



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Instituto de Biologia

Renata Erbert Contriciani

“Estudo da expressão do gene *Dact1* em cultura primária de
mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) ”

“*Dact1* gene expression in primary culture of chick myoblasts
(*Gallus gallus*)”

Campinas
(2018)

Renata Erbert Contriciani

“Estudo da expressão do gene *Dact1* em cultura primária de mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) ”

“*Dact1* gene expression in primary culture of chick myoblasts (*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.

Dissertation presented to the Institute of Biology of the State University of Campinas as part of the requirements to obtain the degree of Master in Celular e Structural Biology in the field of Tissue Biology

ESTE ARQUIVO DIGITAL CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA
PELA ALUNA RENATA ERBERT CONTRICIANI E
ORIENTADA PELA PROF^a DR^a LÚCIA ELVIRA
ALVARES.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lúcia Elvira Alvares

**Campinas
(2018)**

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

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

C768e Contriciani, Renata Erbert, 1976-
Estudo da expressão do gene Dact1 em cultura primária de mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) / Renata Erbert Contriciani. – Campinas, SP : [s.n.], 2018.

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

1. Genes Dapper. 2. Cultura primária de células. 3. Desenvolvimento muscular. 4. Diferenciação celular. 5. Diferenciação tecidual. 6. Células musculares. I. Alvares, Lúcia Elvira, 1968-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Dact1 gene expression in primary culture of chick myoblasts (*Gallus gallus*)

Palavras-chave em inglês:

Dapper genes
Primary cell culture
Muscle development
Cell differentiation
Tissue differentiation
Muscle cells

Área de concentração: Biologia Tecidual

Titulação: Mestra em Biologia Celular e Estrutural

Banca examinadora:

Lúcia Elvira Alvares [Orientador]
Luis Lehmann Coutinho
Sílvia Roberto Consonni

Data de defesa: 27-04-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Celular e Estrutural

Campinas, 27 de abril de 2018.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares (Orientadora)

Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho

Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

Aos meus Pais, Esposo e Filhos

AGRADECIMENTOS

*“ O maior inimigo do conhecimento
não é a ignorância, é a ilusão do conhecimento. ”*

Stephen Hawking

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

À CAPES pelo apoio financeiro.

Agradeço minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Lúcia Elvira Alvares, por me permitir entrar em seu grupo de pesquisa e acreditar no meu trabalho, além de ser uma excelente professora e ter me apresentado à Biologia do Desenvolvimento. Espero ainda realizar muitos trabalhos com o grupo.

Aos professores que compõem esta banca de mestrado, Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho, Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira, Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni e Prof^a. Dr^a. Elaine Cristina Mathias Zacarin. Agradeço muito pelo tempo que disponibilizaram para avaliação deste trabalho.

Aos professores que, de alguma forma, contribuíram para meu aperfeiçoamento, tanto no auxílio intelectual quanto na disponibilização de seus laboratórios para realização deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Mermelstein do Laboratório de Diferenciação Muscular (UFRJ), por compartilhar o protocolo de cultura primária de mioblastos de galinha empregado em seu laboratório.

À Prof^a. Dr^a. Clarice Weis Arns pelo espaço em seu laboratório de cultura celular para realização dos primeiros ensaios de cultura primária.

Ao Prof. Dr. Leonardo Reis Silveira, por me receber em seu laboratório e discutir o protocolo de cultura primária de mioblastos.

Aos Professores, Dr. Áureo Tatsumi Yamada, Dr. Paulo Pinto Joazeiro, Dr. Luís Antônio Violin Dias Pereira e Dr. Silvio Roberto Consonni pelo espaço no Laboratório de Citoquímica e Imunocitoquímica (LCI) do Departamento de Bioquímica e Biologia Tecidual (DBBT). Um agradecimento especial e com muito carinho ao Prof. Áureo que me auxiliou no início do mestrado com padronização da cultura primária de mioblastos no laboratório de Biologia do Desenvolvimento (LBD) e ao Prof. Paulo por toda contribuição e suporte com as análises de histologia e morfologia deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Vera Nisaka Solferini pelo espaço no Laboratório de Genética Animal e Evolução e a sua técnica Célia por toda disposição.

À Prof^a. Dr^a. Carla Beatriz Collares Buzatto pela contribuição no ensaio de imunofluorescência do *Dact1*.

Ao Prof. Dr. Henrique Marques Barbosa de Souza pelo espaço no Laboratório de Regulação Gênica Embrionária (LaRGE).

À Dr^a. Monique Mendonça por sua atenção e gentileza em dirimir minhas dúvidas.

Ao Prof. Dr. Sílvio Roberto Consonni pelo carinho, atenção e por contribuir para minha formação didática através da disciplina de Histologia ministrada.

Ao Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho, por permitir a realização dos ensaios de *Real-Time PCR* no Laboratório de Matriz Extracelular.

Ao Prof. Dr. Marcelo Bispo de Jesus pelo espaço em seu laboratório (*Nanocell Interactions Lab.*) para a realização de parte do trabalho, bem como na contribuição com os ensaios de imunofluorescência e utilização do *Cytation5*.

Ao Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira por permitir o uso do microscópio de fluorescência nas análises de imunofluorescência.

Ao INCT-INFABiC pela utilização do microscópio confocal.

À nossa técnica Thaís que cuida com muito carinho do nosso material de trabalho e da organização da sala de cultura.

À Líliam Panagio, secretária do programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, pela atenção e disponibilidade.

A todos os colegas que estiveram comigo neste período, trabalhando juntos, auxiliando durante a realização dos experimentos, trocando experiências ou dividindo bancada. Aline Mika, Angela, Caíque, Daniela, Denis, Diego, Leandro, Raquel, Ricardo, Thaísa, Valquíria.

Às minhas queridas amigas Aline Mello, Bianca Castelucci, Carolina Mantovani, Fernanda da Veiga, Marina Fontoura, Paula Delatti, Viviane Rosa: um imenso obrigado. Certamente, a ajuda deste grupo foi fundamental para a realização deste trabalho, desde a primeira até a última etapa de experimentos. Todas vocês me acompanharam, me ensinaram e tenho muita consideração por este afeto. Foram momentos de muito estudo e trabalho, mas regados a muitos cafés e ótimos bate-papos intelectuais. Desejo a vocês muito sucesso profissional e que sejam muito felizes. Eu espero um dia poder retribuir tudo que aprendi com vocês.

Agradeço a Deus pelos meus pais Regina e Ernst, que me ensinaram o valor do estudo, do trabalho e do homem de bem. Ao meu esposo Márcio, melhor amigo e companheiro desta vida e a nossos filhos Vitor e Giovanni, que criamos juntos e que hoje já estão trilhando seus caminhos.

RESUMO

A miogênese esquelética é o processo de formação da musculatura esquelética, que ocorre durante o desenvolvimento embrionário de cada indivíduo, assim como no crescimento e reparo do tecido muscular ao longo do período pós-natal. A cultura primária de mioblastos de galinha é uma cultura celular simples e é considerada um dos melhores modelos para estudo da miogênese *in vitro*. Isto porque os mioblastos coletados do embrião conseguem recapitular em poucos dias as fases básicas da miogênese *in vivo*, desde a proliferação à diferenciação terminal e contração das fibras musculares. Pelo conjunto de vantagens expostas, este sistema foi escolhido para realização dos ensaios deste estudo, os quais ocorreram ao longo dos cinco dias necessários para que as células da linhagem miogênica passem do estado proliferativo à diferenciação terminal para formar fibras musculares contráteis. O objetivo principal desta pesquisa foi investigar a expressão do gene *Dact1* e da proteína correspondente (DACT1) durante a miogênese *in vitro*, dado seu papel como modulador dos sinais das vias de sinalização WNT/ β -catenina e WNT/PCP, necessários na miogênese esquelética de vertebrados. Para validar a cultura primária de mioblastos como um modelo para estudo da miogênese de aves, foram realizadas análises morfológicas e detecção dos padrões de expressão proteica (Miogenina e Desmina) e gênica (*Dact1*, *Ciclina D1*, *MyoD* e *Miogenina*) ao longo dos cinco dias da miogênese *in vitro*. Os resultados confirmaram a expressão de *Dact1*, conforme hipotetizada inicialmente, assim como revelaram a coerência da expressão dos marcadores avaliados com as etapas correspondentes da miogênese ao longo dos diferentes dias de cultura. Na etapa seguinte, a expressão de DACT1/*Dact1* foi caracterizada por imunofluorescência e qRT-PCR nos cinco dias de miogênese em cultura. Estes ensaios revelaram que DACT1 é expressa no núcleo e citoplasma dos diferentes tipos celulares presentes na cultura primária (mioblastos, miotubos, miofibras jovens e maduras). Em conjunto com os ensaios de qRT-PCR, foi detectada indução da expressão de DACT1/*Dact1* nos dias mais avançados da miogênese, quando ocorre a diferenciação terminal e maturação das fibras musculares. Finalmente, a análise de expressão gênica (RT-PCR e hibridação *in situ*) e proteica (imunofluorescência) no tecido peitoral de embriões de galinha no dia 11 de

desenvolvimento confirmaram a expressão de *Dact1*/DACT1 *in vivo*. Em conjunto, os dados apresentados neste trabalho apontam para DACT1 como uma molécula envolvida nas diferentes etapas miogênese esquelética de aves, em particular as mais tardias, onde ocorre uma forte indução da sua atividade gênica e proteica. Estes resultados abrem a possibilidade de que *Dact1* participe tanto da miogênese de outros vertebrados quanto em humanos, incluindo esta molécula no repertório de proteínas que podem estar envolvidas em processos de patologias musculares, envelhecimento e reparo do tecido muscular. Várias possibilidades de atuação de DACT1 foram levantadas na discussão deste trabalho, contudo estudos funcionais serão necessários para comprovar as hipóteses levantadas.

ABSTRACT

Skeletal myogenesis is the process of skeletal muscle formation, which occurs in each individual during embryonic development as well as during growth and repair of the skeletal musculature along the postnatal period. The primary culture of chicken myoblasts is a simple system of cell culture and it is considered one of the best models to study myogenesis *in vitro*. This is because the myoblasts collected from the embryo recapitulate in a few days the different phases of the *in vivo* myogenesis, from proliferation to terminal differentiation and maturation of muscle fibers. For the set of advantages exposed, this system was chosen to carry out the assays of this study, which occurred during the five days needed for myoblasts to pass from the proliferative stage to the phase of terminal differentiation to generate contractile muscle fibers. The main goal of this research was to investigate the expression of the *Dact1* gene and its corresponding protein (DACT1) during *in vitro* myogenesis, given its role as a modulator of WNT/ β -catenin and WNT/PCP signaling pathways required for vertebrate skeletal myogenesis. In order to validate the primary culture of myoblasts as a model for the study of avian myogenesis, morphological analyses and detection of protein (Myogenin and Desmin) and gene (*Dact1*, *Cyclin D1*, *MyoD* and *Myogenin*) expression patterns were performed during the five days of *in vitro* myogenesis. The results confirmed the expression of *Dact1*, as initially hypothesized, as well as revealed the expression consistency of the evaluated markers during the myogenic process along the different days of cell culture. In the next step, DACT1/*Dact1* expression was analyzed by immunofluorescence and qRT-PCR during the five days of cell culture differentiation. These assays revealed that DACT1 is expressed in the nucleus and cytoplasm of the different cell types present in the primary culture (myoblasts, myotubes, young and mature myofibers). Together with the qRT-PCR assays, the induction of DACT1/*Dact1* expression was detected in the latter days of myogenesis, when terminal differentiation and maturation of muscle fibers occur. Finally, gene expression (RT-PCR and *in situ* hybridization) and protein (immunofluorescence) analysis in chick embryo breast tissue at day 11 of development confirmed DACT1/*Dact1* expression *in vivo*. Overall, the data presented in this work point to DACT1 as an important molecule for the different skeletal myogenic stages of birds, particularly the later ones, where a strong induction of *Dact1* gene and protein activity occurs.

These results open the possibility that *Dact1* may participate in the myogenesis of other vertebrates as well in humans, including this molecule in the repertoire of proteins that may be involved in processes of muscle pathologies, aging and muscle tissue repair. Several possible actions of DACT1 were raised in the discussion of this work, however functional studies will be necessary to prove the formulated hypotheses.

Sumário

Agradecimentos.....	6
Resumo.....	9
<i>Abstract</i>.....	11
1.Introdução.....	16
2.Revisão Bibliográfica.....	20
2.1. A Musculatura Esquelética.....	20
2.2. A Formação dos Músculos Esqueléticos.....	22
2.2.1. Origem Embrionária.....	22
2.2.2. Controle Molecular da Miogênese.....	27
2.3. Importância da Via de Sinalização WNT.....	31
2.4. Os Genes <i>Dact</i>	35
3. Objetivos.....	38
3.1. Objetivos Gerais.....	38
3.2. Objetivos Específicos.....	38
4. Material e Métodos.....	39
4.1. Padronização da Cultura Primária de Mioblastos de Galinha.....	39
4.1.1. Os Animais.....	39
4.1.2. Coleta, Estadiamento e Dissecção do Músculo Peitoral de Embrião de Galinha.....	39
4.1.3. Cultura Primária de Mioblastos de Galinha.....	40

4.1.4. Extração de Colágeno de Cauda de Rato.....	41
4.1.5. Extrato de Embrião de Galinha.....	41
4.2. Análises de Expressão Gênica Por RT-PCR.....	42
4.2.1. Extração de RNA Total.....	42
4.2.2. Síntese de cDNA.....	43
4.2.3. Desenho dos <i>Primers</i>	43
4.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	45
4.3. Ensaios de Hibridação <i>in situ</i> (HIS)	46
4.3.1. Transformação e Transfecção de Bactérias Competentes para Síntese de Sonda de RNA Antisenso.....	46
4.3.2. Extração de DNA Plasmidial.....	46
4.3.3. Tratamento com Proteinase K.....	48
4.3.4. Síntese de Sonda de RNA Antisenso para HIS.....	49
4.3.5. Processamento Histológico e Análise ao Microscópio de Luz.....	50
4.3.6. Hibridação <i>in situ</i> (HIS)	50
4.4. Análises da Proteína DACT1 em Tecido e Células.....	51
4.4.1. Imunofluorescência em Criocortes.....	51
4.4.2. Imunofluorescência em Células.....	53
4.5. Análises Quantitativas da Expressão Gênica.....	54
4.5.1. Extração de RNA Total das Células.....	54
4.5.2. PCR em Tempo Real (<i>Real Time</i>)	54

4.5.3. Análises Estatísticas.....	55
5. Resultados.....	56
5.1. Cultura Primária de Mioblastos de Galinha Como Modelo de Estudo da Miogênese Esquelética.....	56
5.2. Estudo da Expressão de <i>Dact1</i> durante a Miogênese Fetal <i>in vitro</i>	60
5.3. Análise da Proteína DACT1.....	61
5.4. Quantificação da Expressão de <i>Dact1</i> ao Longo da Miogênese Fetal.....	63
5.5. Estudo da Expressão de <i>Dact1</i> /DACT1 Durante a Miogênese Fetal de Galinha <i>in vivo</i>	66
6. Discussão.....	69
7. Conclusão.....	72
8. Referências Bibliográficas.....	73
9. Anexos.....	81

1. INTRODUÇÃO

O músculo esquelético forma a maior parte do corpo dos organismos vertebrados, conferindo movimento e força aos animais. De fato, é por meio da musculatura esquelética que o sistema nervoso consegue se expressar. Miogênese é o processo de formação dos músculos esqueléticos que acontece durante o desenvolvimento embrionário/fetal assim como após o nascimento, garantindo a manutenção da homeostase da musculatura de cada indivíduo. Ela é fundamental para o crescimento, manutenção e reparo das fibras musculares.

A miogênese requer que mioblastos mononucleados, após proliferação, se retirem do ciclo celular e se fundam para formar miotubos e em seguida fibras musculares, expressando proteínas contráteis. Para tanto, a fusão de mioblastos é fundamental durante o processo de diferenciação das células musculares durante o desenvolvimento embrionário, bem como no reparo muscular em adultos (Sieiro et al., 2017). Há várias etapas envolvidas no processo de diferenciação celular, como reconhecimento e migração celular, adesão e alinhamento de membranas, reorganização do citoesqueleto, sinalização e transdução. Muitos desses eventos celulares e moleculares são conservados em vertebrados (Abmayr and Pavlath, 2012).

Trabalhos de (Hirst and Marcelle, 2015; Sieiro et al., 2017) demonstram que o embrião de galinha, além de ser um modelo experimental de baixo custo, é um modelo rápido, robusto e confiável, que permite uma gama de ensaios funcionais que podem ser testados e quantificados. Este modelo permite ensaios de silenciamento gênico por siRNA, ou CRISPR-Cas-9, bem como a superexpressão de genes candidatos utilizando-se a técnica de eletroporação (Gros et al., 2009; Rios et al., 2011; Véron et al., 2015). Por tratar-se de um organismo amnioto, os processos do desenvolvimento que ocorrem nos embriões de galinha são muito semelhantes àqueles de outros vertebrados, incluindo o ser humano. Estudos utilizando este modelo poderão auxiliar a elucidar processos celulares e moleculares subjacentes ao desenvolvimento animal, além de ter aplicações importantes em pesquisas nas áreas de biotecnologia e agropecuária. No que concerne ao desenvolvimento do músculo

esquelético, a utilização de culturas primárias de mioblastos extraídos da musculatura fetal ou adulta de galinha, constitui um valioso modelo de estudo da miogênese de vertebrados. Isto porque a cultura primária de mioblastos não contém células tumorais, diferentemente das linhagens celulares imortalizadas e, portanto, representa de maneira mais próxima o comportamento de células musculares *in vivo* (Baquero-Perez et al., 2012). Em termos de aplicações, as culturas primárias de ave podem ser utilizadas para: 1) estudos de pesquisa básica, visando elucidar os processos celulares e moleculares que atuam durante a formação da musculatura esquelética; 2) estudos da função de genes específicos na miogênese, uma vez que os mioblastos de aves são facilmente transfectados; 3) *screening* de fármacos ou outras substâncias com potencial terapêutico para tratamento de patologias musculares; 4) elucidar processos fisiológicos do músculo esquelético; 5) aplicações biotecnológicas, como por exemplo, investigar a possibilidade de produção de carne *in vitro* (Baquero-Perez et al., 2012).

Os genes *Dact* constituem uma importante família gênica que codifica proteínas adaptadoras multifuncionais (Schubert et al., 2014a). Nos mamíferos, esta família é composta por três genes (*Dact1*, *Dact2* e *Dact3*) (Hunter et al., 2006), enquanto que no genoma de aves há apenas dois (*Dact1* e *Dact2*) (Alvares et al., 2009). *Dact1* foi o primeiro membro desta família a ser descoberto, graças a sua capacidade de interagir fisicamente com Dishevelled, uma proteína-chave das vias de sinalização molecular WNT/ β -catenina e WNT/PCP (do inglês, *planar cell polarity* – PCP), para modular a atividade destas vias. Mais tarde, descobriu-se que a proteína DACT3 também apresenta a habilidade de modular a via de sinalização WNT/ β -catenina (Cheyette et al., 2002), enquanto DACT2 tem um papel crucial na inibição da via de sinalização TGF- β , marcando os receptores ALK4/5 para degradação via lisossomos (Zhang et al., 2004). Dada a sua participação na modulação de vias de sinalização WNT e TGF- β , as DACTs apresentam uma miríade de funções no desenvolvimento embrionário, incluindo o controle de movimentos morfogenéticos, especificação do eixo corporal, desenvolvimento do sistema nervoso desde a neurulação e estabelecimento das cristas neurais, até a formação do sistema nervoso central, formação do olho e cérebro (Schubert et al., 2014a). O interesse em investigar um possível papel do gene *Dact1* na miogênese esquelética de aves surgiu a partir da identificação da expressão deste gene nos somitos, estruturas precursoras dos músculos esqueléticos de vertebrados,

em um domínio no qual residem células progenitoras da linhagem miogênica responsáveis por formar os mioblastos fetais e células-satélite (Alvares et al., 2009). Outro fator motivador desta pesquisa foi a importância da via de sinalização WNT/ β -catenina em várias etapas da miogênese esquelética de mamíferos. Por exemplo, sabe-se que o comprometimento de células dos somitos com o destino miogênico depende de sinais Wnt liberados pelo tubo neural dorsal e ectoderma (Otto et al., 2006). Em adição, o estabelecimento das junções neuromusculares durante a miogênese fetal e o reparo de danos musculares mediado por células-satélite é dependente de sinais WNT (Cisternas et al., 2014; Rudnicki and Williams, 2015). Portanto, dado o papel chave de *Dact1* no controle dos níveis de sinalização WNT em diversos contextos celulares, seria possível que o mesmo ocorresse no contexto da miogênese esquelética.

Neste trabalho utilizamos cultura primária de mioblastos de galinha (*Gallus gallus*) para caracterização do padrão de expressão temporal de *Dact1* durante as diferentes etapas da miogênese esquelética, utilizando marcadores moleculares para monitorar as etapas de proliferação, diferenciação inicial e tardia, bem como análises morfológicas. Os resultados revelaram uma expressão dinâmica de *Dact1*, que se inicia logo no primeiro dia de cultura e intensifica-se conforme avança o processo de diferenciação terminal e maturação das fibras musculares esqueléticas. Em conjunto, as análises realizadas apontam para *Dact1* como um novo efetor da miogênese esquelética de amniotos, trazendo informações inéditas sobre o papel deste gene para a formação dos músculos esqueléticos. Este estudo trouxe dados que irão viabilizar futuros projetos visando compreender se há alguma associação entre a atividade do gene *Dact1* e a capacidade de crescimento diferencial da musculatura esquelética entre diferentes organismos, bem como com o reparo tecidual, trazendo perspectivas de aplicação destes estudos em biotecnologia e na área da saúde humana e animal.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A MUSCULATURA ESQUELÉTICA

A musculatura esquelética compõe cerca de metade da massa corporal dos vertebrados, desempenhando uma gama de funções essenciais à vida. Os músculos esqueléticos em sua maioria, conectam-se aos ossos compondo o sistema músculo-esquelético, responsável pelos movimentos corporais e, portanto, pela locomoção. Músculos esqueléticos também participam da manutenção da postura corporal, mastigação, deglutição e respiração. Além disso, sabe-se que os músculos liberam substâncias denominadas miocinas, que desempenham papel importante no controle metabólico e exercem ação anti-inflamatória, contribuindo para a prevenção de doenças como obesidade e câncer (Ahima and Park, 2015; Luo et al., 2015).

O músculo esquelético é composto por inúmeros feixes de fibras musculares, uma cápsula de tecido conjuntivo que o envolve, vasos sanguíneos e linfáticos, além de nervos. O tecido conjuntivo do músculo esquelético é constituído por uma matriz extracelular rica em carboidratos e proteínas, sendo mais rígido em suas extremidades. Nestes pontos, os músculos se encontram com os tendões, responsáveis por unir as fibras musculares aos ossos. Esse tecido está organizado em três bainhas de tecido conjuntivo: epimísio, que circunda todo o músculo; perimísio, que divide o músculo em fascículos e endomísio, que circunda cada fibra muscular (Silversthor, 2010). As fibras musculares são formadas por miotubos, estes por sua vez possuem uma membrana celular denominada sarcolema e seu citoplasma denominado sarcoplasma (Carlson, 2014). As fibras musculares são compostas de miofibrilas que são feixes de proteínas contráteis e elásticas, organizadas longitudinalmente e responsáveis pela contração muscular. Essa organização das miofibrilas se deve à atuação de várias proteínas como por exemplo a Desmina, que liga uma miofibrila a outra, e a Distrofina, que é responsável por ligar os filamentos de actina ao sarcolema. (Carneiro, 2013). Além disso, essas proteínas fazem parte de um conjunto de proteínas que formam os costâmeros, que são locais especializados e importantes de mecanotransdução, localizados na região de união entre o

sarcolema e o sarcoplasma (Capetanaki et al., 1997). Cada miofibrila é envolvida por um extenso retículo sarcoplasmático, uma especialização do retículo endoplasmático, responsável por armazenar o Ca^{+2} necessário para a contração muscular. As proteínas que a compõem são contráteis (Actina e Miosina), regulatórias (Troponina e Tropomiosina) e acessórias (Titina e Nebulina). O sarcômero é a unidade básica funcional do músculo esquelético e é formado pelo arranjo em repetição dos filamentos de actina e miosina das miofibrilas (Silversthor, 2010). (Fig.1)

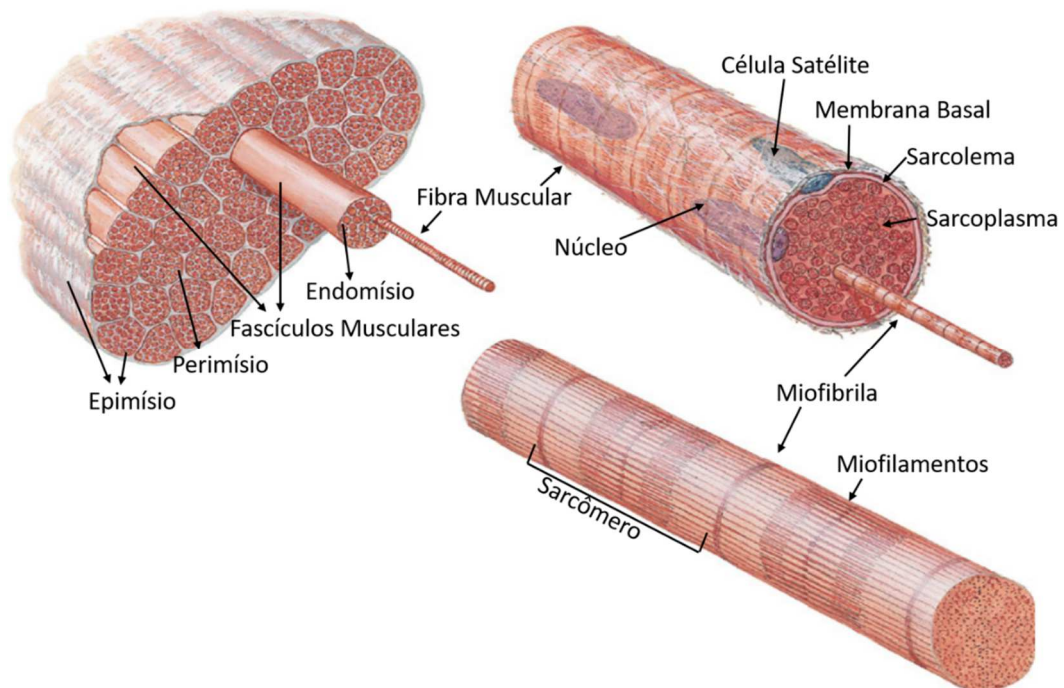


FIGURA 1: Representação do tecido muscular esquelético estriado, bainhas e arranjo das proteínas contráteis. Adaptado de (Iannotti and Parker, 2013).

Interessantemente, é por meio da contração das fibras musculares que o sistema nervoso é capaz de se expressar. Isto ocorre quando um impulso nervoso gerado em um motoneurônio estabelece sinapse com a fibra muscular por meio de uma região de contato, chamada junção neuromuscular. Este processo envolve vários elementos neurais e moleculares que controlam e planejam as etapas de contração muscular (Aires, 2008).

2.2. A FORMAÇÃO DOS MÚSCULOS ESQUELÉTICOS

2.2.1. Origem embrionária

Durante o desenvolvimento embrionário, a musculatura esquelética é gerada por um processo denominado miogênese, que consiste na formação das células musculares a partir de células progenitoras mononucleadas, os mioblastos. Estas células têm origem mesodérmica e derivam dos somitos. Os somitos são estruturas arredondadas originadas do mesoderma paraxial e se formam logo após a gastrulação, quando o mesoderma começa a se epitelizar e suas células a se organizar (Fig.2). Com exceção dos músculos da cabeça, toda musculatura esquelética dos vertebrados é derivada dos somitos (Christ and Ordahl, 1995). A formação e organização dos somitos se dá a partir do eixo ântero-posterior (AP), orquestrada pelos genes homeóticos. Os somitos estão dispostos bilateralmente e sequencialmente ao longo da notocorda e do tubo neural do embrião. Este arranjo é o início da organização metamérica do esqueleto axial e sistema nervoso dos vertebrados (Aulehla and Pourquié, 2006; Buckingham and Vincent, 2009; Chal et al., 2017; Christ and Ordahl, 1995).

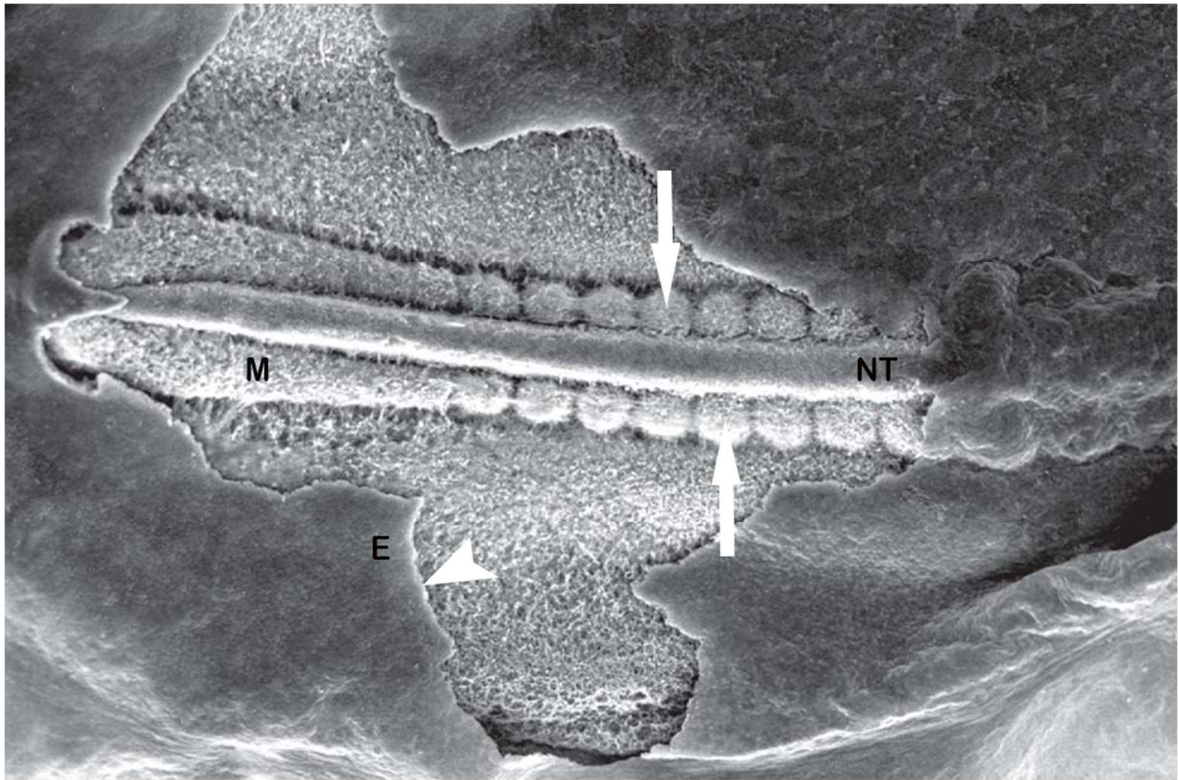


FIGURA 2: Somitogênese: Eletromicrografia de varredura de embrião de galinha, indicando a disposição dos somitos (setas) bilateralmente e paralelamente ao tubo neural (NT). A ectoderme (E) foi parcialmente removida (cabeça de seta). A imagem mostra a segmentação do mesoderma paraxial (M), a partir do eixo ântero-posterior do embrião. Adaptado de (Larsen, 2001)

As células dos somitos são multipotentes e passam por um processo de comprometimento, influenciado pelo fator de transcrição *paired box* PAX3. (Buckingham, 2007). Este fator é um regulador chave das células miogênicas, expresso em células do mesoderma pré-somítico.

Após sua formação, os somitos passam por um processo de amadurecimento formando dois compartimentos: 1) o esclerótomo, situado na porção médio-ventral, responsável por originar a coluna vertebral, costelas, arcos neurais, meninges e tendões 2) o dermomiótomo, localizado dorsalmente e responsável por produzir as células progenitoras da derme, musculatura esquelética e lisa, bem como as células angiogênicas. (Ben-Yair et al., 2003; Ben-Yair and Kalcheim, 2005, 2008; Christ et al., 2004; Christ et al., 2000; Kalcheim and Ben-Yair, 2005; Wilting et al., 1995; Wilting et al., 2001; Wilting et al., 2000; Yusuf and Brand-Saberi, 2006, 2012).

No dermomiótomo, onde residem as células progenitoras musculares, estão presentes ainda dois subdomínios, classificados de acordo com a localização anatômica - a porção dorso-medial, cujas células irão formar o miótomo epaxial, responsável pela formação dos músculos intercostais, enquanto as células da porção latero-ventral irão formar o miótomo hipaxial responsável pela formação dos músculos da parede latero-ventral do corpo, musculatura dos membros, língua e diafragma (Christ et al., 2004; Christ and Ordahl, 1995).

Após a formação dos domínios epaxial e hipaxial, os mioblastos localizados nestes domínios proliferam, sofrendo vários ciclos de divisão celular, até comporem uma população de células que irá migrar aos seus locais adequados para compor o miótomo primário, primeiro arcabouço de células musculares do corpo do embrião (Gros et al., 2004). Para tanto, os mioblastos maduros (miócitos) iniciam a fase de diferenciação, retirando-se do ciclo celular e ativando a expressão de genes estruturais músculo-específicos como α -actina, o receptor de acetilcolina, creatina quinase muscular (MCK), miosina de cadeia pesada (MyHC) e desmina. Nesta fase, moléculas reprimem a expressão de genes que codificam receptores de fatores do crescimento, ocasionando o desaparecimento permanente destes receptores na superfície celular, impossibilitando as células musculares de reentrarem no ciclo celular. Estas alterações promovem o reconhecimento específico entre as células que irão se fundir, por meio do revestimento de moléculas de matriz extracelular, em um processo mediado por Ca^{2+} e por moléculas de adesão como as caderinas. A expressão de moléculas de adesão permite que as células musculares fundam-se com outras células similares ou mioblastos nascentes, formando miotubos multinucleados e posteriormente fibras musculares maduras (Buckingham and Vincent, 2009; Lassar and Münsterberg, 1994; Lim and Hauschka, 1984; Sabourin and Rudnicki, 2000).

Após a miogênese embrionária ou primária, ocorre a miogênese fetal. Nela as etapas de proliferação, diferenciação e maturação das fibras musculares ocorre de maneira semelhante à descrita, exceto pelo fato de que os mioblastos fetais gerados no dermomiótomo irão passar por um número maior de divisões celulares, uma vez que é na miogênese fetal que se forma a maior parte dos músculos de um indivíduo.

No período pós-natal, alguns mioblastos permanecem quiescentes e indiferenciados, compondo a população de células-satélite, que possuem a função de reposição, reparo e crescimento celular em casos de lesão das fibras musculares. (Snow, 1990; Summers et al., 1985). As células-satélite possuem capacidade proliferativa, e darão novos núcleos às fibras, as quais serão incorporadas. Desta forma, há uma fonte extra de DNA para a produção de proteínas. Uma vez que estas células já são comprometidas com linhagem miogênica, o número de células-satélite pode ser determinante para estipular o tamanho que cada músculo pode crescer, dependendo da idade, tipo muscular, nutrição e esforço. Elas estão localizadas entre as fibras musculares e a lâmina basal e têm como característica morfológica um núcleo heterocromático, citoplasma esparso com poucas organelas e ausência de miofilamentos (Carlson, 2014).

Dependendo do momento em que se formam, os mioblastos são, portanto, classificados como mioblastos embrionários, presentes no embrião; mioblastos fetais, presentes na fase fetal e mioblastos adultos (células-satélite), que permanecem na musculatura após o nascimento para promover reparos. As células-satélite também têm um papel essencial em promover o crescimento da musculatura em neonatos. Na galinha, os mioblastos embrionários estão mais abundantes no dia 5 de desenvolvimento, já os mioblastos fetais, entre os dias 8-12 do desenvolvimento e os mioblastos adultos aparecem na fase final do desenvolvimento, persistindo até a fase pós natal (Cossu and Molinaro, 1987; Stockdale, 1992; Yablonka-Reuveni, 1995; Yablonka-Reuveni and Paterson, 2001).

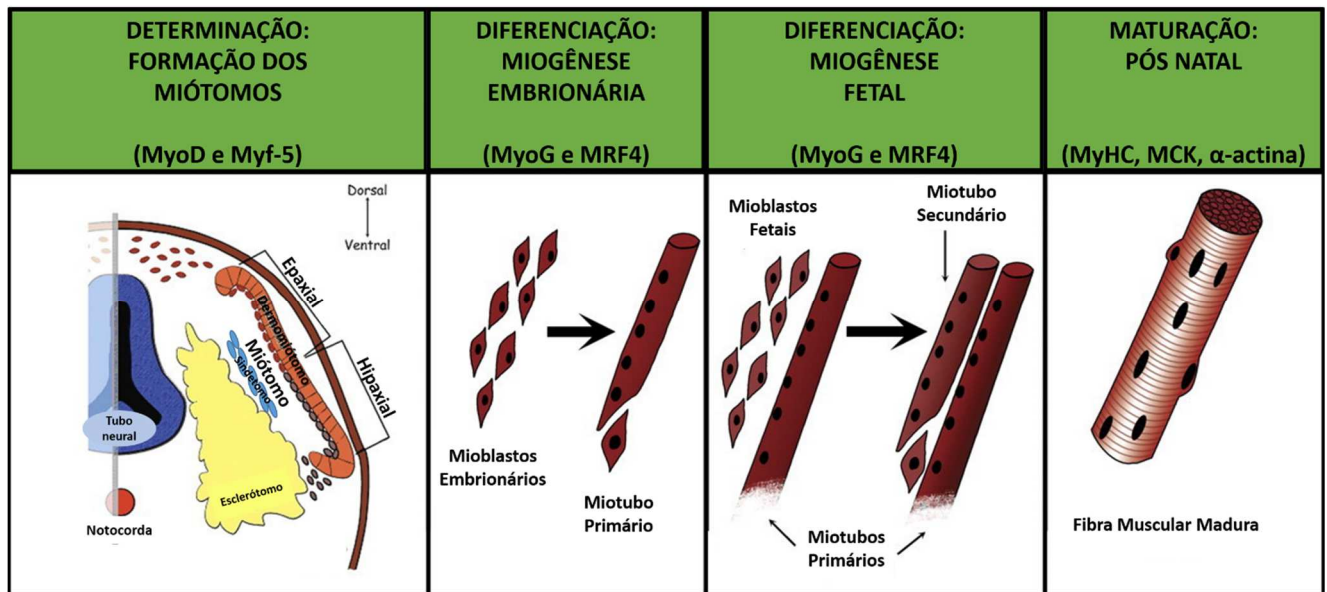


FIGURA 3: Desenvolvimento do músculo esquelético: Determinação, diferenciação embrionária e fetal; e maturação. A determinação termina com a formação dos miótomos a partir do dermomiótomo. Após a expressão MyoD e Myf5, os mioblastos são convertidos em células da linhagem do músculo esquelético. Primeiramente, os mioblastos entram no ciclo celular e proliferam sob influência de fatores de crescimento. Quando estes fatores são retirados, as células proliferativas saem do ciclo celular e iniciam o processo de diferenciação, o qual estão envolvidos os fatores de transcrição miogênicos, MyoG e MRF4. Nesta fase, os mioblastos mudam para uma forma alongada e são chamados de miócitos que se fundem com células vizinhas dando origem a miotubos multinucleados. Nesta fase, os miotubos começam a expressar proteínas específicas do músculo, MyHC (cadeia pesada de miosina), creatina quinase muscular (MCK) e α -actina. Os miotubos primários serão transformados em maduros e posteriormente em miofibras. Adaptado de (Jang and Baik, 2013).

2.2.2 Controle molecular da miogênese

Durante a somitogênese, compartimentalização dos somitos e formação das células precursoras miogênicas, ocorre a sinalização de diferentes fatores parácrinos nas adjacências dos somitos como os sinais positivos WNT, Shh (do inglês - *Sonic hedgehog*), TGF- β (do inglês - *Transforming Growth Factor β*) e Noggin, bem como sinais negativos tais como aqueles mediados por BMP4 (do inglês - *Bone morphogenetic protein*). Em conjunto, estes fatores controlam todas as diferentes etapas da formação dos músculos esqueléticos (Fig.4).

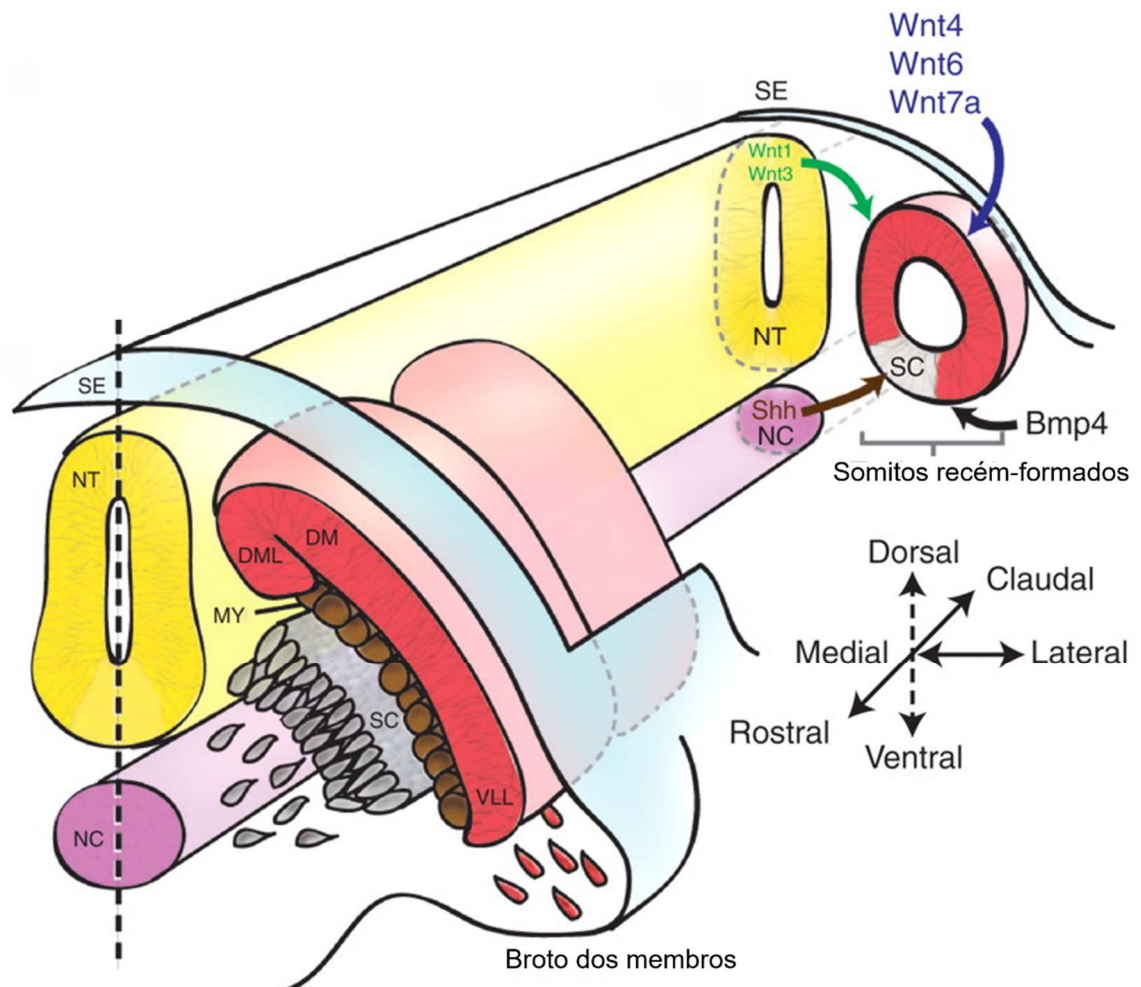


FIGURA 4: Compartimentalização dos somitos em esclerótomo (SC) e dermomiótomo (DM) durante a miogênese. Indução pelos morfógenos WNT, Sonic hedgehog (Shh) e Bone morphogenetic protein (BMP) secretados pelo tubo neural (NT), ectoderma (SE) e notocorda (NC). As células progenitoras musculares (MPCs) originam o miótomo (MY) a partir do lábio dorso medial (DML) e lábio ventro lateral (VLL) do dermomiótomo (DM). A figura também ilustra a delaminação das células do lábio ventro lateral (VLL) para formar os músculos dos membros. Adaptado de (Yann Fedon, 2012).

O contexto de atividade das moléculas sinalizadoras resulta na ativação ou inibição dos fatores de regulatórios miogênicos (MRFs), fatores de transcrição necessários para a ocorrência da miogênese (Münsterberg et al., 1995; Münsterberg and Lassar, 1995; Pourquié et al., 1996; Rudnicki et al., 1993). Há quatro fatores miogênicos: MyoD, Myf5, Miogenina e Myf6 (também conhecido como MRF4), com

funções individuais e/ou sobrepostas nas diferentes etapas da miogênese (Carlson, 2014) (Fig.3). Estes quatro MRFs são expressos nas fibras musculares esqueléticas e ativam diversos genes específicos que devem ser expressos durante a fusão dos mioblastos para formação das fibras musculares (Cossu et al., 1996; Miller et al., 1993; Pourquié et al., 1995). A expressão destes fatores miogênicos é capaz de converter células não miogênicas em miogênicas (Miller et al., 1993).

Os MRFs são estruturalmente semelhantes, pois possuem dois domínios funcionais homólogos: um domínio básico que possui uma sequência de aminoácidos carregados positivamente e um domínio bHLH (do inglês – *basic helix loop helix*) ou hélice-alça-hélice. O domínio bHLH liga o MFR a fatores de transcrição da família E, formando dímeros. Estes dímeros se ligam a uma sequência de DNA específica, conhecida como Ebox (CANNTG), presente na região promotora de vários genes músculo-específicos, regulando a expressão dos mesmos (Ludolph and Konieczny, 1995; Miller et al., 1993; Murre et al., 1989a; Murre et al., 1989b). Eles também possuem domínios não compartilhados, o que sugere que eles tenham outras funções específicas. Por exemplo, os fatores MyoD e Myf5, que além de participarem da miogênese, atuam na regulação do ciclo celular e remodelagem da cromatina (Buckingham, 2001).

MyoD e Myf5, começam a ser expressos na fase de proliferação dos mioblastos, enquanto Miogenina e Myf-6 (ou MRF4), responsáveis pela regulação da fusão e diferenciação dos miócitos (mioblastos maduros) em miotubos, até a formação das fibras musculares (Brand-Saberri and Christ, 1999; Yablonka-Reuveni and Paterson, 2001). Depois de ativo, MyoD continua sendo expresso durante todo o desenvolvimento da célula muscular, possivelmente devido ao fato deste fator poder ativar sua própria transcrição (Song et al., 1998). A Miogenina é induzida durante o início da fase de diferenciação e Myf-6 (ou MRF4) é expresso na fase final da diferenciação, predominando nas fases pós-natal e adulta (Brand-Saberri and Christ, 1999; Lassar and Münsterberg, 1994; Moncaut et al., 2013; Yablonka-Reuveni and Paterson, 2001).(Fig. 3)

In vitro, a proliferação dos mioblastos também depende dos MRFs, bem como da concentração de fatores de crescimento, componentes da matriz extracelular, interações célula-célula e características particulares dos mioblastos que regulam a

resposta a mitógenos, como por exemplo, os receptores de fatores de crescimento na superfície celular e as vias de sinalização (Fishman, 1994; Sastry and Horwitz, 1996). Portanto, na miogênese as células podem proliferar, dependendo dos fatores externos, tais como seu micro-ambiente e fatores de crescimento (Sastry and Horwitz, 1996).

In vivo, as células-satélite quiescentes expressam marcadores de superfície, como por exemplo a M-caderina, molécula de adesão celular dependente de cálcio, importante na manutenção da forma e estrutura celular. Além disso, expressam os fatores de transcrição Pax7 e Myf-5 (Montarras et al., 2005). Frente a estímulos mediados por fatores de crescimento ou injúria do tecido, estas células tornam-se ativas, proliferando e fundindo-se com as fibras adjacentes, aumentando assim o número de núcleos para o crescimento e reparo da fibra (Snow, 1990; Summers et al., 1985). Experimentos demonstraram aumento da expressão de M-caderina em células-satélite ativas, observou-se a presença de Pax7, tanto em células-satélite quiescentes quanto ativas, enquanto que MyoD apenas nas células-satélite ativas. Na ausência de Pax7, as células-satélite morrem (Montarras et al., 2005). Estudos *in vitro* podem ser realizados para compreender melhor a dinâmica das células-satélite e do processo de regeneração utilizando cultura de mioblastos, onde a proliferação e diferenciação são reguladas por meio de fatores de crescimento específicos, demonstrando a plasticidade dos mioblastos adultos (Yablonka-Reuveni et al., 1987; Yablonka-Reuveni et al., 1999).

Segundo (Yablonka-Reuveni et al., 1999), o método utilizado no isolamento de células-satélite de musculatura de galinha dá origem a células de linhagem miogênica viáveis, as quais podem ser mantidas em cultura. Nesta abordagem, foi demonstrado que essas células são semelhantes quanto à proliferação e diferenciação. Portanto, é possível inferir que as células-satélite de musculatura adulta e as células progenitoras miogênicas são idênticas e possuem a mesma origem embrionária, ou seja, provém da mesma linhagem celular (Yablonka-Reuveni et al., 1987).

2.3 IMPORTÂNCIA DA VIA DE SINALIZAÇÃO WNT

Dentre os fatores parácrinos envolvidos em processos do desenvolvimento, bem como em doenças humanas, estão as glicoproteínas de secreção da família WNT e TGF- β , ambas cruciais para a miogênese (Gilbert, 2003). Muitos trabalhos na literatura relacionam o gene *Dact1*, interesse desta pesquisa, à via de sinalização WNT. Portanto, daremos enfoque nesta via para que possamos compreender mais a fundo o papel de *Dact1* no processo de miogênese (Borello et al., 2006; Cheyette et al., 2002; Waxman et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Sinais WNT são fundamentais em todas as fases da embriogênese, regulando a atividade de genes específicos no local e momento exato para promover os mais diferentes aspectos do desenvolvimento. Neste processo, a síntese e liberação das glicoproteínas da família WNT por células indutoras promove interações entre as células de órgãos e tecidos que estão se formando, estabelecendo destinos celulares, controlando os níveis de proliferação celular, coordenando a migração de grupos de células para os sítios de diferenciação, determinando a polaridade das células e controlando a apoptose (Wodarz and Nusse, 1998). Por exemplo, na formação do mesoderma, desenvolvimento da crista neural e órgãos de grande importância como o coração, as WNTs são essenciais (Moon et al., 2004). Além disso, sabe-se que a via de sinalização WNT controla a segmentação e a padronização dos somitos (Bryson-Richardson and Currie, 2008; Buckingham and Montarras, 2008; Ozbudak and Pourquié, 2008), desenvolvimento dos membros (Towers et al., 2009), determinação das células progenitoras musculares (Borello et al., 2006; Cossu et al., 1996; Münsterberg et al., 1995; Schmidt et al., 2000), bem como a diferenciação terminal da musculatura esquelética e a padronização das fibras musculares (Anakwe et al., 2003; Kardon et al., 2003). As WNTs participam também da formação das junções neuromusculares durante a miogênese fetal, bem como do reparo muscular mediado por células-satélite (Cisternas et al., 2014; Rudnicki and Williams, 2015). Portanto, mutações que perturbam as funções de genes *Wnt* durante o desenvolvimento embrionário, estão associadas a malformações no adulto e a muitas doenças humanas, incluindo câncer e doenças degenerativas como a osteoartrose (Clevers, 2006; DeLise et al., 2000).

A família WNT é composta por 19 glicoproteínas ligantes, as quais podem ativar uma ou mais das diferentes vias de sinalização WNT, tais como a via WNT canônica/ β -catenina, a via WNT/ Ca^{2+} e a via de polaridade celular planar (PCP) ou a via WNT/PKA/CREB (Angers and Moon, 2009; Yann Fedon, 2012).

Na via canônica, as glicoproteínas WNT uma vez liberadas, atuam em células alvo por intermédio do complexo de receptores de membrana celular denominadas proteínas *Frizzled* e LRP (do inglês – *low-density receptor-related protein*). Os receptores *Frizzled*, possuem sete domínios transmembranares semelhante ao receptor acoplado à proteína G. Ao se ligarem às glicoproteínas WNT, estes receptores alteram sua conformação e transduzem o sinal WNT para várias proteínas intracelulares. Dentre estas, está a proteína citoplasmática *Dishevelled* (Dsh), que após a sinalização WNT estabiliza a proteína β -catenina, que seria normalmente fosforilada pelo complexo de degradação formado pelas enzimas Axina/GSK3/APC, num processo de ubiquitinação. As proteínas transmembrana LRP-5 e LRP-6 são pertencentes à família de receptores LDL (do inglês – *low-density-lipoprotein*) e atuam como co-receptores da via WNT, sendo fundamentais na ativação da via WNT canônica ao se ligarem à Axina do complexo de degradação da β -catenina, culminando em sua estabilização no citoplasma.

A estabilização da β -catenina leva ao aumento de sua concentração no citoplasma, possibilitando sua translocação para o núcleo. No compartimento nuclear, a β -catenina liga-se à porção N-terminal dos fatores de transcrição de células T (TCF e LEF-1) para modular a transcrição de vários genes específicos. Esta via está associada ao destino celular (Angers and Moon, 2009; Logan and Nusse, 2004; Miller et al., 1999; Yann Fedon, 2012). (Fig.5)

A via WNT não canônica transduz seu sinal independente de β -catenina e são diversas quanto ao seu mecanismo de ação. Por exemplo, a via WNT não canônica de polaridade celular planar (WNT/PCP) controla o movimento celular e a sua polaridade e a (WNT/ Ca^{2+}) está associada aos movimentos morfogênicos durante a gastrulação, indução do coração, padronização dorso-ventral, separação dos tecidos e supressão tumoral (Angers and Moon, 2009; Yann Fedon, 2012). Estas vias não serão detalhadas no contexto desta revisão.

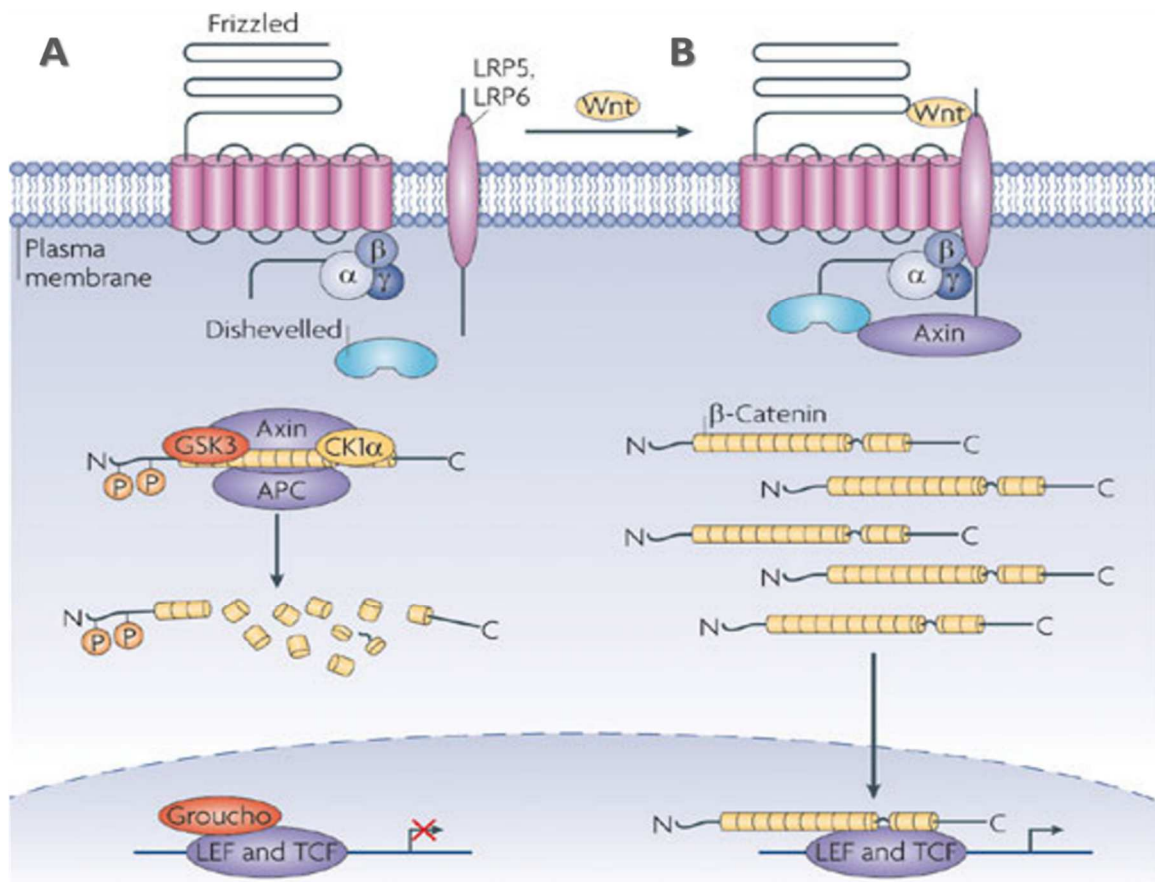


FIGURA 5: Controle pós-transcricional e estabilidade da β -catenina, crucial na via de sinalização WNT/ β -catenina. Em **A** é ilustrado a fosforilação da β -catenina e o complexo para sua degradação pela via de ubiquitinação. Em condições de repouso, há menor concentração de β -catenina no citoplasma e consequentemente a repressão da transcrição de genes alvo da via WNT no núcleo. Em **B**, a proteína WNT se liga aos receptores Frizzled, promovendo a ativação da proteína citoplasmática Dishevelled, que irá impedir a fosforilação de β -catenina pelo complexo de degradação, culminando em seu acúmulo no citoplasma e consequente translocação para o núcleo. Adaptado de (Angers and Moon, 2009).

2.4 OS GENES *DACT*

A família de genes *Dact*, (*Dishevelled antagonist proteins*) também conhecidos como *Dapper*, é composta por genes que codificam proteínas adaptadoras multifuncionais. O número de parálogos entre diferentes animais varia. Por exemplo, no humano e camundongo foram encontrados os genes *Dact1*, *Dact2* e *Dact3*; nos répteis e peixes teleósteos, os genes *Dact1*, *Dact2*, *Dact3* e *Dact4*; na galinha, os *Dact1* e *Dact2* e em *Xenopus*, apenas o gene *Dact1* (Alvares et al., 2009; Cheyette et al., 2002; Fisher et al., 2006; Schubert et al., 2014a; Waxman et al., 2004). Os genes *Dact* tiveram origem comum a partir de um único gene ancestral antes dos dois eventos de duplicação genômica completos, ocorridos na linhagem dos vertebrados (Alvares et al., 2009).

Embora não apresentem domínio catalítico próprio, as proteínas codificadas por estes genes têm como principal característica a habilidade de ligar-se a vários parceiros moleculares. Estas interações ocorrem por meio de diferentes domínios estruturais, que são conservados filogeneticamente a fim de maximizar diferentes processos biológicos (Brott and Sokol, 2005; Cheyette et al., 2002; Kivimae et al., 2011; Waxman et al., 2004; Zhang et al., 2004). Por exemplo, dentre as proteínas que interagem com *Dact1* e *Dact3* estão Dishevelled, Vangl e PKA que participam da via de sinalização WNT canônica e não canônica (Cheyette et al., 2002). Por sua vez, *Dact2* é o único membro desta família que participa do controle da via TGF- β , promovendo a degradação dos receptores Alk4 e Alk5 via lisossomo (Zhang et al., 2004). As funções desempenhadas pelas proteínas DACT dependem das condições celulares nas quais elas estão inseridas e são mediadas por atividades de sinalização distintas e diferentes domínios estruturais conservados entre os parálogos desta família (Brott and Sokol, 2005; Waxman et al., 2004; Zhang et al., 2004).

As proteínas DACT desempenham importantes funções na embriogênese e na manutenção da homeostase pós-natal. Os papéis dessas proteínas nos embriões de vertebrados abrangem a coordenação dos movimentos morfogenéticos durante a gastrulação, adesão celular, especificação do mesoderma, ontogênese dos membros, morfogênese do encéfalo, coração e olhos, adipogênese, desenvolvimento de

sinapses excitatórias na região do hipocampo, delaminação das células da crista neural, cicatrização e desenvolvimento da uretra (Cheyette et al., 2002; Gloy et al., 2002; Jiang et al., 2008b; Lagathu et al., 2009; Okerlund et al., 2010; Rabadán et al., 2016; Suriben et al., 2009; Waxman et al., 2004; Zhang et al., 2006).

Tendo como papel principal, modular as vias de sinalização WNT e TGF- β em diversos contextos celulares, é esperado que os genes *Dact*, estejam envolvidos na tumorigênese, uma vez que estas duas vias desempenham funções reconhecidas no desenvolvimento de câncer e progressão dos tumores. De fato, modificações epigenéticas nos promotores dos genes *Dact*, culminam em alterações em seus níveis de expressão, fato que tem sido associado a diferentes tipos de câncer, como por exemplo o carcinoma epidermóide esofágico e oral (Guo et al., 2017; Schussel et al., 2015), câncer gástrico (Liu et al., 2016; Yu et al., 2014) carcinoma hepatocelular (Zhang et al., 2013), câncer de mama (Yin et al., 2013), câncer colo-retal (Jiang et al., 2008a; Wang et al., 2015) e de pulmão (Jia et al., 2013).

Em embriões de camundongo, *Dact1* é expresso na placa mesodérmica segmentar, brotos dos membros e outros tecidos derivados do mesoderma, bem como nos somitos em desenvolvimento, havendo uma maior concentração de transcritos nos somitos recém-formados e, níveis muito reduzidos, nos maduros. (Fisher et al., 2006). Nos embriões de galinha, *Dact1* é expresso na linha primitiva e no nódulo de Hensen, na notocorda, no mesoderma pré-somítico, no mesoderma lateral, bem como no coração e nos brotos dos membros em desenvolvimento (Alvares et al., 2009). Dentro de cada somito, *Dact1* e *Dact2* diferem em seus domínios de expressão. Enquanto *Dact1* é expresso na região médio-ventral, *Dact2* é expresso em níveis mais baixos na região lateral-dorsal dos somitos. *Dact3* é expresso na região médio-ventral dos somitos maduros e brotos dos membros, no arco branquial do mesênquima e sistema nervoso central (SNC). Diferentemente dos outros dois genes *Dact*, *Dact3* não é expresso nos somitos em desenvolvimento (Fisher et al., 2006).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Estabelecer o padrão de expressão do gene *Dact1* e de marcadores moleculares miogênicos ao longo da miogênese esquelética *in vitro*, utilizando como modelo de estudo, a cultura primária de mioblastos de galinha (*Gallus gallus*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Implementar a cultura primária de mioblastos de galinha como modelo de estudos no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento da Unicamp.
- Confirmar a expressão de *Dact1* em células da linhagem miogênica no músculo peitoral de fetos de galinha (E11) por RT-PCR
- Estabelecer o padrão de expressão espacial de *Dact1* no músculo peitoral (E11) por hibridação *in situ* e compará-lo com a expressão de marcadores miogênicos (Miogenina)
- Confirmar a expressão da proteína DACT1 no músculo peitoral (E11) por imunofluorescência e compará-la com a expressão de proteínas miogênicas (Desmina)
- Confirmar a expressão da proteína DACT1 durante a diferenciação de mioblastos fetais por imunofluorescência e compará-la com a expressão de proteínas miogênicas (Miogenina e Desmina)
- Caracterizar, comparar e quantificar a expressão de *Dact1* com marcadores miogênicos (Miogenina e *Myomaker*) em diferentes etapas da diferenciação miogênica.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. PADRONIZAÇÃO DA CULTURA PRIMÁRIA DE MIOBLASTOS DE GALINHA

4.1.1 Os Animais

Neste projeto foram utilizados embriões de galinha (*Gallus gallus*) 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 - Registro 4236-1). Os ovos fertilizados foram provenientes da granja Yamaguishi S.A.

4.1.2. Coleta, Estadiamento e Dissecção do músculo peitoral de embriões de galinha

Os ovos fertilizados foram acondicionados em incubadoras apropriadas à temperatura de 38,5°C e umidade de 60% por 11 dias. O estágio de desenvolvimento em que o embrião se encontrava foi confirmado pela análise visual dos critérios morfológicos característicos descritos por (Hamburger and Hamilton, 1992). Os embriões foram eutanasiados por decapitação. A membrana que recobre o corpo do embrião foi retirada para dissecção do músculo peitoral. O músculo foi lavado em solução salina PBS (*Phosphate buffered saline*) [1X] feita com água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). Com o auxílio de uma lupa, pinças cirúrgicas e placas de Petri estéreis, o músculo peitoral foi dissecado, retirado o tecido conectivo e inserções ósseas.

4.1.3. Cultura Primária de Mioblastos de Galinha

A cultura primária de mioblastos foi feita baseada nos protocolos descritos por (Mermelstein et al., 2007; Neville et al., 1997; Slater, 1976). Músculos peitorais de embriões de galinha com 11 dias foram retirados após eutanásia e dissecados conforme descrito em 4.1.2. Após remoção do tecido conectivo, o músculo foi fragmentado e incubado a 37°C por 15 min em solução PBS contendo 0,25% de Tripsina, 0,05% EDTA 1x (Gibco). Todo o conteúdo foi removido da placa após os 15 min e transferido para um tubo Falcon® contendo 4 mL de meio de cultura (MEM), preparado com 10% de soro equino, 1,2% de L-glutamina, 1,2% de Fungizona, 0,6% de penicilina-estreptomicina (Gibco) e 5% de extrato de embrião de galinha *homemade* (Slater, 1976). O conteúdo foi centrifugado por 5 min a 750g, o *pellet* ressuspensionado em 6 mL do meio mínimo preparado e então filtrado através do *Cell Strainer* de 70µm (BD Falcon). Após serem ressuspensionadas, as células foram pré plaqueadas em placas de 100mm e incubadas por 30 min a 37°C. Neste processo não há necessidade do revestimento prévio das placas com colágeno e permite a separação parcial de fibroblastos da cultura primária de mioblastos. Os fibroblastos se aderem primeiro à placa, restando em suspensão, um meio de cultura rico em mioblastos principalmente. Este procedimento foi adaptado de (Praud et al., 2003). Após 30 min, a suspensão foi pipetada e as células viáveis foram contadas na câmara de Neubauer em meio contendo azul de tripan 0,4%. O plaqueamento foi feito na densidade de 5×10^5 células em 2 mL de meio, em placas de cultura de 35 mm, previamente revestidas com colágeno (Slater, 1976) de cauda de rato (*homemade*). As células foram incubadas à temperatura de 37°C, com atmosfera umidificada e CO₂ 5%. O meio de cultura preparado foi trocado diariamente.

4.1.4. Extração de colágeno de caudas de rato e cobertura das placas de cultura

O colágeno para plaqueamento dos mioblastos foi preparado a partir de tendões de cauda de rato. O material utilizado foi gentilmente cedido pela Dra. Monique Mendonça (CEUA 4207-1) provenientes de animais controle saudáveis. As caudas

foram limpas, secas e sua pele retirada até a exposição dos feixes fibrosos. Todos os feixes foram separados em filamentos de colágeno e colocados em UV no fluxo laminar por 24hs. Após esterilizados, os filamentos foram colocados em solução de ácido acético glacial 0,1% preparada com água DEPC (300 mL de solução/g de fibras colágenas). O preparado foi mantido sob agitação por 48hs a 4°C e depois centrifugado a 500g por 15 min a 4°C. O sobrenadante foi mantido sob refrigeração. Para a cobertura das placas de cultura, o colágeno deve ser diluído em uma proporção de 1:3 de etanol 60% em água DEPC autoclavada. Uma vez cobertas, as placas permaneceram na UV em fluxo laminar até completa secagem e depois são armazenadas em geladeira.

4.1.5. Extrato de Embrião de galinha

A partir do embrião de 11 dias foi preparado um extrato de embriões de galinha. Este material é rico em fatores de crescimento e diferenciação importantes em culturas primárias de mioblastos. Os embriões, adequadamente eutanasiados e livres das membranas envoltórias, foram colocados em seringa de 50 mL e cuidadosamente macerados pelo êmbolo. O conteúdo foi colocado em um Becker com igual volume de DMEM e deixado *overnight* a 4°C sob agitação. No dia seguinte, a mistura foi acondicionada em tubos apropriados e centrifugados a 30.000g por 6hs. Os tubos foram retirados cuidadosamente da centrifuga e pipetada apenas a fase do meio, uma vez que a fase superior contém muitos adipócitos e deve ser descartada. As alíquotas foram acondicionadas no freezer e filtradas em filtros de seringa de 0,22µm para o preparo do meio de cultura. Este protocolo foi adaptado de (Pajtler et al., 2010)

4.2. ANÁLISES DE EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-PCR

4.2.1. Extração de RNA Total

Após dissecção do músculo peitoral, os mesmos foram adicionados a tubos livres de RNase contendo 1mL de TRIzol® (Invitrogen, USA). As amostras foram homogeneizadas com vórtex e seringa, e a seguir, incubadas por 5 min em temperatura ambiente, seguida pela adição de 200 µL de clorofórmio livre de RNase. Em seguida, nova homogeneização em vórtex por 15s e incubação à temperatura ambiente por 3 min, as amostras foram centrifugadas por 15 min a 12.000g a 4°C. A fase aquosa (superior) contendo o RNA, foi removida e transferida para um novo tubo de 1,5mL e a ela adicionados 500 µL de isopropanol, permanecendo à temperatura ambiente por 10 min. As amostras foram novamente centrifugadas a 12.000g a 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi adicionado, 1mL de etanol 70% gelado seguindo-se nova centrifugação a 7.000g a 4°C por 5 min. Removido o sobrenadante, o *pellet* foi ressuscitado em 30 µL de água tratada com dietilpirocarbonato (DEPC). A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1% em cuba horizontal, com corrente contínua a 100V. Em seguida, o RNA total foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer). As alíquotas dos materiais foram armazenadas a -80°C.

4.2.2. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada utilizando-se o kit RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Fermentas, Glen Burnie, MD, USA) conforme instruções do fabricante. Foi adicionado 1 µg de RNA total obtido, a 1 µL do *primer* oligo (dT)₁₈, ajustando-se o volume final de reação para 12 µL de água DEPC. As amostras foram incubadas a 65° C por 5 min no termociclador. Em seguida, foram adicionados à mistura: 4 µL de 5x Reaction *buffer*, 1 µL de Ribolock Ribonuclease_inhibitor, 2 µL de 10mM dNTP mix e 1 µL de RevertAid H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase,

completando-se o volume final da reação para 20 µL com H₂O DEPC. As amostras foram incubadas no termociclador por 60 min a 42°C e em seguida, por 5 min a 70°C.

As amostras foram quantificadas com auxílio do NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer), aliquotadas e armazenadas a -80°C.

4.2.3. Desenho dos *Primers*

As sequências específicas de oligonucleotídeos utilizadas neste trabalho, foram obtidas do GenBank do National Center for *Biotechnology Information* (NCBI). Os *primers* foram desenhados com o auxílio da ferramenta *Primer Express 3. 0 Software for Real-Time* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e são apresentados na Tabela 1. A confecção dos *primers* foi solicitada à Invitrogen by Thermo Fischer Scientific Brasil.

Tabela 1 – Lista de primers empregados para análise de expressão de *Dact1* e marcadores moleculares.

PRIMERS	SEQUÊNCIA (5'-3')	Tamanho do Produto (bp)
<i>Dact1</i> F	GGT TTT ATG AGC TGA GTG ATG G	598
<i>Dact1</i> R	CCT GGT TTG TTA GTC CTT ACA GAG	
<i>Dact1</i> F	GCC CTT TGG AGG CAA CAC T	174
<i>Dact1</i> R	GGT GGA CAT CTG CAA CGA CA	
18S F	CGA AAG CAT TTG CCA AGA AT	98
18S R	GGC ATC GTT TAT GGT CGC	
β-actina F	ATC TTT CTT GGG TAT GGA GTC	133
β-actina R	GCC AGG GTA CAT TGT GG	

Ciclina D1 F	GAC TTT TGT GGC TCT GTG CG	193
Ciclina D1 R	GCA GGC TCG TAA ACA ATC CG	
MyoD F	GCT ACT ACA CGG AAT CAC CAA AT	200
MyoD R	CTG GGC TCC ACT GTC ACT CA	
MyoG F	CGG AGG CTG AAG AAG GTG AA	320
MyoG R	CGG TCC TCT GCC TGG TCA T	
Myomaker F	TGG GTG TCC CTG ATG GC	165
Myomaker R	CCC GAT GGG TCC TGA GTA G	

4.2.4. Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

As PCRs (do inglês – *polymerase chain reaction*) foram feitas de acordo com o protocolo do fabricante (Thermo Scientific). Cada reação continha 1 µL de cDNA, 1 µL de dNTPs 10mM, 3 µL de MgCl₂ 25mM, 2,5 µL de DMSO, 0,25 µL de Taq DNA Polimerase, 5 µL 10X Taq *buffer* com KCl (fornecido pelo fabricante), 1 µL de cada um dos *primers* (Forward e Reverse). Foi empregada água previamente tratada com DEPC para completar o volume para 50 µL. A amplificação do fragmento desejado foi realizada no Termociclador Eppendorf Mastercycler Pro nas seguintes condições:

- Fase inicial - Pré-desnaturação (1 ciclo) - a 95°C por 1 min.
- Segunda fase (30 ciclos) – 95°C por 30s (desnaturação), seguidos de 55°C por 30s (anelamento), 72°C por 1 min.
- Extensão final (1 ciclo) - 72°C por 10 min.

A verificação da reação de amplificação foi feita em gel de agarose 1,5%, no qual foi aplicado 1 µL do produto de PCR, 1 µL do corante Gel Red, e 8 µL de água DEPC. Para checagem do tamanho do fragmento nesta eletroforese, foram utilizados 1 µL do marcador de peso molecular O'GeneRuler 1kb Ladder (0,1µg/µL, 50 µg (Fermentas), 1 µL de Gel Red e 8 µL de água DEPC.

4.3. ENSAIO DE HIBRIDAÇÃO *in situ* (HIS)

4.3.1. Transformação e Transfecção de bactérias Competentes para Síntese de Sonda Antisenso Utilizadas em (HIS)

A transformação foi feita com 10ng dos clones contendo como inserto fragmentos de cDNA de *Dact1* de galinha no vetor *PBluescript*. Este DNA foi adicionado a 50 µL de bactérias competentes *E. coli* (DH5-α) e 1 µL de DMSO 40 %. Após pelo menos meia hora em gelo, as células foram submetidas a choque térmico à temperatura de 42°C por 90s, seguido de descanso em gelo por 2 min. Após a transformação, foram adicionados 500 µL de meio LB (Luria Bertani) às bactérias que permaneceram sob agitação a 250 rpm por 1 hora a 37°C. Após esse período, foram plaqueados 50 µL do inóculo em placas com meio LB sólido (ágar) contendo 50 mg/mL de ampicilina. As placas foram acondicionadas em estufa a 37°C *overnight*. Este procedimento foi realizado em ambiente estéril em fluxo laminar.

4.3.2. Extração de DNA Plasmidial

Após a transformação, colônias isoladas foram coletadas e transferidas para tubos do tipo Falcon® contendo 5 mL de meio LB líquido acrescido de 5 µL de Ampicilina e deixadas em agitação a 250 rpm a 37°C, *overnight*. A partir deste pré inóculo, foi preparado o estoque glicerinado (600 µL de bactérias + 600 µL de glicerol 50%) e feita mini preparação para extração do DNA plasmidial. Foi utilizado neste procedimento o protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina, descritos a seguir:

Cada cultura líquida de bactérias foi transferida para tubos de 1,5 mL seguido de centrifugação a 13.000g por 1 min e descartado o sobrenadante. O processo anterior deve ser repetido, transferindo o restante de cada cultura líquida no mesmo tubo Falcon® da primeira etapa, para não haver mistura de bactérias. Depois de transferido

todo o conteúdo da cultura líquida, os tubos contendo os *pellets* foram novamente centrifugados por 1 min e retirado, com pipeta, o excesso de meio. Ao *pellet* foi adicionado 200 µL de Solução I e vortexado. Após este passo, foi adicionado 300 µL de Solução II e os tubos levemente agitados (3 a 5 vezes) por inversão. Em sequência, os tubos foram deixados em gelo por 5 min e adicionados 300 µL de Solução III. Os tubos foram levemente agitados (3 a 5 vezes) por inversão, deixados em gelo por 5 min e centrifugados por 10 min. O sobrenadante foi transferido para tubo limpo, adicionados 2 µL de RNase A (10mg/mL) e incubados a 37°C por 30 min. Após incubação foram adicionados 400 µL de clorofórmio, seguido de centrifugação por 1 min. Nesta etapa há formação de duas fases, onde apenas a fase superior contendo o DNA foi transferida para novo tubo e a ela adicionado 1 volume de isopropanol 100%. O conteúdo foi centrifugado por 10 min e seu sobrenadante descartado. Ao *pellet* foram adicionados 500 µL de etanol 70%, seguido de nova centrifugação por 5 min. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* seco foi ressuscitado em 30 µL de água MilliQ. O produto foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer) e sua integridade analisada por eletroforese em gel de agarose 1,0% aplicando aproximadamente 100ng de cada DNA obtido.

Preparo das soluções utilizadas no protocolo de extração de DNA plasmidial por lise alcalina:

Solução I - 50mM glicose (Peso Molecular = 180,2 g); 25 mM Tris-HCl (pH 8,0); 10mM EDTA (pH 8,0); completar o volume com água MilliQ autoclavada. Estocar a 4°C.

Solução II - Esta solução deve ser preparada somente na hora, seguindo as etapas nesta ordem: 880 µL de água MilliQ; 20 µL NaOH 10N; 100 µL SDS 10%. Estocar a temperatura ambiente.

Solução III - 60 mL acetato de potássio 5 M (final: 3 M); 11,5 mL ácido acético glacial; 28,5 mL água MilliQ; estocar a 4°C.

4.3.3. Tratamento com Proteinase K

Procedeu-se tratamento com Proteinase K para purificação do DNA plasmidial extraído a partir de mini preparação. Neste processo foram adicionados 80 µL de plasmídeo digerido a 25,5 µL de *buffer* de digestão contendo 18 µL de NaCl 5M, 4,5 µL de SDS 20% e 3 µL de Proteinase K – 10µg/µL. Foi empregada água DEPC para completar o volume para 300 µL, seguindo-se incubação por 1h a 65°C. Após 1h foi realizada remoção da Proteinase K adicionando-se à solução, 300 µL de fenol: clorofórmio: álcool isomérico, seguindo-se rápida vortexação e centrifugação por 3 min. Após centrifugação, a fase superior contendo o DNA foi coletada e transferida para um novo tubo. Foram então adicionados 2 volumes de etanol 100% a este novo tubo e incubado *overnight* a -20°C. No dia seguinte o conteúdo foi centrifugado por 10 min, o sobrenadante descartado e ao *pellet*, adicionados 500 µL de etanol 70% preparado com água DEPC, seguindo-se nova centrifugação por 5 min. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuscitado em 35 µL de água DEPC. A integridade das amostras foi verificada por eletroforese em gel de agarose 2% em cuba horizontal, com corrente contínua a 100V. Em seguida, o DNA foi quantificado com auxílio do NanoDrop (ND1000 Spectrophotometer). As alíquotas dos materiais foram armazenadas a -20°C.

4.3.4. Síntese de Sonda de RNA Antisenso

As sondas de RNA antisenso, as quais foram utilizadas na técnica de Hibridação *In Situ*, foram sintetizadas a partir de produtos de PCR purificados dos clones de cDNA de *Dact1* de galinha conforme descritos por (Alvares et al., 2009). Nas PCRs foram utilizados *primers* direto e reverso do bacteriófago M13 (Invitrogen). A temperatura empregada na etapa de anelamento das PCRs foi de 50°C. Os parâmetros de ciclagem utilizados foram: desnaturação inicial a 95 °C por 1 min, 5 ciclos de desnaturação a 95 °C por 30s, anelamento a 65 °C por 30s e extensão a 72 °C por 1 min; 30 ciclos de 95 °C por 30s, TA por 1 min e 72 °C por 1 min. A extensão final foi de 72°C por 10 min. Os produtos das PCRs foram analisados por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. O produto da PCR foi tratado com DNase e purificado utilizando o *MINELUTE PCR Purification Kit*, conforme orientação do fabricante. Após

purificação, o material foi enviado para sequenciamento e em seguida submetido à transcrição *in vitro* utilizando enzimas T3 RNA polimerase para gerar o RNA antisenso. As sondas foram avaliadas em gel de agarose 1%, quantificadas e diluídas em solução de hibridação aquecida a 70°C, de modo a manter uma concentração de 1µg/ µL.

4.3.5. Processamento Histológico e Análise ao microscópio de luz

Fragmentos do tecido (musculatura peitoral do embrião de galinha E11 foram fixados em paraformaldeído 4% em solução-tampão fosfato 0,1M (pH 7,4), *overnight* a 4º C. No dia seguinte, foi realizado o processamento por técnicas histológicas convencionais para embebição em Resina Glicol-metracrilato (Historresina–Leica–Áustria) bem como em parafina (Paraplast-Sigma). Os cortes dos materiais foram feitos na espessura de 5µm para inclusão em parafina 3µm para inclusão em historresina. Foram empregadas técnicas histológicas básicas para coloração dos tecidos (Consonni et al., 2012). Os materiais foram documentados em fotomicroscópio Eclipse 800 (Nikon, Japão), utilizando-se câmera digital Coolsnap.

Para os materiais que foram empregadas as técnicas de hibridações *in situ*, os cortes histológicos foram realizados em micrótomo a 7µm de espessura, transferidos para água DEPC em banho-maria a 37,5°C e acondicionados em lâminas Star Frost®. As lâminas com os cortes foram mantidas em estufa a 38°C *overnight* para secagem e, posteriormente, armazenadas a 4°C até seu uso no procedimento de Hibridação *in situ*.

4.3.6. Hibridação *in situ* em Lâminas

As lâminas contendo os cortes histológicos do tecido muscular dos embriões, foram desparafinizadas em banhos de xilol seguidos por lavagens seriadas de etanol/PBS[1X] 100%, 95%, 85%, 70% e 50%, finalizando com PBS[1X]_{DEPC}. O pré-tratamento será feito em banho-maria a 37°C com proteinase K [10µg/mL] por aproximadamente 4 min. Em seguida as lâminas foram incubadas à mesma

temperatura em solução de glicina 0,2% em PBS_{DEPC}, passarão por lavagens com apenas PBS_{DEPC}. Na etapa seguinte, as lâminas foram lavadas com PBS_{DEPC} e novamente fixadas com 4% PFA/PBS, seguidas de novas lavagens PBS_{DEPC}. As lâminas passaram pela solução de pré-hibridação a 68°C em câmara úmida e em seguida foram adicionados 200 µL de sonda por lâmina em concentração igual a 1ng/µL. As lavagens pós-hibridação foram feitas com SSC pH4,5 [1x], Solução X e MABT. As amostras foram incubadas com anticorpo anti-DIG em 2% BBR/MABT em diluição 1:2000 *overnight* a 4°C. A detecção foi realizada em temperatura ambiente com a adição de BMPurple. Todas as soluções foram feitas em água tratada com DEPC.

4.4. ANÁLISES DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DACT1 EM TECIDO E CÉLULAS

4.4.1. Imunofluorescência em Criocortes

Fragmentos do tecido (musculatura peitoral do embrião de galinha E11) foram coletados e fixados em Metacarn (Metanol 60%, Clorofórmio 30%, Ácido Acético 10%) durante 24hs e em seguida, foram realizados banhos de sacarose 10%, 20% e 30% respectivamente por 12hs. Posteriormente as amostras foram congeladas por imersão em n-heptano e embebidas em Tissue Tek (Sakura, EUA) e então armazenadas a -80°C. Para realização dos ensaios de imunofluorescência, foram feitos criocortes de 8µm em criostato (CM1850, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) a -25°C e armazenados a -20°C.

As lâminas contendo os criocortes foram descongeladas até chegarem a temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram lavados com PBS 0,1M e incubados com solução *Blocking buffer* (BSA 1%, 0,1% de Triton-X 100, glicina 50mM e PBS 0,1M) por 30 min. Após essa etapa, os criocortes foram lavados com solução *Working buffer* (Wb) (*Blocking buffer*/PBS – 1:5) 3 vezes durante 3 min. Em seguida, o anticorpo Primário foi diluído em solução Wb e incubado *overnight* a 4°C em câmara

úmida. Após a incubação, os criocortes foram lavados em solução Wb 3 vezes por 5 min. O anticorpo secundário foi diluído em solução Wb e incubado por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida, os criocortes foram lavados em tampão PBS 0,1M e incubados com *DAPI* (sc-3598, Santa Cruz, CA, EUA) 1:1000, diluído em tampão PBS 0,1M durante 5 min. A montagem das lâminas foi realizada com *VECTASHIELD Mounting Medium* (Vector Labs, Burlingame, CA, EUA). Como controle negativo da reação a etapa de incubação com o anticorpo primário, foi omitida. Os materiais foram documentados em microscópio de fluorescência Leica DM5500B nas objetivas de 20x e 40x.

Tabela 2 – Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos

Anticorpo primário	Descrição	Diluição
DACT1 (ab51260) <i>Abcam® plc</i>	Anticorpo policlonal obtido em coelho que reconhece a proteína DACT1	1:300
DESMIN (D93F5) XP® <i>Cell Signaling technology</i>	Anticorpo monoclonal obtido em coelho que reconhece a proteína Desmina	1:300

Tabela 3 – Anticorpo secundário utilizado nos ensaios de imunofluorescência em cortes histológicos

Anticorpo secundário	Descrição	Diluição
(ab150077) <i>Abcam® plc</i>	Anti- imunoglobulina G de coelho: obtido em cabra conjugado com Alexa Fluor® 488	1:400

4.4.2. Imunofluorescência em Células

Foi realizada cultura celular em placas de 24 wells com lamínulas preparadas com colágeno. As lamínulas foram coletadas e fixadas em acetona 100% por 3min em gelo, lavadas com PBS 0,1M pH7,4 e armazenados a 4°C.

Em seguida seguiu-se o mesmo procedimento aplicado para imunofluorescência, conforme descrito anteriormente. As imagens foram obtidas com microscópio Confocal LSM780 – NLO INFABiC-UNICAMP e microscópio de fluorescência Leica DM5500B nas objetivas de 20x e 40x.

Tabela 4 – Anticorpos primários utilizados nos ensaios de imunofluorescência em células

Anticorpo primário	Descrição	Diluição
DACT1 (ab51260) <i>Abcam® plc</i>	Anticorpo policlonal obtido em coelho que reconhece a proteína DACT1	1:300
DESMIN (D93F5) XP® <i>Cell Signaling technology</i>	Anticorpo monoclonal obtido em coelho que reconhece a proteína Desmina	1:300
MYOGENIN (F5D) (Sc12732) <i>Santa Cruz Biotechnology, inc</i>	Anticorpo monoclonal obtido em camundongo que reconhece o fator de transcrição Miogenina	1:100

Tabela 5 – Anticorpos secundários utilizados nos ensaios de imunofluorescência em células

Anticorpo secundário	Descrição	Diluição
(ab150077) <i>Abcam® plc</i>	Anti-imunoglobulina G de coelho: obtido em cabra conjugado com AlexaFluor® 488	1:400
(ab150109) <i>Abcam® plc</i>	Anti- imunoglobulina G de camundongo: obtido em burro conjugado com Alexa Fluor® 488	1:400

4.5. ANÁLISES QUANTITATIVAS DA EXPRESSÃO GÊNICA

4.5.1. Extração de RNA Total de células

A placa de cultura utilizada para extração de RNA, foi lavada com PBS 1X e em seguida, foi adicionado 1 mL de Tryzol® (Invitrogen). Após este processo, o conteúdo da placa foi passado para tubo de 1,5 mL, seguido das etapas de extração de RNA total, conforme protocolo descrito em 4.2.1.

4.5.2. PCR em tempo Real (qRT-PCR)

Para cada reação foram utilizados 5 µL de *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems), 1 µL de cDNA (400ng/µL), 3,5 µL de água DEPC, 1 µL de *primer* F+R (3mM). Foi utilizado termociclador Applied Biosystems 7500 com o programa nas seguintes etapas: (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 triplicata biológica e duplicata técnica, utilizando placas *MicroAmp® Optical 96-well Reaction Plate* (Applied Biosystems ref. N8010560) compatíveis para o termociclador Applied Biosystems 7500. O gene normalizador utilizado e avaliado foi (*18s*). Os resultados serão normalizados utilizando os valores de Ct (*threshold cycle*) do gene *18s* da mesma placa. Para quantificar a expressão gênica relativa, foi utilizado o modelo matemático $2^{-\Delta\Delta Ct}$, considerando o dia 1 como calibrador. Para validar os ensaios de PCR em tempo real, as curvas de eficiência e de dissociação foram confeccionadas previamente e ajustes de concentração de cDNA e *primers* foram efetuados. 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.

4.5.3. Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas com base nos trabalhos de (Conover W.J and Iman, 1981; Montgomery, 1991), utilizando o ranqueamento de dados para posterior análise semiparamétrica. A análise da expressão dos diferentes genes (*Dact1*, *MyoG*, *Myomaker*) realizada entre os dias de diferenciação miogênica foi feita a partir do ranqueamento de dados e análise semiparamétrica por ANOVA de medidas repetidas, seguida do teste de Tukey. A significância estatística foi definida como $P < 0,05$ (*) e $P < 0,01$ (**). Os dados foram apresentados como média $\pm$ erro-padrão da média (SEM $\pm$).

5. RESULTADOS

5.1. CULTURA PRIMÁRIA DE MIOBLASTOS DE GALINHA COMO MODELO DE ESTUDO DA MIOGÊNESE ESQUELÉTICA

Durante o desenvolvimento embrionário de galinha (HH20), *Dact1* é expresso em uma subpopulação de células dos somitos localizada na interface entre o dermomiótomo e esclerótomo, composta por células progenitoras miogênicas que irão formar a musculatura fetal e adulta, bem como as células-satélite, indicando um papel para esta molécula neste processo (Alvares et al., 2009). A cultura primária de mioblastos de galinha é um modelo bem estabelecido para estudo da miogênese fetal (Hirst and Marcelle, 2015; Sieiro et al., 2017) e foi escolhida para investigar um possível papel do gene *Dact1* nesta fase de formação dos músculos esqueléticos.

As culturas de mioblastos foram incubadas por 1, 2, 3, 4 e 5 dias para acompanhar as diferentes etapas da formação, diferenciação e maturação das fibras musculares de galinha (Fig.6A).

Como pode-se observar, após 1 dia de cultivo as células miogênicas apresentam-se com morfologia oval ou alongada e fazem pouco contato entre si (Fig.6A). Estas células são todas mononucleadas e correspondem a mioblastos ou fibroblastos (Possidonio et al., 2014).

Com 2 dias de diferenciação, já é possível observar um crescimento das células em cultivo, que se dividem quanto à morfologia entre células alongadas distribuídas e células ovais isoladas (Fig.6A). Três tipos celulares são encontrados neste momento: mioblastos, fibroblastos e miotubos jovens multinucleados (Possidonio et al., 2014). Nesta fase, é possível observar alterações no citoesqueleto das células pela marcação com faloidina (Fig.6B), conforme elas começam a se alongar e iniciam o processo de diferenciação miogênica. Faloidina é uma micotoxina que se liga aos

filamentos de actina. Sua utilização na microscopia de fluorescência permite avaliar as funções diretas e indiretas dos filamentos de actina no citoplasma nas suas diferentes fases de formação do polímero (Cooper, 1987; Estes et al., 1981).

O processo de diferenciação miogênica torna-se mais acentuado a partir de 3 dias de cultivo. Neste dia, as culturas são compostas principalmente por miotubos multinucleados, que são mais largos e longos do que aqueles encontrados no dia 2 de cultivo (Fig.6A), havendo poucos mioblastos e fibroblastos entre eles (Possidonio et al., 2014). Esta composição celular é compatível com a expressão do marcador de diferenciação MIOGENINA, que conforme esperado, localiza-se no núcleo da maioria das células em cultura (Fig.6B). Esta proteína é um fator de transcrição muscular que conduz os mioblastos proliferativos a se retirarem do ciclo celular e sofrerem diferenciação miogênica, resultando na fusão dos mesmos e formação de miotubos multinucleados (Zammit, 2017). Portanto, por imunofluorescência foi possível localizar os mioblastos visualmente separados das demais células presentes na cultura, pois apenas eles e outras células da linhagem miogênica são reativos para o anticorpo específico para MIOGENINA.

Entre os dias 4 e 5, são evidentes as alterações na morfologia das células, as quais são compatíveis com o processo de diferenciação miogênica terminal e maturação das fibras musculares. Esta observação é confirmada pela intensa marcação da proteína de diferenciação terminal DESMINA nas células com 5 dias de cultivo (Fig.6B). Desmina é a principal subunidade dos filamentos intermediários e é expressa no músculo estriado esquelético, cardíaco, bem como nas células musculares lisas de embriões e tecidos adultos. A expressão de Desmina é específica para mioblastos pós-mitóticos e miotubos (Yablonka-Reuveni and Nameroff, 1990). Foi observado que mioblastos de galinha são capazes de expressar Desmina antes mesmo de Miosina. Outro fato importante é que sua expressão é mínima em embriões, sendo preponderante durante a miogênese fetal. Dentre as funções de Desmina no processo de diferenciação muscular, estão a miofibrillogênese, suporte mecânico para músculo, localização mitocondrial, regulação da expressão de genes e sinalização intracelular (Costa et al., 2004).

Pelo exposto, demonstramos que a análise morfológica e de expressão de marcadores moleculares validou o sistema da cultura primária de mioblastos,

conforme realizado em nosso laboratório, como sendo capaz de reproduzir o processo de gênese e formação das fibras musculares a partir dos mioblastos fetais de galinha. A partir de então, passamos ao estudo do gene de interesse de nossa pesquisa.

A cultura primária de mioblastos de galinha é uma técnica bem estabelecida em vários laboratórios para estudo da miogênese embrionária e fetal. Esta técnica foi implementada pela primeira vez em nosso laboratório durante este projeto de mestrado.

A cada procedimento de cultura, foram preparadas 5 placas, as quais tiveram seu RNA total extraído durante 5 dias de diferenciação. (Fig.6A.).

Foi realizada análise morfológica das células presentes na cultura de mioblastos primários de galinha em microscopia confocal. Observa-se os núcleos ainda localizados no centro dos miotubos em formação (Fig.6B). Durante a diferenciação celular e subsequente maturação das fibras musculares, os núcleos irão gradativamente se distanciar do centro em direção à periferia da célula. O citoesqueleto das células foi marcado nos locais onde a Faloidina se liga aos filamentos de actina. (Fig.6B).

Por imunofluorescência, os mioblastos são visualmente separados das demais células presentes nas culturas, pois apenas eles e outras células da linhagem miogênica são reativos para os anticorpos específicos Miogenina (MyoG) e Desmina. (Fig.6B).

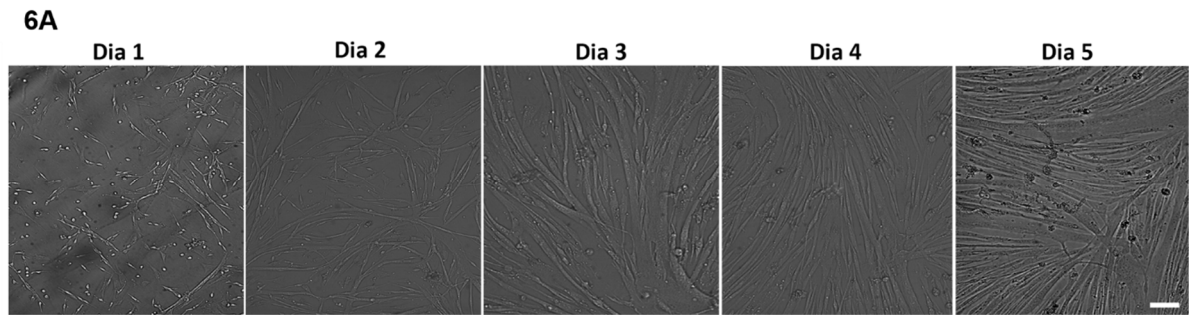


Figura 6A: As diferentes etapas da miogênese esquelética de galinha são recapituladas *in vitro*. Imagens em campo claro das células miogênicas após 1, 2, 3, 4 e 5 dias de incubação. Barra 50um.

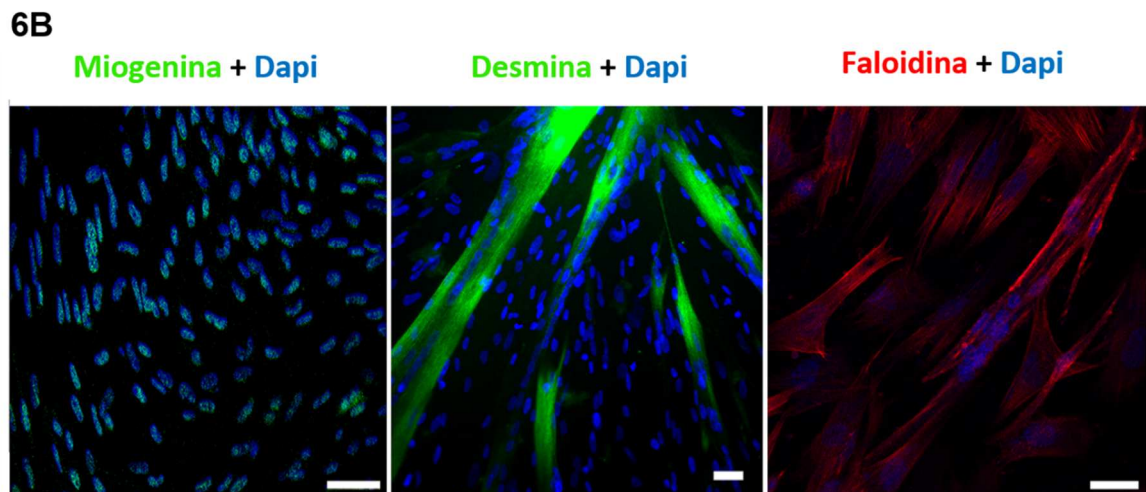


Figura 6B: Imunofluorescência evidenciando a expressão da proteína MIOGENINA (MyoG) nas células com 3 dias de diferenciação, com os núcleos marcados por esta proteína e DAPI. Marcador de diferenciação terminal, Desmina (verde) e Dapi (azul) no 5º dia de diferenciação. Barras 20um. Imunofluorescência com Faloidina evidenciando o citoesqueleto de células com 3 dias de diferenciação, com os núcleos marcados com DAPI. Barra 50um

5.2. ESTUDO DA EXPRESSÃO DE *DACT1* DURANTE A MIOGÊNESE FETAL *IN VITRO*

A expressão de *Dact1* durante as diferentes etapas da diferenciação miogênica de galinha foi inicialmente analisada por RT-PCR. Células cultivadas ao longo dos 5 dias de diferenciação tiveram o perfil de expressão estabelecido para *Dact1*, *Ciclina D1* (marcador de proliferação celular), *MyoD* e *Miogenina* (marcadores miogênicos) e β -actina (gene de expressão endógena). A escolha da *Ciclina D1* como marcador de proliferação celular foi feita considerando que *Dact1* é um modulador da via de sinalização WNT/ β -catenina e que a *Ciclina D1* é um gene alvo clássico desta via (Cheyette et al., 2002; Shtutman et al., 1999). *MyoD* e *Miogenina* (*MyoG*) foram escolhidos para análise uma vez que eles são predominantemente expressos durante as etapas de proliferação e diferenciação miogênicas (Zammit, 2017), respectivamente. Os resultados obtidos mostram que *Dact1*, assim como os marcadores moleculares selecionados para esta análise inicial de expressão gênica, são expressos ao longo dos 5 dias de diferenciação miogênica (Fig. 7A). Este fato corroborou nossa hipótese de participação de *Dact1* na miogênese fetal de galinha, motivando a etapa seguinte desta pesquisa visando localizar a proteína DACT1 nas células em diferentes fases deste processo.

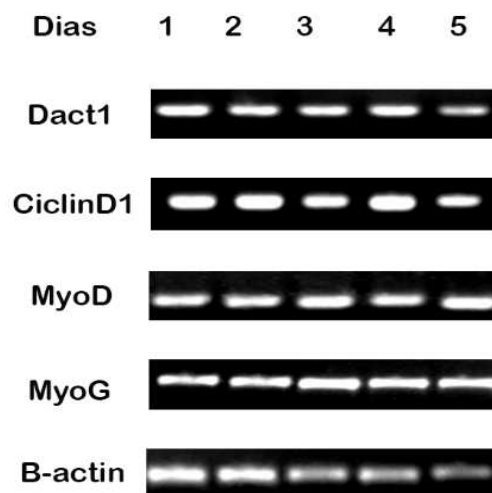


Figura 7: Expressão do gene *Dact1* e de marcadores moleculares de proliferação celular (CiclinaD1) e miogênese esquelética (MyoD e MyoG) durante a miogênese *in vitro* de galinha. O gene de expressão constitutiva β -actina foi empregado para monitorar a integridade das amostras comparadas

5.3. ANÁLISE DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA DACT1

A análise da expressão da proteína DACT1 corroborou a análise inicial de expressão gênica. A Figura 8 mostra que DACT1 é expresso em todos os dias de diferenciação, embora os níveis de expressão e a distribuição espacial desta proteína variem. Com 1 dia, é possível observar a presença da DACT1 no citoplasma e núcleo dos mioblastos (ou fibroblastos, uma vez que não é possível distinguir estes dois tipos celulares), embora em níveis relativamente reduzidos (Fig. 8). No dia 2, a expressão de DACT1 permanece moderada enquanto os miotubos começam a se alongar, mantendo sua distribuição citoplasmática e nuclear, onde assume um aspecto pontilhado (Fig.8- seta). Nos dias 3 e 4 há uma manutenção do aspecto citoplasmático da expressão de DACT1, contudo a expressão nuclear torna-se mais organizada, formando pontos conspícuos onde há acúmulo da proteína (Fig.8- seta). No dia 5, há um aumento intenso dos níveis de DACT1, que parece acompanhar o processo de maturação das fibras musculares. A distribuição de DACT1 no citoplasma destas células assemelha-se ao de proteínas sarcoméricas, sendo possível observar as bandas típicas dos sarcômeros em toda a extensão da miofibrila (Fig.8- cabeça de seta). Como se sabe, os sarcômeros são formados por complexos de proteínas, dentre as quais estão a actina e a miosina, que se alinham em série para formar as miofibrilas localizadas no interior das fibras musculares (Belanto et al., 2014). Este resultado sugere que DACT1 interaja com proteínas dos sarcômeros e costâmeros ou participe da formação dos sarcômeros durante a fase de maturação das fibras musculares esqueléticas. Em adição, a marcação nuclear de DACT1 no dia 5 é organizada e assume o formato de pequenas rosetas que lembram a marcação nucleolar, sugerindo que o papel desta proteína no contexto nuclear sofreu alterações conforme o processo de diferenciação celular progrediu.

Em resumo, os resultados dos ensaios de imunofluorescência revelaram a expressão de DACT1 ao longo de toda a miogênese *in vitro*, com aumento significativo na expressão durante a maturação das miofibras esqueléticas. Estes resultados evidenciaram ainda a translocação da DACT1 para o núcleo das células, o que é compatível com a presença da sequência de localização nuclear (NLS - *nuclear localization signal*) que permite essa translocação (Schubert et al., 2014b).

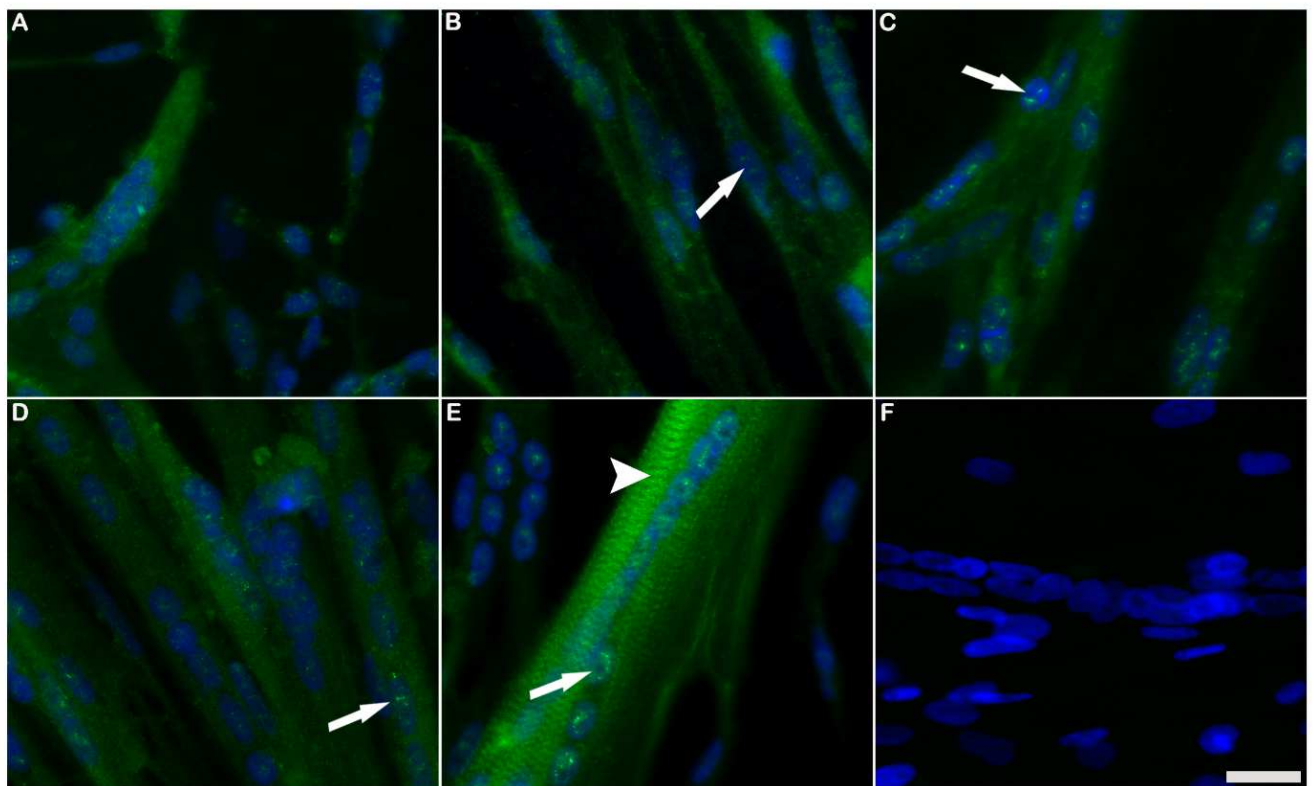


Figura 8: Expressão de DACT1 ao longo da miogênese esquelética de galinha *in vitro*. A-E) Dias 1 a 5 de diferenciação miogênica. F) controle negativo. A imunofluorescência com o anticorpo DACT1 foi marcada também com DAPI para evidênciação dos núcleos celulares. Barra 20uM.

5.4. QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DE *DACT1* AO LONGO DA MIOGÊNESE

Após os estudos de localização da proteína DACT1 nos diferentes dias da miogênese esquelética, foram realizados ensaios de RT-PCR quantitativa para verificar se a forte indução da expressão desta proteína nos últimos dias da cultura é acompanhada por elevação dos níveis da sua transcrição. Em conjunto, foram quantificados os níveis de expressão da *Miogenina* como marcador de diferenciação celular e de *Myomaker*, que codifica uma proteína necessária para a fusão dos mioblastos às miofibras em desenvolvimento (Luo et al., 2015). A Figura 9A mostra que os níveis de expressão de *Dact1* aumentam progressivamente ao longo da miogênese, havendo de fato uma indução da sua expressão nos dias 4 e 5 em relação aos demais dias de cultura ($p < 0,05$). Esta indução ocorre um dia após a indução transcricional da *Miogenina* no dia 4 Figura 9B, contudo os níveis deste fator de transcrição caem logo em seguida, enquanto os níveis de transcritos de *Dact1* permanecem elevados. Conforme esperado, *Myomaker* tem um pico de expressão no dia 3 (Figura 9C), quando há uma intensa fusão dos mioblastos às miofibras em crescimento. De maneira geral, há uma perfeita concordância entre as análises de expressão gênica e proteica.

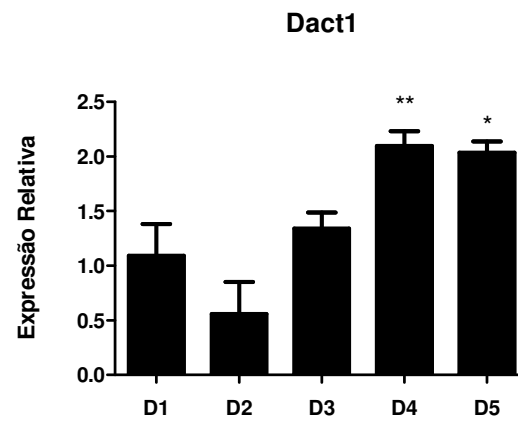
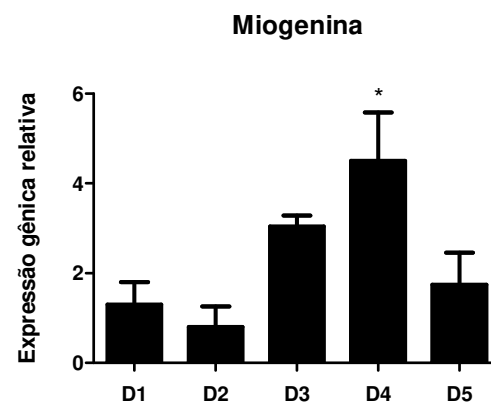
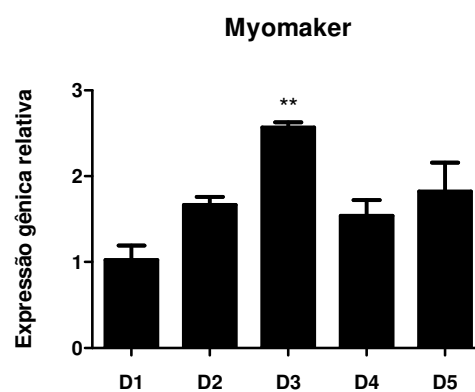
A**B****C**

Figura 9: Expressão de *Dact1*, *Miogenina*, e *Myomaker* por RT-PCR quantitativa ao longo de 5 dias de diferenciação miogênica. As análises de ANOVA de medidas repetidas, seguidas de teste de Tukey. Significância $p < 0,05$ (*) e $p < 0,01$ (**) são indicadas por comparação entre os dias 1-5. Barras representam SEM $\pm$.

5.5. ESTUDO DA EXPRESSÃO DE *DACT1*/DACT1 DURANTE A MIOGÊNESE FETAL DE GALINHA *IN VIVO*.

A identificação de um padrão de expressão gênica e proteica de DACT1 ao longo da miogênese *in vitro* de galinha motivou a investigação da sua expressão *in vivo*. Para tanto, RT-PCR, hibridação *in situ* e imunofluorescência foram realizadas em cortes do músculo peitoral de galinha de embriões no dia 11 de desenvolvimento. Este dia foi escolhido para as análises por tratar-se do dia no qual o músculo esquelético é coletado dos embriões de galinha para preparação das culturas de mioblastos.

A Figura 10A sumariza o conjunto de análises realizadas. As análises de RT-PCR confirmaram a expressão de *Dact1* e dos marcadores moleculares estudados no músculo peitoral (Figura 10A). Na Figura 10B analisamos inicialmente a morfologia da musculatura esquelética do embrião de galinha com 11 dias de desenvolvimento em cortes longitudinais. Nesse estágio o tecido já se apresenta melhor organizado, observa-se os núcleos dos miócitos em diferenciação ainda localizados centralmente nas fibras. Hemácias nucleadas, podem ser observadas no interior dos vasos sanguíneos, bem como as células endoteliais dos mesmos. Este processamento nos permitiu analisar a morfologia do tecido que está sendo coletado para cultura de células, confirmando a presença de outros tipos celulares importantes na organização, formação e manutenção das fibras musculares. Em comparação, a hibridação *in situ* mostra de maneira evidente a expressão de *Dact1* no tecido muscular em desenvolvimento. Figura 10B, havendo um nível maior de expressão dos miotubos em relação aos mioblastos circundantes Figura 10B. Interessantemente, parece haver uma maior concentração de transcritos de *Dact1* nas regiões de contato entre os miotubos e mioblastos em processo de fusão (Figura 10B seta). Em comparação, a marcação de Miogenina é restrita ao núcleo dos miotubos em processo de diferenciação inicial (Figura 10B seta). Os resultados de imunofluorescência evidenciam a expressão da proteína DACT1 principalmente nos miotubos em desenvolvimento (Figura 10C seta), o que está de acordo com a expressão de Desmina nas células que expressam DACT1 (Figura 10C).

Em conjunto, estes resultados apontam para um papel de DACT1 na miogênese esquelética de galinha. Considerando que seus níveis de expressão são mais elevados nas fibras musculares que estão se formando a partir da fusão dos mioblastos e miócitos maduros, é possível que *Dact1* atue durante a fase diferenciação do músculo esquelético. Estudos adicionais são necessários para confirmar a expressão desta proteína em fases mais avançadas da formação dos músculos de galinha.

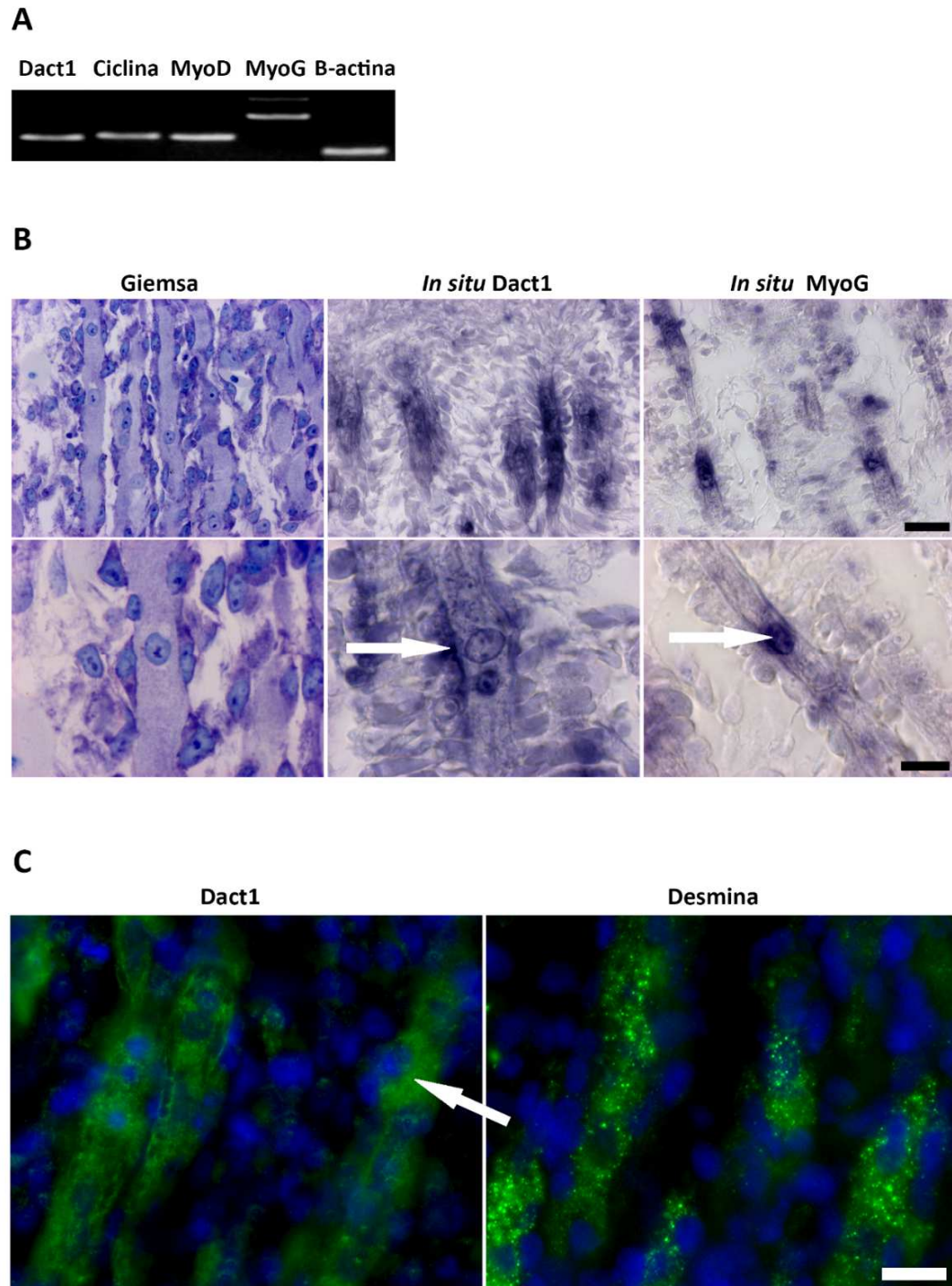


FIGURA 10: **A:** Expressão do RNAm (RNA mensageiro) de *Dact1*, *CiclinaD1*, *MyoD*, *MyoG* e β -*actina* pelo método de RT-PCR na musculatura esquelética de embrião de galinha com 11 dias. **B:** Morfologia do tecido muscular esquelético em historresina utilizando Giemsa como método de coloração. Técnica de Hibridação *in Situ* (ISH) revela a expressão do gene *Dact1*, bem como do fator de transcrição MyoG em células musculares no 11º dia do desenvolvimento do embrião de galinha. Barras 20µm em 40X e 10µm em 100X **C:** Imunofluorescência confirmando a atividade das proteínas DACT1 e Desmina na musculatura peitoral do embrião de galinha com 11 dias. Barra 30µm.

6. DISCUSSÃO

A miogênese esquelética envolve um conjunto de etapas consecutivas e interdependentes, comuns a todos os vertebrados. Ela inicia-se com a proliferação de células progenitoras (mioblastos) por vários ciclos de divisão celular. Estas células interrompem o ciclo celular e se alongam, gerando miócitos capazes de migrar e se aderir a outros miócitos para então fundirem-se, gerando miotubos nascentes, que contém apenas poucos núcleos (Buckingham and Vincent, 2009). Conforme a diferenciação destas células progride, novos núcleos são adicionados e as fibras musculares começam a maturar, gerando as miofibrilas contráteis que irão possibilitar a contração muscular (Buckingham and Vincent, 2009). Moléculas sinalizadoras (morfógenos), fatores de transcrição e proteínas estruturais específicas são recrutadas para trabalhar no momento e local apropriados, garantindo a correta formação dos músculos esqueléticos.

Nosso trabalho revelou que DACT1, uma proteína adaptadora com múltiplas funções no desenvolvimento, metabolismo e manutenção da homeostase pós-natal é expressa ao longo de todas as etapas da miogênese de galinha *in vitro*. Também foi revelada a expressão de DACT1 no tecido muscular peitoral de galinha (E11), indicando que esta molécula é expressa na miogênese *in vivo*.

DACT1 foi inicialmente identificada por sua capacidade de interagir com a proteína Dishevelled, uma molécula central da via de sinalização WNT/ β -catenina (Cheyette et al., 2002; Gloy et al., 2002). Estudos subsequentes revelaram que DACT1 é um importante modulador desta via, tanto no desenvolvimento embrionário quanto em doenças humanas (Clevers, 2006). Portanto, é possível que DACT1 atue modulando esta via para promover o nível de atividade WNT compatível com as diferentes etapas da miogênese. De fato, sabe-se que a formação e reparo dos músculos esqueléticos de vertebrados requer a participação de glicoproteínas da família WNT. Por exemplo, as WNTs são secretadas pelo tubo neural dorsal e ectoderma durante a miogênese embrionária, promovendo o comprometimento de células progenitoras multipotentes com o destino muscular (von Maltzahn et al., 2012). Além disto, as WNTs atuam durante a formação das junções neuromusculares

durante a miogênese fetal, assim como no reparo muscular (Cisternas et al., 2014; Rudnicki and Williams, 2015).

DACT1 também regula uma importante via de sinalização mediada por glicoproteínas WNT, a via de polaridade celular planar (PCP). Seu papel nesta via envolve sua interação com a proteína transmembrana VANGL2, para regular sua atividade (Suriben et al., 2009). Um trabalho recente revelou que VANGL2 é recrutada para promover a formação das junções neuromusculares em um processo mediado por WNT4 e WNT11 (Messeant et al., 2017). Este importante achado sugere que DACT1 possa interagir com VANGL2 para colaborar no estabelecimento das junções neuromusculares. Interessantemente, é justamente durante a miogênese fetal que tais junções são estabelecidas e este período corresponde àquele analisado no contexto deste trabalho.

DACT1 é ainda capaz de interagir com uma gama de cinases, incluindo PKA, PKC, Casein Kinase 1 δ/ϵ , dentre outras (Kivimae et al., 2011). Dentre estas, sabe-se que a via de sinalização cAMP/PKA é crucial para o estabelecimento da população miogênica a partir de células progenitoras dos somitos (Berdeaux et al., 2007). Redução nos níveis de atividade desta via afeta a homeostase muscular, causando um fenótipo distrófico (Hoffman et al., 1987). Portanto, é plausível hipotetizar um papel de DACT1 na modulação da via cAMP/PKA na miogênese esquelética.

A expressão mais intensa de DACT1 demonstrada neste trabalho ocorre na etapa de maturação das fibras musculares, quando há a formação dos sarcômeros que vão compor as miofibrilas contráteis do tecido muscular. Em termos estruturais, DACT1 tem uma fraca homologia com as proteínas musculares Distrofina e Utrofina, que são proteínas citoplasmáticas que ligam o citoesqueleto da fibra muscular à matriz extracelular através da membrana celular (Belanto et al., 2014). Não se sabe até o momento o significado funcional da conservação destes resíduos. Contudo, é possível especular que de alguma maneira DACT1 possa assumir uma conformação espacial que possibilite sua participação na miogênese semelhante àquela das proteínas Distrofina e Utrofina.

Apesar das inúmeras possibilidades de atuação de DACT1 levantadas nesta discussão, estudos funcionais são necessários para comprovar as hipóteses

levantadas. Estudos adicionais serão realizados no futuro para caracterizar os mecanismos de ação de DACT1 na miogênese esquelética de vertebrados.

7. CONCLUSÃO

A cultura primária de mioblastos de galinha recapitula *in vitro* as etapas da miogênese esquelética de vertebrados (proliferação, diferenciação inicial e tardia), conforme revelado pelas análises morfológicas e de expressão de marcadores moleculares.

Dact1 é expresso durante todas as etapas da miogênese de galinha, conforme análises de expressão gênica por RT-PCR quantitativa ao longo dos cinco dias de diferenciação *in vitro*.

A proteína DACT1 acompanha a expressão do gene *Dact1* ao longo de toda a miogênese *in vitro*.

Há um aumento acentuado da expressão de *Dact1*/DACT1 durante a diferenciação terminal e maturação das fibras musculares esqueléticas *in vitro*.

A expressão de *Dact1*/DACT1 também ocorre *in vivo*, conforme demonstrado por estudos de expressão gênica por hibridação *in situ* e proteica por imunofluorescência na musculatura peitoral de embriões de galinha no dia 11 de desenvolvimento.

8. BIBLIOGRAFIA

- Abmayr, S.M., Pavlath, G.K., 2012. Myoblast fusion: lessons from flies and mice. *Development* 139, 641-656.
- Ahima, R.S., Park, H.K., 2015. Connecting Myokines and Metabolism. *Endocrinol Metab (Seoul)* 30, 235-245.
- Aires, M.d.M., 2008. *Fisiologia*, 3.ed. ed.
- Alvares, L.E., Winterbottom, F.L., Jorge, E.C., Rodrigues Sobreira, D., Xavier-Neto, J., Schubert, F.R., Dietrich, S., 2009. Chicken dapper genes are versatile markers for mesodermal tissues, embryonic muscle stem cells, neural crest cells, and neurogenic placodes. *Dev Dyn* 238, 1166-1178.
- Anakwe, K., Robson, L., Hadley, J., Buxton, P., Church, V., Allen, S., Hartmann, C., Harfe, B., Nohno, T., Brown, A.M., Evans, D.J., Francis-West, P., 2003. Wnt signalling regulates myogenic differentiation in the developing avian wing. *Development* 130, 3503-3514.
- Angers, S., Moon, R.T., 2009. Proximal events in Wnt signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 468-477.
- Aulehla, A., Pourquié, O., 2006. On periodicity and directionality of somitogenesis. *Anat Embryol (Berl)* 211 Suppl 1, 3-8.
- Baquero-Perez, B., Kuchipudi, S.V., Nelli, R.K., Chang, K.C., 2012. A simplified but robust method for the isolation of avian and mammalian muscle satellite cells, *BMC Cell Biol*, p. 16.
- Belanto, J.J., Mader, T.L., Eckhoff, M.D., Strandjord, D.M., Banks, G.B., Gardner, M.K., Lowe, D.A., Ervasti, J.M., 2014. Microtubule binding distinguishes dystrophin from utrophin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 5723-5728.
- Ben-Yair, R., Kahane, N., Kalcheim, C., 2003. Coherent development of dermomyotome and dermis from the entire mediolateral extent of the dorsal somite. *Development* 130, 4325-4336.
- Ben-Yair, R., Kalcheim, C., 2005. Lineage analysis of the avian dermomyotome sheet reveals the existence of single cells with both dermal and muscle progenitor fates. *Development* 132, 689-701.
- Ben-Yair, R., Kalcheim, C., 2008. Notch and bone morphogenetic protein differentially act on dermomyotome cells to generate endothelium, smooth, and striated muscle. *J Cell Biol* 180, 607-618.
- Berdeaux, R., Goebel, N., Banaszynski, L., Takemori, H., Wandless, T., Shelton, G.D., Montminy, M., 2007. SIK1 is a class II HDAC kinase that promotes survival of skeletal myocytes. *Nat Med* 13, 597-603.
- Borello, U., Berarducci, B., Murphy, P., Bajard, L., Buffa, V., Piccolo, S., Buckingham, M., Cossu, G., 2006. The Wnt/beta-catenin pathway regulates Gli-mediated Myf5 expression during somitogenesis. *Development* 133, 3723-3732.
- Brand-Saberi, B., Christ, B., 1999. Genetic and epigenetic control of muscle development in vertebrates. *Cell Tissue Res* 296, 199-212.
- Brott, B.K., Sokol, S.Y., 2005. Frigo proteins: modulators of Wnt signaling in vertebrate development. *Differentiation* 73, 323-329.

- Bryson-Richardson, R.J., Currie, P.D., 2008. The genetics of vertebrate myogenesis. *Nature Reviews Genetics* 9, 632-646.
- Buckingham, M., 2001. Skeletal muscle formation in vertebrates. *Curr Opin Genet Dev* 11, 440-448.
- Buckingham, M., 2007. Skeletal muscle progenitor cells and the role of Pax genes. *C R Biol* 330, 530-533.
- Buckingham, M., Montarras, D., 2008. Skeletal muscle stem cells. *Curr Opin Genet Dev* 18, 330-336.
- Buckingham, M., Vincent, S.D., 2009. Distinct and dynamic myogenic populations in the vertebrate embryo. *Curr Opin Genet Dev* 19, 444-453.
- Capetanaki, Y., Milner, D.J., Weitzer, G., 1997. Desmin in muscle formation and maintenance: knockouts and consequences. *Cell Struct Funct* 22, 103-116.
- Carlson, B.M., 2014. *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento*, 5edição ed.
- Carneiro, L.C.J.e.J., 2013. *Histologia Básica*, 12 ed. ed.
- Chal, J., Guillot, C., Pourquié, O., 2017. PAPC couples the segmentation clock to somite morphogenesis by regulating N-cadherin dependent adhesion. *Development*.
- Cheyette, B.N.R., Waxman, J.S., Miller, J.R., Takemaru, K.I., Sheldahl, L.C., Khlebtsova, N., Fox, E.P., Earnest, T., Moon, R.T., 2002. Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Developmental Cell* 2, 449-461.
- Christ, B., Huang, R., Scaal, M., 2004. Formation and differentiation of the avian sclerotome. *Anat Embryol (Berl)* 208, 333-350.
- Christ, B., Huang, R., Wilting, J., 2000. The development of the avian vertebral column. *Anat Embryol (Berl)* 202, 179-194.
- Christ, B., Ordahl, C.P., 1995. Early stages of chick somite development. *Anat Embryol (Berl)* 191, 381-396.
- Cisternas, P., Henriquez, J.P., Brandan, E., Inestrosa, N.C., 2014. Wnt signaling in skeletal muscle dynamics: myogenesis, neuromuscular synapse and fibrosis. *Mol Neurobiol* 49, 574-589.
- Clevers, H., 2006. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell* 127, 469-480.
- Conover W.J and Iman, R.L., 1981. Rank transformations as a bridge between parametric and nonparametric statistics. *The American Statistician* 35, 124-129.
- Consonni, S.R., Rosa, R.G., Nascimento, M.A., Vinagre, C.M., Toledo, O.M., Joazeiro, P.P., 2012. Recovery of the pubic symphysis on primiparous young and multiparous senescent mice at postpartum. *Histol Histopathol* 27, 885-896.
- Cooper, J.A., 1987. Effects of cytochalasin and phalloidin on actin. *J Cell Biol* 105, 1473-1478.
- Cossu, G., Molinaro, M., 1987. Cell heterogeneity in the myogenic lineage. *Curr Top Dev Biol* 23, 185-208.

Cossu, G., Tajbakhsh, S., Buckingham, M., 1996. How is myogenesis initiated in the embryo? *Trends in Genetics* 12, 218-223.

Costa, M.L., Escaleira, R., Cataldo, A., Oliveira, F., Mermelstein, C.S., 2004. Desmin: molecular interactions and putative functions of the muscle intermediate filament protein. *Braz J Med Biol Res* 37, 1819-1830.

DeLise, A.M., Fischer, L., Tuan, R.S., 2000. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis and Cartilage* 8, 309-334.

Estes, J.E., Selden, L.A., Gershman, L.C., 1981. Mechanism of action of phalloidin on the polymerization of muscle actin. *Biochemistry* 20, 708-712.

Fisher, D.A., Kivimae, S., Hoshino, J., Suriben, R., Martin, P.M., Baxter, N., Cheyette, B.N., 2006. Three Dact gene family members are expressed during embryonic development and in the adult brains of mice. *Dev Dyn* 235, 2620-2630.

Fishman, R.A., 1994. *Myology: Basic and clinical*, second edition, vols 1 and 2. Edited by Andrew G. Engel and Clara Franzini-Armstrong, New York, McGraw-Hill, 1994, 1937 pp. illustrated.

Gilbert, S.F., 2003. *Biologia do Desenvolvimento*, 7^o edição ed.

Gloy, J., Hikasa, H., Sokol, S.Y., 2002. Frodo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol* 4, 351-357.

Gros, J., Scaal, M., Marcelle, C., 2004. A two-step mechanism for myotome formation in chick. *Dev Cell* 6, 875-882.

Gros, J., Serralbo, O., Marcelle, C., 2009. WNT11 acts as a directional cue to organize the elongation of early muscle fibres. *Nature* 457, 589-593.

Guo, Y.L., Shan, B.E., Guo, W., Dong, Z.M., Zhou, Z., Shen, S.P., Guo, X., Liang, J., Kuang, G., 2017. Aberrant methylation of DACT1 and DACT2 are associated with tumor progression and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Biomed Sci* 24, 6.

Hamburger, V., Hamilton, H.L., 1992. A SERIES OF NORMAL STAGES IN THE DEVELOPMENT OF THE CHICK-EMBRYO, (REPRINTED FROM JOURNAL OF MORPHOLOGY, VOL 88, 1951). *Developmental Dynamics* 195, 231-&.

Hirst, C.E., Marcelle, C., 2015. The avian embryo as a model system for skeletal myogenesis. *Results Probl Cell Differ* 56, 99-122.

Hoffman, E.P., Brown, R.H., Jr., Kunkel, L.M., 1987. Dystrophin: the protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51, 919-928.

Hunter, N.L., Hikasa, H., Dymecki, S.M., Sokol, S.Y., 2006. Vertebrate homologues of Frodo are dynamically expressed during embryonic development in tissues undergoing extensive morphogenetic movements. *Dev Dyn* 235, 279-284.

Iannotti, J.P., Parker, R., 2013. *The Netter Collection of Medical Illustrations: Musculoskeletal System*, Volume 6, Part III - Biology and Systemic Diseases - 9781416063797 | US Elsevier Health Bookshop. Saunders.

Jang, Y.N., Baik, E.J., 2013. JAK-STAT pathway and myogenic differentiation, JAKSTAT.

Jia, Y., Yang, Y., Brock, M.V., Zhan, Q., Herman, J.G., Guo, M., 2013. Epigenetic regulation of DACT2, a key component of the Wnt signalling pathway in human lung cancer. *J Pathol* 230, 194-204.

Jiang, X., Tan, J., Li, J., Kivimae, S., Yang, X., Zhuang, L., Lee, P.L., Chan, M.T., Stanton, L.W., Liu, E.T., Cheyette, B.N., Yu, Q., 2008a. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* 13, 529-541.

Jiang, X., Tan, J., Li, J.S., Kivimae, S., Yang, X.J., Zhuang, L., Lee, P.L., Chan, M.T.W., Stanton, L.W., Liu, E.T., Cheyette, B.N.R., Yu, Q., 2008b. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell* 13, 529-541.

Kalcheim, C., Ben-Yair, R., 2005. Cell rearrangements during development of the somite and its derivatives. *Current Opinion in Genetics & Development* 15, 371-380.

Kardon, G., Harfe, B.D., Tabin, C.J., 2003. A Tcf4-positive mesodermal population provides a prepattern for vertebrate limb muscle patterning. *Dev Cell* 5, 937-944.

Kivimae, S., Yang, X.Y., Cheyette, B.N., 2011. All Dact (Dapper/Frodo) scaffold proteins dimerize and exhibit conserved interactions with Vangl, Dvl, and serine/threonine kinases. *BMC Biochem* 12, 33.

Lagathu, C., Christodoulides, C., Virtue, S., Cawthorn, W.P., Franzin, C., Kimber, W.A., Nora, E.D., Campbell, M., Medina-Gomez, G., Cheyette, B.N.R., Vidal-Puig, A.J., Sethi, J.K., 2009. Dact1, a Nutritionally Regulated Preadipocyte Gene, Controls Adipogenesis by Coordinating the Wnt/beta-Catenin Signaling Network. *Diabetes* 58, 609-619.

Larsen, W.J., 2001. *Human Embryology*, 3rd ed. ed.

Lassar, A., Münsterberg, A., 1994. Wiring diagrams: regulatory circuits and the control of skeletal myogenesis. *Curr Opin Cell Biol* 6, 432-442.

Lim, R.W., Hauschka, S.D., 1984. A rapid decrease in epidermal growth factor-binding capacity accompanies the terminal differentiation of mouse myoblasts in vitro. *J Cell Biol* 98, 739-747.

Liu, Y., Zhang, J., Yu, W., Zhang, X., Wang, G., Zhao, Z., 2016. Dapper homolog 1 alpha suppresses metastasis ability of gastric cancer through inhibiting planar cell polarity pathway. *Oncotarget* 7, 81423-81434.

Logan, C.Y., Nusse, R., 2004. The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 781-810.

Ludolph, D.C., Konieczny, S.F., 1995. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. *FASEB J* 9, 1595-1604.

Luo, W., Li, E., Nie, Q., Zhang, X., 2015. Myomaker, Regulated by MYOD, MYOG and miR-140-3p, Promotes Chicken Myoblast Fusion. *Int J Mol Sci* 16, 26186-26201.

Mermelstein, C.S., Portilho, D.M., Mendes, F.A., Costa, M.L., Abreu, J.G., 2007. Wnt/beta-catenin pathway activation and myogenic differentiation are induced by cholesterol depletion. *Differentiation* 75, 184-192.

- Messeant, J., Ezan, J., Delers, P., Glebov, K., Marchiol, C., Lager, F., Renault, G., Tissir, F., Montcouquiol, M., Sans, N., Legay, C., Strochlic, L., 2017. Wnt proteins contribute to neuromuscular junction formation through distinct signaling pathways. *Development* 144, 1712-1724.
- Miller, J.B., Everitt, E.A., Smith, T.H., Block, N.E., Dominov, J.A., 1993. Cellular and molecular diversity in skeletal muscle development: news from in vitro and in vivo. *Bioessays* 15, 191-196.
- Miller, J.R., Hocking, A.M., Brown, J.D., Moon, R.T., 1999. Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18, 7860-7872.
- Moncaut, N., Rigby, P.W., Carvajal, J.J., 2013. Dial M(RF) for myogenesis. *FEBS J* 280, 3980-3990.
- Montarras, D., Morgan, J., Collins, C., Relaix, F., Zaffran, S., Cumano, A., Partridge, T., Buckingham, M., 2005. Direct isolation of satellite cells for skeletal muscle regeneration. *Science* 309, 2064-2067.
- Montgomery, D.C., 1991. Design and Analysis of Experiments, 3 ed. Montgomery, D.C., 1991. Design and Analysis of Experiments, 3 ed.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., De Ferrari, G.V., Kaykas, A., 2004. WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5, 691-701.
- Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D., 1989a. A NEW DNA-BINDING AND DIMERIZATION MOTIF IN IMMUNOGLOBULIN ENHANCER BINDING, DAUGHTERLESS, MYOD, AND MYC PROTEINS. *Cell* 56, 777-783.
- Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D., 1989b. INTERACTIONS BETWEEN HETEROLOGOUS HELIX-LOOP-HELIX PROTEINS GENERATE COMPLEXES THAT BIND SPECIFICALLY TO A COMMON DNA-SEQUENCE. *Cell* 58, 537-544.
- Münsterberg, A.E., Kitajewski, J., Bumcrot, D.A., McMahon, A.P., Lassar, A.B., 1995. Combinatorial signaling by Sonic hedgehog and Wnt family members induces myogenic bHLH gene expression in the somite. *Genes Dev* 9, 2911-2922.
- Münsterberg, A.E., Lassar, A.B., 1995. Combinatorial signals from the neural tube, floor plate and notochord induce myogenic bHLH gene expression in the somite. *Development* 121, 651-660.
- Neville, C., Rosenthal, N., McGrew, M., Bogdanova, N., Hauschka, S., 1997. Skeletal muscle cultures. *Methods Cell Biol* 52, 85-116.
- Okerlund, N.D., Kivimae, S., Tong, C.K., Peng, I.F., Ullian, E.M., Cheyette, B.N., 2010. Dact1 is a postsynaptic protein required for dendrite, spine, and excitatory synapse development in the mouse forebrain. *J Neurosci* 30, 4362-4368.
- Otto, A., Schmidt, C., Patel, K., 2006. Pax3 and Pax7 expression and regulation in the avian embryo. *Anat Embryol (Berl)* 211, 293-310.
- Ozbudak, E.M., Pourquié, O., 2008. The vertebrate segmentation clock: the tip of the iceberg. *Curr Opin Genet Dev* 18, 317-323.
- Pajtler, K., Bohrer, A., Maurer, J., Schorle, H., Schramm, A., Eggert, A., Schulte, J.H., 2010. Production of chick embryo extract for the cultivation of murine neural crest stem cells. *J Vis Exp*.

- Parker, M.H., Seale, P., Rudnicki, M.A., 2003. Looking back to the embryo: Defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nature Reviews Genetics* 4, 497-507.
- Perry, R.L., Rudnick, M.A., 2000. Molecular mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. *Front Biosci* 5, D750-767.
- Possidonio, A.C., Soares, C.P., Portilho, D.M., Midlej, V., Benchimol, M., Butler-Browne, G., Costa, M.L., Mermelstein, C., 2014. Differences in the expression and distribution of flotillin-2 in chick, mice and human muscle cells. *PLoS One* 9, e103990.
- Pourquié, O., Coltey, M., Bréant, C., Le Douarin, N.M., 1995. Control of somite patterning by signals from the lateral plate. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92, 3219-3223.
- Pourquié, O., Fan, C.M., Coltey, M., Hirsinger, E., Watanabe, Y., Bréant, C., Francis-West, P., Brickell, P., Tessier-Lavigne, M., Le Douarin, N.M., 1996. Lateral and axial signals involved in avian somite patterning: a role for BMP4. *Cell* 84, 461-471.
- Praud, C., Montarras, D., Pinset, C., Sebillé, A., 2003. Dose effect relationship between the number of normal progenitor muscle cells grafted in mdx mouse skeletal striated muscle and the number of dystrophin-positive fibres. *Neurosci Lett* 352, 70-72.
- Rabadán, M.A., Herrera, A., Fanlo, L., Usieto, S., Carmona-Fontaine, C., Barriga, E.H., Mayor, R., Pons, S., Martí, E., 2016. Delamination of neural crest cells requires transient and reversible Wnt inhibition mediated by Dact1/2, *Development*, pp. 2194-2205.
- Rios, A.C., Serralbo, O., Salgado, D., Marcelle, C., 2011. Neural crest regulates myogenesis through the transient activation of NOTCH. *Nature* 473, 532-535.
- Rudnicki, M.A., Schnegelsberg, P.N., Stead, R.H., Braun, T., Arnold, H.H., Jaenisch, R., 1993. MyoD or Myf-5 is required for the formation of skeletal muscle. *Cell* 75, 1351-1359.
- Rudnicki, M.A., Williams, B.O., 2015. Wnt signaling in bone and muscle. *Bone* 80, 60-66.
- Rutledge, B.J., Zhang, K., Bier, E., Jan, Y.N., Perrimon, N., 1992. The *Drosophila* spitz gene encodes a putative EGF-like growth factor involved in dorsal-ventral axis formation and neurogenesis. *Genes Dev* 6, 1503-1517.
- Sabourin, L.A., Rudnicki, M.A., 2000. The molecular regulation of myogenesis. *Clin Genet* 57, 16-25.
- Sastry, S.K., Horwitz, A.F., 1996. Adhesion-growth factor interactions during differentiation: an integrated biological response. *Dev Biol* 180, 455-467.
- Schmidt, M., Tanaka, M., Munsterberg, A., 2000. Expression of (beta)-catenin in the developing chick myotome is regulated by myogenic signals. *Development* 127, 4105-4113.
- Schubert, F.R., Sobreira, D.R., Janousek, R.G., Alvares, L.E., Dietrich, S., 2014a. Dact genes are chordate specific regulators at the intersection of Wnt and Tgf-beta signaling pathways. *BMC Evol Biol* 14, 157.
- Schubert, F.R., Sobreira, D.R., Janousek, R.G., Alvares, L.E., Dietrich, S., 2014b. Dact genes are chordate specific regulators at the intersection of Wnt and Tgf-beta signaling pathways. *Bmc Evolutionary Biology* 14.

- Schussel, J.L., Kalinke, L.P., Sassi, L.M., de Oliveira, B.V., Pedruzzi, P.A., Olandoski, M., Alvares, L.E., Garlet, G.P., Trevilatto, P.C., 2015. Expression and epigenetic regulation of DACT1 and DACT2 in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark* 15, 11-17.
- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., Ben-Ze'ev, A., 1999. The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway, *Proc Natl Acad Sci U S A*, pp. 5522-5527.
- Sieiro, D., Veron, N., Marcelle, C., 2017. The chicken embryo as an efficient model to test the function of muscle fusion genes in amniotes. *PLoS One* 12, e0177681.
- Silversthorh, D.U., 2010. *Fisiologia Humana-Uma Abordagem Integrada*, 5ª edição ed.
- Slater, C.R., 1976. Control of myogenesis in vitro by chick embryo extract. *50*, 264-284.
- Snow, M.H., 1990. Satellite cell response in rat soleus muscle undergoing hypertrophy due to surgical ablation of synergists. *Anat Rec* 227, 437-446.
- Song, A., Wang, Q., Goebel, M.G., Harrington, M.A., 1998. Phosphorylation of nuclear MyoD is required for its rapid degradation. *Mol Cell Biol* 18, 4994-4999.
- Stockdale, F.E., 1992. Myogenic cell lineages. *Dev Biol* 154, 284-298.
- Summers, P.J., Ashmore, C.R., Lee, Y.B., Ellis, S., 1985. STRETCH-INDUCED GROWTH IN CHICKEN WING MUSCLES - ROLE OF SOLUBLE GROWTH-PROMOTING FACTORS. *Journal of Cellular Physiology* 125, 288-294.
- Suriben, R., Kivimae, S., Fisher, D.A., Moon, R.T., Cheyette, B.N., 2009. Posterior malformations in Dact1 mutant mice arise through misregulated Vangl2 at the primitive streak. *Nat Genet* 41, 977-985.
- Towers, M., Fisunov, G., Tickle, C., 2009. Expression of E2F transcription factor family genes during chick wing development. *Gene Expr Patterns* 9, 528-531.
- von Maltzahn, J., Chang, N.C., Bentzinger, C.F., Rudnicki, M.A., 2012. Wnt signaling in myogenesis. *Trends Cell Biol* 22, 602-609.
- Véron, N., Qu, Z., Kipen, P.A., Hirst, C.E., Marcelle, C., 2015. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Dev Biol* 407, 68-74.
- Wang, S., Dong, Y., Zhang, Y., Wang, X., Xu, L., Yang, S., Li, X., Dong, H., Su, L., Ng, S.S., Chang, Z., Sung, J.J., Zhang, X., Yu, J., 2015. DACT2 is a functional tumor suppressor through inhibiting Wnt/beta-catenin pathway and associated with poor survival in colon cancer. *Oncogene* 34, 2575-2585.
- Waxman, J.S., Hocking, A.M., Stoick, C.L., Moon, R.T., 2004. Zebrafish Dapper1 and Dapper2 play distinct roles in Wnt-mediated developmental processes. *Development* 131, 5909-5921.
- Wilting, J., Brand-Saberi, B., Huang, R., Zhi, Q., Köntges, G., Ordahl, C.P., Christ, B., 1995. Angiogenic potential of the avian somite. *Dev Dyn* 202, 165-171.
- Wilting, J., Papoutsis, M., Othman-Hassan, K., Rodriguez-Niedenführ, M., Pröls, F., Tomarev, S.I., Eichmann, A., 2001. Development of the avian lymphatic system. *Microsc Res Tech* 55, 81-91.
- Wilting, J., Schneider, M., Papoutsis, M., Alitalo, K., Christ, B., 2000. An avian model for studies of embryonic lymphangiogenesis. *Lymphology* 33, 81-94.

- Wodarz, A., Nusse, R., 1998. Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 59-88.
- Yablonka-Reuveni, Z., 1995. Development and postnatal regulation of adult myoblasts. *Microsc Res Tech* 30, 366-380.
- Yablonka-Reuveni, Z., Nameroff, M., 1990. Temporal differences in desmin expression between myoblasts from embryonic and adult chicken skeletal muscle. *Differentiation* 45, 21-28.
- Yablonka-Reuveni, Z., Paterson, B.M., 2001. MyoD and myogenin expression patterns in cultures of fetal and adult chicken myoblasts. *J Histochem Cytochem* 49, 455-462.
- Yablonka-Reuveni, Z., Quinn, L.S., Nameroff, M., 1987. Isolation and Clonal Analysis of Satellite Cells from Chicken Pectoralis Muscle. *Dev Biol* 119, 252-259.
- Yablonka-Reuveni, Z., Seger, R., Rivera, A.J., 1999. Fibroblast growth factor promotes recruitment of skeletal muscle satellite cells in young and old rats. *J Histochem Cytochem* 47, 23-42.
- Yann Fedon, A.B., Stéphanie Gay, Barbara Vernus, Francis Bacou and Henri Bernardi, 2012. *Skeletal Muscle - From Myogenesis to Clinical Relations*.
- Yin, X., Xiang, T., Li, L., Su, X., Shu, X., Luo, X., Huang, J., Yuan, Y., Peng, W., Oberst, M., Kelly, K., Ren, G., Tao, Q., 2013. DACT1, an antagonist to Wnt/beta-catenin signaling, suppresses tumor cell growth and is frequently silenced in breast cancer. *Breast Cancer Res* 15, R23.
- Yu, Y., Yan, W., Liu, X., Jia, Y., Cao, B., Lv, Y., Brock, M.V., Herman, J.G., Licchesi, J., Yang, Y., Guo, M., 2014. DACT2 is frequently methylated in human gastric cancer and methylation of DACT2 activated Wnt signaling. *Am J Cancer Res* 4, 710-724.
- Yusuf, F., Brand-Saberi, B., 2006. The eventful somite: patterning, fate determination and cell division in the somite. *Anat Embryol (Berl)* 211 Suppl 1, 21-30.
- Yusuf, F., Brand-Saberi, B., 2012. Myogenesis and muscle regeneration. *Histochem Cell Biol* 138, 187-199.
- Zammit, P.S., 2017. Function of the myogenic regulatory factors Myf5, MyoD, Myogenin and MRF4 in skeletal muscle, satellite cells and regenerative myogenesis. *Semin Cell Dev Biol* 72, 19-32.
- Zhang, L., Gao, X., Wen, J., Ning, Y., Chen, Y.G., 2006. Dapper 1 antagonizes Wnt signaling by promoting dishevelled degradation. *J Biol Chem* 281, 8607-8612.
- Zhang, L., Zhou, H., Su, Y., Sun, Z., Zhang, H., Zhang, Y., Ning, Y., Chen, Y.G., Meng, A., 2004. Zebrafish Dpr2 inhibits mesoderm induction by promoting degradation of nodal receptors. *Science* 306, 114-117.
- Zhang, X., Yang, Y., Liu, X., Herman, J.G., Brock, M.V., Licchesi, J.D., Yue, W., Pei, X., Guo, M., 2013. Epigenetic regulation of the Wnt signaling inhibitor DACT2 in human hepatocellular carcinoma. *Epigenetics* 8, 373-382.

9. ANEXOS

9.1. Resultado dos Sequenciamentos

Gg *Dact1* clone sequence:

A região sequenciada abrange todo o segmento marcado abaixo.

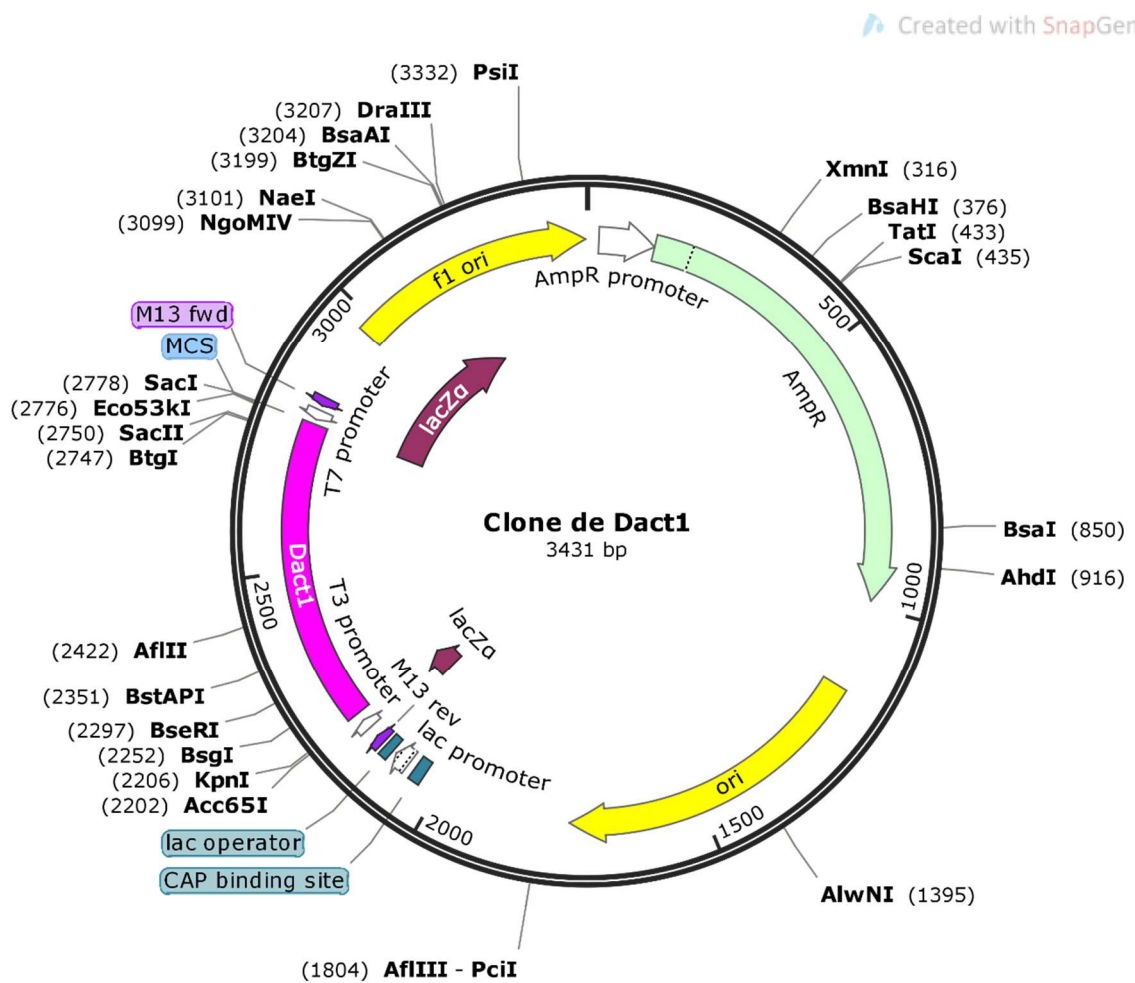
```
>gi|113206173|ref|NM_001044692.1| Gallus gallus dapper, antagonist of
beta-catenin, homolog 1 (Xenopus laevis) (DACT1), mRNA
CCCATTTCGCGAGCTGTAGCGGCGGGCGGAGCGGAGCGGCCGAGCCGCGATGAAGCCGAGCCCGGCGGG
CGCCGCCGCGGCGGGGCGGGGTTGGGACAGGCGGCGGGGGGACCCGATGCTCGCTGGAGGGAGAAGGGC
GAAGCGGAGGCGGAGAGGCAGCGAACCCGCGAGCGGCTGGAGGCCACGCTGGCCGGGCTGGGCGAGCTGG
AGTACCTGAGGCAGCGGCAGGAGCTGCTGGTGAAGAGCCTCCTGCTGCGGAGAGCCCCGGGAGCTCAGGG
CGGCCGCGGGGAGCAGCAGGGCGAGGGGCCGCCGCCGCGCAGTCTGGAGGAGAAGTTCCTGGAGGAGAAC
ATCCTCCTGCTGCGGCGGCAGCTGAACTGCTTGAGGAGGAGGGATGCTGGCCTATTAAATCAGTTGCAAG
AGCTAGATAAGCAAATTAGTGACCTCCGTCTGGACGTGGAAAAACGACAGATGAACACCTTGAGACAGA
CAGTCGTCCAAGTTCAGGGTTTTATGAGCTGAGTGATGGAGCTTCTGGATCGCTCTCCAATTCGTCTAAC
TCTGTCTTCAGTGAGTGTTTATCCAGTTGCCATTCTAGCACTTGCTTTTGCAGCCCTTTGGAGGCAACAC
TGAATATCTCAGATGGACGCCCTAAATCTGCAGATCTCATAGGCTGGATGGATTATAATAAAGAAAGCCA
ACGTGAGGACCAGACCGCGGGCTCTGTCTGTCGCTCTTTGTCCACACCGCACTCAAATTCCTCGATGTC
GTTGCAGATGTCCACCCAAAGTACCAGTGTGATCTGGTGTCTAAAAACGGGAGTGACGTCTACCGGTACC
CCAGCCCACTCCATGCGGTAGCTGTGCAGAGTCCCATGTTCTCTCCCTGTGACTGAGAACCCCCAGCA
AGAAGAGGAGAGGCTTGGCTGTGACATTACCGATGTTTTCGCCACATCTGAAACAGACTCAGGAAAAGCA
ACCGATGCCTTTCTCCCGCGGGCTCCTGGCCTGCCTCGTGCCCGTCTGCCAGCAAGAGGATAGACGGCT
ACATCTTAAGCCTGGTTCAGAGAAAGACTCACTCTGTAAGGACTAACAAACCAAGGACAAGTCTCAACGC
CGATCCCACCAAGGGGATCTTGCGACATGGCAGCATGTGTGTCAGGCAGACTGCCGGGGTGGTTTCACAC
AGTAGCGTCGTAAACCTGAAGAGCGCGAAGCAAGTGAGCTTGCCATCCAGCGGGGCAACTGCTTCTGACA
ACACGGCTCCTTCCCCGCTCAAGCAGAGGCCGAGGGAAGCGGGTGGCGAGCAGGTGGAGAGCAGAAAGGT
GCTTTTGCCGGCAGCTTTTCCACCCAGCGAACTCCAGAGCAAGCATCAGCCGCGGGGTGCCAAGGCAGTG
CCTCCAGAGCTCAGCCGACACGCGGTGGCTGCCACGGGGGATGTCCCCAAGGAAGGCAGCCAGCACTTCG
CTGCATCTCCCAAAGAGAGCCCGGGGAAGCCAGTGGTGTGTCAGCCAGAGACCAGGGTCAGCCAGCCTCC
CAAAAAGGTCTGTGAAGGGCAGCTCGCAGGCGGCTCACTCGTCATCGCCTCCTGTGGAGGAGAGGGCC
GCGCTGGACTTCAAAGCGAGGGCTCTTCTCTCAGAGCCTCGATGACGGATTGCTGGTGAATGCCAGT
ACATCCCAGCCCAGCAGCAAAGCGTTAAGCTGCACAAAGGCACCAGGAACGTCAAGATTTTGAAGAGCTC
TGCGCTGAAGCACAGGCCACACCTTGCCAAATGGGCTTGAGAACGGTGCTCAGGCCCTGCGGGAGAAAGGC
AAGCCCATCAGCAAGAAGTGCCGCTTTTCTGATGAGTTGGATACAAATAAGAACTGAAAAAGCCCTCCT
CAAGGGGAAGCGCGGCGGCGGCCTGCAGCCAGAGTCAGGCCTCCAGGGGCGGCCAACCGGCCTGCA
TAAATCTGTGGTGAGGTGCGACGGACACGGCCGGGAGGTGGTGGTGCCAAACCAAAACACAAGCGGGCC
GACTACCGCCGGTGGAAGTCTCGGCGGAGATCTCCTATGAGGAGGCCCTGCGGAGGGCAAGGAGGAACC
GGAGGGATGGTGTAGGAGTCTACGCTCAAGTTCTCTGCCATACGTCAGCCCGTACGCCTACGTGGCCAG
TGACTCGGAGTACTCGGCAGAGTGCGAATCTCTGTTCCACTCCACCGTGGTGGACACGAGTGAGGATGAG
CAGAGCAACTACACGACGAAGTCTTTGGAGACAGCGAGTCGAGCCTGAGTGAGGTGGAGTTCGTGCGGG
AGAGCACCACCAGCGACTCCGATGAGAGCGGAGGTCTCATTTGGTCCCAGTTTGTCCAGACACTCCC
CATCCAGACCGTCACTGCTCCGGAGCTGCATGAAAACGCAGCAAAGGCCTTTGTCAAAATCAAAGCCTCC
CATAACCTCAAGAAGAAAATCCTGCGCTTTTGGTCAAGGCTCCCTGAAGCTCATGACGACCGTCTAGTGGA
GTGACTTGGTGGAAATGTATCTGTTTCTGCTTTGGGAAGCAAGGTGCTTTTGTGTACATATTTCCACAGAT
TTTTTTTTTTTTTATACAAATATTTAAACTTAAGGTAAATTATGTCGCTTGTCTTCAGAACTGGGGTGG
ATACTAGTGCCTTTTAAATGGAAATAAAAGACCATTACACTTGTTTAAAAAACATAACGCTGCCATTC
AGTGGTGAACAGCCTCCAGTGATGGTGTGAGAAGGCTTTGAAAGAAAGGCTCA
```

SacI

KpnI

9.2. VETOR DE CLONAGEM

- Vector – pBluescript
- *Insert size: 595 pb*
- Use T3 for *antisense*.



9.3. CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada **Estudo da expressão dos genes Dact1 e Dact2 em cultura primária de mioblastos de galinha (Gallus gallus)**, registrada com o nº **4236-1**, sob a responsabilidade de **Profa. Dra. Lúcia Elvira Alvares e Renata Erbert Contriciani**, 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 **08 de junho de 2016**.

Finalidade:	() Ensino () Pesquisa Científica
Vigência do projeto:	20/06/2016-01/02/2018
Vigência da autorização para manipulação animal:	
Espécie / linhagem/ raça:	embriões de galinha
No. de animais:	50
Peso / Idade:	embrião
Sexo:	machos/fêmeas
Origem:	Granja Yamaguishi S. A.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

Campinas, 08 de junho de 2016.

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.

9.4. Bioética e Biossegurança em procedimentos para utilização de animais de laboratório



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Comissão de Ética no Uso de Animais



CEUA/UNICAMP

Certificamos que **RENATA ERBERT CONTRICIANI** concluiu o curso online **Legislação e procedimentos para utilização de animais de laboratório**, oferecido pelo **Instituto de Biologia da UNICAMP** e pela **Comissão de Ética no Uso de Animais de Laboratório - CEUA/UNICAMP**, obtendo nota **19**.

Este certificado tem validade de 02 (dois) anos a partir da data de emissão.

Campinas, 31 de agosto de 2017.

Prof. Dr. Wagner José Fávaro
Professor Assistente Doutor
Presidente da CEUA/UNICAMP

9.5. Direitos Autorais

As cópias de artigos de minha autoria ou de minha co-autoria, já publicados ou submetidos para publicação em revistas científicas ou anais de congresso sujeitos a arbitragem, que constam da minha Dissertação de Mestrado, intitulada “**Estudo da expressão do gene *Dact1* em cultura primária de mioblastos de galinha (*Gallus gallus*)**”, não infringem os dispositivos da Lei n.º 9.610/98, nem o direito autoral de qualquer editora.

Campinas, 27/04/2018

Assinatura:



Nome da autora: Renata Erbert Contriciani

RG n.º 26.356.371-6

Assinatura:



Nome da Orientadora: Lúcia Elvira Alvares

RG n.º 17.371.210-1