**ESTUDO DA EXPRESSÃO ESPACIAL E TEMPORAL DO GENE
DA MIOSTATINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO
EMBRIONÁRIO DE GALINHA (*Gallus gallus*)**

ELAINE CRISTINA CASTELHANO-BARBOSA

Engenheira Agrônoma

Orientador: Prof. Dr. **LUIZ LEHMANN COUTINHO**

Dissertação apresentada à Escola Superior
de Agricultura “Luiz de Queiroz”,
Universidade de São Paulo, para a obtenção
do título de Mestre em Agronomia, Área de
Concentração: Ciência Animal e Pastagens.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio de 2001

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - Campus "Luiz de Queiroz"/USP

Castelhano-Barbosa, Elaine Cristina

Estudo da expressão espacial e temporal do gene da miostatina durante o desenvolvimento embrionário de galinha (*Gallus gallus*) / Elaine Cristina Castelhano-Barbosa. -- Piracicaba, 2001.

78 p. : il.

Dissertação (mestrado) -- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2001.
Bibliografia.

1. Embrião animal 2. Expressão genica 3. Galinha 5. Híbridização I. Título

CDD 636.5

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte—O autor"

Aos meus pais

e à minha irmã,

DEDICO

Ao meu esposo

Mauricio,

OFEREÇO

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Luiz Lehmann Coutinho, pelos ensinamentos, incentivo, confiança e amizade, que foram fundamentais para a realização deste trabalho;
- Aos meus pais, Aparecida e Francisco, pelo exemplo, confiança, compreensão e amor especial, que só os pais sabem dedicar;
- Ao meu esposo Mauricio, pela compreensão nos momentos de ausência, pelo incentivo às minhas idéias, pela amizade e pelos momentos de felicidade;
- À minha irmã Elisângela, grande e fiel companheira;
- À Jane E. Gabriel, Lúcia E. Alvares e Cláudia B. M. Vitorello que contribuíram de modo especial, oferecendo sua experiência técnica, companheirismo e paciência ao longo do meu aprendizado;
- Aos colegas do Laboratório de Biotecnologia Animal pela colaboração e amizade;
- Aos funcionários do Departamento de Produção animal pela disponibilidade e ajuda oferecidas sempre que necessário;
- Aos professores do Depto. de Produção Animal e aos demais professores das disciplinas cursadas pelos ensinamentos e instruções técnicas importantes para minha formação e para a realização desta dissertação;
- Aos meus amigos pelos momentos de alegria e pela amizade;
- Aos Professores Vicente J. M. Savino, Antonio A. D. Coelho, Carlos Alberto Labate e à Dra. Mônica Labate pela colaboração e boa vontade;
- À ESALQ que ofereceu toda a estrutura necessária para a realização deste trabalho;
- À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos e da reserva técnica;

SUMÁRIO

	Página
LISTA DE FIGURAS.....	iv
RESUMO.....	v
SUMMARY.....	vii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Origem do tecido muscular esquelético.....	3
2.2 Miogênese.....	4
2.3 Fatores da família TGF- β	6
2.4 A caracterização da miostatina.....	7
2.5 Relação entre a miostatina e animais de musculatura dupla.....	7
2.6 Localização da expressão do gene da miostatina.....	9
2.7 Modulação da expressão da miostatina.....	10
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	3
3.1 Estudo temporal da expressão da miostatina.....	3
3.1.1 Incubação dos ovos e coleta dos embriões e tecidos.....	3
3.1.2 Extração de RNA total.....	4
3.1.3 Síntese de cDNA.....	15
3.1.4 Amplificação do cDNA com “primers” específicos ao gene da miostatina.....	16
3.2 Expressão espacial do gene da miostatina.....	17
3.2.1 Síntese das sondas de RNA “antisense” e “sense” para o gene da miostatina.....	18
3.2.2 Análises de hibridização in situ.....	27

3.2.3 Cortes histológicos dos embriões hibridizados.....	30
3.3 Caracterização do transcrito alternativo da miostatina em galinha	31
3.3.1 Eluição e sequenciamento do transcrito alternativo.....	31
3.4 Sequenciamento do intron 1 do gene da miostatina de galinha.....	32
3.4.1 Amplificação de um fragmento do DNA genômico da miostatina de galinha.....	33
3.4.2 Preparação de células de “E. coli” DH5 α competentes	33
3.4.3 Clonagem do fragmento de DNA genômico da miostatina	34
3.4.4 Sequenciamento das extremidades do clone de DNA genômico da miostatina	35
3.4.5 Construção da minibiblioteca de DNA genômico	35
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
4.1 Expressão temporal do gene da miostatina	38
4.2 Estudo espacial do gene da miostatina.....	40
4.3 Estudo do transcrito alternativo da miostatina em galinha	46
5 CONCLUSÕES	50
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51
APÊNDICES.....	56

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Expressão temporal da miostatina por RT-PCR ao longo do desenvolvimento embrionário de galinha.....	39
2. Hibridização <i>in situ</i> de embriões de galinha com a sonda de RNA "antisense" marcada com digoxigenina, específica para a miostatina.....	41
3. Hibridização <i>in situ</i> de embriões inteiros de galinha no estágio HH24.....	42
4. RT-PCR-competitiva de embriões de galinha nos estádios HH1, HH20 e HH24.....	44
5. Cortes histológicos transversais de embriões HH24 submetidos à hibridização <i>in situ</i>	45
6. Esquema da sequência de nucleotídeos da miostatina referente aos fragmentos de 427 pb e 275 pb por análises de RT-PCR e de aminoácidos sintetizadas por essa região.....	47
7. Sequência de nucleotídeos do DNA genômico da miostatina de Galinha.....	49

ESTUDO DA EXPRESSÃO ESPACIAL E TEMPORAL DO GENE DA MIOSTATINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO DE GALINHA (*Gallus gallus*)

Autora: ELAINE CRISTINA CASTELHANO-BARBOSA

Orientador: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

RESUMO

O padrão de expressão temporal e espacial do gene da miostatina foi investigado em embriões de galinha em 12 diferentes estádios do desenvolvimento e também nos tecidos hepático e muscular esquelético de uma ave jovem com a utilização das técnicas de RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase) e hibridização *in situ*. Ovos recém postos foram incubados e embriões de galinha foram coletados e estadiados de acordo com sua fase de desenvolvimento. Amostras de RNA total foram extraídas dos embriões e tecidos mencionados acima e a partir destas foi realizada a síntese de cDNA, o qual foi utilizado nas reações de PCR com “primers” específicos a um fragmento do gene da miostatina de galinha. Embriões nos estádios HH20 e HH24 foram submetidos à hibridização *in situ* com sondas de RNA senso e antisenso específicas à miostatina, digoxigenina-marcadas. Visando uma determinação precisa do local de expressão da miostatina, também foram realizados cortes histológicos nos embriões hibridizados. Os resultados da RT-PCR revelaram que houve expressão do gene da miostatina em todos os estádios estudados, desde HH1 (ovo recém posto) até HH26 (5 dias) e também no tecido muscular esquelético de um frango com 14 dias, não sendo detectada expressão deste gene no tecido hepático. Além disso, foi possível identificar por esta técnica a presença de um transcrito alternativo deste gene. Análises em programas de computador específicos para este fim indicaram que a tradução deste produto alternativo geraria uma proteína truncada pela adição de um códon de terminação precoce na posição 129 da cadeia de aminoácidos. Para determinar as

prováveis causas da presença deste transcrito alternativo, o intron 1, situado entre os sítios de ancoragem dos “primers” utilizados, foi sequenciado e a sua sequência foi analisada e submetida ao GenBank (gi|9739164). Nenhuma alteração foi encontrada nos sítios de processamento do intron 1, sendo mantido o padrão GT-AG. As análises de hibridização *in situ* permitiram a visualização de sinais da expressão da miostatina nos somitos dos embriões hibridizados. Embriões mais jovens (HH20) apresentaram um sinal menos intenso quando comparados com embriões mais desenvolvidos (HH24) e este sinal iniciou-se na região distal com relação ao complexo tubo neural/notocorda, abrangendo uma porção maior dos somitos em embriões mais desenvolvidos. Cortes histológicos transversais dos embriões hibridizados demonstraram que a expressão da miostatina ocorre no miótomo dos somitos.

SPATIAL AND TEMPORAL MYOSTATIN GENE EXPRESSION DURING CHICKEN (*Gallus gallus*) EMBRYONIC DEVELOPMENT

Author: ELAINE CRISTINA CASTELHANO-BARBOSA

Adviser: Prof. Dr. LUIZ LEHMANN COUTINHO

SUMMARY

The temporal and spatial myostatin gene expression patterns were studied in chicken embryos at 12 different developmental stages and in hepatic and muscular tissues of a young chicken by RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction) and by whole mount *in situ* hybridization techniques. Fertilized eggs were incubated, and the chicken embryos were collected and assorted according to their developmental stage. Total RNA samples were extracted from the embryos and the above mentioned tissues. These samples were used as templates for cDNA synthesis, which was applied in PCR reactions with specific primers for chicken myostatin. Stage HH20 and HH24 embryos were submitted to whole mount *in situ* hybridization with myostatin specific sense and antisense DIG-labelled RNA probes. To accurately localize the myostatin expression region, embryos were submitted to histological sections. The RT-PCR results showed that myostatin was expressed in all stages studied, from HH1 (unincubated embryos) to HH26 (5-day-old embryos) as well as in skeletal muscle tissue from a 14-day-old chicken. Myostatin expression was not detected in hepatic tissue. Moreover, this technique allowed the detection of an alternative transcript of this gene. Analyses using specific softwares indicate that translation of this alternative product would lead to a truncated protein caused by a precocious terminator codon at position 129 of the aminoacid chain. With the purpose of detecting the possible causes leading to the formation of the alternative product, intron 1, situated between the primer recognition sites, was sequenced and submitted to the GenBank (gi|9739164). Alterations were not found at intron 1 splicing sites, which followed the GT-AG rule.

With whole mount *in situ* hybridization analyses it was possible to visualize signs of myostatin expression in chicken somites. The younger embryos (HH20) presented a less intense signal than more developed embryos (HH24), and this signal began at the most distal region in relation to the neural tube/notochord complex. Analyses of the transversal histological sections of the hybridized embryos showed that myostatin expression occurs in the myotomal region of the somite.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil situa-se hoje como o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, alcançando uma produção de 5.980,7 milhões de toneladas no ano de 2000. Aproximadamente 85% desta produção é destinada ao consumo interno, sendo os 15% restantes exportados (Fonte: UBA/APINCO, 2001). Essa grande produção de carne de frango vem aumentando ao longo dos anos juntamente com a eficiência produtiva. Na década de 60, os frangos eram abatidos ao atingirem um peso corporal de 1,6 kg, o que levava um prazo de 63 dias, atualmente, os frangos são abatidos com aproximadamente 49 dias, alcançando neste prazo um peso de 2,7 kg (Luchesi, 2000). Tais avanços foram possíveis graças a progressos obtidos nas áreas de sanidade avícola, nutrição e melhoramento genético das aves.

Além de peso corporal e conversão alimentar, novas características vêm sendo consideradas em programas de melhoramento genético, e o emprego da biologia molecular no estudo dos genes envolvidos nessas características pode oferecer valiosas contribuições nessa área, principalmente no que diz respeito à seleção assistida por marcadores e à avaliação precoce e precisa das características (Schmidt e Ledur, 1999).

O estudo do desenvolvimento da massa muscular é fundamental, uma vez que o tecido muscular é o principal produto final na produção de frangos de corte, havendo um grande interesse tanto no aumento generalizado da musculatura quanto no aumento de determinadas partes, tais como: peito e coxas. Muitos dos estudos relacionados à expressão de genes envolvidos no desenvolvimento da musculatura dos animais têm utilizado aves como modelo experimental devido à facilidade em se obter embriões em grandes quantidades e à praticidade relacionada à coleta dos mesmos. Atualmente, o

grande número de informações geradas a partir de estudos conduzidos em aves permite uma maior integração dos resultados obtidos.

O desenvolvimento da massa muscular dos animais é influenciado por diversos fatores que atuam em nível celular e molecular. Recentemente, foi identificado por McPherron et al. (1997) um novo fator de crescimento e diferenciação celular, denominado GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8) ou miostatina. Análises bioquímicas e moleculares mostraram que esse fator pertence à superfamília TGF- β (fatores transformantes do crescimento- β) e atua como um potente regulador negativo no desenvolvimento da musculatura esquelética em vertebrados. O bloqueio por recombinação homóloga da expressão desse gene em camundongos causou um aumento significativo na deposição de massa muscular nos animais mutantes (McPherron et al., 1997). Tendo em vista o impacto dessa descoberta no setor agropecuário, o presente estudo tem como objetivo investigar o padrão de expressão espacial e temporal do gene da miostatina durante o desenvolvimento embrionário de galinha, por análises de hibridização *in situ* e RT-PCR (transcrição reversa-reação em cadeia da polimerase). Os resultados obtidos devem fornecer subsídios importantes para a realização de futuras pesquisas visando à manipulação da expressão da miostatina em busca de uma maior eficiência na produção de frangos de corte.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Origem do tecido muscular esquelético

A musculatura esquelética é formada a partir de células precursoras de mioblastos localizadas no miótomo dos somitos (Slack, 1997). Somitos são blocos sedimentares de mesoderme paraxial dispostos ao longo do tubo neural no sentido rostro-caudal durante o desenvolvimento embrionário. Durante a embriogênese, os somitos são subdivididos em esclerótomo (porção ventral), cujas células originarão as vértebras e as costelas, e dermomiótomo (porção dorsal), o qual originará a derme e a musculatura esquelética. O miótomo é formado por células da porção dorsomediana dos somitos que migram sob o dermomiótomo e diferenciam-se. As células migratórias da região dorsomediana do dermomiótomo formarão a musculatura epaxial (musculatura intercostal) e as células da região ventrolateral do dermomiótomo formarão a musculatura hipaxial (musculatura do peito, membros e outras) (Perry & Rudnick, 2000).

A musculatura dos membros é formada em momentos distintos, envolvendo pelo menos duas populações de células que originarão os miotubos primários e secundários. Cada uma dessas duas populações de células expressa diferentes isoformas de miosina de cadeia pesada (mhc), que são moléculas protéicas de miosina com 200 kDa (Pinney & Emerson Jr, 1992), sendo os mioblastos primários formadores das fibras de músculos lentos, e os mioblastos secundários, formadores das fibras de músculos rápidos (Perry & Rudnick, 2000).

Após a fusão dos mioblastos formando as fibras multinucleadas características da musculatura esquelética, a divisão das fibras ou de seus núcleos é interrompida, entretanto, durante o desenvolvimento pós-natal do animal, existe uma população de células-satélite mononucleadas de origem embrionária que persistem na vida adulta e se fundem a miofibras pré-existentes, sendo responsáveis pela regeneração muscular após injúrias (Seale & Rudnick, 2000). O aumento da massa muscular em animais adultos, decorrente de exercícios físicos, é devido inteiramente a um aumento no tamanho das fibras (hipetrofia), e não a um aumento no número de fibras (hiperplasia) (Slack, 1997).

2.2 Miogênese

O desenvolvimento da linhagem embrionária que origina a musculatura esquelética dos vertebrados é regulada pelos fatores regulatórios miogênicos (MRFs) que são um grupo de fatores de transcrição da família hélice-volta-hélice básica (bHLH) composto pelos membros MyoD, Myf5, miogenina e MRF4 (Kablar et al., 1999). O domínio de ligação HLH é responsável pela dimerização dos MRFs com proteínas-E (E12, E47, HEB e ITF) e o domínio de ligação básico é importante para que ocorra a ligação com o DNA na sequência conhecida como E-box (CANNTG), presente nos elementos regulatórios de muitos genes específicos da musculatura esquelética (Pinney & Emerson Jr, 1992 e Perry & Rudnick, 2000)

Os MRFs expressam-se de maneira orquestrada, sendo que MyoD e Myf5 atuam no processo de determinação miogênica, enquanto miogenina e MRF4 controlam o processo de diferenciação miogênica nos embriões (Pownall et al., 1996). A expressão dos MRFs ocorre em padrões diferentes na musculatura epaxial e hipaxial. Estudos conduzidos em camundongos, em que a expressão de múltiplos MRFs foi bloqueada, demonstraram que a miogenina compensa a perda de MRF4 apenas na presença do MyoD, sugerindo que MyoD e miogenina sejam responsáveis pela determinação e diferenciação de uma linhagem celular, a qual originará a musculatura hipaxial e Myf-5

e MRF4 pela definição de uma outra linhagem celular, responsável pela musculatura epaxial (Perry & Rudnick, 2000).

Visto que os MRFs são fatores fundamentais para a determinação e o desenvolvimento da linhagem celular nos animais, alguns estudos foram realizados em busca dos ativadores desses MRFs (Pourquié et al., 1995; Pownall et al., 1996 e Dietrich et al., 1997) . Em um desses estudos, Pownall et al. (1996) revelaram que estruturas axiais, tais como o tubo neural e a notocorda, enviam sinais essenciais para a ativação dos fatores miogênicos regulatórios (MRFs) em codornas, sendo a notocorda responsável pela ativação de MyoD e Myf5, e o tubo neural responsável pela manutenção desses dois fatores em níveis altos nas células progenitoras do miótomo até que estas se diferenciem, quando então a expressão dos genes da família bHLH torna-se independente dos sinais axiais. Em outro estudo, embriões de galinha no estágio HH12 tiveram o complexo tubo neural/notocorda afastado dos 3 últimos somitos e de parte da placa segmentar por microcirurgia. A expressão do fator miogênico MyoD não foi detectada na região afastada, entretanto, esse gene voltou a ser expresso quando as estruturas afastadas foram reaproximadas, confirmando a influência de estruturas axiais na expressão do MyoD (Alves et al., 1999).

Como regra geral, pode-se dizer que estruturas axiais, tais como o tubo neural e a notocorda, produzem sinais necessários para a determinação miogênica epaxial, enquanto a linhagem miogênica hipaxial depende de sinais provenientes da placa lateral da mesoderme e da ectoderme dorsal. Os fatores secretados por essas estruturas incluem “Sonic hedgehog” (Shh), Wnts, fatores transformantes do crescimento- β (TGF- β), fatores de crescimento dos fibroblastos (FGFs) e proteínas ósseas morfogênicas (BMPs) (Perry & Rudnick, 2000).

Atuam ainda na miogênese genes, tais como o *Pax3*, cuja função é direcionar as células que originarão a musculatura hipaxial a migrarem até seu destino na forma não diferenciada, fazendo com que as mesmas venham a expressar genes da família MyoD apenas ao atingir o local exato para a diferenciação final (Ludolph & Konieczny, 1995; Pourquié et al, 1995 e Perry & Rudnick, 2000), e também o gene *Lbx1*, envolvido no

padrão de migração dorsoventral das células miogênicas precursoras durante o desenvolvimento (Perry & Rudnick, 2000).

2.3 Fatores da família TGF- β

A família TGF- β (fatores transformantes do crescimento- β) é composta por um grande número de fatores de crescimento estruturalmente relacionados, os quais estão envolvidos na regulação de muitos processos celulares, tais como: proliferação, diferenciação e adesão celulares (Moses & Serra, 1996 e Capdevila & Izpisua Belmonte, 1999).

Os TGF- β e fatores relacionados são agonistas multifuncionais, cujos efeitos dependem mais das condições de resposta das células-alvo do que dos fatores propriamente ditos, sendo que o mesmo tipo celular pode apresentar respostas opostas sob diferentes condições experimentais (Moses et al., 1990 e Massagué, 1998). Fazem parte desta família uma subfamília de proteínas morfogênicas ósseas (BMP2 e BMP4) e seu homólogo em *Drosophila*, chamado decapentaplégico (Dpp). Os outros membros da família TGF- β são ordenados com base nas divergências presentes nos domínios bioativos, quando comparados com a subfamília citada acima, iniciando pela subfamília BMP5, seguida pelas subfamílias GDF-5 (fatores de crescimento e diferenciação 5), Vg1, BMP3, membros intermediários (onde está incluído o GDF-8 também conhecido como miostatina), ativinas, subfamília TGF- β e membros mais distantes (Massagué, 1998 e Capdevila & Izpisua Belmonte, 1999).

Os membros da família TGF- β apresentam formas precursoras biologicamente inativas, as quais são ativadas por clivagem com endoproteases em sítios específicos. Além disso, os membros dessa família atuam biologicamente na forma de dímeros, cujos ligantes podem ter diferentes padrões de expressão no embrião (Capdevila & Izpisua Belmonte, 1999). Dessa forma, alterações no processo de dimerização ou na proteólise

dos TGF- β precursores influenciam no processo de sinalização dos membros dessa família.

A miostatina ou GDF-8 foi classificada por McPherron et al. (1997) como um membro da família TGF- β por apresentar características tais como: sequência sinalizadora para secreção, sítio de processamento proteolítico e resíduos conservados de cisteína na região carboxi-terminal. No tecido muscular, os TGF- β atuam como reguladores negativos da diferenciação dos mioblastos.

2.4 A caracterização da miostatina

A miostatina, conhecida também como GDF-8 (fator de crescimento e diferenciação-8), é um membro da superfamília TGF- β e atua como um regulador negativo no desenvolvimento da massa muscular esquelética dos animais. Esse gene foi caracterizado por McPherron et al. (1997) em um experimento de recombinação homóloga conduzido em camundongos visando ao bloqueio de sua expressão, o que originou animais mutantes com um aumento generalizado na musculatura esquelética, sendo que alguns músculos tiveram seu tamanho aumentado em até três vezes. A análise de cortes histológicos de músculos de animais mutantes revelou que esse aumento foi causado principalmente por hiperplasia e, em menor grau, por hipertrofia celular.

2.5 Relação entre a miostatina e os animais de musculatura dupla

Devido à semelhança entre o fenótipo do camundongo nulo quanto à expressão da miostatina e algumas raças de bovinos com fenótipo de hipermuscularidade denominado musculatura dupla, estudos foram realizados visando a associar a hipertrofia muscular bovina a alterações na sequência da miostatina (Grobet et al., 1997; Grobet et al., 1998; McPherron & Lee, 1997 e Smith et al., 1997). O mapeamento físico e genético da miostatina bovina mostrou que este gene está situada no cromossomo 2

(BTA2-2q11), indistinguível da localização citogenética do locus *mh*, responsável pela hipertrofia muscular bovina, colocando a miostatina como um gene candidato ao fenótipo de musculatura dupla (Grobet et al., 1997 e Smith et al., 1997). O seqüenciamento do gene da miostatina em raças bovinas com musculatura dupla permitiu a detecção de uma deleção de 11 nucleotídeos na seqüência codante de bovinos da raça Belgian Blue e Austuriana, entretanto, bovinos Maine-Anjou com musculatura dupla apresentaram a seqüência da miostatina idêntica à selvagem, a qual foi obtida pelo seqüenciamento desse gene em animais-controle (Holstein-Friesian e Jersey), o que sugere heterogeneidade alélica para o gene da miostatina (Grobet et al., 1997). Novos estudos demonstraram a presença de outros polimorfismos na seqüência da miostatina de animais de musculatura dupla, tais como a substituição de uma cisteína por uma tirosina na região madura da proteína em Piedmontese (McPherron et al., 1997), o qual foi descrito também por outros autores em um total de sete polimorfismos, sendo que cinco destes bloquearam a função da miostatina em 10 raças bovinas européias com fenótipo de musculatura dupla (Grobet et al., 1998).

Uma mutação denominada *Cmpt*, originada da palavra “compacta”, também foi detectada em camundongos com fenótipo de hipermuscularidade que passaram por um longo período de seleção para deposição de proteína na carcaça. O locus *Cmpt* foi localizado no cromossomo 1 de camundongos, em uma região homóloga ao cromossomo 2 de bovinos onde se localiza o locus *mh*, sugerindo que a miostatina seja um candidato ao fenótipo *Cmpt*. O seqüenciamento do gene da miostatina de animais com esse fenótipo revelou uma deleção de 12 pb em relação a camundongos BALB/c (controles) (Szabó et al., 1998).

Diante dos resultados apresentados acima, torna-se importante o estudo de animais com deposição privilegiada de massa muscular em busca de transcritos alternativos, que podem inclusive vir a ser empregados como marcadores em programas de seleção assistida.

2.6 Localização da expressão do gene da miostatina

No estudo de caracterização do gene da miostatina, McPherron et al. (1997) detectaram a presença de transcritos da miostatina (2,9 kb) apenas na musculatura esquelética dos camundongos, sendo observado um baixo nível de expressão no tecido adiposo.

Em suínos na fase pós-natal, análises de “Northern Blot” permitiram a detecção de transcritos da miostatina com tamanhos de 1,5 e 0,8 kb, tanto na musculatura esquelética quanto na glândula mamária de animais em lactação. No mesmo estudo, foi observado que em suínos com peso abaixo da média ao nascer, a expressão da miostatina no músculo *longissimus* foi 65% maior em relação a suínos nascidos com peso normal. A administração de hormônio do crescimento em suínos em desenvolvimento não alterou a expressão da miostatina, sugerindo que sua atuação no desenvolvimento muscular esteja altamente associada ao período pré-natal (Ji et al., 1998).

Um estudo comparativo da expressão da miostatina em humanos adultos portadores de HIV (vírus da imunodeficiência humana), com perda acentuada de massa muscular em comparação a humanos saudáveis, determinou que a expressão desse gene apresenta uma relação inversa com a massa muscular de humanos. No mesmo trabalho foi sintetizada uma proteína imunorreativa da miostatina, a qual foi empregada em estudos de localização. Os resultados permitiram a detecção de uma proteína de 26 kDa que foi expressa unicamente na musculatura esquelética, sendo secretada no plasma (Gonzales-Cadavid et al., 1998), entretanto Wehling et al. (2000) apontaram em seu trabalho que esses autores utilizaram como anticorpo para reconhecer a proteína imunorreativa à miostatina, um peptídeo altamente homólogo à sequência madura do GDF-11 (fator de crescimento e diferenciação 11), outro membro da superfamília TGF- β , podendo esse resultado apresentar efeito cruzado desses dois genes.

A miostatina foi detectada também na musculatura cardíaca de bovinos e de ovinos nas fases fetal e adulta, mais especificamente nas fibras de Purkinje e nos cardiomiócitos (Sharma et al., 1999), sendo que em bovinos de musculatura dupla a

forma de miostatina encontrada apresentou a deleção na sequência de nucleotídeos descrita em estudos anteriores realizados por Grobet et al. (1997), Grobet et al. (1998) e McPherron & Lee (1997). Com o emprego da técnica de “Western Blot”, os autores observaram que no coração de bovinos normais e de ovinos, apenas a forma precursora não-processada da miostatina foi detectada, entretanto, no tecido muscular desses animais, ambas as formas processada e não-processada estavam presentes. A expressão da miostatina nos cardiomiócitos de ovelhas que tiveram um infarto induzido foi maior quando comparada com a expressão em animais não-infartados, sugerindo que esse gene desempenhe alguma função no desenvolvimento e na fisiologia cardíaca (Sharma et al., 1999).

Nenhum estudo de localização da expressão do gene da miostatina foi realizado em aves por hibridização *in situ*, mas resultados anteriores utilizando essa técnica em embriões de camundongos com 9,5 e 10,5 dpc (dias *post coitum*) permitiram a detecção da expressão desse gene nos somitos (McPherron et al., 1997), que são as estruturas embrionárias que originarão a musculatura esquelética dos animais.

2.7 Modulação da expressão da miostatina

Um estudo realizado por Bass et al. (1999) determinou que o aumento da expressão da miostatina durante a fase embrionária está diretamente associado ao estágio de gestação, onde os primeiros mioblastos estão começando a se fundir em miofibras e os mioblastos secundários estão iniciando sua proliferação e fusão. Segundo Kocamis et al. (1999), isso estaria ocorrendo em galinha entre os dias 7 e 18 do desenvolvimento embrionário. Sendo assim, a miostatina causa uma diminuição do número de mioblastos que atingem a diferenciação terminal e apresenta efeito no grau de alargamento das fibras, ao contrário dos IGFs (fatores de crescimento semelhantes à insulina) que atuam na proliferação dos mioblastos (Bass et al., 1999).

Alguns estudos também foram realizados visando a identificar possíveis funções da miostatina na fase pós-natal, como por exemplo o estudo comparativo da expressão

da miostatina entre humanos portadores de HIV com perda acentuada de massa muscular e humanos saudáveis (Gonzalez-Cadavid et al., 1998). O estudo da expressão da miostatina em ovelhas submetidas a infarto do miocárdio, sugere uma atuação desse gene na fisiologia cardíaca (Sharma et al., 1999) e a detecção de expressão da miostatina na glândula mamária de suínos lactantes indica sua participação na lactação (Ji et al., 1998). Além das citações acima, outros estudos foram conduzidos visando a estudar a expressão da miostatina na fase pós-natal, em tecidos totalmente diferenciados. Em um desses estudos, foi realizada a atrofia induzida dos membros posteriores de ratos, o que resultou na diminuição de 16% da massa do músculo *plantaris*, 110% de aumento na expressão do mRNA da miostatina e 37% de aumento na proteína miostatina presente nesse músculo em relação ao de animais controle (Wehling et al., 2000). Embora a diminuição da massa muscular tenha sido acompanhada pelo aumento nos níveis de miostatina, os autores afirmam que esse aumento apenas não foi suficiente para causar diminuição na massa muscular dos animais, pois ratos submetidos à diminuição de carga dos membros posteriores, mas com 30 minutos diários de carga normal, não apresentaram atrofia muscular, embora os níveis de mRNA da miostatina tenham apresentado um aumento de 55%.

Outro estudo em que camundongos foram submetidos à atrofia induzida dos membros posteriores mostrou que o aumento da miostatina varia entre diferentes músculos, embora essa variação não esteja relacionada com o nível de atrofia obtido em um determinado período de tempo, mas sim ao tipo de fibra que compõe o músculo em questão (Carlson et al., 1999). Os autores observaram que, embora o músculo *soleus* (composto principalmente por fibras do tipo I) tenha apresentado um maior nível de atrofia em relação ao músculo *gastrocnemius-plantaris* (composto principalmente por fibras do tipo II), este último apresentou um maior nível de expressão da miostatina, gerando uma correlação significativa ($r=0,725$, $P<0,0005$) entre a porcentagem de mhc (cadeia pesada da miosina) da isoforma IIb e a abundância da expressão do mRNA da miostatina.

À medida que se aprofundam os conhecimentos sobre os mecanismos regulatórios envolvidos na expressão da miostatina, bem como a determinação de seus

receptores e inibidores, mais próxima fica a possibilidade da manipulação desse gene nos animais visando a uma maior eficiência na produção de carne.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Estudo temporal da expressão da miostatina

O estudo temporal da expressão do gene da miostatina durante o desenvolvimento embrionário foi realizado por análises de RT-PCR. Nestes experimentos foram empregados embriões de galinha da linhagem AgRoss® (Agrocères), coletados a partir de ovos provenientes da “Granja Ninho Verde”, situada no município de Tietê-SP. Esses embriões foram estadiados pelo método descrito por Hamburger & Hamilton (1951) e os estádios utilizados foram HH1 (ovo recém-posto), HH5 (19 a 22 horas), HH8 (26 a 29 horas), HH10 (33 a 38 horas), HH12 (45 a 49 horas), HH15 (50 a 55 horas), HH18 (65 a 69 horas), HH20 (70 a 72 horas), HH21 (3 dias e meio), HH23 (3 e meio a 4 dias), HH24 (4 dias) e HH26 (4 e meio a 5 dias), sendo cada amostra de cDNA obtida a partir de um único embrião. Foram amplificadas 10 amostras para cada estádio do desenvolvimento estudado. Para a realização das análises de RT-PCR foi necessária a execução das etapas abaixo.

3.1.1 Incubação dos ovos e coleta dos embriões e tecidos

Os ovos de galinha recém-postos foram imediatamente incubados ou estocados em uma sala refrigerada a 16°C até o momento de sua utilização, sendo que os ovos estocados por mais de uma semana foram descartados. A incubação ocorreu em uma incubadora industrial com temperatura regulada para aproximadamente 38°C, e com

movimentação automática dos ovos a cada 1 hora. Os períodos de incubação variaram de 19 a 120 horas, de acordo com os estádios de desenvolvimento desejados, sendo que no estágio HH1, os embriões foram coletados a partir de ovos recém-postos, sem incubação prévia. Os embriões foram coletados com o auxílio de material cirúrgico e, após retirada das membranas envoltórias, foram analisados com o auxílio de um microscópio estereoscópico Wild M8 (Leica) e estadiados segundo Hamburger & Hamilton (1951).

Além dos embriões, foram coletados também tecido muscular esquelético e tecido hepático de uma ave com 14 dias para a extração de RNA total. Fragmentos com aproximadamente 100 mg desses tecidos foram coletados imediatamente após o abate do animal com o auxílio de pinças e tesouras e estocados em tubos de 1,5 ml livres de RNases previamente identificados, criopreservados e estocados a -70°C para posteriores análises.

3.1.2 Extração de RNA total

Cada embrião ou amostra de tecido coletado foi transferido para um tubo estéril contendo 250 μl de água DEPC (água tratada com 0,01% dietilpirocarbonato) e 750 μl de Trizol LS[®] (Gibco/BRL), sendo então homogeneizado até sua completa dissolução.

O RNA total das amostras foi obtido a partir do método descrito por Chomczynski & Sacchi (1987). As amostras congeladas em solução contendo Trizol LS[®] foram descongeladas e mantidas à temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida 200 μl de clorofórmio foram adicionados e, após agitação manual, os tubos foram mantidos à temperatura ambiente por mais 15 minutos. Seguiu-se então uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C , e a fase superior foi coletada em um novo tubo. Para a precipitação do RNA total, 500 μl de isopropanol foram adicionados à solução coletada e, após 10 minutos, houve uma nova centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C . O sobrenadante foi descartado, o precipitado de RNA total foi lavado em

1 ml de etanol 75% e centrifugado a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Após completa secagem à temperatura ambiente, esse precipitado foi ressuspendido em volumes de 30 a 100 µl de água DEPC.

As amostras obtidas foram quantificadas em espectrofotômetro com a 260 nm e submetidas à eletroforese para a constatação de integridade das bandas de RNA ribossômico 18S e 28S. As cubas e acessórios utilizados nestas eletroforeses de amostras de RNA foram previamente lavados com água e detergente neutro e tratados por imersão em água DEPC durante 12 horas para a eliminação de RNAses. O gel e as soluções também foram preparados com água DEPC em vidraria previamente tratada por aquecimento a 180°C por 4 horas.

3.1.3 Síntese de cDNA

O cDNA foi sintetizado com o emprego do kit Superscript II RT (Gibco/BRL) a partir de 1 µg de RNA total. Inicialmente o RNA foi incubado por 10 minutos a 70°C com 0,5 µg de “primer” oligo (dT) e água DEPC em um volume final de reação de 12 µl. Em seguida, os tubos de reação foram incubados em gelo por 1 minuto. Ao serem retiradas do gelo, as amostras receberam tampão de PCR 1 x concentrado, 5 mM MgCl₂, 0,5 mM de uma mistura de dNTPs e 10 mM DTT e foram incubadas a 42°C por 5 minutos. Posteriormente, foram adicionadas 200 unidades da enzima transcriptase reversa Superscript II RT (Gibco/BRL) por tubo, em um volume final de 20 µl. A síntese de cDNA ocorreu a 45°C por 50 minutos, e então a enzima Superscript II RT (Gibco/BRL) foi inativada por incubação a 70°C por 15 minutos. Para a degradação do RNA molde foi adicionado 1 µl de RNase H seguido de uma incubação a 37°C por 20 minutos. O cDNA obtido foi estocado a -20°C até o momento do uso, não permanecendo em estoque por períodos superiores a 2 meses.

Antes das amostras de cDNA serem empregadas nas análises de RT-PCR para o gene da miostatina, sua integridade foi testada pela amplificação de 10% do volume de

cDNA obtido na reação de transcrição reversa em uma reação contendo 10 pmol de cada um dos "primers" específicos ao gene da β -actina, cujas seqüências foram: 5'AATCATAGGTTTCAGGTGCCC³ (direto) e 5'ATCACAGGGGTGTGGGTGTT³ (reverso); 1,5 mM de MgCl₂; 0,2 mM dNTP e 1 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco/BRL) em um volume final de 20 μ l. O programa utilizado foi composto por uma desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 20 ciclos de amplificação com desnaturação 95°C por 1 minuto, anelamento a 55°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto, sendo que no último ciclo a extensão ocorreu a 72°C por 10 minutos. O gene da β -actina foi amplificado para testar a qualidade das amostras, por tratar-se de um gene constitutivo. Os fragmentos obtidos foram visualizados após eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 0,5 μ g/ml, sendo que as amostras que não apresentaram produto de amplificação foram descartadas.

3.1.4 Amplificação do cDNA com "primers" específicos ao gene da miostatina

Para a amplificação de um fragmento de DNA específico ao gene da miostatina, foram sintetizados "primers" específicos com base na seqüência de seu RNA mensageiro (mRNA), cuja seqüência está disponível no GenBank (gi|2623569). Com o auxílio dos programas BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) e PRIMER 3 (<http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>), foi escolhida a região da miostatina a ser amplificada e também a combinação de "primers" mais adequada para flanquear essa região, atentando para que a mesma não fosse homóloga a nenhum outro fator de crescimento. Os "primers" escolhidos foram 5'AGTAGCGATGGCTCTTTGGA³ ("primer" direto) e 5'CTGGGAATGTGACAGCAAGA³ ("primer" reverso), flanqueando uma região de 427 pares de base entre os nucleotídeos 301 (exon 1) e 727 (exon 2) do mRNA da miostatina.

As reações de amplificação ocorreram na presença de 10% da amostra de cDNA (2 μ l) obtida na reação de transcrição reversa, tampão de PCR 1 x concentrado, 2 mM

MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 µM de cada “primer” e 1,25 unidade da enzima *Taq* DNA polimerase (Gibco/BRL) em um volume final de reação de 50 µl. O programa de amplificação foi composto por uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida por ciclos repetitivos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 62°C por 40 segundos e extensão a 72°C por 40 segundos. Esses ciclos foram repetidos 40 vezes na amplificação de amostras de embriões dos estádios HH1 a HH15 e 35 vezes na amplificação de amostras de embriões dos estádios HH18 a HH26. Após essas repetições, seguiu-se uma extensão final a 72°C por 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em géis de agarose 2% e, após separação dos fragmentos, o gel foi corado em uma solução 0,5 µg/ml de brometo de etídio, sendo o produto de amplificação visualizado por exposição à luz ultravioleta.

3.2 Expressão espacial do gene da miostatina

Para a visualização dos locais de expressão da miostatina, embriões de galinha nos estádios HH20 e HH24 foram submetidos a análises de hibridização *in situ*, empregando uma sonda de RNA “antisense” específica ao gene da miostatina e também uma sonda de RNA “sense”, utilizada como controle. A síntese das sondas envolveu a clonagem do fragmento da miostatina a ser utilizado como fita molde no vetor de expressão pGEM-4Z (Promega). A confirmação da orientação do fragmento de interesse no vetor e de sua identidade foi realizada por clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento. Em seguida, o fragmento clonado foi submetido à reação de transcrição *in vitro* para a síntese das sondas, as quais foram quantificadas por análises “Dot Blot” e posteriormente hidrolisadas para serem utilizadas nas reações de hibridização *in situ*. O protocolo de hibridização *in situ* empregado foi inicialmente descrito por Coutinho et al. (1992). Embriões HH24 hibridizados com a sonda de RNA “antisense” foram submetidos a cortes histológicos transversais em um vibratomo1000 - Formely Lancer[®] (Technical Products International, Inc.) em uma espessura de 70 µm para a visualização precisa da região onde a expressão da miostatina foi detectada.

3.2.1 Síntese das sondas de RNA “antisense” e “sense” para o gene da miostatina

As sondas utilizadas nas análises de hibridização *in situ* foram sintetizadas a partir do fragmento de 427 pb, situado entre os nucleotídeos 301 e 727 da região codificante da miostatina, obtido a partir das reações de RT-PCR e eluído a partir de géis de agarose.

3.2.1.1 ELUIÇÃO DO FRAGMENTO DE 427 pb DA MIOSTATINA

A eluição do DNA do gel foi realizada com o emprego do Sephaglas® Band Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Após eletroforese do produto amplificado, a banda correspondente ao fragmento de 427 pb foi recortada do gel com o auxílio de um bisturi, pesada e colocada em um tubo contendo 1 µl de agente solubilizante/mg de gel e 5 µl de ácido acético 50% para cada 250 mg de gel. O tubo foi incubado a 60°C por 10 minutos, e em seguida foram adicionados 5 µl da resina Sephaglas BP em suspensão, o tubo foi agitado mecanicamente e centrifugado a 12000 x g por 30 segundos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e uma nova centrifugação foi realizada para a remoção de qualquer resíduo líquido. Foram adicionados ao precipitado de DNA e resina, 16x o volume de tampão de lavagem do kit, e a sílica foi ressuspensa e novamente centrifugada nas condições descritas acima. Esse processo foi repetido mais duas vezes, e finalmente o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspensa em 20 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl pH8,0; 1 mM EDTA). Após incubação por 5 minutos à temperatura ambiente com agitação constante, o tubo foi centrifugado a 12000 x g por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e armazenado a -20°C. Através da eletroforese do fragmento eluído foi possível confirmar sua qualidade, estimar sua concentração e identificar a presença de possíveis contaminações.

3.2.1.2 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES

Bactérias *E. coli* JM 109 foram preparadas segundo protocolo descrito por Hanahan, (1983). Inicialmente, as células foram plaqueadas em meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl; 4% ágar; 10 mM de $MgCl_2$) e permaneceram a 37°C durante 16 horas para o crescimento das colônias. Após esse período, uma colônia foi isolada e incubada em 3 ml de meio SOB (2% triptona; 0,5% extrato de levedura; 10m M NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM $MgCl_2$ e 10 mM $MgSO_4$, pH 6,7-7,0) a 37° C durante 16 horas. Em seguida, 50 µl dessa cultura foram transferidos para 50 ml de meio SOB e seguiu-se uma nova incubação a 37°C sob vigorosa agitação. Através de leituras ao espectrofotômetro a 550 nm, foi realizado o monitoramento para que a D.O. (densidade ótica) dessa cultura atingisse valores entre 0,5 e 0,6, o que levou em média 4 horas. Ao atingir a D.O. desejada, foram adicionados à cultura 500 µl de 1M $MgCl_2$, e as células foram transferidas para um tubo estéril gelado, permanecendo incubadas em gelo por 15 minutos. Após esse período de incubação, os tubos contendo a cultura foram centrifugados a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado. O precipitado de células foi ressuspensionado em 10 ml de meio RF I (100 mM KCl; 10 mM $MgCl_2 \cdot 4H_2O$; 30 mM acetato de potássio, 10m M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 15% de glicerol) e procedeu-se uma nova incubação em gelo por 15 minutos, seguida de uma nova centrifugação a 1500 x g por 10 minutos a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspensionado em 2 ml de meio RF II (10 mM NaMOPS; 10 mM KCl; 75 mM $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 15% de glicerol) e essa cultura foi distribuída em aliquotas (100 µl/tubo), criopreservadas e estocada a -70°C.

3.2.1.3 LIGAÇÃO DO FRAGMENTO DE 427 pb DA MIOSTATINA EM VETOR DE EXPRESSÃO

As reações de ligação foram realizadas com o emprego do SureClone[®] Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech). Inicialmente cada produto a ser clonado passou por uma reação de reparo das extremidades a fim de eliminar os nucleotídeos adicionados ao produto de PCR na sua extremidade 3' pela ação de algumas polimerases termoestáveis e de fosforilar os fragmentos para evitar que eles se liguem entre si. Essa reação ocorreu em um volume final de 20 µl, em que foram adicionados 100 ng do produto de PCR

eluído, tampão de reparo das extremidades 1x concentrado, 8,1 unidades do fragmento *Klenow* e 7,9 unidades de polinucleotídeo quinase. Esses componentes foram misturados e incubados a 37°C por 30 minutos. Após esse período, foram adicionados 20 µl da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e os tubos foram agitados mecanicamente e centrifugados por 1 minuto a 12000 x g. A fase superior de cada tubo foi coletada e purificada em colunas MicroSpin®, as quais foram previamente preparadas pela adição de 500 µl da resina Sephacryl®S-200 em suspensão e centrifugação para possibilitar a eliminação do líquido no qual a resina foi ressuspensa. Após a purificação dos fragmentos pela sua passagem nas colunas, estas foram descartadas e cada efluente foi empregado nas reações de ligação.

O fragmento da miostatina de 427 bp, que serviu como molde para a síntese das sondas de RNA “sense” e “antisense”, foi ligado no vetor de expressão pGEM-4Z® (Promega) o qual contém 2746 pb e apresenta um sítio de resistência à ampicilina, além das seqüências dos promotores para as enzimas *SP6* e *T7* RNA polimerase flanqueando a região do “polilinker”, que está situado dentro da seqüência do gene *Lac Z*.

Na reação de ligação, foram utilizados 4 µl do efluente da coluna, 50 ng do vetor desfosforilado e linearizado com a enzima *SmaI*, tampão de ligação 1x concentrado, 10 mM DTT e 5,5 unidades de *T4* DNA ligase, em um volume de reação de 20 µl. Após devidamente misturados, os componentes foram incubados a 16°C por 2 horas, e 2 µl do produto de reação foram empregados na transformação de bactérias competentes.

3.2.1.4 TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES COM O CLONE DE 427 PB DA MIOSTATINA

As células competentes foram descongeladas em gelo por 5 minutos, e foram adicionados 2 µl do produto da reação de ligação. Essa mistura foi mantida em gelo por 20 minutos, incubada por 45-50 segundos a 42°C, permanecendo novamente em gelo por mais 2 minutos. Em seguida, foram adicionados à cultura 950 µl de meio SOB à temperatura ambiente, e seguiu-se um período de incubação a 37°C, 150 rpm por 1,5 horas até o plaqueamento em meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25%

NaCl; 4% ágar) contendo 10 µg/ml de ampicilina, 50 µg/ml de X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) e 0,1 mM IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosida).

Durante o plaqueamento, foram realizados três tipos de controle: o primeiro constituiu-se de uma placa contendo apenas meio LB (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl; 4% ágar) e *E. coli* sem o inserto. Neste teste obteve-se, após incubação das placas a 37°C por 15 horas, uma cobertura completa da superfície do meio de cultura com células bacterianas, o que era esperado para a certificação de que essas células estavam viáveis. O segundo controle foi realizado utilizando-se uma placa com meio LB contendo 0,1 mg de ampicilina/ml de meio, plaqueada com *E. coli* não transformada. Nenhuma colônia cresceu nesse meio, já que sem o plasmídeo pGEM-4Z® ou o pUC18 esta bactéria não apresenta resistência a esse antibiótico. O terceiro e último teste foi realizado em uma placa contendo LB e ampicilina na concentração mencionada acima; 0,1 mM IPTG e 50 µg/ml X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida). Essa placa recebeu *E. coli* transformada com o plasmídeo pGEM-4Z® sem o inserto de DNA, e apenas colônias azuis foram obtidas nesse controle, conforme o esperado, pois a ausência do inserto de DNA manteve o gene *Lac-Z* intacto e exercendo sua função de produzir β-galactosidase para a degradação da lactose e da X-gal, uma lactose sintética que, ao ser degradada, forma um precipitado azul, gerando o aparecimento dessa cor às colônias.

Após um período de incubação a 37°C por 13 horas, foi possível selecionar as colônias transformadas com o plasmídeo contendo os fragmentos de DNA de interesse. Essas colônias foram coletadas da placa em condições estéreis e inoculadas para crescer individualmente em tubos contendo 5 ml de meio LB líquido (1% triptona; 0,5% extrato de levedura; 0,25% NaCl) e 0,1 mg de ampicilina/ml de meio, a 37°C por 15 horas.

3.2.1.5 MINIPREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL

Para a extração dos plasmídeos, 1,5 ml da cultura de bactérias *E. coli* transformadas com o clone da miostatina foi coletado e centrifugado a 12000 x g por 30 segundos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 100 µl de

GET (50 mM glicose; 2,5 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM EDTA). Em seguida, 200 µl de uma solução contendo SDS 1% (dodecil sulfato de sódio) e NaOH 0,2 N recém-preparada foram adicionados ao tubo, as amostras foram misturadas por inversão e permaneceram por 10 minutos em gelo. Posteriormente, foram adicionados 150 µl de acetato de potássio 3M (3M acetato de potássio; 11,5% ácido acético glacial), e procedeu-se uma nova incubação em gelo por 20 minutos. O tubo foi centrifugado a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e o sobrenadante foi coletado para um novo tubo, onde foi adicionado 1 ml de etanol absoluto gelado, seguido por uma nova centrifugação a 12000 x g, 15 minutos a 4°C. O precipitado foi lavado com 500 µl de etanol 70% e, finalmente, após uma nova centrifugação a 10000 x g por 5 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado permaneceu secando por 1 hora a 37°C antes de ser ressuspensionado em 20 µl de tampão T.E. (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 e 10 mM EDTA) contendo 10 µg/ml de RNase e ser incubado a 37°C por 15 minutos.

Para confirmar a eficiência da minipreparação, 2 µl do produto de DNA plasmidial foram submetidos a uma eletroforese em gel de agarose 0,8%.

3.2.1.6 DETERMINAÇÃO DA ORIENTAÇÃO E PRÉ-CONFIRMAÇÃO DA IDENTIDADE DO PRODUTO CLONADO

Para obter uma confirmação prévia da identidade do produto clonado, além de determinar sua orientação no vetor de expressão, aproximadamente 500 ng desse produto foram digeridos com 8,5 unidades da enzima *EcoRI* na presença do tampão "one phor all" (100 mM Tris-acetato pH 7,5; 100 mM acetato de magnésio e 500 mM acetato de potássio) 2x concentrado (Amersham Pharmacia Biotech) em um volume final de reação de 20 µl. A digestão ocorreu por 2 horas a 37°C, e o produto obtido foi analisado por eletroforese em gel de agarose 3%.

3.2.1.7 SEQUENCIAMENTO DO CLONE DA MIOSTATINA

O sequenciamento do fragmento de 427 pb clonado no vetor pGEM-4Z a ser utilizado como fita molde para as sondas de RNA "sense" e "antisense" foi realizado para uma confirmação definitiva de sua identidade. A reação de sequenciamento foi

realizada segundo instruções do kit DYEnamic™ Terminator Cyclor Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech), desta forma, 500 ng de DNA foram empregados em uma reação contendo 2 µl do Kit-Mix; 3,2 pmol do "primer" M13 universal (5'-GTAAAACGACGGCCAGT³) e 6 µl de tampão contendo 200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂ em um volume total de reação de 20 µl. Foram realizados 25 ciclos de amplificação com temperaturas de 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C por 5 segundos (anelamento) e 60°C por 4 minutos (extensão). Em seguida, a amostra foi precipitada pela adição de 80 µl de isopropanol, mantida à temperatura ambiente por 15 minutos e centrifugada a 13800 x g por 20 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado em 250 µl de isopropanol 75%, seguindo-se uma nova centrifugação a 13800 x g por 15 minutos. Após eliminação do sobrenadante, o precipitado foi seco, ressuscitado em 4 µl de tampão de carregamento (5:1 formamida: "blue dextran"), a amostra foi desnaturada a 98°C por 2 minutos e 1 µl da reação de seqüenciamento foi aplicado em um gel de acrilamida 4,25% [Gel Mix® (Gibco/BRL)]. O tempo de corrida foi de aproximadamente 7 horas em um seqüenciador automático ABI 377 (Perkin Elmer).

3.2.1.8 TRANSCRIÇÃO "IN VITRO" PARA A SÍNTESE DAS SONDAS DE RNA "SENSE" E "ANTISENSE" DO GENE DA MIOSTATINA

Na reação de transcrição *in vitro* é importante que o DNA a ser utilizado como molde apresente alta pureza e esteja linearizado. Devido à orientação do inserto no vetor de expressão, a linearização do clone foi realizada na presença da enzima *KpnI* para a síntese da sonda "antisense", em uma reação de digestão com volume final de 50 µl contendo 3 µg de DNA plasmidial, 16 unidades da enzima *KpnI* e tampão de reação 1x concentrado (Amersham Pharmacia Biotech), mantida a 37°C por 4 horas. Para a síntese da sonda "sense" 3 µg de DNA plasmidial foram digeridos em 10 unidades da enzima *BamHI* em tampão de reação "one phor all" 1x concentrado (Amersham Pharmacia Biotech) em um volume final de 50 µl a 37° C por 4 horas.

Após a linearização dos clones, uma extração com fenol/clorofórmio foi realizada. Para isso, 100 µl de água milli-Q e 100 µl da mistura fenol:clorofórmio (1:1) foram adicionados às amostras, e estas foram agitadas mecanicamente por 30 segundos. Em seguida, procedeu-se a uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, e a fase aquosa superior foi coletada para novos tubos, sendo adicionados a eles NaCl em uma concentração final de 100 mM e 2 vezes o volume de etanol absoluto. Os tubos permaneceram a -20°C por 12 horas para a precipitação do DNA, e a seguir foram centrifugados a 12000 x g por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o precipitado obtido foi lavado em 150 µl de etanol 70%. Após nova centrifugação a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, o precipitado foi seco, ressuspendido em 10 µl de água milli-Q e quantificado em um espectrofotômetro a 260 nm.

A síntese das sondas ocorreu com o emprego do kit DIG RNA Labelling® (Boehringer Mannheim), em tubos separados, com volume final de reação de 20 µl. No caso da sonda de RNA "sense", a 1 µg de DNA plasmidial purificado e linearizado foram adicionados tampão de transcrição 1x concentrado, 2 µl de uma mistura de NTPs marcados com digoxigenina, 2 µl da enzima SP6 RNA polimerase e 1 µl de inibidor de RNase. Essa mistura foi incubada por 2 horas a 37°C, e posteriormente 2 µl de DNase I livre de RNase foram adicionados à reação para a eliminação da fita molde de DNA, seguindo-se um período de incubação a 37°C por 15 minutos. Após esse período, 2 µl de EDTA 0,2 M, pH 8,0 foram adicionados a fim de neutralizar a reação, e a sonda marcada foi precipitada pela adição de 2,5 µl de LiCl 4 M, 75 µl de etanol 75% gelado e incubação a -70°C por 30 minutos. Após precipitação, foi realizada uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos, o precipitado foi lavado em 50 µl de etanol 70% gelado, seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 100 µl de água DEPC a 37°C por 30 minutos. Em seguida, 1 µl de inibidor de RNase foi adicionado ao tubo para proteger a sonda de possíveis contaminações com RNase.

Para a síntese da sonda "antisense", algumas modificações foram realizadas: 1 µg do plasmídeo linearizado foi inicialmente submetido a uma reação com volume final de 15 µl contendo tampão de transcrição 1 x concentrado e 8,1 unidades da enzima *Klenow* com incubação a 22°C por 15 minutos, conforme recomendado pelos fabricantes do DIG

RNA Labelling Kit[®] (Boehringer Mannheim). Este procedimento foi adotado pois a utilização de determinadas enzimas, tais como a *KpnI*, durante a linearização do DNA plasmidial resulta em extremidades protuberantes nas fitas de DNA, prejudicando a reação de transcrição *in vitro*. Após essa reação inicial, foram adicionados 2 µl da mistura de NTPs marcados com digoxigenina, 2 µl da enzima *T7* RNA polimerase e 1 µl de inibidor de RNase. A partir dessa etapa, a síntese da sonda "antisense" prosseguiu de maneira idêntica à da sonda "sense".

3.2.1.9 QUANTIFICAÇÃO E HIDRÓLISE DAS SONDAS

As sondas foram quantificadas pela técnica de "Dot Blot". Para isso, os RNAs marcados com digoxigenina obtidos durante as reações de transcrição *in vitro* foram diluídos serialmente (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000; 1:100000) e 1 µl de cada diluição das sondas "sense" e "antisense" foi aplicado em uma membrana de náilon, contendo 1 µl da diluição das amostras controle (presentes no kit), em concentrações que variaram de correspondendo a 0,1 µg/µl a 10 pg/µl. A membrana contendo as amostras foi mantida em estufa a 80°C por 30 minutos, e a revelação do sinal ocorreu com o emprego do kit Gennius Systems 7 (DIG Luminescent Detection Kit, Boehringer Mannheim). Para isso a membrana de náilon foi embebida em tampão maleato (100 mM de ácido maléico pH 7,5; 150 mM NaCl), incubada por 5 minutos em solução bloqueadora [1:5 10% solução bloqueadora estoque (10% reagente bloqueador para hibridização de ácidos nucleicos; 0,1 M maleato de sódio pH 7,5):tampão maleato)]. Posteriormente, foi realizada uma nova incubação por 5 minutos em solução bloqueadora contendo 0,2% de anticorpo anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina. Concluídas as incubações, a membrana de náilon foi lavada em tampão maleato e incubada por 2 minutos em 2,5 ml de Genius buffer 3 (100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl e 50 mM MgCl₂). Para a revelação do sinal, a membrana de náilon foi imersa por 1 hora em Genius buffer 3 contendo 9 µl de NBT (cloreto de tetrazolio nitro azul) e 7 µl de X- fosfato (5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato).

A hidrólise das sondas em fragmentos de aproximadamente 200 pares de bases foi realizada para facilitar o acesso do RNA dig-marcado aos tecidos a serem

hibridizados. Foram hidrolisados 0,2 µg de cada sonda “sense” e “antisense” marcadas com digoxigenina pela adição de 2 volumes de tampão carbonato (60 mM Na₂CO₃; 40 mM NaHCO₃ pH 10,2), seguido por um período de incubação de 10 minutos a 60°C. Após essa fase, foi adicionado igual volume de tampão de neutralização (1 M Tris-HCl pH 8,0; 1,5 M NaCl), 1 µl de glicogênio 20 mg/ml e 3 volumes de etanol absoluto para a precipitação o RNA. A precipitação ocorreu a -70°C por 12 horas, em seguida os tubos foram centrifugados a 12000 x g, por 15 minutos a 4°C, os precipitados obtidos foram lavados em 100 µl de etanol 70%, e após nova centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente, os precipitados foram secos e ressuspensos em 20 µl de água DEPC.

Para verificar se a hidrólise ocorreu satisfatoriamente, foi preparado um gel de agarose 1,5% em condições desnaturantes [1,5% agarose; tampão de corrida 1x (0,2 M MOPS pH 7,0; 80 mM acetato de sódio e 10 mM EDTA) e 2,2 M formaldeído]. Nesse gel, foram aplicados 1 µl do controle do kit (aproximadamente 760 bp), 3 µl da sonda hidrolisada e 3 µl da sonda não hidrolisada, previamente desnaturadas por incubação a 65°C por 7 minutos. Após eletroforese, o gel foi lavado 2 vezes em SSC 10x (1,5 M NaCl; 150 mM citrato de sódio pH 7,0) por 10 minutos e foi colocado em um sistema de transferência composto por uma ponte de papel Whattmann e papel de filtro embebidos em SSC 10x. Logo acima do gel foi colocada uma membrana de náilon e, sobre esta, papel de filtro, ambos embebidos em SSC 2x (1:5 10xSSC/água). Finalmente foram adicionados ao sistema de transferência várias camadas de papel toalha comprimidas por um peso visando a um maior contato entre componentes do sistema de transferência. A transferência ocorreu por 16 horas, e então a membrana de náilon foi retirada do sistema e colocada em estufa a 80°C por 30 minutos para a fixação do RNA. Em seguida a membrana foi umedecida em tampão maleato, incubada por 5 minutos em solução bloqueadora estoque 10% e novamente por 5 minutos em solução bloqueadora estoque 10%, contendo 0,2% anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina. A membrana passou por 2 lavagens de 5 minutos cada em tampão maleato, foi incubada em Genius buffer 3 por 2

minutos e finalmente em 2 ml de Genius buffer 3, contendo 9 µl de NBT e 7 µl de x-fosfato por 2 horas.

3.2.2 *Análises de hibridização in situ*

O protocolo utilizado foi inicialmente descrito por Coutinho et al. (1992). Foram utilizados nestes ensaios embriões de galinha nos estádios HH20 e HH24 coletados conforme descrito no item 3.1.1. Esses embriões, após coleta e estadiamento, foram lavados em PBS 1x (0,14 M NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 1,8 mM KH₂PO₄; pH 7,4) e fixados em paraformaldeído 4% dissolvido em PBS 1x, por 12 horas a 4°C. Após a fixação, os embriões foram transferidos para uma solução de etanol 70%, na qual foi realizada a retirada de suas membranas envoltórias. Em seguida, os embriões foram submetidos a uma série de lavagens de 2 minutos cada em etanol 80%, 95% e 100%, seguida por uma lavagem de 5 minutos em etanol 100%, incubação por 5 minutos em 1:1 etanol 100%/xileno 100% e posterior incubação por 30 minutos em xileno 100% para completar a desidratação. Após essa fase, os embriões foram lavados rapidamente em etanol 100% por 5 vezes e foram reidratados progressivamente por incubações de 2 minutos em etanol 95%, 80% e 70%. Os embriões reidratados foram lavados 3 vezes em PBT-3 (PBS 1x contendo 0,3% de TRITON X-100) por 2 minutos cada e digeridos a 37°C em tampão proteinase K (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 30 µg/ml de proteinase K) por 10 minutos, no caso dos embriões no HH20, e 15 minutos, no caso de embriões HH24. Em seguida os embriões foram novamente lavados 3 vezes em PBT-3 por 2 minutos cada e finalmente incubados por 10 minutos em 1:1 PBT-3/solução de hibridização [50% formamida; 4x SSC; 1x solução Denhardt's (5 g Ficoll, 5 g polivinilpirolidona, 5 g albumina de soro bovino em um volume final de 500 ml); 0,5 µg/ml DNA de esperma de salmão desnaturado, 0,25 µg/µl tRNA de levedura e 10% dextran sulfato] e pré-hibridizados em solução de hibridização por 3 horas a 57°C.

Durante a hibridização, alguns embriões foram incubados na presença da sonda “antisense” da miostatina, outros receberam a sonda “sense” e alguns ainda não receberam sonda. As sondas adicionadas à solução de hibridização em uma concentração de 1ng/μl, foram previamente desnaturadas. Os embriões que não receberam sonda foram incubados apenas em solução de hibridização. A hibridização ocorreu por 45 horas a 57°C. Após esse período, os embriões foram lavados em solução de hibridização, na ausência das sondas, a 57°C por períodos consecutivos de 5 minutos, 2,5 horas e 16 horas, e finalmente foram lavados em solução de hibridização/PBT-3 nas proporções (80%/20%, 60%/40%, 40%/60% e 20%/80%) por 30 minutos cada e 2 vezes lavados em PBT-3 por 1 hora cada lavagem.

O procedimento de imunodeteção do sinal de hibridização iniciou-se com a incubação dos embriões em PBT-3 contendo 5% de soro de galinha por 1 hora, seguida de uma nova incubação em PBT-3 contendo 5% de soro de galinha e anticorpo anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina em uma proporção de 1:2000, por 2 horas à temperatura ambiente. Os embriões foram submetidos a 2 lavagens rápidas em PBT-3, 5 lavagens de 20 minutos cada em PBT-5 (PBS 1x contendo 0,5% de Triton X-100), 2 lavagens de 15 minutos cada em CT-3 (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂ pH 9,5; 0,3% Triton X-100) sendo finalmente incubados em 1 ml de CT (100 mM Tris-HCl; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂; pH 9,5), contendo 4,5 μl de NBT e 7,5 μl de X-fosfato na ausência de luz por aproximadamente 12 horas para a geração do sinal. A reação colorimétrica foi interrompida pela adição de tampão T.E. (100 mM Tris-HCl, pH 7,5 e 10 mM EDTA) e os embriões, foram fotografados em um microscópio estereoscópico Wild M8 (Leica) com aumentos de 10 a 35x.

3.2.2.1 RT-PCR-COMPETITIVA PARA CONFIRMAÇÃO DOS RESULTADOS DE HIBRIDIZAÇÃO “IN SITU”

Este ensaio de RT-PCR-competitiva foi realizado com a finalidade de detectar diferenças no padrão de expressão da miostatina em embriões de galinha nos estádios HH1, HH20 e HH24 da embriogênese. Esses estádios foram escolhidos porque HH1 corresponde a um estágio inicial do desenvolvimento embrionário, em que se supõe

haver um nível menor de expressão da miostatina, e HH20 e HH24 foram estádios já utilizados nas análises de hibridização *in situ*. Desta forma, seria possível confirmar esses resultados por análises de RT-PCR-competitiva.

Inicialmente, foi necessária a construção de um fragmento denominado “competidor”, o qual tem a finalidade de competir com o fragmento endógeno em uma reação de amplificação. Esse fragmento competidor deve apresentar algumas particularidades tais como: apresentar uma deleção de alguns pares de bases em comparação ao produto endógeno amplificado, bem como apresentar regiões de flanqueamento dos “primers” homólogas às presentes no fragmento endógeno.

O fragmento competidor utilizado neste ensaio foi construído com base na metodologia descrita por Tsai & Wiltbank (1996). Esse procedimento envolveu a construção de um “primer” denominado “direto competidor”, o qual apresentava, adjacente à sequência do “primer” direto utilizado nos ensaios de RT-PCR (situada entre os nucleotídeos 301 e 320 do mRNA da miostatina), uma sequência de 19 bases situada entre os nucleotídeos 369 a 387 do mRNA da miostatina. A sequência do “primer” direto competidor foi representada pela sequência de nucleotídeos 5’AGTAGCGATGGCTCTTTGGAGGAGTCTGATTTTCTTGTA’3’.

A amplificação de 10% do volume de cDNA de embrião de galinha obtido na reação de transcrição reversa com o “primer” direto competidor em associação com o “primer” reverso da miostatina (5’CTGGGAATGTGACAGCAAGA’3’) gerou um produto amplificado de 378 pb. Este fragmento competidor, apresentava uma deleção de 49 pb entre os nucleotídeos 320 e 369 do mRNA da miostatina de galinha. Essa amplificação foi realizada de maneira similar à descrita no item 3.1.4, sendo o programa composto por 35 ciclos de amplificação.

O tamanho e a identidade do fragmento competidor foram confirmados pela digestão com enzima de restrição, onde 500 ng deste fragmento foram digeridos com 4,0 unidades da enzima *EcoRI* na presença do tampão (Amersham Pharmacia Biotech) em um volume de reação de 20 µl, por 2 horas a 37°C. Em seguida, esse produto foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídeo 0,5 µg/ml.

Após obtenção do fragmento competidor, as reações de PCR quantitativa ocorreram na presença de 10% do volume final de reações de transcrição reversa para a síntese de cDNA de embriões nos estádios HH1, HH20 e HH24. É importante destacar que cada amostra de cDNA foi obtida a partir de um único embrião pela metodologia descrita no item 3.1.3. Além do cDNA, fizeram parte da reação tampão de PCR 1x concentrado; 2 mM $MgCl_2$; 0,4 mM dNTPs; 0,2 μM “primer” direto ($5'AGTAGCGATGGCTCTTTGGA^3$); 0,2 μM primer reverso ($5'CTGGGAATGTGACAGCAAGA^3$); 2,5 unidades de *Taq* DNA polimerase (Gibco/BRL) e 1 μl do fragmento competidor em uma diluição de 10^{-5} fmoles, completando-se o volume das reações para 25 μl com água contendo carreador (plasmídeo BlueScript) em uma concentração de 10 fmoles. O programa de amplificação utilizado apresentou uma desnaturação inicial de 3 minutos a $94^\circ C$, seguida de 40 ciclos de amplificação com desnaturação a $94^\circ C$ por 30 segundos, anelamento a $62^\circ C$ por 40 segundos, extensão a $72^\circ C$ por 40 segundos e, acabadas as 40 repetições desse ciclo, seguiu-se uma extensão final a $72^\circ C$ por 5 minutos. As amostras amplificadas foram submetidas à eletroforese em um gel de agarose 2% para a separação dos fragmentos, e o mesmo foi corado em solução 0,5 $\mu g/ml$ brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados por exposição à luz ultravioleta.

3.2.3 Cortes histológicos dos embriões hibridizados

Os embriões HH24 hibridizados com a sonda “antisense” do gene da miostatina foram utilizados para a realização de cortes histológicos no sentido transversal, envolvendo a região dos somitos mediano-caudais (mais jovens) e mediano-craniais (mais desenvolvidos) para que o sinal gerado pela sonda, correspondendo ao local da expressão do mRNA da miostatina, pudesse ser mais precisamente identificado. Os embriões foram emblocados em agarose 10% e submetidos a cortes histológicos com 70 μm de espessura em um Vibratomo-1000 Formely Lancer® (Technical Products International, Inc.) Os cortes foram imobilizados em lâminas de vidro e fotografados em

sistema de microfotografia composto por uma câmera fotográfica Wild MPS 48 (Leica) acoplada a um microscópio DMIL (Leica).

3.3 Caracterização do transcrito alternativo da miostatina em galinha

Durante a realização dos ensaios de RT-PCR para o estudo da ontogenia do gene da miostatina em embriões de galinha, além do fragmento de tamanho esperado, com 427 pb, os “primers” utilizados (descritos no item 3.1.4) também permitiram a amplificação de outro fragmento de aproximadamente 275 pb. Algumas condições utilizadas nos ensaios de PCR foram alteradas visando a minimizar a amplificação desse fragmento de tamanho inesperado, acreditando tratar-se de um produto de amplificação inespecífico. Devido à persistência da amplificação desse fragmento com 275 pb, o mesmo foi eluído de géis de agarose, purificado e seqüenciado para a determinação de sua identidade.

3.3.1 Eluição e seqüenciamento do transcrito alternativo

A eluição do fragmento foi realizada de maneira similar àquela descrita no item 3.2.1.1 e, sendo o produto precipitado para uma concentração final de 200 ng/ μ l, a qual é necessária para a realização de seqüenciamento direto do produto de PCR, sem clonagem prévia. Para isso, foram adicionados ao fragmento de DNA eluído e purificado 0,1 volume de 3M acetato de sódio e 2,5 volumes de etanol absoluto, sendo incubado a – 70°C por 10 minutos. Em seguida, procedeu-se uma centrifugação a 12000 x g por 15 minutos, o sobrenadante obtido foi descartado e o precipitado foi lavado em 100 μ l de etanol 70%. Uma nova centrifugação a 12000 x g por 5 minutos foi realizada e o precipitado foi seco à temperatura ambiente e ressuspendido em 5 μ l de água milli-Q. A

concentração deste material foi estimada após eletroforese, por comparação com uma amostra de concentração conhecida.

A reação de seqüenciamento foi realizada com o emprego do kit DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) na presença de 400 ng do fragmento eluído, 2 µl do kit-mix, 3,2 pmol do “primer” direto da miostatina (5'AGTAGCGATGGCTCTTTGGA³) e 6 µl de tampão de seqüenciamento (200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂) em um volume total de reação de 20 µl. O programa de amplificação utilizado no seqüenciamento bem como a precipitação, lavagem e aplicação da amostra no gel foram realizados como descrito anteriormente no item 3.2.1.7. O seqüenciamento foi realizado em um seqüenciador automático ABI377 (Perkin Elmer).

3.4 Seqüenciamento do intron 1 do gene da miostatina de galinha

Após a confirmação da identidade do fragmento menor, obtido nas análises de RT-PCR, como sendo específico ao gene da miostatina, foi realizado o seqüenciamento do intron 1, situado entre os sítios de ancoragem dos “primers” empregados neste estudo, na busca de informações sobre as possíveis causas da ocorrência do processamento alternativo.

Esta análise envolveu várias etapas, tais como: a amplificação do DNA genômico da miostatina com os “primers” específicos, a clonagem desse fragmento, o seqüenciamento de suas extremidades, a amplificação do produto clonado, e a construção de uma minibiblioteca de DNA.

3.4.1 Amplificação do DNA genômico da miostatina de galinha

Neste ensaio, o DNA genômico de galinha foi amplificado na presença dos “primers” específicos da miostatina descritos acima, situados respectivamente nos exons 1 e 2 desse gene. A reação ocorreu na presença de 300 ng de DNA genômico, tampão de PCR 1x concentrado, 0,2 mM dNTP, 2mM MgCl₂, 0,2μM de cada “primer” e 5 unidades da enzima *Taq* DNA polimerase, em um volume final de 50 μl. O programa de amplificação utilizado apresentou uma desnaturação inicial a 94°C por 3 minutos, seguida de 35 ciclos com temperaturas de desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 65°C por 2 minutos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após esses ciclos houve uma extensão final a 72°C por 7 minutos, e os fragmentos amplificados foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado em solução de brometo de etídio 0,5 μg/ml.

3.4.2 Preparação de células de “*E. coli*” DH5α competentes

Uma colônia de bactérias *E. coli* DH5α foi coletada a partir de uma placa contendo meio LB ágar e pré-inoculada em 3 ml de meio SOB, permanecendo em agitação a 37°C por 16 horas. Em seguida, 1ml dessa cultura foi inoculada em 100 ml de meio SOB e permaneceu novamente sob agitação a 37°C até atingir D.O. entre 0,45-0,55 nm. A cultura com D. O. desejada foi dividida em 2 tubos de 50 ml cada, os quais foram mantidos em gelo por 10 minutos. Em seguida esses tubos foram centrifugados a 1500 x g, por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 15 ml de meio RF I* (30 mM acetato de potássio; 100 mM RbCl; 50 mM MnCl₂; 10 mM CaCl₂ e 15% glicerol) por agitação mecânica. Em seguida, os conteúdos dos dois tubos foram unidos em um só tubo, o qual foi mantido em gelo por 30 minutos. Após esse período, o tubo foi centrifugado a 1500 x g por 10 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspensionado em 10 ml de meio RF II* (10 mM MOPS; 10 mM RbCl₂, 75 mM CaCl₂ e 15% glicerol). Essa cultura foi mantida em gelo

por 1 hora, e foram preparadas alíquotas de 200 µl em tubos de 1,5 ml, os quais foram imediatamente congelados em nitrogênio líquido e estocados a -70° C.

3.4.3 Clonagem do fragmento de DNA genômico da miostatina

O fragmento de DNA genômico amplificado, contendo aproximadamente 2,5 kb, foi eluído do gel de agarose de acordo com o método descrito no item 3.2.1.1 e foi clonado no vetor pUC18 com o auxílio do SureClone™ Ligation kit® (Amersham Pharmacia Biotech). A reação de ligação do inserto no vetor foi realizada pela mesma metodologia descrita no item 3.2.1.3, entretanto, ao invés da utilização do vetor de expressão pGEM-4Z, o fragmento de DNA genômico foi clonado no vetor pUC18, presente no kit utilizado.

A reação de transformação foi realizada na presença de 2 µl do produto de ligação, que foram misturados a 200 µl de células competentes DH5α previamente estocadas a -70°C e descongeladas em gelo. A mistura permaneceu a 0°C por 20 minutos, em seguida, o tubo foi incubado a 42°C por 90 segundos e transferido para o gelo por 2 minutos. Após esse período, 800 µl de meio SOB foram adicionados ao tubo e este permaneceu a 37°C com agitação moderada por 1 hora. Após esse período, a cultura foi centrifugada a 735 x g por 1 minuto e plaqueada em placas de meio LB contendo 50 µg/ml de ampicilina e 50 µg/ml de X-Gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosida) para possibilitar a seleção das colônias transformadas (coloração branca). As colônias selecionadas foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio LB líquido e ampicilina em uma concentração de 50 µg/ml de meio, e essa cultura permaneceu a 37°C sob agitação durante 12 horas para favorecer a multiplicação bacteriana. A minipreparação do DNA plasmidial foi realizada pelo método de lise alcalina descrito no item 3.2.1.5.

3.4.4 Sequenciamento das extremidades do clone de DNA genômico da miostatina

Os clones obtidos foram seqüenciados em tubos de reação, contendo o “primer” M13 universal direto (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'), e em tubos de reação contendo o “primer” M13 reverso (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). A reação foi composta por 3,2 pmoles de “primer”; 2 µl DYEnamic™ Terminator Cyclor Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech) e 500 ng do DNA plasmidial, o programa utilizado para a amplificação foi o mesmo descrito no item 3.2.1.7. Após amplificação, as amostras foram precipitadas com 1 µl de 1,5 M acetato de sódio/250 mM EDTA, água milli-Q até completar 6 µl e 40 µl de etanol 96%. Essa mistura foi agitada mecanicamente e permaneceu no gelo por 20 minutos, em seguida foi realizada uma centrifugação a 13800 x g, por 15 minutos à temperatura ambiente, o sobrenadante obtido foi descartado e foram adicionados ao precipitado 250 µl de álcool 70%, os tubos foram novamente centrifugados a 13800 x g por 10 minutos à temperatura ambiente e, após descarte do sobrenadante, o precipitado ficou secando em uma estufa a 37°C por 15 minutos. As amostras foram ressuspensas em 4 µl de tampão de carregamento (5:1 formamida:"blue dextran"), desnaturadas a 98°C por 2 minutos e colocadas imediatamente em gelo. Em seguida, 2 µl de cada amostra foram colocados no gel de poliacrilamida para eletroforese em um seqüenciador automático ABI-377 (Perkin Elmer). Esse seqüenciamento foi realizado para a obtenção das extremidades do fragmento, visando a facilitar o alinhamento dos outros clones para a obtenção da seqüência consenso.

3.4.5 Construção da Minibiblioteca de DNA genômico

Com a finalidade de obter uma quantidade suficiente de fragmentos de DNA genômico para a construção da minibiblioteca, o clone da miostatina que teve suas extremidades seqüenciadas foi amplificado com os “primers” M13 universal e M13 reverso, com o emprego do Kit Elongase® Amplification System (Gibco/BRL). Para isso

foi preparada uma reação contendo 0,2 mM dNTP; 9,6 pmoles de cada “primer”; aproximadamente 300 ng do DNA plasmidial; 0,4x tampão A; 0,6x tampão B e 2 µl de Mix de enzima elongase em um volume final de 50 µl. O programa utilizado apresentou uma pré-desnaturação a 94°C por 30 segundos, e em seguida, foram repetidos 35 ciclos com temperatura de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 68°C por 2,5 minutos. O produto amplificado foi corado em solução 0,5 µg/ml brometo de etídio e visualizado em gel de agarose 0,8%.

O produto de PCR foi sonificado e as extremidades dos fragmentos gerados foram reparadas em uma reação contendo 20 µl do produto sonificado; 5 unidades da enzima *T4* polimerase; tampão da enzima 1x concentrado e 0,2 mM dNTP em um volume de reação de 35 µl. Após 20 minutos a 37°C, foram adicionadas a essa reação 4,7 unidades do fragmento *Klenow*, a reação então permaneceu por 15 minutos à temperatura ambiente. O produto foi separado por eletroforese em gel de agarose 0,8% e em seguida, com o auxílio de um bisturi, foram recortadas as porções do gel contendo fragmentos com tamanho variando de 500 a 1200 pb, os quais foram colocados em um tubo de 1,5 ml que foi submetido à centrifugação por alguns segundos para sedimentação da agarose. Em seguida, os fragmentos de gel foram aquecidos a 65°C por 5 minutos com agitação constante e adicionou-se 0,1 volumes de NaCl 4N, seguido de uma nova incubação a 65°C por 3 minutos com agitação constante. Posteriormente 1 volume de fenol foi adicionado e, após homogeneização, seguiu-se uma centrifugação a 13800 x g por 15 minutos à temperatura ambiente, visando à obtenção de uma fase aquosa superior que foi recuperada. Esses procedimentos de adição de fenol, centrifugação e recuperação do sobrenadante foram repetidos por mais 2 vezes. Aos sobrenadantes coletados foram adicionados 2 volumes de éter etílico saturado com água e as amostras foram centrifugadas a 13800 x g por 1 minuto à temperatura ambiente, sendo descartada a fase superior. Os processos de adição de éter etílico e centrifugação foram repetidos mais duas vezes e, após a última retirada da fase superior, o tubo foi colocado em um bloco aquecedor a 37°C por 5 minutos para a evaporação total do éter. Em seguida, 0,1 volume de 3M acetato de sódio pH 5,2 e 1 ml de etanol absoluto foram adicionados para a precipitação do DNA, em incubação a -70°C por 1 hora. A amostra foi então

centrifugada a 13800 x g por 20 minutos a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado de DNA foi lavado em 500 µl de etanol 70%. Após 5 minutos de centrifugação a 10000 x g, o etanol foi descartado, o precipitado foi seco à temperatura ambiente, ressuspendido em 50 µl de água milli-Q estéril e quantificado em um espectrofotômetro a 260 nm.

A ligação dos fragmentos foi realizada na presença de 130 ng de DNA sonificado; 25 ng do vetor pUC18 linearizado com a enzima *Sma*I e desfosforilado (SureClone Ligation Kit); 0,5 µl DTT (presente no SureClone Ligation Kit); 5 unidades da enzima *T4* DNA ligase e tampão da enzima 1x concentrado, em um volume final de 10 µl, a reação ocorreu por 16 horas a 16°C. A transformação das células competentes de *E. coli* DH5α foi realizada pela mesma metodologia descrita no item 3.4.3, entretanto com todo o volume da ligação (10 µl), bem como o plaqueamento e a minipreparação do DNA plasmidial. Os clones obtidos foram seqüenciados em reação contendo 3,2 pmoles do “primer” M13 universal direto (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3'); 2 µl da mistura de reação presente no kit DYEnamic™ Terminator Cycle Sequencing (Amersham Pharmacia Biotech) e aproximadamente 300 ng do DNA plasmidial. O programa utilizado para a amplificação foi o mesmo descrito no item 3.4.4, assim como a precipitação e a lavagem do DNA.

As seqüências obtidas dos clones foram alinhadas com o auxílio do programa Sequencer V. 3.1.1 e, em seguida, a qualidade das seqüências foi analisada com o emprego do “software” Phed Phrap Consed (Phil Green, 1998). Mesmo com a obtenção da seqüência consenso total, foi necessário o seqüenciamento de alguns clones com o “primer” M13 reverso e com o “primer 1” (5'-AGTAGCGATGGCTCTTTGGA-3') interno à seqüência consenso obtida, visando a obter confirmação dessa seqüência pela repetição de duas fitas em orientações distintas. Mais uma vez foi empregada a mesma metodologia mencionada anteriormente. A seqüência consenso foi submetida ao banco de dados GenBank, número de acesso gi|9739164.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Expressão temporal do gene da miostatina

O estudo da expressão temporal da miostatina foi verificado ao longo do desenvolvimento embrionário de galinha e também nos tecidos muscular esquelético e hepático de um frango de corte com 14 dias, por análises de RT-PCR.

Foram visualizados sinais da expressão da miostatina em todos os estádios da embriogênese analisados, desde o estágio HH1 (ovo recém-posto) até o estágio HH26 (embriões com 5 dias). Nos animais com 14 dias, foi detectada expressão desse gene apenas no tecido muscular peitoral, não sendo possível visualizar qualquer sinal de expressão no tecido hepático (Figura 1). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos por McPherron et al. (1997), onde foi observado que a expressão da miostatina ficou restrita à musculatura esquelética em camundongos. Na Figura 1, é possível observar, além do fragmento da miostatina de tamanho esperado (427 pb), outro de menor tamanho (275 pb), também específico para esse gene.

No gel apresentado na Figura 1 estão representadas apenas 2 amostras de cada estágio estudado, investigando as demais amostras, foi possível observar que houve amplificação da banda da miostatina em 60% das amostras de HH1, 90% das amostras de HH10, HH15 e HH18 e em 100% das amostras dos outros estádios (HH5, HH8, HH12, HH20, HH21, HH23, HH24 e HH26). A ausência de produto amplificado em 40% das amostras de embriões no estágio HH1 pode ter sido resultado de uma mínima quantidade de transcrito da miostatina próxima ao limite de detecção da técnica. Nos

outros estádios, pode ter havido uma degradação parcial das amostras entre o período no qual a qualidade dessas amostras foi testada por meio de amplificação para o gene da β -actina e o momento da amplificação para o gene da miostatina.

FIGURA 1: Expressão temporal da miostatina por RT-PCR ao longo do desenvolvimento embrionário de galinha. **HH1** a **HH26**: estádios de desenvolvimento das amostras amplificadas, **M**: tecido muscular peitoral; **F**: tecido hepático; **P**: padrão de peso molecular ϕ X174/*Hae*III (Gibco/BRL). Os números na lateral esquerda de cada gel indicam os tamanhos do padrão de peso molecular em pb, e as setas indicam os fragmentos amplificados com 427 e 275 pb.

É pouco provável que a miostatina não esteja sendo expressa nas amostras que não geraram resultados, visto que em um estudo realizado por Kocamis et al. (1999) utilizando a técnica de RT-PCR-quantitativo em amostras de cDNA de galinha, foi detectada expressão da miostatina desde o estágio de HH1 até o estágio correspondente a 20 dias de incubação. Além disso, registros na literatura relatam que a miostatina apresenta forte atuação na fase pré-natal e provavelmente está associada à inibição da proliferação de mioblastos durante a embriogênese (Bass et al., 1999).

4.2 Estudo espacial do gene da miostatina

As análises de RT-PCR permitem detectar se o transcrito de interesse está presente nas amostras, mas não é informativa quanto ao local da expressão desse gene. Para isso, embriões inteiros de galinha foram submetidos à hibridização *in situ* com o emprego de uma sonda de RNA “antisense” digoxigenina-marcada. A localização dos sinais da expressão desse gene ocorreu nos somitos dos embriões (Figuras 2A e B), que correspondem às estruturas embrionárias que vão originar a musculatura esquelética durante a embriogênese. A hibridização com a sonda de RNA “sense” da miostatina marcada com digoxigenina serviu como controle da especificidade deste sinal e ainda, alguns embriões foram submetidos aos mesmos procedimentos experimentais, entretanto foram colocados em solução de hibridização sem sonda.

Embriões no estágio HH20 apresentaram um sinal de hibridização localizado na região distal dos somitos em relação ao complexo tubo neural/notocorda, estando esse sinal restrito aos somitos mediano-caudais (somitos mais jovens) (Figuras 2A e C). Em embriões no estágio HH24, o sinal gerado pela sonda foi mais intenso, quando comparado com aquele presente em embriões HH20, envolvendo uma região mais ampla do somito e estando presente em quase todos eles, apresentando-se de maneira menos intensa apenas nos somitos situados no terço superior do corpo (Figuras 2B e D). Tais resultados estão de acordo com aqueles obtidos por McPherron et al. (1997), em que a expressão da miostatina foi demonstrada nos somitos dos embriões de camundongos.

A hibridização dos embriões com a sonda de RNA “sense” da miostatina marcada com digoxigenina não gerou marcação específica, entretanto, embriões hibridizados com essa sonda apresentaram uma coloração escura por todo o corpo, quando comparados com embriões hibridizados com a sonda “antisense” (Figura 3A). Embriões que foram submetidos à hibridização sendo incubados em solução sem sonda, como esperado, não apresentaram qualquer sinal de marcação em suas estruturas (Figura 3B).

FIGURA 2: Hibridização *in situ* de embriões de galinha com a sonda de RNA "antisense" marcada com digoxigenina, específica para a miostatina. **A)** Embrião HH20, aumento de 12x; **B)** Embrião HH24, aumento de 10x; **C)** e **D)** Embriões HH20 e HH24 respectivamente, aumento de 35x; As setas indicam o sinal gerado pela sonda.

FIGURA 3: Hibridização *in situ* de embriões inteiros de galinha no estágio HH24. **A)** Embriões hibridizados com as sondas “antisense” (esquerda) e “sense” (direita) da miostatina (aumento de 6x); **B)** Embrião incubado sem sonda (aumento de 9x). As setas indicam o sinal gerado pela sonda.

As diferenças no padrão de expressão do gene da miostatina, observadas nas análises de hibridização *in situ*, foram confirmadas por ensaios de RT-PCR-competitiva. Tais ensaios foram conduzidos em embriões nos mesmos estádios utilizados nas análises de hibridização *in situ* (HH20 e HH24) e adicionalmente em embriões HH1. A RT-PCR-competitiva foi escolhida por tratar-se de uma técnica extremamente sensível em comparada à hibridização *in situ*, sendo ideal aos estudos de expressão temporal e quantitativa. Com a técnica de RT-PCR foi possível detectar expressão da miostatina em embriões desde HH1 (Figura1), enquanto, utilizando a técnica de hibridização *in situ*, a miostatina pôde ser detectada apenas em embriões a partir do estágio HH20 da embriogênese de galinha.

A técnica de RT-PCR-competitiva consiste na co-amplificação de um transcrito de tamanho conhecido expresso na amostra com um fragmento de DNA de tamanho diferente do transcrito endógeno, adicionado no início da reação em quantidade conhecida, o qual competirá com o transcrito endógeno pelos “primers” e demais reagentes. A partir do momento em que a concentração inicial do fragmento competidor adicionado à reação de PCR é conhecida, a análise do produto amplificado por meio de comparações das intensidades das bandas geradas, pôde ser utilizada como referência para afirmar se a concentração inicial do fragmento endógeno é maior ou menor do que a do competidor.

Nos ensaios de RT-PCR-competitiva apresentados na Figura 4, não houve amplificação do fragmento endógeno da miostatina (427 pb) nos embriões do estágio HH1, estando presente apenas a banda correspondente ao fragmento competidor, em uma quantidade correspondente a 10^{-5} fmoles. Essa observação permite a conclusão de que, nesse embrião HH1, a expressão da miostatina foi menor do que 10^{-5} fmoles. A observação da amostra correspondente ao embrião HH20 permite a visualização das duas bandas, correspondentes à co-amplificação dos fragmentos endógeno e competidor. Essas bandas apresentam intensidades similares, indicando que nesse embrião HH20 os níveis de expressão da miostatina são de aproximadamente 10^{-5} fmoles. Embriões no estágio HH24 apresentaram a banda correspondente ao fragmento endógeno em

intensidade maior do que a banda do competidor, portanto, estima-se que, em tais condições, sua expressão seja superior a 10^{-5} fmoles (Figura 4).

FIGURA 4: RT-PCR-competitiva de embriões de galinha nos estádios HH1, HH20 e HH24. As setas indicam os fragmentos endógeno (427 pb) e competidor (380 pb). Além desses fragmentos é possível também detectar a presença do transcrito alternativo da miostatina (275 pb) nas amostras de embriões HH20 e HH24.

Além do fragmento competidor com 380 pb e do transcrito endógeno normal da miostatina (427 pb), pode-se observar na Figura 3, a presença de um transcrito alternativo da miostatina com 275 pb, já detectado anteriormente nas análises de RT-PCR.

A hibridização *in situ* de embriões inteiros permite a visualização do padrão espacial de expressão do gene da miostatina em todo o embrião, entretanto para observar detalhadamente em que regiões do somito a miostatina está sendo expressa, foram realizados cortes histológicos transversais de embriões HH24 hibridizados com a sonda de RNA “antisense” da miostatina. A análise desses cortes revelou que a expressão desse gene está localizada na região do miótomo dos somitos, o que pode ser observado tanto nos somitos da região caudal do embrião (somitos mais jovens) (Figura 5A) quanto naqueles situados na metade superior do corpo dos embriões (somitos mais desenvolvidos) (Figura 5B).

FIGURA 5: Cortes histológicos transversais de embriões HH24 submetidos à hibridização *in situ*. **A)** região caudal do embrião, onde estão localizados os somitos mais jovens; **B)** região mediano-cranial do embrião, onde estão os somitos mais desenvolvidos. Espessura: 70 μ m; NC: notocorda; TN:tubo neural e ST:somito. As setas indicam o sinal gerado pela sonda da miostatina na região do miótomo.

Essas descobertas concordam com os resultados apresentados por McPherron et al (1997) em análises realizadas em camundongos.

4.3 Estudo do transcrito alternativo da miostatina em galinha

Durante o estudo da ontogenia do gene da miostatina na embriogênese de galinha por análises de RT-PCR, além do transcrito esperado, com 427 pb, foi amplificado também outro transcrito, apresentando 275 pb, detectado também nas amostras amplificadas a partir do tecido muscular esquelético de um frango de corte com 14 dias (Figura 1), bem como nas amostras utilizadas nos ensaios de RT-PCR-competitiva (Figura 4).

A persistência da amplificação desse fragmento nas amostras estudadas tornou necessário seu seqüenciamento para a determinação de sua identidade. A comparação da seqüência de nucleotídeos desse fragmento alternativo contendo 275 pb com seqüências depositadas no GenBank, realizada com o emprego do programa BLAST, revelou que o mesmo é específico ao gene da miostatina. Seu alinhamento com a seqüência de 427 pb, situada entre os nucleotídeos 301 e 727 do mRNA da miostatina de galinha, mostrou que esse fragmento apresenta uma deleção entre os nucleotídeos 273 e 517, o que ocasionaria uma alteração no quadro de leitura para a síntese protéica.

Assim, durante a tradução, a proteína originada a partir desse transcrito alternativo apresentaria uma alteração na seqüência de aminoácidos a partir da posição 124, sendo que, ao atingir o aminoácido da posição 129, seria inserido um códon de terminação da síntese protéica, levando à geração de uma proteína truncada (Figura 6B).

A)

301

AGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAGAC
 GATTATCACAATGCCTACGGAGT³⁷³#CTGATTTTCTTGTACAAATGGAGGGA
AAACCAAAATGTTGCTTCTTTAAGTTTAGCTCTAAAATACAATATAACA
AAGTAGTAAAGGCACAATTATGGATATACTTGAGGCAAGTCCAAAACC
TACAACGGTGTTTGTGCAG⁵¹⁷#ATCCTGAGACTCATTAAAGCCCATGAAAGAC
 GGTACAAGATATACTGGAATTCGATCTTTGAAACTTGACATGAACCCAGGC
 ACTGGTATCTGGCAGAGTATTGATGTGAAGACAGTGCTGCAAAATTGGCTC
 AAACAGCCTGAATCCAATTTAGGCATCGAAATAAAAGCTTTTGATGAGACT
 GGACGAGATCTTGCTGTCACATTCCCAGG⁷²⁷

B)

SSDGSLEDDDYHATTETIITMPTE	aa124	aa129	
	S	D	F L V Q M E G
SSDGSLEDDDYHATTETIITMPTE	Y	P E T H	Stop

PROTEÍNA NORMAL

PROTEÍNA TRUNCADA

FIGURA 6: Esquema da sequência de nucleotídeos da miostatina referente aos fragmentos de 427 pb e 275 pb por análises de RT-PCR e de aminoácidos sintetizadas por essa região. **A)** Esquema do processamento alternativo e sequência de nucleotídeos do fragmento de 427 pb da miostatina. A sequência apresentada na cor azul corresponde à região deletada no transcrito alternativo deste gene, a sequência AG foi sublinhada por fazer parte do padrão conservado de processamento em introns GT-AG (a sequência GT está presente no intron, não representado neste esquema). **B)** sequência de aminoácidos das proteínas normal e truncada da miostatina. As sequências marcadas em azul indicam pontos onde há divergência de aminoácidos. É possível visualizar também a inserção do códon de terminação na posição 129 da cadeia, causando a síntese da proteína truncada da miostatina

Ainda na figura 6A, pode-se observar a presença dos nucleotídeos AG na junção da sequência eliminada do transcrito alternativo adjacente à sequência do cDNA. Foi observado que a sequência deletada no transcrito alternativo da miostatina estava situada entre os pares de nucleotídeos GT (correspondente aos dois primeiros nucleotídeos da sequência do intron, não representada na figura 6A) e AG (correspondendo aos dois últimos nucleotídeos retirados, imediatamente anteriores à junção) seguindo o padrão GT-AG de processamento. Entretanto, é mais comum encontrar na literatura exemplos onde exons inteiros são retirados durante o processamento alternativo. Neste caso, o processamento alternativo resultou na retirada de apenas uma parte do exon 2, e não do exon inteiro. Processamentos desse tipo são de ocorrência possível, segundo revisão publicada por Graveley (2001).

Em alguns casos, a ocorrência de processamento alternativo de introns está associada à presença de mutações em um ou mais sinais de processamento dos introns, causando seu não reconhecimento e levando à retirada de um exon ou parte dele. Com base nessa possibilidade, o intron 1 da miostatina de galinha, situado entre os sítios de ancoragem dos “primers” que geraram a amplificação do transcrito alternativo, foi totalmente seqüenciado, e sua sequência foi analisada e depositada no GenBank (gi|9739164).

A análise da sequência do intron 1 não revelou alterações no padrão de processamento GT-AG, não sendo essa a provável causa da existência do processamento alternativo (Figura 7).

AGTAGCGATGGCTCTTTGGAAGACGATGACTATCATGCCACAACCGAGAC
 GATTATCACAATGCCTACGGAGT³⁷³GTAAGTAACAACCCTGCTGCTTTTCGTCT
CGCACCGCTCCTCTGAGAGTTGTCTCTGTGCTGTAGAGCCTCACAACTCCT
TCTCAGGCTCTCCCAACAGGCTGCTGGCTGGAGTCTGCCGGAGGGAGGGA
GGAGAGTGTA.....TGCATCCACTCTGTTACCAATACCGTTTATGTAATA
TTGTAAGACATCCTACATGATCTGGAAAAAAATTGGGTTATATATGCATAT
TTCTTTTTTGTTCCTTCAGTAATTTGTTCTTTCCATTCAATTTATA³⁷⁴AGCTGA
 TTTTCTTGTACAAATGGAGGGGAAAACCAAAATGTTGCTTCTTTAAGTTTAG
 CTCTAAAATACAATATAACAAAGTAGTAAAGGCACAATTA...

FIGURA 7: Sequência de nucleotídeos do DNA genômico da miostatina de galinha. Os nucleotídeos escritos em preto correspondem à sequência codificante do gene; os nucleotídeos em azul representam uma parte do intron 1 da miostatina. A região sublinhada indica sequências que são conservadas no processamento dos introns e os números indicam a posição dos nucleotídeos na sequência codificante.

O sequenciamento do intron 1 da miostatina de galinha revelou que o mesmo apresenta 2091 pb, diferente do intron 1 da miostatina de humanos, que apresenta 1789 pb (Gonzales-Cadavid, 1998).

Novos estudos devem ser realizados a fim de investigar os mecanismos envolvidos no processo de tradução desse transcrito alternativo e na função dessa proteína truncada, pois como a sequência de aminoácidos seria interrompida muito precocemente durante a síntese dessa proteína, não seria possível a tradução da região C-terminal, composta por resíduos de cisteína importantes para a função biológica da proteína (McPherron & Lee, 1997), podendo essa proteína truncada ser não-funcional. Se realmente essa suposição for confirmada, a proteína truncada da miostatina estaria competindo com a miostatina funcional e favorecendo a deposição de massa muscular. Um estudo envolvendo a relação da expressão transcrito normal/alternativo pode ser realizados em animais com diferenças na capacidade de deposição de massa muscular e, se tais resultados demonstrarem correlação significativa, a presença do transcrito alternativo da miostatina pode ser utilizado como marcador para a seleção assistida em busca de animais com maior deposição de massa muscular.

5 CONCLUSÕES

Em tais condições concluiu-se que:

- Há indução da miostatina na embriogênese das aves;
- A detecção da expressão espacial do gene da miostatina em aves apresentou-se em estruturas embrionárias responsáveis pela formação de tecido muscular esquelético;
- Análises de hibridização *in situ* permitiram localizar a expressão deste gene na região correspondente ao miótomo;
- Foi detectado um transcrito alternativo da miostatina, apresentando uma deleção de 144 pb na sequência codificante, entre os nucleotídeos 373 e 517 do mRNA da miostatina de galinha;
- A sequência do intron 1 da miostatina de galinha apresenta 2091 pb e seus sítios de processamento seguem o padrão GT-AG;

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F.; GISH, W; MILLER, W. et al. **BLAST® (Basic Local Alignment Search Tool)**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. (20 jan, 1999).
- ALVES, H.J.; GABRIEL, J.E.; ALVARES, L.E.; COUTINHO, L.L. Neural tube/notochord complex influence on myogenic factor MyoD expression and cellular proliferation in chicken embryos. **Genetics and Molecular Biology**, 1999. /No prelo/
- BASS, J.; OLDHAM, J.; SHARMA, M. et al. Growth factors controlling muscle development. **Domestic Animal Endocrinology**, v.17, p.191-197, 1999.
- CAPDEVILA, J.; IZPISÚA BELMONTE, J.C. Extracellular modulation of the Hedgehog, Wnt and TGF- β signalling pathways during embryonic development. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.9, n.4, p.427-433, Aug., 1999.
- CARLSON, C.J.; BOOTH, F.W.; SCOTT, E.G. Skeletal muscle myostatin mRNA expression in fiber-type specific and increases during hindlimb unloading, **American Journal of Physiology**, v.277, p.601-606, 1999.
- CHOMCZYNSKI, P.; SACCHI, N. Single step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol chloroform extration. **Analitical Biochemistry**, v.162, p.156-159, 1987.

- COUTINHO L.L.; MORRIS, J.; IVARIE, R. Whole mount *in situ* detection of low abundance transcripts of the myogenic factor qmf1 and myosin heavy chain protein in quail embryos. **Biotechniques**, v.13, n.5, p.722-724, 1992.
- DIETRICH, S.; SCHUBERT, F.R.; LUMSDEN, A. Control of dorsoventral pattern in the chick paraxial mesoderm. **Development**, v.124, p.3895-3908, 1997.
- GONZALEZ-CADAVID, N.; TAYLOR, W.E.; YARASHESKI, K. et al. Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.95, p.14938-14943, Dec., 1998.
- GRAVELEY, B.R. Alternative splicing: increasing diversity in the proteomic world, **Trends in Genetics**, v.17, n.2, p.100-107, Feb., 2001.
- GROBET, L.; ROYO, L.J.; PONCELET, D. et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscle phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v.17, p.71-74, Sep., 1997.
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J. et al. Molecular definition of a allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v.9, p.210-213, 1998.
- HAMBURGER V.; HAMILTON, H.L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, v. 88, p. 49-92, 1951.
- HANAHAHAN, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. **Journal of Molecular Biology**, v.166, n.4, p. 557-580, Jun., 1983.

- JI, S.; LOSINSKI, R.L.; CORNELIUS, S.G.; FRANK, G.R. et al. Myostatin expression in porcine tissues: tissue specificity and developmental and postnatal regulation. **American Journal of Physiology**, v.275, p.1265-1273, 1998.
- KABLAR, B.; KRASTEL, K.; YING, C. et al. Myogenic determination occurs independently in somites and limb buds. **Developmental Biology**, v.206, p.219-231, 1999.
- KOCAMIS, H.; KIRKPATRICK-KELLER, D.C.; RICHTER, J. et al. The ontogeny of myostatin, follistatin and activin-B mRNA expression during chicken embryonic development, **Growth, Development & Aging**, v.63, p.143-150, 1999.
- LUCHESI, J.B. Nutrição de frangos de corte. In: CONFERÊNCIA APINCO'2000 DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, 2000. **Anais**. Campinas: FACTA, 2000. p.111-133.
- LUDOLPH, D.C.; KONIECZNY, S.F. Transcription factor families: muscling in on the myogenic program. **The FASEB Journal**, v.9, p.1595-1604, Dec., 1995.
- MASSAGUÉ, J. TGF β signal transduction. **Annual Reviews in Biochemistry**, v.67, p.753-791, 1998.
- McPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. **Nature**, v.387, p.83-90, May, 1997.
- McPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.94, p.12457-12461, Nov., 1997.

MOSES, H.L.; YANG, E.Y.; PIETENPOL, J.A. TGF- β stimulation and inhibition of cell proliferation: new mechanistic insights. **Cell**, v.63, p.245-247, Oct., 1990.

MOSES, H.L.; SERRA, R. Regulation of differentiation by TGF- β . **Current Opinion in Genetics & Development**, v.6, n.5, p.581-586, Oct., 1996.

PERRY, R.L.S; RUDNICK, M.A. Molecular Mechanisms regulating myogenic determination and differentiation. **Frontiers in Bioscience**, v.5, p.750-767, Sep., 2000.

PINNEY, D.F; EMERSON Jr, C.P. Skeletal muscle differentiation. In: RUSSO, V.E. A.; BRODY, S.; COVE, D. e OTTOLENGHI, S. **Development: the molecular approach**. Berlim: Springer-Verlag, 1992. cap.31, p.459-478.

POURQUIE, O.; COTLEY, M.; BREANT, C.; Le DOUARIN, N.M. Control os somite patterning by signals from the lateral plate. **Proccedings of the Natinal Academy os Sciences USA**, v.92, p.3219-3223, 1995.

POWNALL, M.E.; STRUNK, K.E.; EMERSON Jr, C.P. Notochord signals control the transcriptional cascade of myogenic bHLH genes in somites of quais embryos. **Development**, v.122, p.1475-1488, 1996.

ROZEN, S; SKALETISKY, H.J. **Primer 3**. <http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3.cgi>. (10 jan. 1999).

SCHMIDT, G.S. & LEDUR, M.C. Interação da genética quantitativa e molecular no processo de seleção de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLAS, Campinas, 1999. **Anais**. Campinas: APINCO, 1999. p.133-144.

- SEALE, P.; RUDNICK, M.A. A new look of the origin, function and “stem-cell” status of muscle satellite cells. **Developmental Biology**, v.218, p.115-124, 2000
- SHARMA, M.; KAMBADUR, R.; MATTHEWS, K.G. et al. Myostatin, a transforming growth factor- β superfamily member, is expressed in heart muscle and is upregulated in cardiomyocytes after infarct. **Journal of Cellular Physiology**, v.180, p.1-9, Feb., 1999.
- SLACK, J.M.W. Growth control: Action mouse. **Current Biology**, v.7, n.8, p.467-469, 1997.
- SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALEZ, N.L.; KAPPES, S.M. et al. Myostatin maps to the interval containing the bovine *mh* locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.742-744, 1997.
- SZABÓ, G.; DALLMANN, G.; MÜLLER, G. et al. A deletion in the myostatin gene causes the compact (*Cmpt*) hypermuscular mutation in mice. **Mammalian Genome**, v.9, p.671-672, 1998.
- TSAI, S. & WILTBANK, M.C. Quantification of mRNA using competitive RT-PCR with standard curve methodology. **Biotechniques**, v.21, p.862-866, 1996.
- WEHLING, M.; CAI, B. e TIDBALL, J.G. Modulation of myostatin expression during modified muscle use. **FASEB Journal**, v.14, p.103-110, Jan., 2000.

APÊNDICES

APÊNDICE 1. EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

- Homogeneizar de 50 a 100 mg de tecido em 750 µl do reagente Trizol (Life Technologies), adicionar 250 µl de água DEPC homogeneizar novamente e incubar as amostras por 5 minutos à 15-30°C;
- Adicionar 200 µl de clorofórmio a cada tubo e agitar vigorosamente os tubos contendo as amostras, manualmente, por 15 segundos. Incubar as amostras a 15-30°C por 2 a 3 minutos;
- Centrifugar as amostras a 12000 x g por 15 minutos a 4°C;
- Transferir a fase aquosa transparente (sobrenadante) para um novo tubo e se desejado estocar a fase orgânica para a extração de DNA ou proteína;
- Precipitar o RNA da fase aquosa adicionando 500 µl de álcool isopropílico e incubar as amostras a 15-30°C por 10 minutos. Centrifugar as amostras a 12000 x g por 10 minutos a 4°C;
- Remover o sobrenadante e lavar o “pellet” de RNA com 1 ml de etanol 75%. Misturar as amostras em um agitador mecânico e centrifugar a 7500 x g por 5 minutos a 4°C;
- Descartar o sobrenadante e secar parcialmente o “pellet” à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos, não deixar que o “pellet” de RNA seque completamente para que não ocorra uma grande diminuição na sua solubilidade;
- Dissolver as amostras de RNA em água DEPC e quantificar em espectrofotômetro em absorbância a 260/280 nm;

**APÊNDICE 2. SÍNTESE DE cDNA UTILIZANDO O SuperScript™
Preamplification System for First Strand cDNA Synthesis
(Life Technologies)**

- Preparar a mistura de RNA total/“primer” em um tubo estéril de 0,5 ml adicionando:

RNA total	1 µg
Oligo(dT) ₁₂₋₁₈ (0,5 µg/µl)	1 µl
água _{DEPC} ;	q.s.p. 12 µl

- Incubar a amostra a 70°C por 10 minutos e em seguida transferi-la ao gelo por 1 minuto;
- Preparar o mix de reação contendo:

Tampão de PCR 10x	2 µl
25 mM MgCl ₂	2 µl
10 mM dNTP mix	1 µl
0,1 M DTT	2 µl
- Adicionar 7 µl do mix de reação ao tubo contendo a mistura RNA total/“primer”, misturar gentilmente e centrifugar brevemente para que os reagentes desçam ao fundo do tubo;
- Incubar a 42°C por 5 minutos;
- Adicionar 1 µl (200 unidades) de SuperScript II RT a cada tubo, misturar e incubar a 42°C por 50 minutos;
- Terminar a reação incubando a amostra a 70°C por 15 minutos e em seguida colocar o tubo em gelo;
- Coletar o conteúdo da tampa do tubo com uma breve centrifugação, adicionar 1µl de RNase H ao tubo e incubar por 20 minutos a 37°C. Estocar a -20°C.

APÊNDICE 3. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA COM “PRIMERS” PARA β -ACTINA

Reação:

Tampão de PCR 10x	1x
MgCl ₂	1,5 mM
dNTP	0,2 mM
Primer direto (5' AATCATAGGTTTCAGGTGCCC3')	10 pM
Primer reverso (5' ATCACAGGGGTGTGGGTGTT3')	10 pM
cDNA	2 μ l
<i>Taq</i> DNA polimerase	1 unidade
Água milli Q	q.s.p 20 μ l

Programa:

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	95°C	5 minutos	1x
2	95°C	1 minuto	20x
	55°C	1 minuto	
	72°C	1 minuto	
3	72°C	10 minutos	1x

APÊNDICE 4. AMPLIFICAÇÃO DE cDNA COM “PRIMERS” PARA A MIOSTATINA

Reação:

Tampão de PCR 10x	1x
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	0,2 mM

Primer direto (5' AATCATAGGTTTCAGGTGCCC3')	0,2 µM
Primer reverso (5' ATCACAGGGGTGTGGGTGTT3')	0,2 µM
cDNA	2 µl
<i>Taq</i> DNA polimerase	1,25 unidades
Água milli Q	q.s.p 50 µl

Programa:

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições	
			E1 a E15	E18 a E26
1	94°C	3 minutos	1x	1x
2	94°C	30 segundos	40x	35x
	62°C	40 segundos		
	72°C	40 segundos		
3	72°C	5 minutos	1x	1x

APÊNDICE 5. PURIFICAÇÃO DE DNA ELUÍDO DE GÉIS DE AGAROSE COM O EMPREGO DO Sephaglas™ BandPrep Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

- Pesar um tubo de 1,5 ml vazio e anotar o peso;
- Recortar a banda de interesse do gel de agarose com o auxílio de um bisturi e colocá-la no tubo de 1,5 ml previamente pesado, pesar o tubo contendo o fragmento do gel de agarose;
- Calcular a diferença entre os pesos anotados e determinar o peso do fragmento do gel de agarose presente no tubo, se o fragmento do gel pesar até 250 mg, proceder exatamente conforme o protocolo descrito, se o fragmento pesar mais de 250 mg, aumentar os volumes dos reagentes proporcionalmente;

- Adicionar 250 μ l do agente solubilizante de gel e 5 μ l de ácido acético 50%, agitar vigorosamente o tubo e incubá-lo a 60°C por 5-10 minutos para a dissolução da agarose;
- Agitar vigorosamente o frasco contendo Sephaglas BP até formar uma suspensão uniforme e adicionar ao tubo 5 μ l da suspensão para cada μ g de DNA estimada, agitar gentilmente e incubar à temperatura ambiente por 5 minutos, agitando o tubo a cada minuto;
- Centrifugar o tubo por 30 segundos a 12000 x g e remover o sobrenadante sem desmanchar o “pellet”;
- Repetir a centrifugação anterior e remover qualquer resíduo líquido restante;
- Adicionar 80 μ l de tampão de lavagem ao “pellet” e homogeneizar com o auxílio de um pipetador. Centrifugar a 12000 x g por 30 segundos e remover o sobrenadante sem desmanchar o “pellet”. Repetir este procedimento mais 2 vezes em um total de 3 lavagens;
- Descartar o sobrenadante e colocar o tubo com a abertura para baixo sobre um papel absorvente por aproximadamente 10 minutos para a secagem do “pellet”;
- Adicionar 20 μ l de tampão de eluição ao “pellet”, agitar gentilmente para ressuspender o “pellet”, incubar por 5 minutos à temperatura ambiente com agitação periódica e centrifugar o tubo a 12000 x g por 1 minuto;
- Remover o sobrenadante para um tubo novo sem tocar o “pellet” e estocar o DNA eluído a -20°C (não estocar o DNA eluído na presença de Sephaglas).

APÊNDICE 6. PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES *E. coli* JM 109

Método descrito por Hanahan D., Journal of Molecular Biology, v.166, n.4, p. 557-580, Jun., 1983.

- Plaquear células de uma cultura de bactérias *E. coli* JM 109 em uma placa contendo meio LB ágar contendo 10 mM MgCl₂ e manter a 37°C por 16 horas para o crescimento das colônias;
- Coletar uma colônia isolada e incubá-la em 3ml de meio SOB a 37°C durante 16 horas;
- Transferir 50 µl desta cultura para 50 ml de meio SOB e manter esta nova cultura a 37°C com agitação periódica até que a mesma atinja D.O entre 0,5 e 0,6;
- Adicionar 500 µl de 1M MgCl₂ á cultura com D.O. desejada e transferir esta cultura para um tubo estéril gelado, manter a cultura incubada em gelo por 15 minutos;
- Centrifugar o tubo contendo a cultura a 3000 x g por 10 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante e ressuspender o “pellet” de células em 10 ml de meio RF I, incubar o tubo em gelo por mais 15 minutos;

Centrifugar o tubo a 1500 x g por 10 minutos a 4°C e ressuspender o “pellet” em 2 ml de meio RF II, aliquotar esta cultura (100 µl/tubo), congelar imediatamente em nitrogênio líquido e estocar a -70°C.

APÊNDICE 7. REAÇÃO DE LIGAÇÃO COM O SureClone® Ligation Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

A. Reparar as extremidades dos fragmentos a serem clonados em uma reação contendo:

Produto a ser clonado	100 ng
Tampão “blunting/kinasing” 10x	1x

Fragmento <i>Klenow</i>	8,1 unidades
Polinucleotídeo quinase	7,9 unidades
Água Milli-Q	q.s.p. 20 µl

- Misturar os componentes acima e incubar a 37°C por 30 minutos;

B. Purificação dos fragmentos a serem clonados:

- Misturar ao tubo de reação 20 µl de uma mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (50:48:2) e agitar o tubo vigorosamente;
- Centrifugar por 1 minuto a 11000 x g e coletar a fase superior para um novo tubo;
- Preparar a coluna MicroSpin® adicionando 500 µl da resina Sephacryl® S-200 em suspensão em seu interior e centrifugar a 11000 x g por 1 minuto para a eliminação do líquido no qual a resina foi ressuspendida;
- Adaptar a coluna MicroSpin® a um tubo de 1,5 ml e colocar o produto purificado no interior desta coluna MicroSpin® previamente preparada, centrifugar a 11000 x g por 1 minuto, descartar a coluna e utilizar o seu efluente na reação de ligação;

C. Reação de ligação:

Efluente da coluna	4 µl
Vetor desfosforilado e linearizado com a enzima <i>SacI</i>	50 ng
Tampão de ligação 10 x	1x
DTT	10 mM
Enzima <i>T4</i> DNA ligase	5,5 unidades
Água milli-Q	q.s.p. 20 µl

- Misturar os componentes e incubar a 16°C por 2 horas.

APÊNDICE 8. TRANSFORMAÇÃO DAS CÉLULAS COMPETENTES JM

109

- Descongelar o tubo contendo as células competentes em gelo por 5 minutos;
- Adicionar ao tubo contendo as células competentes 2 µl do produto da reação de ligação e incubar o tubo em gelo por 20 minutos;
- Colocar o tubo a 42°C por 45 a 50 segundos e retorná-lo ao gelo por mais 2 minutos;
- Adicionar à cultura 950 µl de meio SOC à temperatura ambiente e incubar a cultura a 37°C com agitação constante por 1,5 horas;
- Realizar o plaqueamento da cultura em meio LB ágar contendo 10 µg/ml ampicilina, 50 µg/ml X-gal e 0,1 mM IPTG;
- Incubar as placas a 37°C por 13 horas e coletar as colônias transformadas, colocando cada colônia em um tubo de ensaio contendo 5 ml de meio LB e 0,1 mg ampicilina/ml de meio;
- Incubar esta cultura a 37°C com agitação constante por 15 horas e proceder a minipreparação do DNA plasmidial;

APÊNDICE 9. MINIPREPARAÇÃO DO DNA PLASMIDIAL – MÉTODO DE LISE ALCALINA

- Coletar 1,5 ml de cultura e centrifugar por 30 segundos, descartando o sobrenadante. Retirar 500 µl de cultura para o estoque em glicerol;
- Adicionar 100 µl de GET e ressuspender no vortex até dissolver o "pellet"
- Preparar solução SDS 1%; NaOH 0,2N (preparar na hora do uso) e adicionar 200 µl, misturar por inversão e incubar no gelo por 10 minutos;
- Adicionar 150 µl de acetato de potássio, misturar por inversão e deixar no gelo por 10 minutos;

- Centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, manter os tubos no gelo após a centrifugação e transferir o sobrenadante para um tubo limpo (previamente identificado);
- Adicionar 1 ml de etanol absoluto gelado, centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante (cuidado com o "pellet")
- Adicionar 500 µl de etanol 70% (não ressuspender o "pellet") e centrifugar a 10000 x g por 5 minutos a 25°C, descartar o sobrenadante;
- Retirar totalmente o etanol restante com uma micropipeta e deixar o "pellet" secando por 1 hora à temperatura ambiente;
- Ressuspender em 20 µl de água milli Q;
- Adicionar 10 µl de RNase (1mg/ml), incubar em banho-maria a 37°C por 2 horas;

APÊNDICE 10. SEQUENCIAMENTO DE DNA

A. Reação de amplificação com emprego do DYEnamic™ Terminator Cyler Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech)

Kit-Mix	2 µl
Primer (3,2 pmol)	1 µl
Tampão (2mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl ₂)	6 µl
Água milli-Q	q.s.p 20 µl

- Homogeneizar e distribuir 15 µl desta mistura por tubo, adicionar 500 ng de DNA e centrifugar para coletar resíduos presentes na tampa e nas paredes do tubo;

B. Programa de amplificação

Temperatura	Tempo	Nº de ciclos
96°C	10 segundos	25x
50°C	5 segundos	
60°C	4 minutos	

C. Precipitação do DNA para posterior aplicação no gel:

- Transferir o material para tubos de 0,5 ml
- Adicionar 80 µl de isopropanol 75% (concentração final 65%)
- Agitar vigorosamente e brevemente e deixar à temperatura ambiente por 15 minutos;
- Centrifugar a 13800 x g por 20 minutos à temperatura ambiente;
- Descartar cuidadosamente o sobrenadante;
- Adicionar 250 µl de isopropanol 75% e ressuspender por agitação;
- Centrifugar a 13800 x g por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Descartar o sobrenadante e colocar os tubos para secar com a tampa aberta no termociclador a 90°C por 1 minuto;
- Ressuspender a amostra em 4 µl de tampão de carregamento (5:1 formamida:“blue dextran”);
- Desnaturar o DNA a 98°C por 2 minutos;
- Carregar 1 µl de cada amostra no gel;

APÊNDICE 11 PURIFICAÇÃO DE AMOSTRAS DE DNA COM FENOL/CLOROFÓRMIO

- Completar o volume da amostra de DNA a ser purificada para 100 µl com água milli-Q;
- Adicionar à amostra 100 µl da mistura fenol/clorofórmio 1:1 e agitar vigorosamente o tubo por 30 segundos;
- Centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C e coletar a fase aquosa superior para um novo tubo;
- Adicionar 5M NaCl até que a solução atinja uma concentração de 100 mM NaCl, adicionar 2x o volume de etanol absoluto e colocar a material a -20°C por 12 horas para a precipitação do DNA;
- Centrifugar a 12000 x g por 15 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante e adicionar ao “pellet” 150 µl de etanol 70%;
- Centrifugar a 12000 x g por 10 minutos a 4°C, descartar o sobrenadante e secar o “pellet” à temperatura ambiente por aproximadamente 1 hora;
- Ressuspender em água milli-Q e quantificar;

APÊNDICE 12. TRANSCRIÇÃO *IN VITRO* PARA A SÍNTESE DAS SONDAS DE RNA MARCADAS COM DIGOXIGENINA

- Coletar o volume correspondente a 1 µg do DNA a ser utilizado como molde para a sonda, previamente linearizado e purificado com fenol:clorofórmio e colocá-lo em um tubo de 1,5 ml;
- Colocar o tubo contendo o DNA no gelo e adicionar a ele os seguintes reagentes, presentes no DIG RNA Labellin Kit (SP6/T7) (Boehringer Mannheim): 2 µl de 10x tampão de transcrição; 2 µl de uma mistura de NTPs marcados; 2 µl da enzima SP6 ou T7 RNA polimetase e 1 µl de inibidor de RNase;

- Centrifugar rapidamente e incubar o tubo contendo a reação por 2 horas à 37°C;
- Eliminar o DNA molde presente ao final da reação pela adição de 2 µl de DNase livre de RNase, incubar por mais 15 minutos a 37°C;
- Adicionar 2 µl de uma solução de EDTA 0,2 mol/L, pH 8,0 para parar a reação;
- Precipitar o RNA marcado com 2,5 µl de LiCl 4 mol/L e 75 µl de etanol pré-resfriado a -20°C, misturar bem;
- Deixar o RNA precipitando por pelo menos 30 minutos a -70°C ou 2 horas a -20°C;
- Centrifugar o tubo a 12000 x g, descartar o sobrenadante e lavar o “pellet” de RNA com 50 µl de etanol 70% gelado, secar à temperatura ambiente por aproximadamente 15 minutos e dissolver o RNA em 100 µl de água DEPC, incubar a 37°C por 30 minutos para uma melhor dissolução;
- Adicionar 1 µl de inibidor de RNase para inibir possíveis contaminações com RNases e estocar a -70°C;

OBS:

Para a síntese da sonda de RNA antisenso DIG-marcada da miostatina é necessário que o DNA molde linearizado e purificado seja submetido a uma digestão na presença do fragmento *Klenow* visando eliminar as extremidades 3' protuberantes dos fragmentos previamente digeridos com a enzima *KpnI* para que não haja a síntese de transcritos indesejáveis.

APÊNDICE 13. REGULAÇÃO DO TAMANHO DA SONDA POR HIDRÓLISE ALCALINA

Protocolo baseado no Genius System User's Guide, version 2.0 - Boehringer Mannheim, p.34-35

Este protocolo é uma modificação do método descrito por Cox et al. (1984, Develop. Biol., 101:484-502) e foi adaptado para o uso com sondas de RNA DIG-UTP marcadas.

- Hidrolizar 1 µg de RNA adicionando igual volume de água DEPC e 2 volumes de tampão carbonato (60 mM Na₂CO₃; 40 mM NaHCO₃; pH 10,2). Incubar por 10 minutos à 60°C;
- Adicionar igual volume de tampão de neutralização da hidrólise (200 mM acetato de sódio; 1% v/v ácido acético; pH 6,0) para parar a reação;
- Adicionar 1 µl de solução de glicogênio (20 mg/ml glicogênio em água destilada) e 3 volumes de etanol gelado para precipitar o RNA. Misturar bem e incubar a -70°C por 30 minutos;
- Remover do -70°C e centrifugar a 13000 x g por 5 minutos;
- Decantar o etanol e lavar o "pellet" com 100 µl de etanol 70%. Centrifugar a 13000 x g por 5 minutos e remover o etanol 70%;
- Secar o "pellet" e ressuspender em 20 µl de água DEPC. Aquecer a 37°C por 30 minutos para total ressuspensão do RNA;
- Diluir 1 µl do RNA controle em 2 µl de água DEPC, e correr esta amostra com 3µl da sonda hidrolisada e 3µl da sonda não hidrolisada em um gel de agarose em condições desnaturantes. Transferir as amostras do gel para uma membrana de nylon e utilizar os procedimentos descritos nos itens 4 a 10 do anexo 4 para visualização do sinal e análise da hidrólise da sonda;

APÊNDICE 14. QUANTIFICAÇÃO DA SONDA DE RNA DIG-MARCADA

Protocolo baseado no Genius System User's Guide version 2.0 - Boehringer Mannheim
p.32-34

- Fazer diluições seriais de 10x a partir do RNA controle DIG-marcado presente no kit utilizando água DEPC;
- Fazer diluições seriais de 10x a partir da sonda obtida na reação de transcrição *in vitro* utilizando água DEPC;

RNA controle DIG-marcado	Volumes p/ diluição	Concentração final	Diluição total
0,1 µg/µl	2µl/18µl H ₂ O	10 ng/µl (A)	1:10
10 ng/µl (diluição A)	2µl/18µl H ₂ O	1 ng/µl (B)	1:100
1,0 ng/µl (diluição B)	2µl/18µl H ₂ O	100 pg/µl (C)	1:1000
100 pg/µl (diluição C)	2µl/18µl H ₂ O	10 pg/µl (D)	1:10000
10 pg/µl (diluição D)	2µl/18µl H ₂ O	1 pg/µl (E)	1:100000

- Pipetar 1 µl de cada diluição do RNA controle e da sonda a ser quantificada em uma membrana de "nylon";
- Fixar o RNA à membrana por aquecimento a 80°C por 30 minutos;
- Umedecer a membrana em tampão maleato (100 mM maleato de sódio, pH 7,5; 150 mM NaCl);
- Incubar a membrana em Solução Bloqueadora do Northern Blotting ou "NBS" (10% solução estoque do agente bloqueador diluído 1:5 em tampão maleato) por 5 minutos à temperatura ambiente;
- Diluir anti-DIG acoplado à fosfatase 1:5000 em NBS;
- Incubar a membrana no anticorpo diluído por 5 minutos à temperatura ambiente;
- Lavar a membrana 2x, por 5 minutos cada em tampão maleato à temperatura ambiente;

- Incubar a membrana em tampão Genius 3 (100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂; pH 9,5) e adicionar o substrato de coloração (para 1ml de tampão Genius 3 colocar 4,5 µl de NBT e 3,5 µl de X-fosfato), a reação de desenvolvimento da cor deve ocorrer no escuro e o sinal é visível após 1 hora aproximadamente;
- Comparar a intensidade do sinal das amostras controle com a das diluições da sonda e estimar sua concentração;

APÊNDICE 15. TÉCNICA DE HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Baseado no protocolo descrito por Coutinho et al. (1992) – *Biotechniques* v.13 p.722-724

- Incubação dos ovos de galinha a 37,5°C;
- Coleta dos embriões e fixação em paraformaldeído 4% por 12 horas a 4°C;
- Remoção das membranas envoltórias e estocagem em etanol 70% a -20°C;

Pré-hibridização e hibridização

- Desidratação em 1 ml de etanol 80% por 2 minutos;
- Desidratação em 1 ml de etanol 95% por 2 minutos;
- Desidratação em 1 ml de etanol 100% por 2 minutos;
- Lavagem em 1 ml de etanol 100% por 5 minutos;
- Incubação em 1 ml de solução contendo etanol 50%/xileno 50% por 5 minutos;
- Incubação em 1ml de xileno por 30 minutos;
- Lavagens rápidas (5 vezes) em 1 ml de etanol 100%;
- Hidratação em 1 ml de etanol 95% por 2 minutos;
- Hidratação em 1 ml de etanol 80% por 2 minutos;
- Hidratação em 1 ml de etanol 70% por 2 minutos;

- Lavagens (3 vezes) em 1 ml PBS-3 (PBS 1x contendo 0,3% TRITON X-100) por 2 minutos cada lavagem;
- Digestão dos embriões em 1 ml de tampão proteinase K (100 mM Tris-HCl pH 8,0; 50 mM EDTA; 30 µg/ml proteinase K) por aproximadamente 15 minutos¹ a 37°C;
- Lavagens (3 vezes) em 1 ml de PBT-3 por 2 minutos cada lavagem;
- Incubação por 10 minutos em 200 µl de solução de hibridização 50% (50% formamida; 4x SSC; 1x Denhardt's solution; 0,5 µg/µl DNA de esperma de salmão desnaturado; 0,25 µg/µl tRNA de levedura e 10% dextran sulfato)/PBT-3 50%;

PRÉ-HIBRIDIZAÇÃO: 3 horas a 57°C em 100 µl solução de hibridização;

HIBRIDIZAÇÃO: 45 horas a 57°C em 100 µl de solução de hibridização contendo a sonda digoxigenina-marcada de RNA "antisense" do gene de interesse em uma concentração final de 0,3 ng/µl;

Lavagens

- 100 µl solução de hibridização por 5 minutos a 57°C;
- 100 µl solução de hibridização por 2,5 horas a 57°C;
- 100 µl solução de hibridização por 16 horas a 57°C;
- 80 µl solução de hibridização / 20 µl PBT-3 (80%/20%) por 30 minutos;
- 60 µl solução de hibridização / 40 µl PBT-3 (60%/40%) por 30 minutos;
- 40 µl solução de hibridização / 60 µl PBT-3 (40%/60%) por 30 minutos;
- 20 µl solução de hibridização / 80 µl PBT-3 (20%/80%) por 30 minutos;

C) IMUNODETECÇÃO

- Incubação por 1 hora em 500 µl PBT-3 contendo 5% de soro de galinha sob leve agitação;
- Incubação por 2 horas em 500 µl PBT-3 contendo 5% de soro de galinha e 0,25 µl de anti-DIG acoplado à fosfatase alcalina (diluição 1:2000);

- Lavagens rápidas (2 vezes) em 500 µl PBT-3 e estocagem a 4°C, O/N - **Tubo novo!!!**
- Lavagens (5 vezes) em 500 µl PBT-5 por 20 minutos cada lavagem;
- Lavagens (2 vezes) em 500 µl CT-3 (100 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂, pH 9,5; 0,3% TRITON X-100 por 15 minutos cada lavagem;

REAÇÃO DE DESENVOLVIMENTO DA COR:

Em 1 ml de CT (100 mM Tris; 150 mM NaCl; 25 mM MgCl₂, pH9,5) adicionar 4,5 µl NBT e 3,5 µl X-fosfato. Esta reação ocorre em 12 horas e deve ser realizada na ausência de luz;

APÊNDICE 16. AMPLIFICAÇÃO DNA GENÔMICO DA MIOSTATINA

Reação de amplificação:

Tampão de PCR 10x	1x
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	0,2 mM
Primer direto	0,2 µM
Primer reverso	0,2 µM
DNA genômico	300 ng
<i>Taq</i> DNA polimerase	5 unidades
Água milli Q	q.s.p 50 µl

Programa:

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	94°C	3 minutos	1x
2	94°C	1 minuto	35x
	65°C	2 minutos	
	72°C	1 minuto	
3	72°C	7 minutos	1x

APÊNDICE 17 PREPARAÇÃO DE CÉLULAS COMPETENTES DH5α

- Coletar uma colônia isolada de bactérias *E. coli* DH5α e inoculá-la em meio SOB (com 10 mM MgCl₂), manter sob agitação constante a 37°C durante 12 horas;
- Coletar 1 ml da cultura e inoculá-la em 100 ml de meio SOB, manter sob agitação constante a 37°C até que seja atingida a D.O. de 0,45/0,55 a 550 nm;
- Transferir a cultura para 2 tubos de 50 ml, deixar em gelo por 10 minutos, centrifugar a 1500 x g por 10 minutos a 4°C e descartar o sobrenadante;
- Adicionar às células 15 ml de meio RF I* e ressuspender as células, em seguida, juntar o conteúdo dos 2 tubos em 1 só tubo estéril e manter em gelo por 30 minutos;
- Centrifugar a 1500 x g por 10 minutos a 4°C;
- Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em 10 ml de meio RF II*, deixar no gelo por 1 hora;
- Distribuir alíquotas de 100 µl em tubos de 1,5 ml previamente resfriados, congelar em nitrogênio líquido e estocar a -70°C;

APÊNDICE 18 AMPLIFICAÇÃO DO CLONE DE DNA GENÔMICO DA MIOSTATINA COM O KIT Elongase® Amplification System (Gibco/BRL)

Reação de amplificação:

Tampão A	0,4x
Tampão B	0,6x
dNTP	0,2 mM
Primer M13 universal	9,6 pMoles
Primer M13 reverso	9,6 pMoles
Elongase Enzyme Mix	2 µl
DNA	300 ng
Água milli-Q	q.s.p. 50 µl

Programa de amplificação:

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	94°C	30 segundos	1x
2	94°C	30 segundos	35x
	55°C	30 segundos	
	68°C	2,5 minutos	
3	72°C	5 minutos	1x

APÊNDICE 19 FRAGMENTAÇÃO E REPARO DAS EXTREMIDADES DO DNA GENÔMICO DA MIOSTATINA

- Fragmentar o DNA pela ação de um sonicador regulado a 75% por 30 segundos;

- Coletar 20 μ l do produto fragmentado e reparar suas extremidades em uma reação contendo:

Enzima T4 polimerase	5 unidades
Tampão de da enzima	1x
dNTP	0,2 mM
Água milli-Q	q.s.p. 35 μ l

Misturar bem e incubar a 37°C por 20 minutos;

- Adicionar a esta reação 4,7 unidades do fragmento *Klenow*
- Incubar por 15 minutos à temperatura ambiente;
- Submeter o este produto à eletroforese em gel da agarose com baixo ponto de fusão e uma concentração de 0,8%;

APÊNDICE 20. PURIFICAÇÃO DE FRAGMENTOS ELUÍDOS DE GEL DE AGAROSE PARA MONTAGEM DE MINIBIBLIOTECA

- Remover do gel, com o auxílio de um bisturi, a banda apropriada e colocá-la em um tubo;
- Centrifugar por alguns segundos para sedimentar os pedaços de agarose;
- Aquecer por 5 minutos a 65°C agitando periodicamente o tubo em vortex;
- Estimar o volume em cada tubo e adicionar 0,1 volumes de NaCl 4N;
- Aquecer por 3 minutos a 65°C, agitando periodicamente em vortex;
- Adicionar 1 volume de fenol e misturar bem, centrifugar por 15 minutos a 13800 x g, temperatura ambiente e recuperar a fase aquosa (superior);
- Repetir o passo anterior de adição de fenol e centrifugação por mais 2x;
- Adicionar 2 volumes de éter saturado com água (mistura 1/2 volume de água e 1/2 volume de éter etílico, agita frasco e espera separar em 2 fases, usar somente a fase superior=éter) e misturar bem no vortex, centrifugar a 13800 x g por 1 minuto à temp. ambiente e descartar a fase superior (éter);

- Repetir o procedimento anterior de adição de éter saturado com água e centrifugação por mais 2x (colocar no bloco aquecido a 37°C para evaporar o resíduo de éter por 5-10 minutos);
- Adicionar 0,1 volumes de acetato de sódio 3M pH 5,2 e 2 volumes de etanol ($\pm$ até encher o tubo), agitar manualmente quando colocar o acetato de sódio e mecanicamente quando colocar o etanol;
- Incubar por 1 hora a -70°C;
- Centrifugar a 13800 x g por 20 minutos a 4°C;
- Lavar com 0,5 ml de etanol 70%, centrifugar a 10000 x g por 5 minutos e secar o "pellet";
- Ressuspender em 50 μ l de água milli-Q estéril;

APÊNDICE 21. SÍNTESE DO FRAGMENTO COMPETIDOR EMPREGADO NA PCR COMPETITIVA

Síntese do chamado primer direto competidor por empresas especializadas:
 5'-AGTAGCGATGGCTCTTTGGAGGAGTCTGATTTTCTTGTA₃' ("primer" direto competidor)

Reação de amplificação:

Tampão de PCR 10x	1x
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	0,2 mM
Primer direto competidor	0,2 μ M
Primer reverso (5' ATCACAGGGGTGTGGGTGTT ³)	0,2 μ M
cDNA	2 μ l
Taq DNA polimerase	1,25 unidades
Água milli Q	q.s.p 50 μ l

Programa:

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	94°C	3 minutos	1x
2	94°C	30 segundos	35x
	62°C	40 segundos	
	72°C	40 segundos	
3	72°C	5 minutos	1x

As condições acima permitiram a amplificação de um fragmento competidor para a miostatina, contendo uma deleção de 49 pb entre os nucleotídeos 320 e 369 do mRNA;

APÊNDICE 22 PCR COMPETITIVA

Reação:

Tampão de PCR 10x	1x
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	0,4 mM
Primer direto	0,2 µM
Primer reverso	0,2 µM
cDNA	2 µl
<i>Taq</i> DNA polimerase	2,5 unidades
Fragmento competidor (10^{-5} fmoles)	1 µl
Água contendo 10 fmoles de carreador (plasmídeo BlueScript)	q.s.p 25 µ

Programa

Passo	Temperatura	Tempo	Repetições
1	94°C	3 minutos	1x
2	94°C	30 segundos	40x
	62°C	40 segundos	
	72°C	40 segundos	
3	72°C	5 minutos	1x