



UNICAMP

ESTUDO DA RELAÇÃO ENTRE OS FATORES MYOD, MEIS1 E PBX E A ATIVIDADE DO GENE DA MIOSTATINA, ATRAVÉS DA COMPARAÇÃO DOS SEUS PADRÕES DE EXPRESSÃO DURANTE A ONTOGÊNESE DE AVES

Hernandes, L.H.P.¹; Grade, C.V.C.¹; Alvares, L.A.¹.

¹Departamento de Histologia e Embriologia, IB-UNICAMP
PIBIC/CNPq

Palavras-chave: Miostatina – promotor – regulação



Introdução

A proteína Miostatina modula negativamente a deposição da musculatura esquelética durante a embriogênese dos vertebrados, de tal maneira que o nocaute de seu gene causa hiperplasia e hipertrofia das fibras musculares. Recentemente nosso grupo de pesquisa identificou o promotor basal da *Miostatina* e, dentre os sítios de ligação para fatores de transcrição observados na região do promotor, está um sítio de ligação para o fator homeobox Meis1. Sabendo que o complexo Meis1/Pbx1 é capaz de recrutar a proteína MyoD para ligação ao promotor da *Miogenina* (HEIDT *et al.* 2007), nós hipotetizamos que processo semelhante possa estar envolvido na ativação da transcrição do gene da *Miostatina* uma vez que MyoD é o principal trans ativador deste gene (SPILLER *et al.* 2002). Deste modo, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar o padrão de expressão espacial e temporal dos genes *Meis1*, *Pbx1*, *MyoD* e *Miostatina* durante a ontogênese de galinha, utilizando ensaios de hibridização *in situ*.

Metodologia

Embrões de galinha em diferentes estágios do desenvolvimento foram coletados e fixados em PFA 4% overnight. Para podermos visualizar nos embrões onde e em quais estágios estão sendo expressos os genes de interesse (*MyoD*, *Meis1*, *Pbx* e *Miostatina*) utilizamos a técnica de hibridização *in situ* que, neste caso, se baseia na detecção de RNAs mensageiros específicos a partir de sondas anti-senso produzidas *in vitro*. As sondas para *Pbx* e *Mstn* foram produzidas a partir de RNA total extraído dos embrões de galinha com auxílio de primers apropriadamente desenhados, enquanto as sondas dos genes *Meis1* e *MyoD* foram sintetizadas a partir de plasmídeos previamente preparados. Tais sondas anti-senso possuem em sua estrutura uma das bases (Uracila) ligadas à Digoxigenina, que no decorrer do ensaio será reconhecida por um anticorpo anti-digoxigenina conjugado à fosfatase alcalina, que permitirá a visualização do sinal onde houver a presença de transcritos dos genes de interesse. (Figura 1)

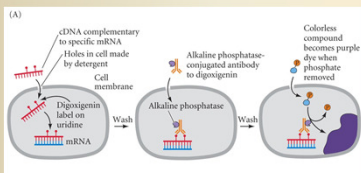


Figura 1: Esquema simplificado demonstrando o processo de hibridização *in situ* desde a adição da sonda (à esquerda) até a visualização do sinal (à direita). Figura retirada do livro *Developmental Biology*, 7ª edição.

Conclusão

Analisando os resultados obtidos durante a execução do projeto, podemos notar que a expressão da Miostatina apresenta-se muito mais restrita quando comparada ao padrão de expressão dos demais genes em todos os estágios de desenvolvimento analisados. Isso pode significar que há outras moléculas envolvidas na regulação deste gene, e que restringem sua expressão à um domínio determinado. Para verificar com mais detalhe a validade da hipótese de coexpressão será necessário cortar os embrões em vibratome para uma visualização mais detalhada dos domínios de expressão, especialmente de *Pbx* e *Meis*. Além disso, será importante realizar hibridações *in situ* duplas em corte histológico. Estas novas metodologias serão empregadas em um futuro próximo.

Resultados e Discussão

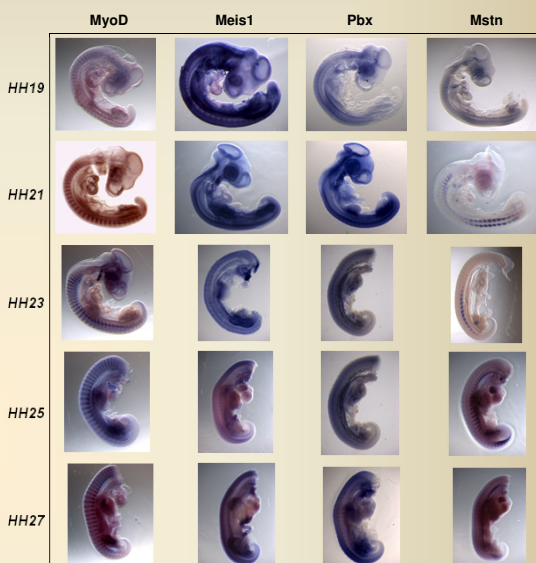


Figura 2: Expressão dos genes *MyoD*, *Meis1*, *Pbx* e *Mstn* nos estágios HH19, HH21, HH23, HH25 e HH27 de embrões de galinha. A Miostatina começa a ser observada em HH19 em alguns somitos mais rostrais e a expressão vai se estendendo ao longo do desenvolvimento para os somitos mais caudais, estando sempre voltada para a porção ventrolateral dos somitos. Por outro lado, a expressão de *MyoD* pode ser observada em todos os somitos já em HH19 e permanece bem evidente em toda a extensão dos somitos até HH27. Os padrões de expressão de *Meis1* e *Pbx* são muito parecidos, apresentando-se de forma bem difusa em todos os estágios de desenvolvimento analisados.

Referências Bibliográficas

- SPILLER, M. P., KAMBADUR, R., JEANPLONG, F., THOMAS, M., MARTYN, J. K., BASS, J. J. & SHARMA, M. The myostatin gene is a downstream target gene of basic helix-loop-helix transcription factor MyoD. *Molecular and Cellular Biology*, Oct: 7066-7082, 2002.
- HEIDT, A.B., ROJAS, A., HARRIS, I.S. & BLACK, B.L. Determinants of Myogenic Specificity within MyoD Are Required for Noncanonical E Box Binding. *Molecular and Cellular Biology*, 27: 5910–5920, 2007.
- GRADE, C. V. C., SALERNO, M. S., SCHUBERT, F. R., DIETRICH, S. & ALVARES, L. E. An evolutionarily conserved Myostatin proximal promoter/enhancer confers basal levels of transcription and spatial specificity *in vivo*. *Dev Genes Evol*, 219: 497–508, 2009.
- AMTHOR, H., HUANG, R., MCKINNELL, I., CHRIST, B., KAMBADUR, R., SHARMA, M. & PATEL, K. The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. *Developmental Biology*, 251: 241-257, 2002.

Developmental Biology, Seventh Edition, Figura 4.18 (Part 1)