao longo da miogênese esquelética de galinha (*Gallus gallus*)**”, não infringem os dispositivos da lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 01 de Agosto de 2018.



Autora: **Raquel Albuquerque Rangel**
RG n.º 55.030.617-1



Orientadora: **Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares**
RG n.º 17.371.210-1