

MARCELLA PECORA MILAZZOTTO

**USO DE VETOR LENTIVIRAL CARREANDO shRNA
PARA KNOCKDOWN DO GENE DA MIOSTATINA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
TRANSGÊNICOS EM BOVINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora

São Paulo

2006

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

MARCELLA PECORA MILAZZOTTO

**USO DE VETOR LENTIVIRAL CARREANDO shRNA
PARA KNOCKDOWN DO GENE DA MIOSTATINA NA
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES
TRANSGÊNICOS EM BOVINOS**

Tese apresentada ao programa de pós-graduação interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora

Área de concentração: Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. José Antônio Visintin

São Paulo

2006

*DEDICO ESTE TRABALHO AOS MEUS PAIS,
QUE SÃO MEUS ANJOS DA GUARDA DA TERRA
E MEUS AVÔS JULIO E CHICO,
QUE SÃO MEUS ANJOS DA GUARDA DO CÉU*

AGRADECIMENTO

Fiquei muito feliz neste momento por perceber quantas pessoas tinham passado pela minha vida ao longo destes quatro anos e ajudado, de alguma maneira, neste trabalho. Todos vocês são muito especiais e sem cada um, nada disso seria possível!!! Gostaria, no entanto de agradecer especialmente:

A **Deus** por meu corpo são e minha mente “nem tanto”, e por ter enchido minha vida com tantos amigos queridos.

Aos meus pais LINDOS, **Angela** e **Ari** que sempre acreditaram que eu era capaz (mesmo sem entender muito bem o que eu fazia aqui...).

À minha irmã **Du** que ficou para me ver terminar... você vai ser sempre a caçula, né?

À minha toda família que me apóia de onde estiver, minha avó mais coruja **Antonieta** e minha avó **Olga**.

Ao meu orientador **Visintiiiiiiin**, em primeiro lugar por ter acreditado em mim, mesmo sem ter porque fazer isso, neste projeto, em todas as coisas mirabolantes que nós tivemos que fazer para poder terminá-lo e, principalmente, por ter o maior coração do mundo. Ao longo desses anos você se tornou um exemplo e um grande amigo... Nossos embriõezinhos verdes estão aí!!!

Ao **Prof Dr José Fernando Garcia**, por ter sido o maior incentivador deste trabalho...

Ao **Dr Franklin Antonio Ribeiro** por cuidar das minhas maluquices...

Às minhas eternas amigas de infância **Ana**, **Márcia** e **Bia** em quem eu sempre pude confiar e que sempre souberam me fazer rir, até nos momentos mais difíceis...

Às minhas eternas companheiras **Fran**, **Paula**, **Ligia** e **Maria** pela nossa amizade que cresce a cada ano e por estarem sempre ao meu lado...

À minha irmazona **Déa**, sempre me ouvindo, palpitando, emprestando todos os reagentes do mundo e principalmente acreditando em mim...

À **Dra. Tatá Vannucchi** por sempre me “dar atenção” pra tudo, me ouvir, me fazer rir nas aulas do **Bobô**, me apresentar aos meus queridos amigos que eu gostaria

de agradecer também, “**Seu**”**Zé, D. Maria e Arnold** e por me ajudar nesse trabalho às vezes sem nem entender do que se tratava (o que são essas bolas verdes????)...

A todos do laboratório de *Fecundação in vitro, clonagem e transgenia animal*, atuais, antigos e agregados: **Alessandra Brandão (Alezinha), Alessandra Nicácio (Alê), Ana Rita (Nani), Aníbal (Bibão), Camilla, Cláudia, Cristina, Flávia, Gisele, Heloisa, Jackeline, José Sérgio (Zeca), Leydson (Creysson), Liege, Marcelo (Febem), Marco, Maria Angélica (Maran), Mariana Marques, Mariana Rovegno (Lacraia), Mariel, Marina, Mayra, Renata (Rê), Silvia Crusco, Viviane e Weber (Gooooordo)**. Obrigada pela ajuda no projeto, pela convivência diária, pelas festas, pelos papos (Rê, brigadão!!!), pelas broncas (essa é pra você, Creyssão!), pelos almoços, pelos aniversários, pelas brigas, por Pirassununga e por tudo que eu pude aprender com cada um de vocês... *Essa família é muito unida...*

Ao **Marcão** por ter me “apresentado” ao micromanipulador com sua paciência budista (“*Marcão, por que as pipetas não mexem mais??? -Porque quebraram....*”)

Aos amigos e colegas da FMVZ **Celinho, Lindsay, Torres, Henderson, Manolo, Marcílio, Nélcio** pela maravilhosa convivência

À **Ligia Mesquita, Paula Ripamonte e Felipe Braga** do Laboratório de Morfofisiologia do Desenvolvimento da FZEA-USP pelo auxílio com as análises de Real Time PCR.

Ao **Prof Dr Flávio Vieira Meirelles** do laboratório de Morfofisiologia do Desenvolvimento da FZEA-USP pelas discussões e por manter as portas do seu laboratório sempre abertas.

À **Profa Dra. Mariz Vainzof** e toda sua equipe, em especial à **Paula**, do Centro de Estudos do Genoma Humano pelas discussões, pelo entusiasmo e por terem sempre as portas abertas para mim, principalmente nessa reta final!!

Ao **Prof Dr Byan Eric Strauss e Marcio Bajgelman** do Instituto do Coração da Faculdade de Medicina da USP pelo imenso auxílio com os lentivírus.

Ao **Prof Dr Roger Chammas e Andréia Otake** do Laboratório de Oncologia da Faculdade de Medicina da USP pelo auxílio com citometria de fluxo.

Ao **Prof Dr Dimas Tadeu Covas e Patrícia Palma** do Hemocentro da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelo auxílio com citometria de fluxo e sorting das células.

À **Profa Dra Iscia Lopes Cendes** e **Dr Tiago Campos Pereira** do Laboratório de Genética Molecular da Unicamp pelo auxílio no desenho do shRNA.

Aos eternos amigos de Araçatuba **Sérgio (Índio)**, **Gustavo (Turco)**, **Marcos (Bunda)**, **Alexandre (Baixo)** por estarem sempre presentes.

À **D. Silvia** e **Neide** pelo cafézinho que me acordou todas as manhãs (e às vezes à tarde também).

Às secretárias do departamento de Reprodução Animal da FMVZ – USP, **Harumi**, **Thais** e **Alice**, sempre quebrando meus galhos...

Aos professores e funcionários do Departamento de Reprodução Animal.

Aos funcionários da Secretaria de Pós Graduação em Biotecnologia.

À FAPESP pelo auxílio financeiro concedido.

Aos animais utilizados nos experimentos.

Finalmente gostaria de agradecer aos meus dois “fiéis escudeiros”, porque sem eles provavelmente eu não teria terminado esse trabalho. **Mayra**, minha “multifuncional”, apesar de tanta gente duvidar que nós nos tornaríamos amigas nós contrariamos as expectativas. Um exemplo de cientista, capaz de palpitar sobre todas as metodologias, resultados e maluquices desse trabalho. Além disso, minha psicóloga e psiquiatra de plantão, segurando todas as minhas barras... **Weber**, que chegou como “carioca caladão” e hoje é meu companheiro de idéias, de trabalhos, de papos intermináveis sobre qualquer coisa, de fins de semana escrevendo papers e comendo pastel de feira (Gooooordo), e que me agüenta (só por isso merecia um prêmio!!!). Vocês viram o que havia de melhor em mim e acreditaram mesmo quando nem eu mesma acreditava mais. É por isso que eu amo muito vocês!!!

O novo incomoda

Por quê?

Porque desafia

Mas, queiram ou não, o novo sempre vem.

E, para nossa felicidade o novo geralmente vence

E, quando o novo vence, a máquina do tempo gira melhor

O novo é belo porque nos muda, nos leva a novas estações.

O novo nos torna pessoas melhores porque nos torna novas pessoas

E assim como os sonhos, o novo não envelhece

O novo é lindo!

RESUMO

MILAZZOTTO, M.P. **Uso de vetor lentiviral carreando shRNA para knockdown do gene da miostatina na produção *in vitro* de embriões transgênicos em bovinos.** 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Atualmente, o setor pecuário visa principalmente o aumento da eficiência dos caracteres de produção como, por exemplo, o ganho de peso. A miostatina é descrita como uma proteína de regulação negativa do crescimento do músculo esquelético e a sua manipulação genética, com a conseqüente produção de animais com musculatura dupla e capazes de transmiti-la à progênie, possibilita seu emprego na produção animal. Neste contexto, o presente trabalho objetivou avaliar a expressão do gene da miostatina em musculatura esquelética de fetos bovinos da raça Nelore em diferentes idades gestacionais; a inibição da miostatina pela técnica de shRNA mediada por vetores lentivirais em cultivos de mioblastos murinos e a viabilidade da produção *in vitro* de embriões bovinos geneticamente modificados, empregando o shRNA mediado por vetores lentivirais. A análise da expressão do gene da miostatina na musculatura esquelética fetal foi realizada por RT-PCR semiquantitativa. Para inibição da miostatina em mioblastos e embriões, foi produzido vetor lentiviral carreador do gene da *green fluorescent protein* (GFP) sob controle do promotor da ubiquitina C e do shRNA para inibição do gene da miostatina sob controle do promotor U6. A eficiência do vetor foi avaliada *in vitro* em mioblastos murinos (linhagem C2C12) por meio da morfologia celular após sua diferenciação e por PCR em tempo real. Para a produção de embriões transgênicos, oócitos bovinos foram maturados *in vitro* e após a remoção das células do cumulus, lentivírus carreando o vetor de expressão foram microinjetados no espaço

perivitelínico ($2,5 \times 10^6$ UI/mL). Oócitos maduros não microinjetados foram empregados como controle. Após a microinjeção, os oócitos foram fecundados e cultivados *in vitro*. Após 4 dias de cultivo, os embriões foram avaliados por microscopia de epifluorescência, sendo considerados positivos para a expressão do vetor os que emitiram fluorescência verde. Os resultados demonstraram maior expressão da miostatina nas primeiras fases da gestação (60-120 dias). Ainda, o vetor foi capaz de inibir o RNAm da miostatina em células C2C12, pois houve menor formação de miotúbulos no grupo transduzido quando comparado ao controle. A PCR em tempo real indicou que após 72 horas de diferenciação houve tendência à redução da quantidade do RNAm da miostatina. Em relação ao total de embriões microinjetados, $96,9 \pm 0,34\%$ clivaram (62/65), $80,24 \pm 4,38\%$ (51/65) emitiram fluorescência verde e $50,95 \pm 3,37\%$ (29/65) atingiram o estágio de blastocisto. Após a eclosão, $3,07\%$ (2/65) continuaram emitindo fluorescência. Para o grupo controle, $93,81 \pm 0,68\%$ (61/65) clivaram, $38,34 \pm 2,36$ (25/65) atingiram o estágio de blastocisto e nenhum emitiu fluorescência verde. Pode-se concluir que a musculatura esquelética de fetos bovinos da raça Nelore apresenta pico de expressão de miostatina entre 60 e 120 dias de gestação. Os vetores lentivirais carreando shRNA são eficientes para knockdown do gene da miostatina e, portanto, são uma opção inovadora para produção de embriões bovinos transgênicos e animais com fenótipo de musculatura dupla.

Palavras-chave: *short hairpin RNA (shRNA)*, miostatina, musculatura dupla, transgenia, bovino

ABSTRACT

MILAZZOTTO, M.P. **Myostatin gene knockdown through lentiviral mediated delivery of shRNA for *in vitro* production of transgenic bovine embryos.** 101f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

Nowadays, the main goal of husbandry and beef cattle production is to enhance performance rates as, for example, weight gain. Myostatin is referred as a negative regulator of the skeletal muscle growth. Genetic engineering of such character in order to gender double muscling animals that can transmit to future progeny will provide its usefulness. In this context, the present research aimed to analyze myostatin gene expression in fetal skeletal muscle of Nelore bovine breed along gestation; myostatin inhibition through lentiviral mediated delivery of shRNA in mouse myoblasts culture and the feasibility of the lentiviral mediated delivery of shRNA into *in vitro* produced transgenic bovine embryos. Myostatin gene expression analysis in fetal skeletal muscle was performed through semiquantitative RT-PCR. In order to knockdown myostatin in cell and embryo culture, a lentiviral vector was inserted by ubiquitin C promoter-driven GFP gene (green fluorescent protein) and shRNA to suppress myostatin gene expression driven by the U6 promoter. Vector efficiency was verified through *in vitro* murine myoblast (C2C12) cell morphology after inductive differentiation and by means of real time PCR. Later, bovine oocytes were matured *in vitro* and the lentiviral vector was microinjected into the oocyte perivitelline space (2.5×10^6 UI/mL) after cumulus cell removal. Non microinjected mature oocytes were considered as control. After infection, oocytes were fertilized and cultured *in vitro*. After 4 days of culture, embryos were evaluated by epifluorescence microscopy. The GFP-positive embryos were green under

fluorescence. Results demonstrated a higher fetal myostatin expression during the initial phases of pregnancy (60-120 days). Moreover, the vector was able to inhibit myostatin mRNA in C2C12 cells as the transduced group progressed less to myotubule than control. A less amount of mRNA after 72 hours of differentiation was indicated as a tendency by Real Time PCR. In relation to the transgenic embryos, 96.9±0.34% developed to clivage (62/65), 80.24±4.38% were GFP-positive (51/65) and 50.95±3.37% (26/65) achieved blastocyst stage. After eclosion, 3.07% (2/65) of GFP-positive embryos maintained fluorescent. In relation to control group, clivage rate was 93.81±0.68% (61/65); blastocyst rate 38.34±2.36 (25/65) and none were fluorescent. In conclusion, there was a peak of myostatin expression in Nelore fetal muscle during the 60-120th days of pregnancy. In addition, myostatin gene knockdown was effectively performed by lentiviral vector mediated delivery of shRNA. Thus, this technique can be considered a novel option for the production of transgenic embryos and double muscling animals.

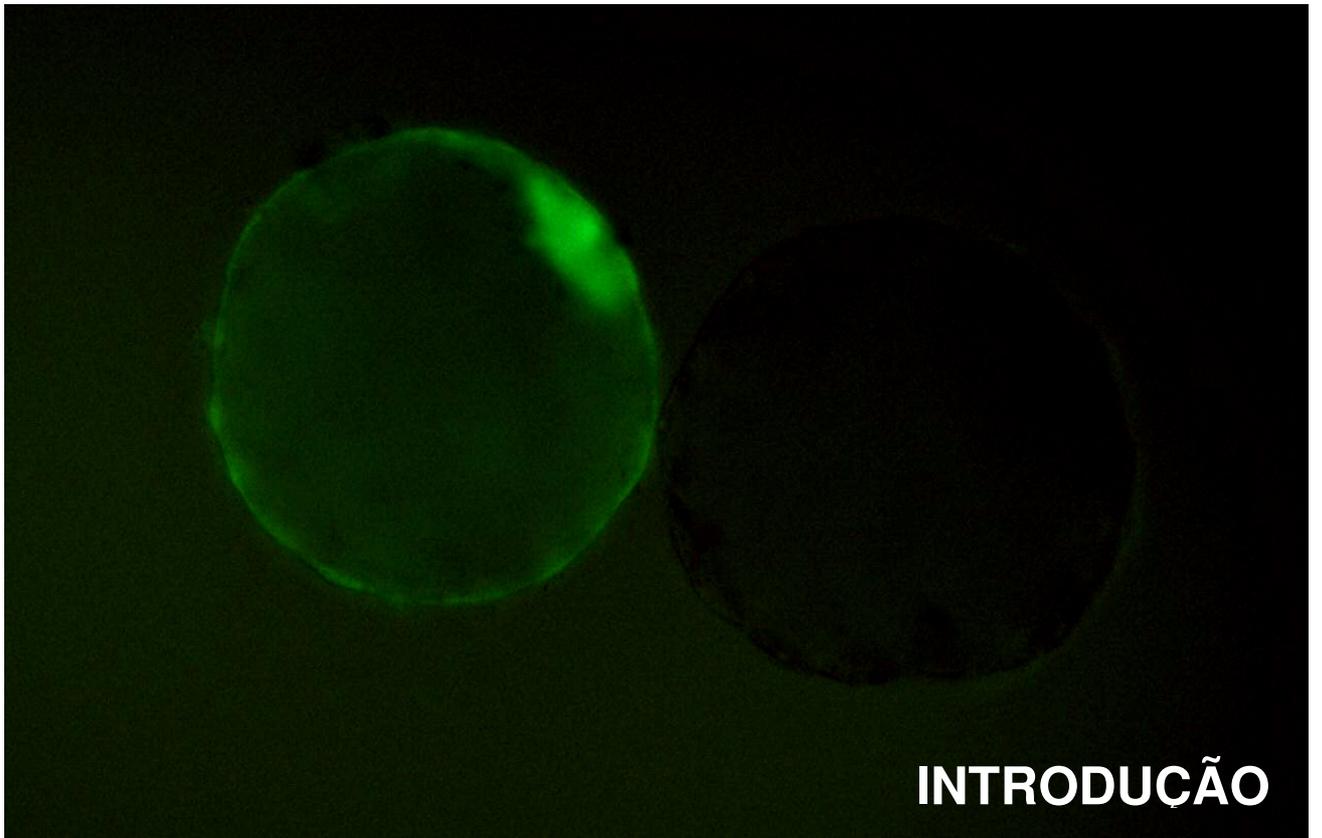
Keywords: *short hairpin RNA (shRNA)*, myostatin, double muscle, transgenic, bovine

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	HIPÓTESE	21
3	OBJETIVOS	23
4	REVISÃO DE LITERATURA	25
5	MATERIAL E MÉTODOS	39
5.1	Avaliação da síntese de RNAm específico para miostatina durante o desenvolvimento fetal em bovinos da raça Nelore	40
5.1.1	Colheita do material e extração do RNA total	40
5.1.2	Síntese da primeira fita de cDNA	41
5.1.3	Determinação da fase exponencial de amplificação do gene da miostatina e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase/GAPDH (controle endógeno)	41
5.1.4	Determinação da expressão diferencial do gene da miostatina por PCR semi-quantitativo	42
5.2	Construção do vetor para intererência de RNA	43
5.2.1	Desenho do siRNA	43
5.2.2	Clonagem do vetor para shRNA no plasmideo <i>pSilencerTM 2.1-U6 neo</i>	44
5.2.3	Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial	45
5.2.4	Digestão do DNA plasmidial	46
5.2.5	Eletroforese em gel de poliacrilamida	46

5.3	Construção do vetor lentiviral	46
5.3.1	Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial	48
5.3.2	Construção do vetor lentiviral para inserção estável do shRNA	48
5.3.3	Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial	49
5.3.4	Digestão do DNA plasmidial	50
5.4	Formação das partículas virais	50
5.4.1	Semeadura e transfecção das células A293T (célula renal humana) com vetores lentivirais	50
5.4.2	Titulação viral	51
5.5	Cultivo de mioblastos murinos (linhagem C2C12)	52
5.5.1	Transdução dos mioblastos murinos (linhagem C2C12) com vetores lentivirais	52
5.5.2	Determinação da eficiência do shRNA	53
5.5.3	Reação de PCR em tempo real	54
5.5.4	Determinação da eficiência do shRNA após separação das células CGM por citometria de fluxo	54
5.6	Produção <i>in vitro</i> de embriões	55
5.6.1	Colheita e maturação <i>in vitro</i> dos oócitos	55
5.6.2	Microinjeção dos oócitos com vetor lentiviral	56
5.6.3	Fecundação <i>in vitro</i>	57
5.6.4	Cultivo dos embriões	57

5.7	Análise estatística	58
6	RESULTADOS	61
6.1	Avaliação da síntese de RNAm específico para miostatina durante o desenvolvimento fetal em bovinos da raça Nelore	61
6.2	Construção do vetor	63
6.3	Construção do vetor lentiviral	64
6.4	Formação das partículas virais	65
6.4.1	Avaliação da eficiência dos vetores	66
6.4.1.1	Avaliação da cinética de diferenciação das células C2C12 e CGM	67
6.4.2	Real Time PCR	68
6.4.3	Determinação da eficiência do shRNA em cultivos de células CGM após separação por citometria de fluxo	70
6.5	Produção <i>in vitro</i> de embriões transgênicos	72
7	DISCUSSÃO	77
8	CONCLUSÕES	88
	REFERÊNCIAS	90
	ANEXOS	99



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Animais geneticamente modificados são definidos como aqueles que apresentam DNA de origem exógena, introduzido por manipulação genética (JACENKO, 1997). Apesar dos primeiros experimentos terem sido conduzidos em ratos, durante os últimos 15 anos, os estudos têm sido voltados para animais de interesse zootécnico, com o intuito de aumentar a produção animal (PINKERT; MURRAY, 1999).

Para geração destes animais, são utilizadas três metodologias principais: injeção de DNA exógeno em pronúcleos de zigotos; produção de quimeras por modificação de células-tronco embrionárias e, mais recentemente, transferência nuclear (TN). Para esta última, fibroblastos cultivados *in vitro* são modificados geneticamente e posteriormente fundidos com oócitos receptores enucleados (McCREATH et al., 2000). Apesar do aumento da eficiência da transgenia e da diminuição do tempo para produção do animal (STICE; RZUCIDLO, 2001), a TN associada à célula somática geneticamente modificada apresenta como desvantagem a baixa eficiência de produção de embriões (COLMAN, 2000).

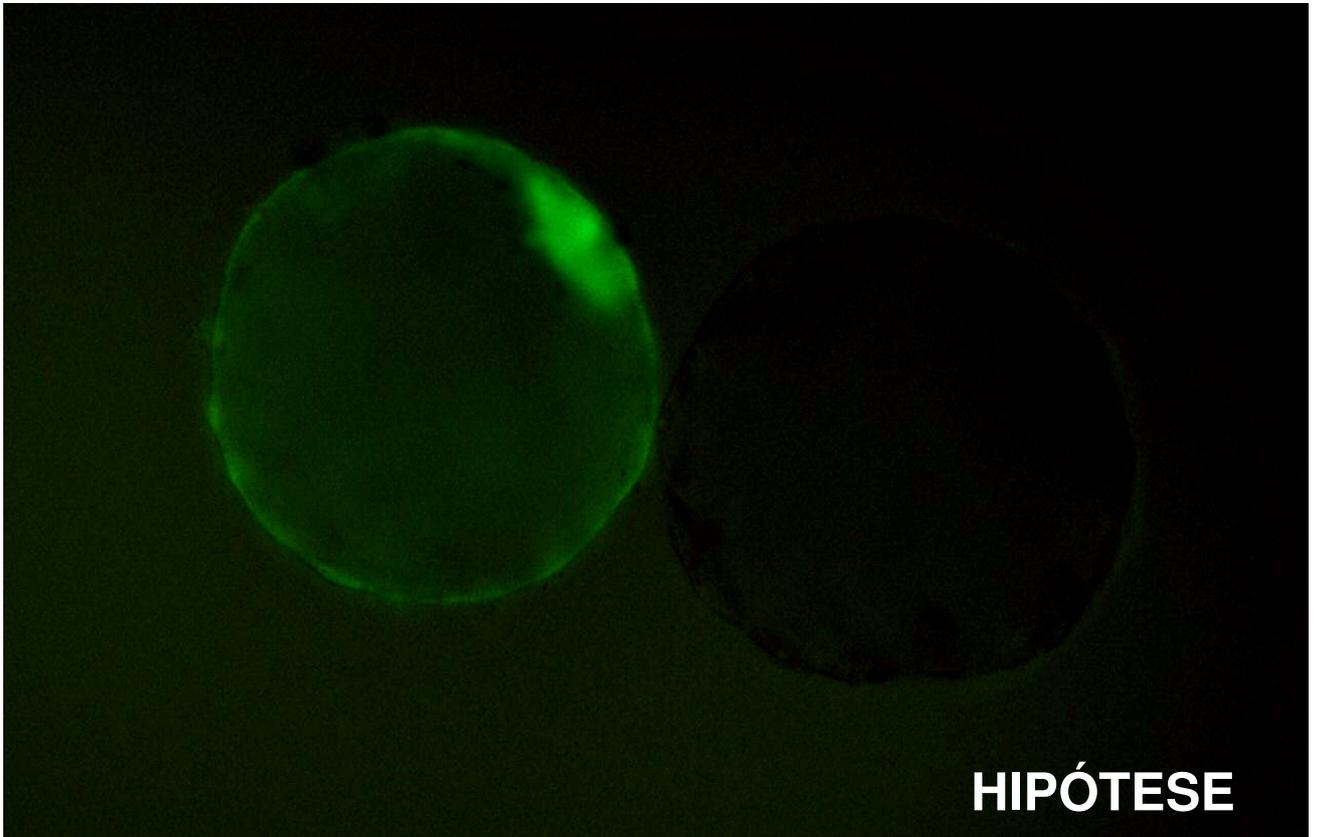
Recentemente, o emprego de vetores virais para introdução do transgene tem tornado o processo mais eficiente (GOJO et al., 2002). A possibilidade do uso direto em células germinativas e/ou embrionárias com excelentes resultados faz dos vetores virais alvo de diversos estudos (JAENISCH, 1976; CHAN et al., 1998; CABOT et al., 2001; TISCORNIA et al., 2003; HOFMANN et al., 2004). Outra vantagem é a possibilidade de transduzir com eficiência vetores para o *knockdown* de genes pela técnica de RNA de interferência (TISCORNIA et al., 2003; STEWART et al., 2003). Até o momento, a grande maioria dos trabalhos envolvendo modulação gênica é realizada em camundongos, devido à dificuldade de se produzir animais *knockout* em outras

espécies, as quais apresentam menor disponibilidade de linhagens de células-tronco embrionárias.

Além de permitir o estudo da função de genes específicos, o *knockdown* promovido pelos RNAs de interferência (RNAi) permite que características indesejáveis que possam acompanhar fenótipos de interesse induzidos pelo bloqueio da expressão de genes específicos sejam atenuadas pela inibição parcial da expressão.

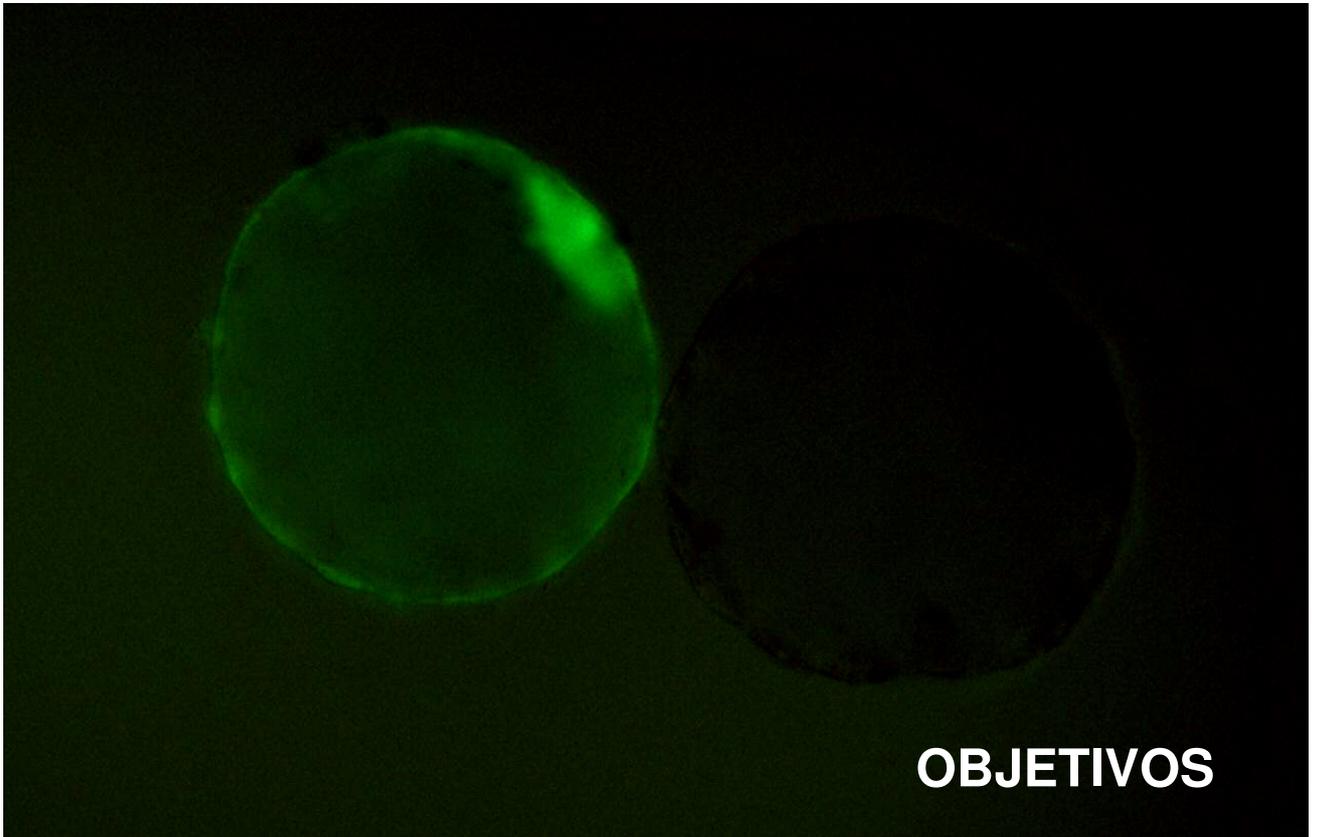
A miostatina é reguladora negativa do crescimento do músculo esquelético e age regulando a diferenciação muscular pela inibição da proliferação dos mioblastos, que são as células precursoras dos músculos (RIOS et al., 2002). Mutações no gene da miostatina são descritas como responsáveis pelo fenótipo de musculatura dupla, descritas na natureza apenas em algumas raças de bovinos, além de um caso em humano (GROBET et al., 1998; CATIPOVIC, 2004). A reprodução deste fenótipo em laboratório, resultando em animais com ausência da formação da miostatina funcional e conseqüente aumento do tamanho e do número de fibras musculares, já foi descrita em camundongos (MCPHERRON et al., 1997). No fenótipo de musculatura dupla em bovinos, há falha no controle do ciclo das células precursoras do músculo, devido ao bloqueio da síntese desta proteína (SMITH et al., 1994; THOMAS et al., 2000). O aumento da proliferação dos mioblastos em animais de produção, como na raça Nelore, pelo bloqueio da miostatina resultaria em maior desenvolvimento muscular e conseqüentemente maior ganho de peso.

Em função da indisponibilidade de cultivos de células-tronco embrionárias bovinas, somada a ineficiência da técnica de *knockout* em células somáticas para uso em TN (DAI et al., 2002; LAI et al., 2002) e a menor eficiência reprodutiva dos animais com bloqueio da miostatina (POTTS et al., 2003), fazem dessa proteína uma candidata à modulação via RNA de interferência, visando a produção de bovinos transgênicos com aumento de musculatura.



2 HIPÓTESE

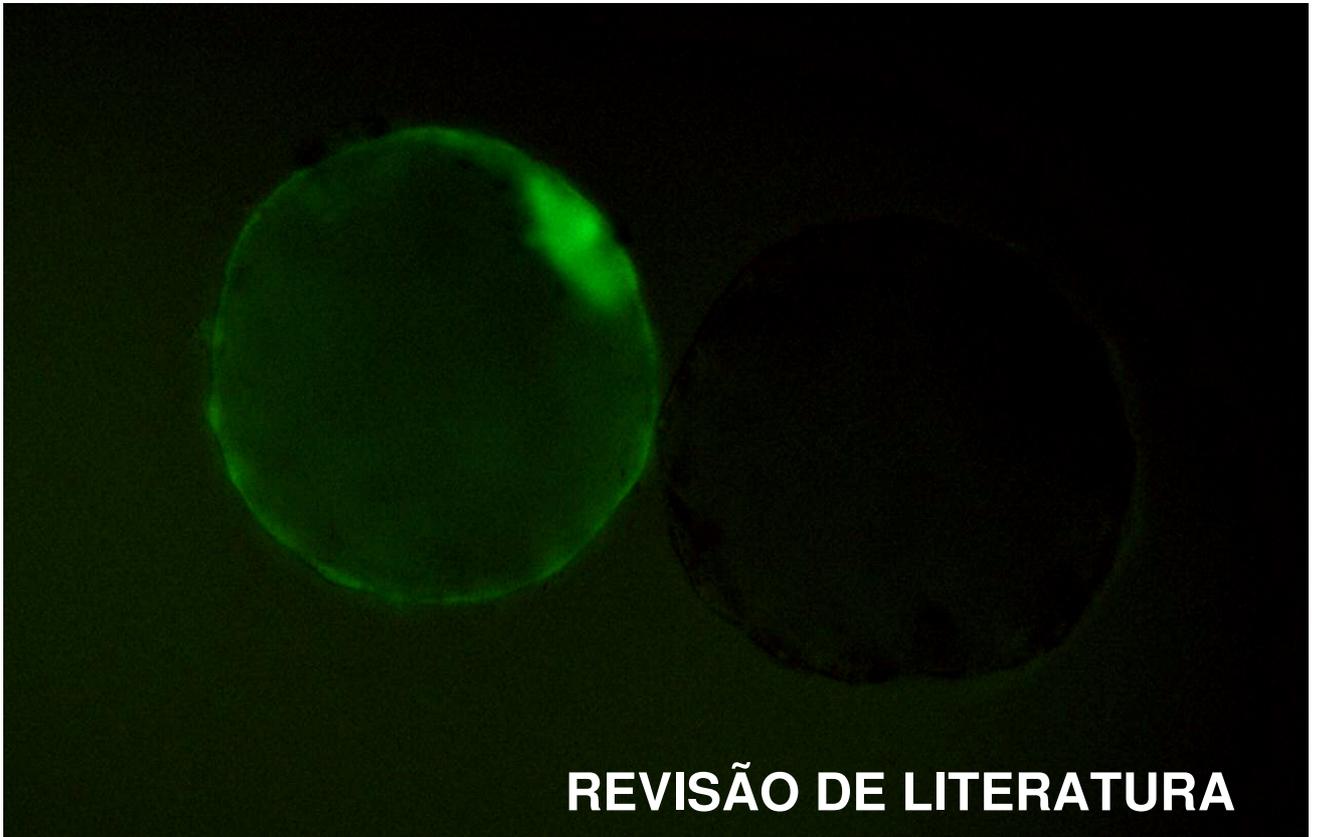
A manipulação genética baseada na tecnologia de shRNA mediada por vetor lentiviral é efetiva para produção de embriões de bovinos geneticamente modificados com inibição do RNAm da miostatina, visando o aumento da musculatura dos animais.



3 OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos avaliar:

- 1) a expressão do gene da miostatina em musculatura esquelética de fetos bovinos da raça Nelore em diferentes idades gestacionais.
- 2) o bloqueio da miostatina pela técnica de shRNA mediada por vetores lentivirais em cultivo de mioblastos murinos.
- 3) a viabilidade da técnica de shRNA mediada por vetores lentivirais na produção *in vitro* de embriões bovinos geneticamente modificados.



REVISÃO DE LITERATURA

4 REVISÃO DE LITERATURA

O setor pecuário visa o aumento da produção, tendo como objetivo ampliar o número de animais, bem como a eficiência tanto na produção quanto na reprodução (CUNNINGHAN, 1999). Entre as espécies domésticas de interesse zootécnico, os bovinos têm atraído grande atenção da pesquisa, que hoje é direcionada para a produção, por apresentar grande apelo social e econômico.

A bovinocultura de corte no Brasil é uma atividade bastante difundida e de grande alcance social. Estima-se que o Brasil possua 192 milhões de bovinos, sendo um dos maiores exportadores de carne do mundo (FAO, 2005). Dentre estes animais, 80% do rebanho é representado por animais da raça Nelore (*Bos primigenius indicus*) (www.abcz.org.br). A obtenção de animais que apresentem superioridade em relação aos caracteres de produção, como o ganho de peso pelo maior desenvolvimento muscular, torna-se cada vez mais importante para a exploração zootécnica, sendo promissor alvo de estudos de manipulação gênica (VAN REENEN et al., 2001).

Em bovinos, o desenvolvimento muscular esquelético ocorre a partir do somito, estrutura derivada da mesoderme do embrião. A capacidade de formar musculatura esquelética é propriedade única do somito e ocorre durante a compartimentalização embrionária, sob controle de sinais dos tecidos adjacentes (CHRIST; ORDAHL, 1995). Como em todos os tecidos do corpo, as células musculares esqueléticas iniciam-se como células precursoras indiferenciadas. Estas células são moduladas por fatores de crescimento (IGFs, TGFs, FGFs) em estágios distintos de diferenciação que determinam sua identidade final (KELVIN et al., 1989).

Mioblastos primários são as primeiras células musculares identificáveis, que expressam fatores regulatórios de miogênese como MyoD e myf5, ambos identificados nos somitos (SMITH et al., 1994). Os mioblastos proliferam-se durante a miogênese, quando iniciam a fase G1 do ciclo celular e são estimuladas a formar miotúbulos. Esta progressão e a parada do ciclo celular são controladas por ciclinas dependentes de quinase e seus inibidores (CDK e CKI, respectivamente). Thomas et al. (2000) descreveram que a CKI denominada p21cip1 age inibindo a ativação do complexo ciclina/Cdk2 em mioblastos e controlam a transição G1-S e G2-M. Esta inativação é modulada pela miostatina. A ação da miostatina está associada à retirada do mioblasto do ciclo proliferativo, aumentando a expressão de p21cip1 e diminuindo a expressão de Cdk2, precedendo a formação da fibra muscular (Figura 1). Assim, na presença da miostatina, o ciclo celular é interrompido. A parada do ciclo também envolve outros fatores miogênicos regulatórios como MyoD e miogenina (OLDHAN et al., 2001).

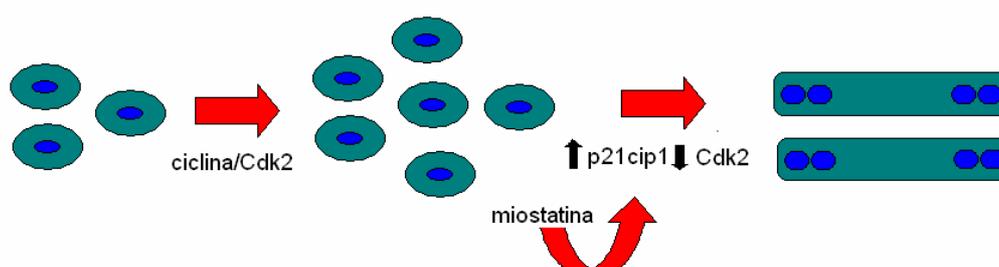


Figura 1 – Esquema Representativo da ação da miostatina. Mioblastos proliferam-se pela formação do complexo ciclina/Cdk2. A miostatina inibe a formação deste complexo pelo estímulo da síntese da CKI p21cip1 e diminuição da síntese de Cdk2, ocasionando a retirada do mioblasto do ciclo proliferativo e posterior fusão.

A miostatina é membro da família dos fatores de crescimento transformantes beta (TGF-beta) e expressa-se no músculo esquelético de vertebrados. O gene da miostatina é expresso em linhagem de células musculares durante a embriogênese, iniciando no miotomo dos somitos em desenvolvimento (MCPHERRON et al., 1997). Em bovinos é composto de três exons intercalados por dois introns. Os dois primeiros exons são compostos de 506 e 374pb, respectivamente, enquanto o exon três pode variar de 1701, 1812 ou 1887pb devido a presença de 3 sinais de poliadenilação localizados a 1301, 1401 e 1477pb do stop códon, o que resultaria em transcritos de 2581, 2692 e 2767, respectivamente. Os dois introns possuem 1840 e 2033pb, respectivamente. O sítio de início da transcrição localiza-se 133pb acima do códon de iniciação (JEANPLONG et al., 2001).

A seqüência de aminoácidos desta proteína tem sido conservada ao longo da evolução, incluindo sinal N-terminal, sítio de processamento proteolítico dibásico e logo a seguir domínio C-terminal altamente conservado com 9 cisteínas (MCPHERRON; LEE, 1997). A proteína existe como um grande complexo latente e quando ativa é um homodímero de 26 kDa (MCPHERRON; LEE, 1997). A miostatina é um fator circulante secretado pelas células musculares e sinaliza pela ativação do receptor de ativina tipo II (ActRIIB) (MCPHERRON; LEE, 1997; LEE; MCPHERRON, 2001).

Igualmente à estrutura, a função parece ser conservada, uma vez que mutações no gene foram descritas como responsáveis pelo fenótipo de dupla musculatura. Mc Pherron et al. (1997) descreveram em camundongos a presença de fator de crescimento/diferenciação (GDF-8/miostatina) que funciona como regulador negativo do crescimento do músculo esquelético. A ausência da proteína funcional em animais que apresentam mutação neste gene propicia aumento de 2 a 3 vezes a massa

muscular, fenótipo semelhante ao ocorrido em bovinos. A miostatina age regulando a diferenciação miogênica por mecanismo autócrino, inibindo, dessa forma, a proliferação das células precursoras do músculo. Logo, na ausência da proteína funcional, esta inibição estaria ausente (RIOS et al., 2002).

Em bovinos, a característica de musculatura dupla foi primeiramente relacionada com o *locus mh* onde se localiza o gene da miostatina, no cromossomo 2 (BTA2) 2q11 (SMITH et al., 1997). Kambadur et al. (1997) relacionaram o *locus mh* com o gene da miostatina, demonstrando deleção de 11pb na região codificante do gene em bovinos da raça Belgian Blue e troca de G-A na mesma região, causando a perda da função em Piemontês, ambos com fenótipo de musculatura dupla. Mc Pherron et al. (1997) e Grobet et al. (1997) também confirmaram que a miostatina controla o crescimento muscular pré-natal e está relacionada com a manifestação da característica de musculatura dupla, o que foi demonstrado por estudos em animais Belgian Blue e Piemontês. Esta deleção também foi descrita em bovinos da raça South Devon por Smith et al. (2000). Em Piemontês, a mutação no exon 3 do gene da miostatina resultou na troca da tirosina por cisteína na miostatina, fazendo com que houvesse perda de função. Em bovinos Piemontês, a presença de um alelo inativo resultou no aumento de $3,2 \pm 0,8$ kg no peso ao nascimento. Ao desmame, o aumento foi de $24,5 \pm 8$ kg (CASAS et al., 1999). Assim como em camundongos, o aumento do número de fibras musculares em animais Belgian Blue ocorre pela proliferação desregulada dos mioblastos (THOMAS et al., 2000). Sete mutações, sendo que cinco que alteram a função da miostatina, foram descritas por Grobet et al. (1998) em dez diferentes raças de bovinos, as quais apresentam fenótipo de musculatura dupla

(Belgian Blue, Blonde d'Aquitaine, Charolês, Gasconne, Limousin, Maine-Anjou, Parthenaise, Asturiana, Rubia Gallega e Piemontês).

A expressão da miostatina ocorre preferencialmente durante a gestação e é mantida até a fase adulta (MCPHERRON et al., 1997; THOMAS et al., 2000).

Em bovinos, nos músculos bíceps femural e semitendinoso, os altos níveis de expressão da miostatina são observados no primeiro dia pós-natal e redução gradativa do 8^o ao 14^o dia. No músculo gastrocnêmio, a expressão é maior no 8^o do que no 14^o dia (JEANPLONG et al., 2001). No caso de animais com musculatura dupla, o nível de expressão é aumentado, provavelmente devido a não produção da proteína funcional que resulta na perda de componente regulatório do sistema *feed-back* (OLDHAM et al., 2001). Este componente pode ser a própria miostatina como ocorre em outros membros da família do TGF-beta (KIM et al., 1990).

Em bovinos, durante a embriogênese, a diferenciação normal dos mioblastos em miotúbulos primários nos membros posteriores é iniciada no 39^o dia de gestação, enquanto a diferenciação dos mioblastos tardios em miofibras secundárias ocorre aos 90 dias (PICARD et al., 1995). No entanto, o número total de fibras musculares aumenta até os 240 dias de gestação (ROBELIN et al., 1991). Em animais normais, a expressão de RNAm para miostatina é iniciada aos 29 dias de gestação e tem aumento significativo aos 31 dias (KAMBADUR et al., 1997). Nos membros posteriores, em animais apresentando fenótipo de musculatura dupla, a expressão da miostatina é maior no momento da formação da fibra secundária em relação aos animais de musculatura normal, sugerindo ruptura do sistema *feed-back*. Ambos tiveram o pico máximo de expressão aos 90 dias de gestação, no entanto animais com fenótipo normal retornaram ao nível mais baixo aos 120 dias, enquanto os animais com

musculatura dupla somente aos 210 dias (OLDHAN et al, 2001). No entanto, especificamente no músculo semitendinoso não houve diferença significativa na expressão da miostatina a partir do 50º dia até o final da gestação (KAMBADUR et al.,1997).

O fato de mutações no gene da miostatina resultar em bovinos viáveis e férteis e com produção de carne de alta qualidade demonstra o potencial de produção pelo aumento da massa muscular (Mc PHERRON; LEE, 1997). No entanto, Potts et al. (2003) descreveram que embriões homozigotos para essa característica apresentavam taxas reduzidas de prenhez (0%) em relação aos heterozigotos (65,38%). Assim, touros Piemontês e Belgian Blue têm sido estudados como possíveis reprodutores terminais, com o intuito de conferir vantagens produtivas à progênie heterozigota (BAKER; LUNT, 1990).

Apesar da denominação de “musculatura dupla”, os animais que apresentam esta característica possuem o mesmo número de músculos presentes nos animais normais (ARNOLD et al., 2001). A impressão de aumento da musculatura é enfatizada pela diminuição visível de gordura corporal. Animais Belgian Blue apresentando fenótipo de musculatura dupla, exibem maior proporção de músculo (22%, $p < 0,01$) e menor proporção de gordura (49%, $p < 0,01$), principalmente no tecido gorduroso subcutâneo (80%, $p < 0,05$) quando comparados aos animais normais da mesma raça (HOCQUETTE et al., 1999). A composição total do corpo do animal de musculatura dupla varia entre indivíduos, sexo e raça. A variação ocorre inclusive entre espécies (HOCQUETTE et al., 1999 e MCPHERRON et al., 1997). Em geral, o fenótipo é caracterizado por diminuição da proporção óssea e de gordura e por aumento da proporção muscular em relação aos animais convencionais. Em animais Piemontês,

características como maciez e fragmentação tiveram suas taxas aumentadas em animais com um ou dois alelos inativos (WHEELER et al., 2001). Análise do músculo semitendinoso de Belgian Blue com musculatura dupla apresentou duas vezes mais células musculares do que em animais convencionais (WERGNER et al., 2000).

Esta hipertrofia muscular é uma condição hereditária em bovinos, resultando em aumento do número de fibras musculares (hiperplasia), propiciando aumento de massa muscular de 20 – 25% em relação aos indivíduos convencionais (Mc PHERRON; LEE, 1997). Animais com musculatura dupla representam um modelo de agropecuária moderna, ou seja, carne mais magra, com características de produção comparáveis, em quantidade, a poucos animais (ARNOLD et al., 2001). Neste contexto, bovinos das raças Belgian Blue e Piemontês vêm sendo selecionados para fixação da característica de musculatura dupla nos rebanhos (KAMBADUR et al., 1997).

A presença do fenótipo de musculatura dupla foi descrita somente em algumas raças de bovinos (Belgian Blue, Blonde d'Aquitaine, Charolês, Gasconne, Limousin, Maine-Anjou, Parthenaise, Asturiana, Rubia Gallega e Piemontês). Assim, para a exploração zootécnica desta característica em outras raças de maior representatividade, faz-se necessária a manipulação genética desses animais para induzir o bloqueio ou a diminuição da formação da proteína funcional da miostatina e conseqüente aumento da massa muscular.

A característica de musculatura dupla é descrita como “*knockout natural*” nessas raças de bovinos (MCPHERRON; LEE, 1997; KAMBADUR et al., 1997; GROBET et al., 1997). A geração de animais de produção resultantes de *knockout* de determinado gene por recombinação homóloga em células somáticas e posterior transferência nuclear já foi descrita em ovinos e suínos. Dai et al. (2002) e Lai et al.

(2002) descreveram o nascimento de cinco e quatro porcos, respectivamente, produzidos por transferência de células contendo um dos alelos do gene da α 1,3-galactosiltransferase interrompidos. Denning et al. (2001) descreveram o nascimento de uma ovelha com deleção do gene que codifica prions. No entanto, a obtenção de células positivas é muito trabalhosa e as perdas embrionárias e fetais durante a gestação permanecem muito altas.

O bloqueio da miostatina já foi induzido por Mc Pherron et al. (1997), em experimento de *knockout* por recombinação homóloga em células-tronco embrionárias, resultando em camundongos com ausência da expressão do gene e conseqüente fenótipo de aumento de tamanho e número de fibras musculares. A modulação da expressão do gene da miostatina, no entanto, parece ser mais vantajosa do ponto de vista zootécnico do que sua completa exclusão, tornando-se alvo em potencial para desenvolvimento de tecnologias de silenciamento gênico pós transcricional, em particular, a interferência de RNA (RNAi) (CLARK; WHITELOW, 2003).

RNAi é um processo celular de degradação do RNA mensageiro (RNAm) após sua ligação à uma molécula de RNA complementar, utilizando-se para isso mecanismo biológico pré-existente no organismo. Uma vez encontradas moléculas de RNA fita dupla no citoplasma da célula, a endoribonuclease denominada DICER é utilizada para clivá-lo gerando fragmentos de 21-25pb (*small interference RNAs* (siRNA) (BERNSTEIN et al., 2001). Após a clivagem, os fragmentos se ligam à proteína R2D2, que fica presa à DICER. Uma RNA helicase abre o RNA fita dupla, permitindo a ação do complexo de silenciamento induzido por RNA (*RNA-induced Silencing Complex* - RISC), que interagirá com novas fitas de RNAm alvo, degradando-as (HAMMOND et al., 2000) (Figura 2).

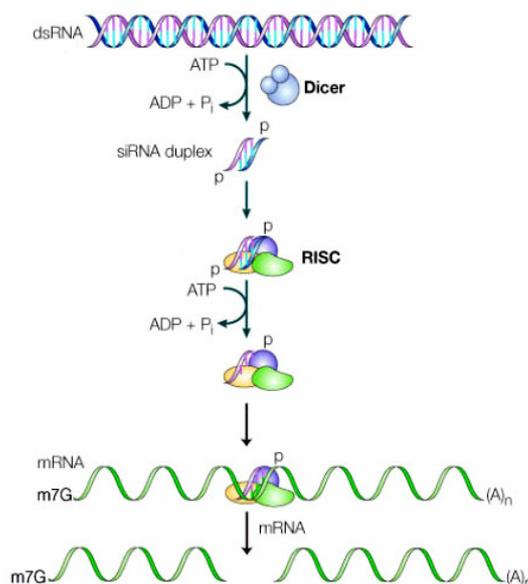


Figura 2 – Esquema representativo da degradação do RNAm pelo processo de RNA de interferência. Uma vez encontradas no citoplasma, moléculas de RNA fita dupla são clivadas em fragmentos menores pela DICER e recrutam o RISC, que interagirá com o RNAm complementar, degradando-o.

Estudos demonstrando a eficiência deste processo têm sido amplamente descritos em diversos tipos celulares, inclusive em células musculares esqueléticas. Experimento de transfecção destas células por eletroporação de siRNAs para inibição de luciferase ou GFP, juntamente com a transfecção de plasmídeos para expressão dessas proteínas resultaram na inibição das mesmas por até 5 dias. O mesmo resultado foi atingido com a transfecção de moléculas de siRNA para o gene endógeno GAPDH (KISHIDA et al., 2004). Estes resultados foram também descritos por Golzio et al. (2005), que demonstraram a eficiência da metodologia *in vivo* com inibição por até 11 dias.

Meng et al. (2002) descreveram a síntese de molécula de RNAi capaz de inibir eficientemente a formação da miostatina *in vitro* em cultivo de mioblastos de feto de galinha. Já Acosta et al. (2005) produziram peixe zebra (*Danio rerio*) exibindo número aumentado de fibras musculares esqueléticas após a microinjeção de moléculas de dsRNA (RNA dupla fita) no embrião. No entanto, a interferência mostrou-se dependente da quantidade de dsRNA injetado. Além disso, a produção de animais de musculatura dupla por efeito de moléculas de siRNA introduzidas por microinjeção foi transiente, ou seja, ocorreu apenas enquanto essas moléculas estavam sendo disponibilizadas.

Para utilização desta tecnologia em bovinos, é necessário o desenvolvimento de vetores de siRNA que pudessem integrar-se ao genoma hospedeiro e induzir síntese contínua destas moléculas. Estas exigências se dão pelo fato deste gene ser expresso majoritariamente durante o desenvolvimento fetal e o acesso a estes animais ser muito difícil, além da grande quantidade de vetor a ser produzida para atingir todas as células. A capacidade de transmitir tal característica à progênie é desejável, por isso a importância da incorporação deste vetor ao genoma.

Para a síntese contínua, moléculas de siRNA têm sido sintetizadas na forma de pequenos grampos (*short hairpin RNA – shRNA*) que induzem o sistema RISC. Estes shRNAs são expressos nas células alvo a partir de uma molécula de DNA inserida de maneira estável no genoma sob controle de promotores constitutivos como o U6 da RNA polimerase III bovina (LAMBETH et al., 2005) e o U6 da RNA polimerase III humana (VAN DE WETERING et al., 2003).

A escolha do método de entrada do transgene na célula é um aspecto fundamental para que ocorra a inserção desta construção (promotor constitutivo + DNA

para shRNA) no genoma da célula hospedeira. A uso de vetores virais (transdução) parece ser o método mais eficiente (GOJO et al., 2002). Para a utilização de vetores virais, faz-se necessária a deleção de regiões genômicas do vírus dispensáveis para essa integração, possibilitando a introdução de genes de interesse e, ao mesmo tempo, impedindo a replicação no hospedeiro (GOJO et al., 2002). Para inserção estável no genoma hospedeiro, pode-se optar pelos retrovírus (ROE et al., 1993), adenovírus associados (GRIMM et al., 2005) ou lentivirus (ABBAS-TERKI et al., 2002).

Os retrovírus são utilizados em diversos estudos clínicos, sendo os primeiros a serem empregados na terapia gênica. Este vetor possui integração estável no genoma do hospedeiro (ROE et al., 1993). Os retrovírus possuem três genes essenciais: o *gag* que codifica proteínas estruturais, o *pol* que codifica a transcriptase reversa/integrase e o *env* que codifica uma glicoproteína do envelope viral. Os retrovírus também foram utilizados de modo pioneiro pela modificação de proteínas do envelope, atingindo populações celulares diferentes. Esta vantagem os torna capazes de transduzir inclusive células germinativas e embrionárias de diferentes espécies, como a suína (CABOT et al., 2001), a bovina (CHAN et al., 1998) e a murina (JAENISCH, 1976). No entanto, os vetores baseados em retrovírus apresentam algumas desvantagens como a incapacidade para transduzir células que não estão em processo de divisão, como as cerebrais, pulmonares e pancreáticas, que não se dividem com tanta frequência (ROE et al., 1993), além de possibilitar a formação de quimeras quando utilizados na produção de embriões.

Os lentivírus utilizam outra via para o transporte de material genético. O mais conhecido desta família é o vírus da imunodeficiência humana (HIV), que faz parte da família dos retrovírus, mas que possui habilidade de transduzir também células que não

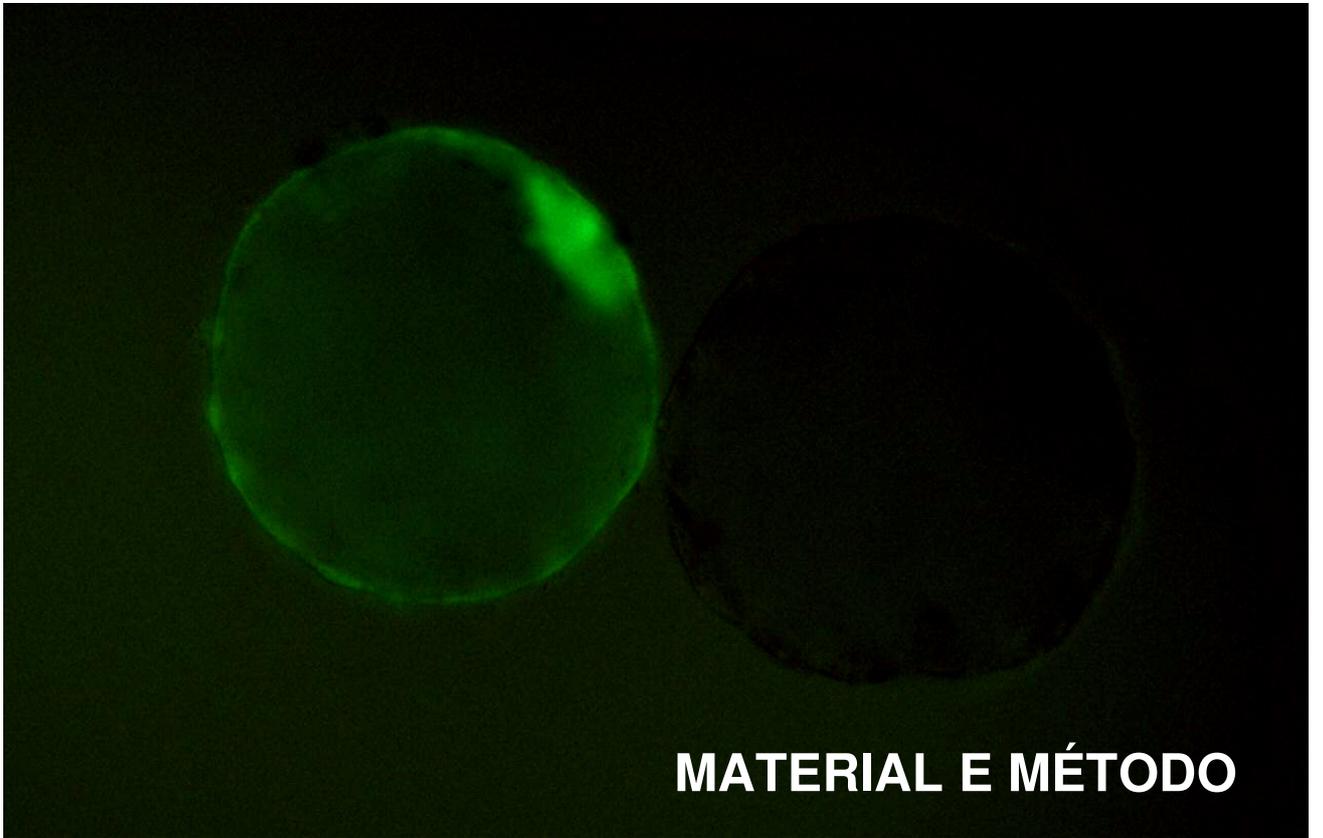
estejam em fase de divisão (NALDINI et al., 1996). Esta propriedade dos lentivírus e, em particular, do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1), depende do transporte ativo do genoma viral para o núcleo da célula infectada sem o requerimento da quebra do envelope nuclear, que ocorre durante a divisão celular (BUKRINSKY et al., 1992). O transporte do genoma viral para o núcleo requer que o complexo de pré-integração (PIC) seja importado ativamente. A ligação do PIC ao núcleo deve-se à ação de diversos sinais de localização nuclear (NLS), presentes em várias proteínas do PIC, incluindo antígeno de matriz (MA), integrase (IN) e proteína viral R (Vpr) (WHITTAKER et al., 2000).

Hofmann et al. (2004) relataram a transdução efetiva de vetores lentivirais para expressão estável da GFP em oócitos bovinos que foram posteriormente utilizados para fecundação *in vitro* (FIV), gerando 83% de embriões fluorescentes. No mesmo trabalho, fibroblastos adultos foram transduzidos e utilizados para transferência nuclear. Apesar da menor eficiência da técnica de transferência nuclear em relação à técnica de FIV, a análise histológica mostrou que os tecidos dos animais eram idênticos, resultando na expressão da GFP em todos os tecidos analisados, inclusive em células de glândula mamária e linhagem germinativa.

Stewart et al. (2003) demonstraram que os lentivírus são efetivos em carrear vetores de expressão estável de RNA de interferência, inclusive em cultivo de células primárias. Tiscornia et al. (2003) descreveram a expressão estável do vetor de RNAi mediado por lentivírus em embriões murinos para *knockdown* da GFP. Relataram que os animais apresentavam a expressão desta proteína mesmo após o nascimento. Mais recentemente, Golding et al. (2006) descreveram a expressão estável de shRNAs para inibição da proteína prion, via vetor lentiviral, em embriões bovinos e caprinos. Estes

resultados demonstram fortes evidências da potencial utilização desta técnica no controle de doenças em animais de produção.

A associação destas metodologias pode resultar em maior eficiência na produção de organismos geneticamente modificados com o objetivo de diminuir a produção de determinada proteína funcional. O bloqueio da miostatina, por ser o fator determinante no fenótipo de musculatura dupla em bovinos, quando associado às técnicas de RNAi e de transdução por vetores lentivirais torna-se potencial alvo de estudos na manipulação genética de bovinos da raça Nelore.

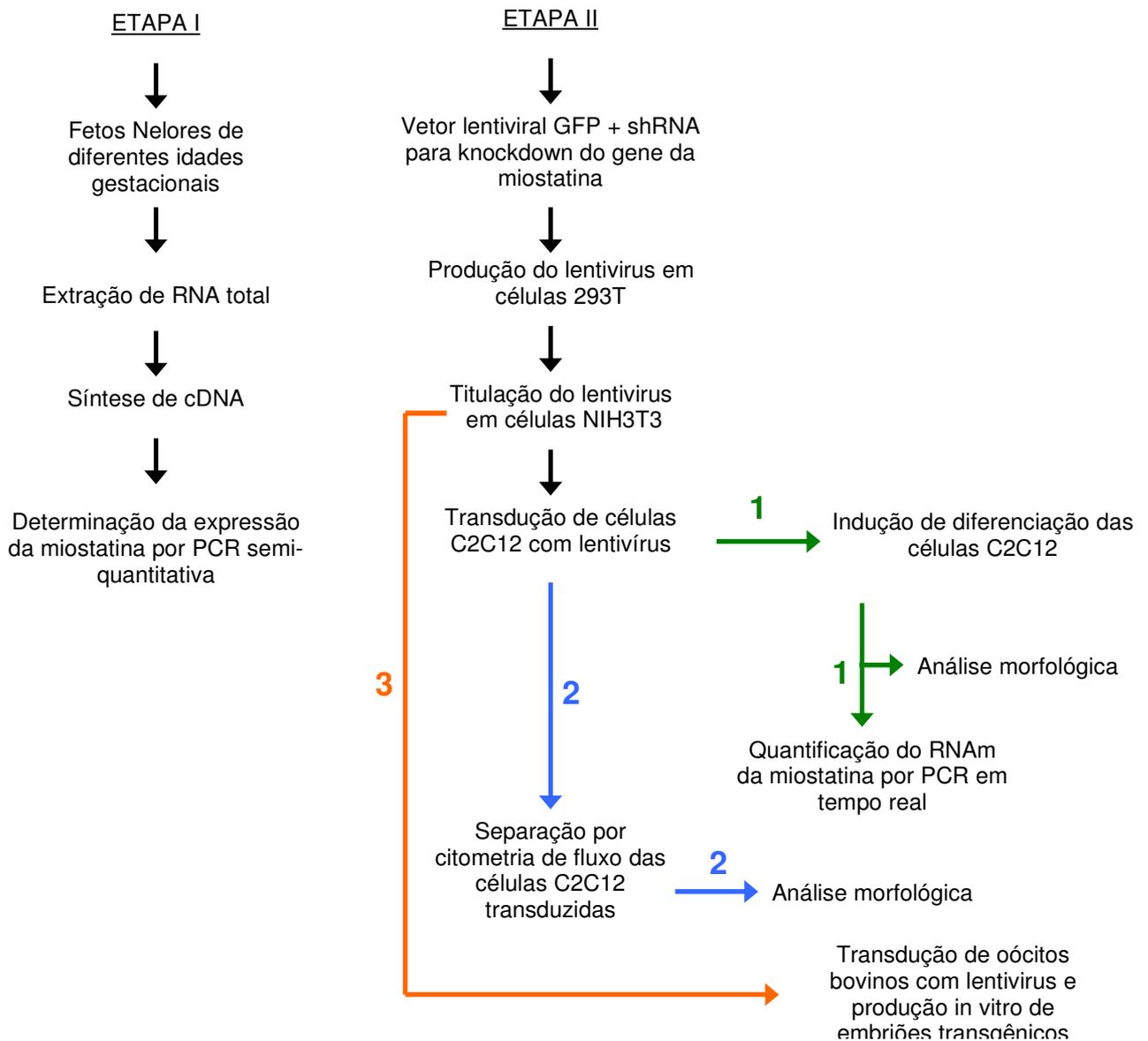


MATERIAL E MÉTODO

5 MATERIAL E MÉTODO

Os experimentos foram conduzidos de acordo com o delineamento experimental abaixo.

DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



ETAPA I: ESTUDO DA EXPRESSÃO DO GENE DA MIOSTATINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

5.1 Avaliação da síntese de RNAm específico para miostatina durante o desenvolvimento fetal em bovinos da raça Nelore

5.1.1 Colheita do material e extração do RNA total

Fetos bovinos da raça Nelore em diferentes estágios da gestação (30, 60, 90, 120, 150, 180 e 210 dias, aproximadamente) foram colhidos em abatedouro, sendo retirados fragmentos de aproximadamente 0,5cm³ do músculo semitendinoso e armazenados em nitrogênio líquido (Figura 3).



Figura 3 – Manipulação de feto bovino oriundo de abatedouro para obtenção de fragmentos de tecido muscular para análise do RNAm

Cada fragmento de músculo foi macerado ainda congelado, sendo adicionado 1ml do reagente TRIZOL[®] (Invitrogen, Califórnia, EUA) seguido de 200µL de clorofórmio (Sigma, St Louis, EUA). A mistura foi homogeneizada e incubada à temperatura ambiente por 10 minutos, sendo centrifugada a 12.000g por 15 minutos à 4°C. A fase aquosa foi transferida para outro tubo, adicionando isopropanol (Sigma, St Louis, EUA) na proporção 1:1 e o sedimento lavado com 1mL de etanol 70% (Sigma, St

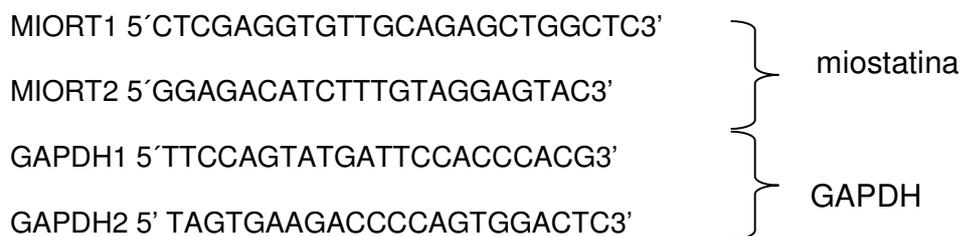
Louis, EUA), seguido de centrifugação a 14.000g por 5 minutos e secagem ao ar. Em seguida, o sedimento foi ressuspensionado em 50µL de água tratada com dietilpicrocarbonato (DEPC) (Sigma, St Louis, EUA) e quantificado o RNA total em espectrofotômetro.

5.1.2 Síntese da primeira fita de cDNA

Aos 2µg do RNA total (item 5.1.1) foi adicionado 1µL de oligo dT e a mistura incubada por 70°C por 5 minutos e resfriada até 4°C. Para a reação de síntese da primeira fita de cDNA foram adicionados 4µL 5x *First strand buffer*; 2µL de 0,1 M DTT; 2µL de 10mM dNTP e água DEPC q.s.p. 19µL (Invitrogen, Califórnia, EUA). Procedeu-se a incubação a 42°C por 1 hora em termociclador, a adição de 1µL de *Superscript II* (Invitrogen, Califórnia, EUA) e a incubação por 1 hora a 42°C, 15 minutos a 70°C e resfriamento até 4°C.

5.1.3 Determinação da fase exponencial de amplificação do gene da miostatina e da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase - GAPDH (controle endógeno)

Os cDNAs (item 5.1.2) foram submetidos à amplificação do gene da miostatina e da GAPDH com oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de seqüências anteriormente depositadas no GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov):



As reações foram feitas em termociclador PTC-100 por 35 ciclos totais, sendo retiradas amostras nos ciclos 18, 21, 24, 27, 30, 32 e 35 para determinação da fase exponencial de amplificação. Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% em TBE por 30 minutos a 100V, corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta. A intensidade das bandas para determinação da fase exponencial foi analisada pelo software Image Quant TL. Os experimentos foram realizados em duplicata.

5.1.4 Determinação da expressão diferencial do gene da miostatina por PCR semi-quantitativo

As reações foram feitas em termociclador PTC-100 por 30 ciclos para a GAPDH e por 32 ciclos para a miostatina, conforme determinação prévia da fase exponencial de amplificação (item 5.1.3). As reações foram padronizadas contendo 5 μ L de 10x PCR buffer; 2,5mM de cada dNTP; 1,5mM de MgCl₂; 1U de Taq DNA polimerase; 20pmol de cada oligonucleotídeo iniciador e 2 μ L do cDNA (item 5.1.2). O ciclo para ambos amplicons consistiu de 95°C por 1 minuto, 30 ou 32 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Após a reação, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel agarose 1% em TBE por 30 minutos a 100V,

corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta. A intensidade das bandas para determinação da expressão diferencial da miostatina e da GAPDH para verificar a quantidade de RNA presente nas reações foi analisada pelo software Image Quant TL. Os experimentos foram realizados em duplicata.

ETAPA II: PRODUÇÃO DE EMBRIÃO BOVINO TRANSGÊNICO PARA MUSCULATURA DUPLA PELA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA

5.2 Construção do vetor para interferência de RNA

5.2.1 Desenho do siRNA

O siRNA foi construído com base na seqüência anteriormente depositada no GeneBank para o cDNA da miostatina de bovino analisada pelo aplicativo *Débora* (Pereira, 2005) e sintetizado de acordo com o protocolo descrito para construção de vetores para siRNA *pSilencerTM 2.1-U6 neo* (Ambion, Austin, EUA). A estrutura consistiu em seqüência de 65 bases (fita shRNA1), sendo 21 nucleotídeos da seqüência do RNAm alvo, uma seqüência complementar a esta seqüência e uma seqüência intercalante com a função de formar uma alça entre as duas, resultando na estrutura de shRNA (Figura 4). Nas duas extremidades foram inseridos sítios de enzimas de restrição (Bam HI e Hind III) para facilitar a clonagem no plasmídeo *pSilencer 2.1 U6neo*.

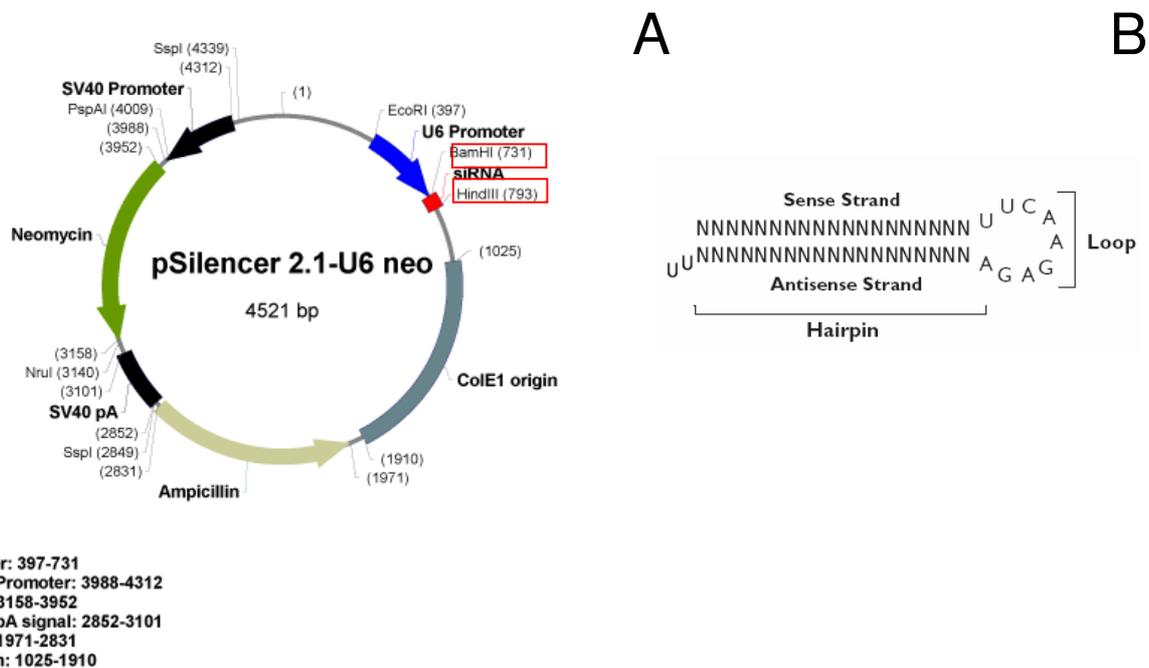


Figura 4 – Representação esquemática da estrutura do vetor, com a presença das regiões de corte das enzimas de restrição utilizadas nos experimentos de clonagem (A) e da provável estrutura do shRNA (B).

A fita complementar à fita simples (fita shRNA2) foi desenhada, sintetizada e anelada para formar fita dupla de DNA a ser clonada no vetor. A reação de anelamento foi conduzida com 2uL da fita siRNA 1 (1ug/uL); 2uL da fita siRNA 2 (1ug/uL) e 46uL do *DNA annealing solution* (fornecida pelo fabricante). A mistura foi posteriormente incubada por 3 minutos a 90 °C, seguida por 1h a 37 °C.

5.2.2 Clonagem do vetor para shRNA no plasmídeo *pSilencerTM 2.1-U6 neo*

Das sequências aneladas no item 5.2.1, 8ng foram ligados ao vetor *pSilencerTM 2.1-U6 neo*. Para isso, 1uL do siRNA (8ng/uL); 1uL da solução *10x T4 DNA*

ligase buffer, 1uL da T4 DNA ligase; 1uL do vetor *pSilencer* e 6uL de água ultra pura foram misturados e incubados por 16 horas a 16 °C.

5.2.3 Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial

Às bactérias DH5 α competentes (F'phi80d*lacZ* delta(*lacZYA-argF*)U169 *deoR recA1 endA1 hsdR17* (rk-, m k+) *phoA supE44 lambda-thi-1 gyrA96 relA1/F' proAB+ lacIqZdeltaM15 Tn10(tetr)* foram adicionados 10uL da reação de ligação, permanecendo por 20 minutos no gelo, 50 segundos a 42 °C e rapidamente retornadas ao gelo. À mistura foram adicionados 100uL de meio de cultivo LB (Anexo D) e deixados por 90 minutos a 37 °C. Após esse período, as bactérias foram espalhadas sobre placas de Petri contendo 50mL do meio LB-ágar (Anexo E) contendo 10ug/mL de ampicilina.

As colônias resistentes à ampicilina foram colhidas com alça de platina estéril, imediatamente inoculadas em 2mL do meio LB (Anexo D) contendo 10ug/mL de ampicilina e mantidas em estufa a 37 °C por 16 horas sob agitação leve.

As culturas foram centrifugadas por 1 minuto a 14000g para retirada do meio LB. As bactérias foram ressuspendidas em 100uL da solução I (25mM Tris/HCl pH8,0; 10mM EDTA; 50mM glicose) e, em seguida, adicionadas de 200uL da solução II (0,2N NaOH, 1%SDS) e misturadas por inversão. A mistura foi deixada 3 minutos à temperatura ambiente e, em seguida, adicionados 150uL de Acetato de Sódio 3M, misturada por inversão, deixada por 30 minutos em gelo e centrifugada por 5 minutos a 14000g. O sobrenadante foi transferido para tubo de polipropileno estéril com

capacidade de 1,5mL. Foi adicionado 1mL de Etanol 95% e a mistura centrifugada por 15 minutos a 14000g. O líquido foi removido por inversão do tubo e o sedimento lavado com 1mL de Etanol 70%, seco ao ar e ressuspendido em 100uL de água deionizada.

5.2.4 Digestão do DNA plasmidial

Cada amostra de DNA foi submetida à digestão com enzima de restrição BamHI e HindIII para liberação do inserto do shRNA e verificação da entrada ou não no plasmídeo.

5.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida

As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão TBE por 4 horas. Posteriormente os géis foram fixados (Anexo F), corados com nitrato de prata (Anexo G) e revelados (Anexo H) até o surgimento das bandas, quando foram retornados à solução fixadora. Após a fixação, os géis foram visualizados sobre luz branca e fotografados.

5.3 Construção do vetor lentiviral

Foram utilizados neste experimento vetores lentivirais de empacotamento, envelope e transferência¹. A representação esquemática de cada um dos vetores encontra-se na Figura 5.

Para posterior checagem da inserção estável do vetor de transferência nas células, foi inserido o gene da GFP sob controle do promotor da ubiquitina em sua estrutura.

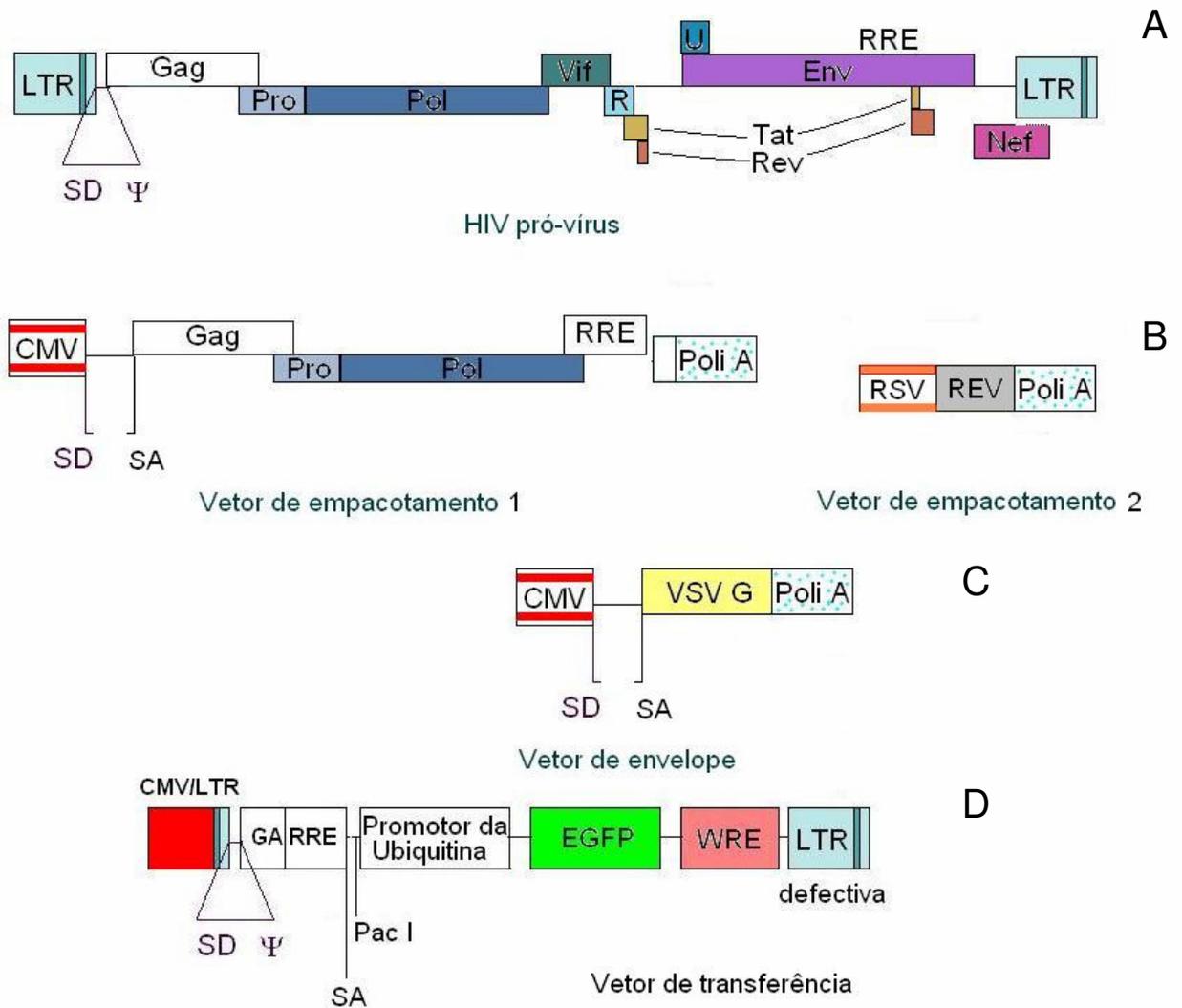


Figura 5 – A) Representação esquemática da porção relevante do pró-vírus do HIV e dos quatro plasmídeos para geração do vetor lentiviral. Estão indicados o sítio doador de splicing (SD) e o sinal de encapsidação (Ψ). B) Nos plasmídeos de empacotamento, foram retirados os genes que conferem a infectividade *in vivo* do vírus. C) No plasmídeo de envelope, a região codificante do VSV G está flanqueada pelo promotor do CMV e um sítio poliA. D) No vetor de transferência, é utilizado o promotor da ubiquitina para direcionar a expressão do gene da GFP. Adaptado de Dull et al. (1998)

¹- Clones cedidos pelo Prof Dr. Bryan Eric Strauss/ Instituto do Coração – Faculdade de Medicina da USP – São Paulo/ SP.

5.3.1 Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial

Cada um dos vetores (empacotamento, envelope e transferência) foi adicionado às bactérias DH5 α competentes que foram transformadas conforme descrito no item 5.2.3. As colônias resistentes à ampicilina foram selecionadas e acrescidas de 250mL do meio LB contendo ampicilina conforme descrito no item 5.2.3. A extração do DNA plasmidial foi realizada com o kit EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as orientações do fabricante e quantificado em espectrofotômetro.

5.3.2 Construção do vetor lentiviral para inserção estável do shRNA

Para inserção estável nas células, o shRNA foi clonado em vetor de transferência lentiviral (Figura 5D) para posterior construção de partículas virais. Para a inserção do fragmento de shRNA no vetor de transferência lentiviral, foi necessária a amplificação da região do shRNA + promotor U6 com oligonucleotídeos iniciadores que a flanqueavam. Estes oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados contendo em suas extremidades sítios para a enzima Pac I, para posterior clonagem.

O fragmento da região do shRNA + promotor U6 + sítios flanqueadores de Pac I foi amplificado com oligonucleotídeos específicos e desenhados com base na sequência do plasmídeo *pSilencer 2.1 U6 neo*, disponibilizada pelo fabricante. O produto amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE por 1 hora a 100V, corado com brometo de etídeo e visualizado sobre luz ultravioleta.

O vetor foi construído pela digestão do vetor de transferência lentiviral e do produto amplificado com 1U da enzima Pac I em tampão (10mM Bis Tris Propano-HCl, 10mM MgCl₂, 1mM DTT, pH7.0) por 4 horas a 37 °C. Após a digestão, ambos fragmentos foram unidos com a enzima T4 DNA ligase (Promega, Madison, EUA) a 25 °C por 1 hora na proporção 3:1 (20ng de inserto:100 ng de fragmento) para obtenção do vetor de transferência completo conforme Figura 6.

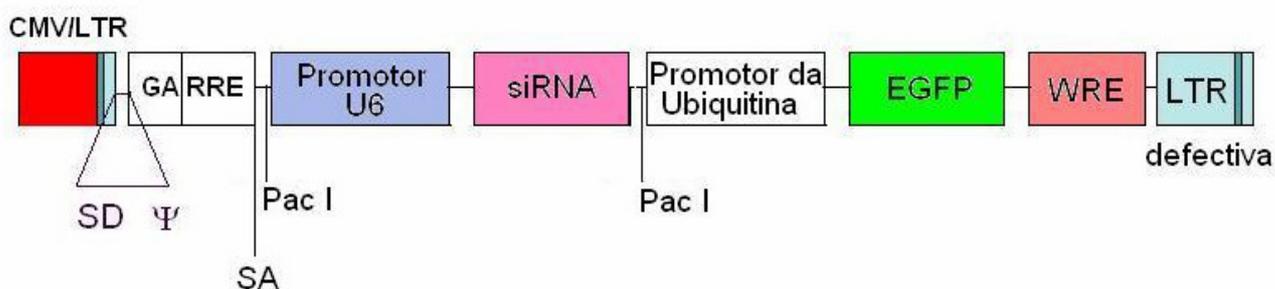


Figura 6 - Representação esquemática do plasmídeo de transferência para gerar o vetor lentiviral. No vetor, o promotor U6 é utilizado para direcionar a expressão do shRNA e o promotor da ubiquitina para direcionar a expressão do gene da GFP.

5.3.3 Transformação bacteriana, isolamento das colônias resistentes e extração do DNA plasmidial.

Bactérias DH5 α competentes foram transformadas com vetor de transferência e as colônias resistentes à ampicilina foram isoladas e crescidas em 250mL de meio LB contendo ampicilina conforme item 5.3.1. O DNA plasmidial foi extraído conforme item 5.3.1.

5.3.4 Digestão do DNA plasmidial

O DNA plasmidial foi digerido com as enzimas de restrição Pac I ou EcoRI ou BamHI/HindIII para liberar o fragmento inserido e verificar os clones positivos. Uma vez determinados, um deles foi selecionado aleatoriamente e inoculado em 250mL do meio LB 1,5x contendo 10ug/mL de ampicilina e mantido em estufa a 37 °C. Após 16 horas, o DNA plasmidial foi extraído conforme item 5.3.1.

5.4 Formação das partículas virais

As partículas virais foram produzidas em etapas.

5.4.1 Semeadura e transfecção das células A293T (célula renal humana) com vetores lentivirais

Foram plaqueadas 5×10^5 células A293T em placa de 6cm contendo 4mL do meio de cultura (Anexo I). Ao atingirem 70-85% de confluência, o meio de cultura foi adicionado de 25uM cloroquina. Paralelamente, em tubo de polipropileno de 5mL foram adicionados 5ug de cada um dos dois vetores de empacotamento, 3ug do vetor de transferência, 2ug do vetor de envelope e 61uL de CaCl_2 (2M), homogeneizando a mistura. Ao tubo foram adicionados 430uL de água deionizada e 500uL de HBS 2x (pH 7,0), borbulhando a mistura por 10 segundos. Após 5 minutos da adição da cloroquina ao meio de cultura de células, a mistura contendo os vetores foi adicionada gota a gota às células e homogeneizada. Após 8 horas, o meio foi substituído por 4mL do meio de

cultura (Anexo I). Após 22 horas, o meio foi trocado, permanecendo por 24 horas, quando foi colhido e centrifugado a 5.000g por 5 minutos. O sobrenadante foi separado e congelado a -80 °C.

5.4.2 Titulação viral

Para este experimento, 24 horas antes da titulação, 100uL de células NIH3T3 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 5×10^5 cél/mL e cobertas com 100uL do meio de cultura (Anexo I). No dia da titulação, o meio de cultura foi aquecido e aliqotado em 6 tubos de polipropileno com 90uL cada. Foram adicionados 10uL da suspensão viral (item 5.4.1) à primeira alíquota, homogeneizando a mistura. Desta mistura, 10uL foram retirados e adicionados ao segundo tubo, que foi homogeneizado. O processo foi repetido até o sexto tubo. Após isto, o meio de cultura foi aspirado dos poços e 50uL da suspensão viral de cada tubo adicionados a um poço contendo as células e incubados por 8 horas. Após este período, o meio contendo a suspensão viral foi trocado por meio de cultura. Após 3 dias, foram verificadas e quantificadas a presença de colônias GFP positivas, sendo que 5×10^5 cfu/50uL é igual a 10^4 cfu/uL.

5.5 Cultivo de mioblastos murinos (linhagem C2C12)

Mioblastos da linhagem C2C12 foram cultivados e transduzidos para verificar o efeito *in vitro* do vetor construído, uma vez que essas células produzem RNAm para miostatina.

Os mioblastos foram cultivados em meio DMEM acrescido de 10% de SFB em incubadora a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade sem atingir a confluência. Para verificação da expressão da miostatina, as células foram induzidas à diferenciação. Para isto, o cultivo foi mantido até 80% de confluência quando o meio foi substituído por DMEM acrescido de 1% de SFB. Após 24, 48 e 72 horas, as células foram lavadas com PBS sem cálcio e sem magnésio (Anexo N) e acrescidas de tripsina (Anexo O). Após o descolamento, as células foram transferidas para tubos de 15mL e centrifugadas a 600g por 5 minutos, sendo o sobrenadante removido e o sedimento congelado a -80 °C até a extração do RNA (item 5.1.1).

5.5.1 Transdução de mioblastos murinos (linhagem C2C12) com vetores lentivirais

Para a transdução *in vitro*, os mioblastos murinos foram semeados em placas de 6 poços e deixados até 50% de confluência em meio DMEM contendo 10% de SFB. No dia da transdução, o meio foi retirado e $2,5 \times 10^4$ partículas virais, previamente acrescidas de 8ug/mL de polibreno, foram adicionadas e o volume completado para 500uL com DMEM. As células foram incubadas a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta

umidade com as partículas virais por 8 horas. Após este período, o meio contendo as partículas virais foi retirado e substituído por meio de cultura (Anexo I). Após 24 horas, o meio foi retirado, as células lavadas com 500uL de PBS sem cálcio e sem magnésio, sendo adicionados 500uL de tripsina (Anexo O) e deixados até o desprendimento das células da placa. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS sem cálcio e sem magnésio e submetidas à citometria de fluxo em equipamento FACScalibur (BD) para determinação do sinal de fluorescência em razão da expressão estável da GFP e separação das células fluorescentes. Células apresentando fluorescência verde foram consideradas positivas quanto a expressão do shRNA para inibição da miostatina e denominadas CGM.

5.5.2 Determinação da eficiência do shRNA

Para determinação da eficiência do shRNA em inibir a miostatina, a cinética de diferenciação das células C2C12 foi avaliada. Cultivos apresentando em torno de 30% de células CGM (item 5.5.1), bem como mioblastos controle (sem expressão do shRNA) foram novamente semeados em placas de 35mm e induzidos à expressão da miostatina conforme descrito no item 5.5 por 24, 48 e 72 horas. Após os diferentes períodos, as células foram analisadas por microscopia óptica para checagem da formação de miotúbulos. Os cultivos foram classificados de forma comparativa em relação ao controle. O experimento foi realizado em duplicata.

5.5.3 Reação de PCR em tempo real

Após a indução da diferenciação por 24 e 72 horas (item 5.5), cultivos apresentando em torno de 30% de células CGM e de mioblastos controle (sem expressão do shRNA) foram lavados e descolados das placas de cultivo conforme descrito no item 5.5.1. O RNA total foi extraído e o cDNA sintetizado a partir de 1ug de RNA total conforme descrito nos itens 5.1.1 e 5.1.2.

O cDNA foi submetido à reação de PCR em tempo real. As reações foram realizadas em equipamento ABI Prism® 7500 utilizando o kit *Platinum® SYBR® Green qPCR Super mix UDG com Rox* (Invitrogen, Califórnia, EUA). Todas as reações foram realizadas em 20uL de volume total e 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 45 segundos para amplificação do gene da miostatina da GAPDH (controle endógeno). A eficiência da reação de amplificação foi calculada pelo software LinRegPCR (Remakers et al., 2003). O experimento foi realizado em triplicata.

5.5.4 Determinação da eficiência do shRNA após separação das células CGM por citometria de fluxo

Após os ensaios iniciais para determinação da eficiência do vetor na inibição da miostatina, células CGM foram separadas por citometria de fluxo em equipamento FACSVantage (BD) e posteriormente plaqueadas para verificação da expressão da GFP em microscopia de epifluorescência. Cultivos de células CGM e de mioblastos controle (sem expressão do shRNA) foram novamente semeadas em placas de 35mm e induzidos à expressão da miostatina conforme descrito no item 5.5.1 por 72 horas. A

cinética de diferenciação das células foi avaliada de forma quantitativa segundo Minotti et al. (1998), com algumas alterações. As células foram fixadas e coradas com panótico rápido por 3 minutos para avaliação da fusão celular. Foram consideradas fundidas células que apresentaram continuidade do citoplasma e pelo menos três núcleos no interior da célula. Dez campos aleatórios e aproximadamente 300 núcleos por campo foram contados para cada amostra. O número total de núcleos de miotúbulos foi dividido pelo número total de núcleos e expresso em porcentagem de fusão.

5.6 Produção *in vitro* de embriões

5.6.1 Colheita e maturação *in vitro* de oócitos

Os ovários de vacas foram colhidos em abatedouro e transportados em recipiente térmico contendo solução salina estéril, aquecida a 30°C. No laboratório, foram lavados 2 vezes em solução salina aquecida a 30°C. Os folículos com diâmetro entre 2 e 8mm foram aspirados com auxílio de agulha 21G acoplada a seringa de 5mL. O líquido folicular foi depositado em tubo cônico, permanecendo em repouso por 10 minutos. Após este período, o sedimento de cada tubo foi colocado em placa de Petri (90mm) para recuperação dos oócitos e posterior seleção e maturação *in vitro* (MIV).

Apenas oócitos apresentando camada de células do *cumulus oophorus* espessa e compacta, assim como citoplasma homogêneo foram selecionados para maturação *in vitro* (MIV). Após a seleção, os oócitos foram lavados três vezes no meio de lavagem (Anexo J) e três vezes no meio de maturação (Anexo L), sendo em seguida

colocados para MIV em gotas de 90 μ l do meio de maturação sob óleo mineral. A maturação foi realizada em incubadora a 38,5°C; 5% de CO₂ em ar e alta umidade por 18 horas.

5.6.2 Microinjeção dos oócitos com vetor lentiviral

Após a maturação, os oócitos tiveram as células do *cumulus oophorus* removidas pela incubação em solução de hialuronidase 2% (ANEXO P) por 10 minutos e pela ação mecânica com auxílio de pipeta automática. Oócitos maduros foram selecionados pela observação do 1^o corpúsculo polar em estereomicroscópio, lavados em meio FIV gota (ANEXO Q) e mantidos em gotas de 90 μ l do meio coberto com óleo mineral até o momento da microinjeção. Os oócitos foram levados ao microscópio invertido (Zeiss, Alemanha) em gotas de PBS acrescido de 10% de SFB e o espaço perivitelínico microinjetado com aproximadamente 100pL da solução contendo partículas lentivirais (2,5x10⁶UI/mL) em equipamento FemtoJet (Eppendorf, Alemanha). Após a microinjeção, os oócitos foram novamente transferidos para o meio FIV gota. Durante este período, oócitos controle (não microinjetados) permaneceram no meio FIV gota.

5.6.3 Fecundação *in vitro*

Os oócitos microinjetados e controle foram fecundados *in vitro* em microgotas de 90µl do meio FIV gota em monocamada de células da granulosa, pois foram desnudados das células do cumulus para microinjeção. Palheta de sêmen de touro da raça Nelore foi descongelada em banho-maria a 37 °C durante 30 segundos e seu conteúdo centrifugado em gradiente de Percoll (45% e 90%) para separação dos espermatozóides móveis, além da remoção do diluidor e do plasma seminal. O sobrenadante foi descartado e os espermatozóides vivos diluídos na concentração de 1×10^6 espermatozóides/mL e as microgotas (aproximadamente 20 oócitos/gota) inseminadas e cobertas com óleo mineral, onde permaneceram em atmosfera com 5% de CO₂ em ar, 38,5°C e alta umidade, durante 18 horas.

5.6.4 Cultivo de Embriões

Os presumíveis zigotos foram co-cultivados em monocamada de células da granulosa com meio SOFaa (Anexo M) por 7 a 9 dias, em estufa a 38,5°C; 5% de CO₂ e alta umidade para avaliar a taxa de desenvolvimento embrionário. Os embriões foram classificados quanto aos índices de clivagem no D4 e de blastocistos no D7 de cultivo. Nestes dias os embriões foram avaliados quanto a presença ou não de fluorescência verde decorrente da expressão estável do gene da GFP. Para isso, os embriões foram avaliados em microscopia de epifluorescência (Olympus, Tokyo, Japão) com filtro de 610nm de emissão e 520nm de excitação. Os índices de clivagem, blastocisto, eclosão

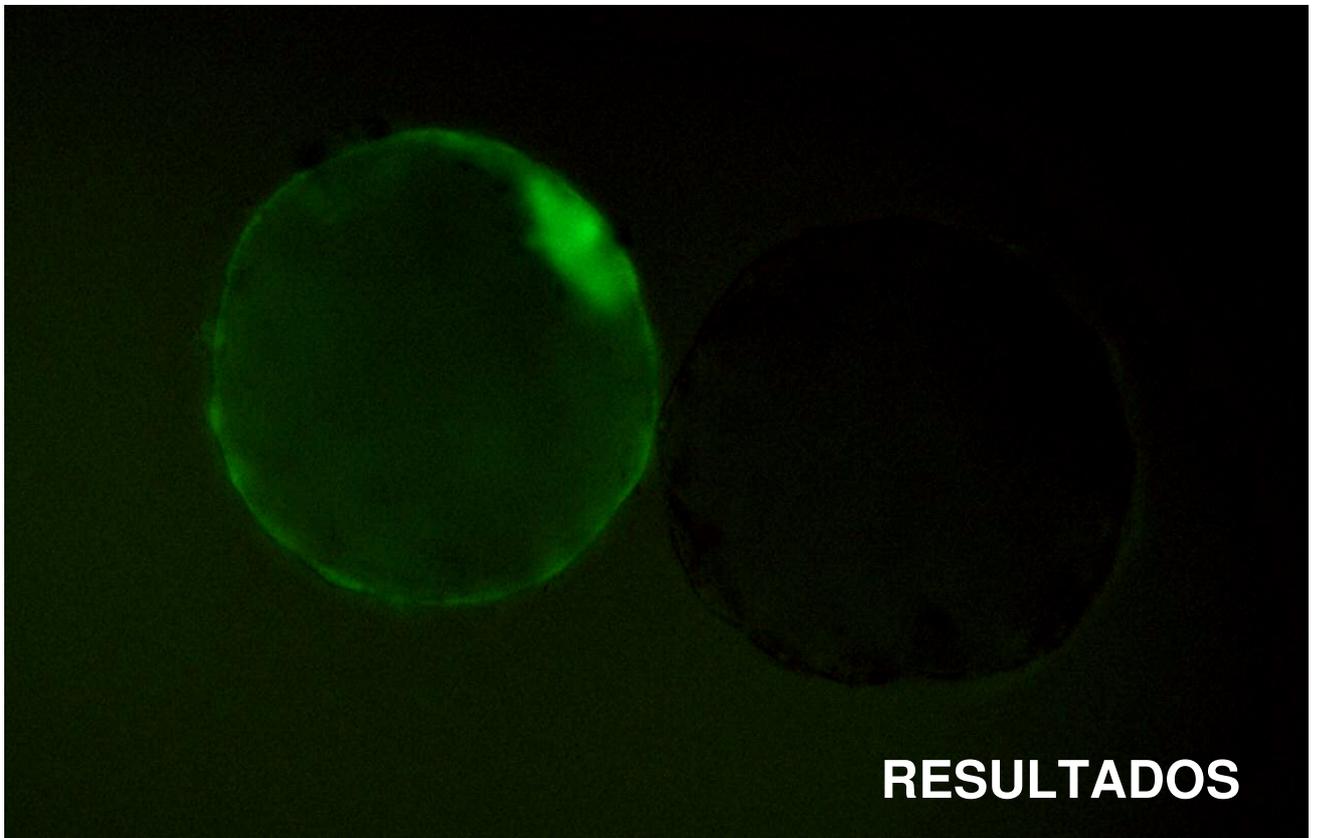
e embriões positivos para expressão da GFP foram representados como média \pm desvio padrão de três manipulações independentes.

5.7 Análise estatística

A análise estatística da diferença de expressão do gene da miostatina dos fetos de diferentes idades gestacionais foi realizada pelo teste Qui-quadrado. A análise estatística da diferença de expressão do gene da miostatina entre os grupos com ou sem o vetor para shRNA foi avaliada mediante a estimativa da eficiência de amplificação após a submissão dos dados ao software REST2005 (Pfaffl et al., 2005) e a variação na taxa de expressão. As reações foram normalizadas pela frequência de expressão do controle endógeno (GAPDH).

Os dados da cinética de diferenciação das células C2C12 e CGM, bem como os dados de desenvolvimento embrionário e presença de embriões fluorescentes foram analisados pelo programa estatístico *MINITAB Release 14 Statistical Software* (Pennsylvania, EUA). Para a descrição dos resultados, foram empregados as médias e seus respectivos desvios padrões (média \pm desvio padrão da média), assim como os níveis de significância (P) dos dados originais. Os dados foram submetidos à análise de variância e comparados pelo teste de Tukey.

O nível de significância para rejeitar H0 (hipótese de nulidade) foi de 5%, isto é, para um nível de significância menor que 0,05, foi considerado que houve diferença estatística entre as variáveis classificatórias para uma determinada variável resposta.



6 RESULTADOS

Os resultados estão expostos de acordo com os itens apresentados no Material e Método.

ETAPA I: AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DO GENE DA MIOSTATINA DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

6.1 Avaliação da síntese de RNAm específico para miostatina durante o desenvolvimento fetal em bovinos da raça Nelore

As regiões dos genes da miostatina e do controle interno GAPDH foram amplificadas e os resultados mostrados na figura 7. Após análise pelo software ImageQuantTL, a intensidade das bandas foi avaliada e os valores encontram-se no Gráfico 1. Pode-se notar a maior expressão da miostatina entre 60 e 120 dias de gestação, seguida de menor expressão com o avanço da idade dos fetos.

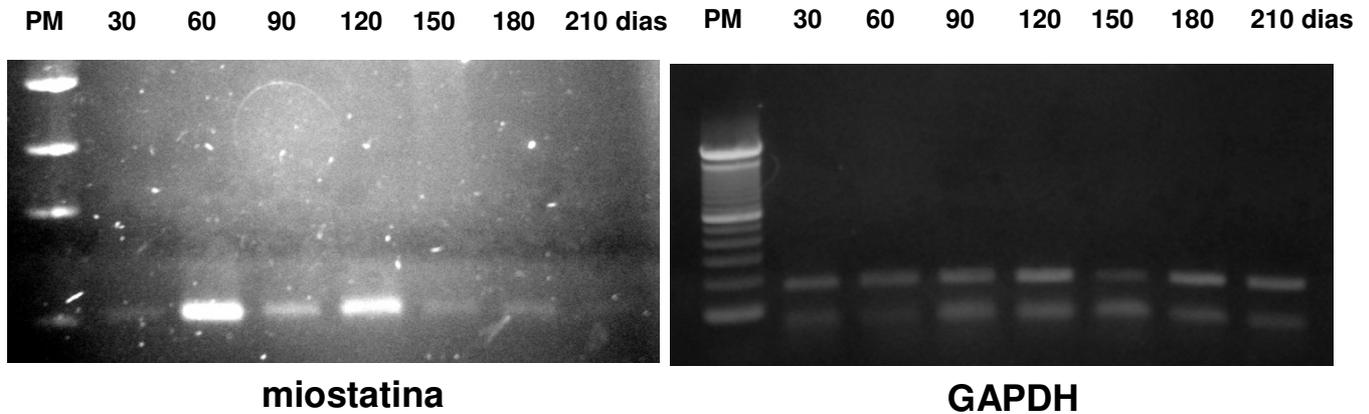


Figura 7 - Eletroforese em gel de agarose 1% em TBE por 1 hora a 100V, corado com brometo de etídeo. Nas diferentes canaletas encontram-se os produtos amplificados para os genes da miostatina e da GAPDH nos diferentes períodos. PM – peso molecular.

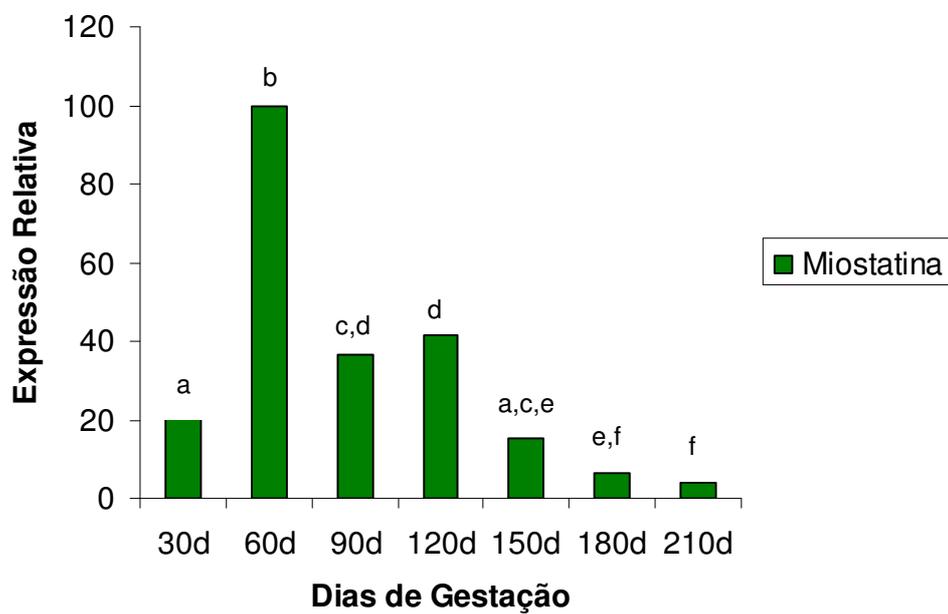


Gráfico 1 – Média da expressão relativa do gene da miostatina em fetos bovinos de diferentes idades gestacionais. Letras diferentes representam $p < 0,05$. Teste de Chi-quadrado.

ETAPA II: PRODUÇÃO DE EMBRIÕES BOVINOS TRANSGÊNICOS PARA MUSCULATURA DUPLA PELA TÉCNICA DE RNA DE INTERFERÊNCIA

6.2 Construção do vetor

A Figura 8 mostra o vetor construído.

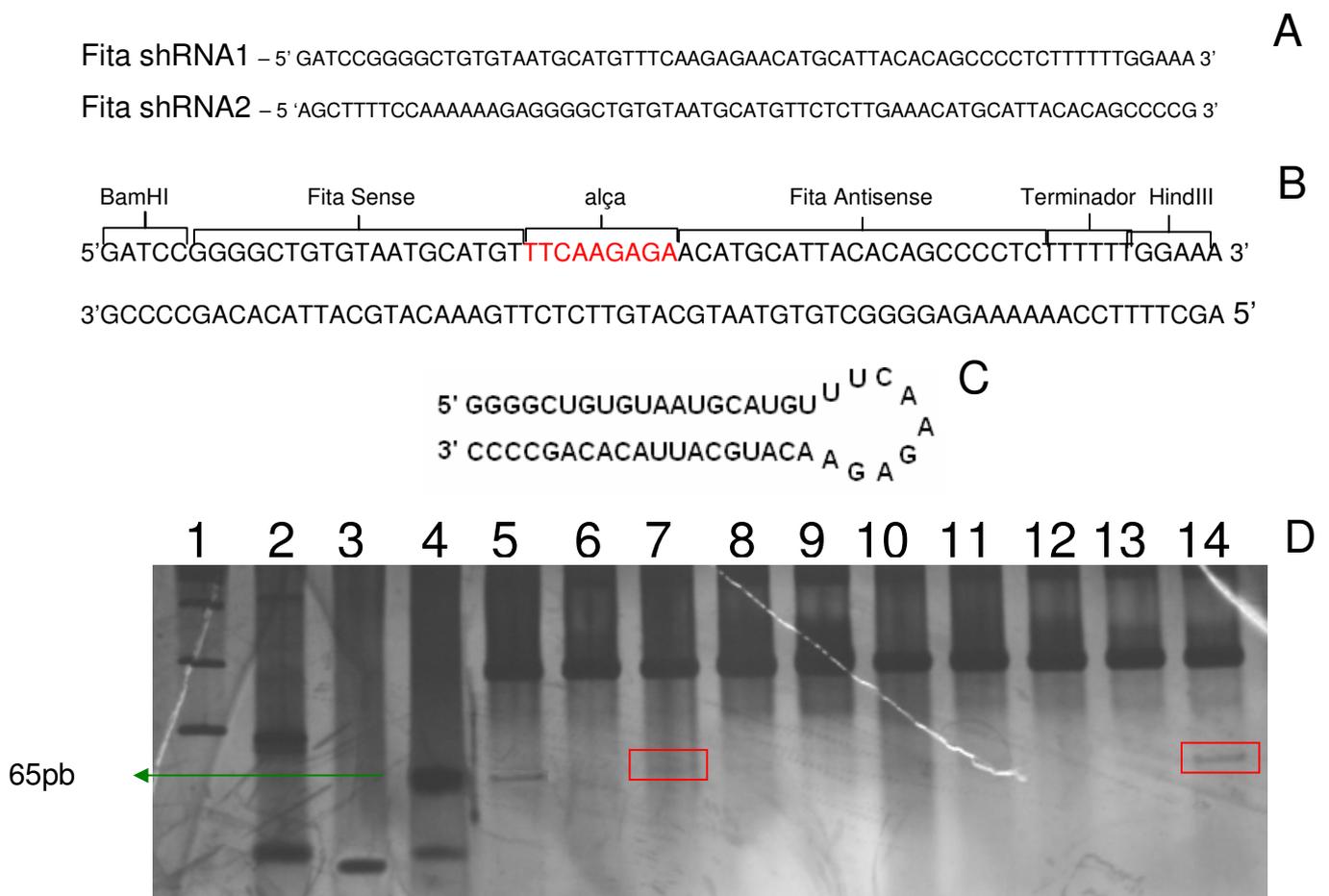


Figura 8 – A - Seqüência dos oligonucleotídeos sintetizados para clonagem no vetor *pSilencer 2.1*; B – Alinhamento das seqüências sintetizadas com destaque para cada uma das funções das seqüências do oligo; C – Esquema da estrutura em forma de grampo desejável devido a complementaridade da fita sense e antisense ; D – Eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão TBE 1x por 4 horas, corado com Nitrato de Prata e analisado sobre luz branca 1– PM em escala de 100pb, 2- oligo shRNA1 não denaturado, 3- oligo shRNA2 não denaturado, 4- oligos anelados (fragmento em torno de 65pb), 5- controle positivo (*pSilencer 2.1 neo* digerido com BamHI e HindIII liberando fragmento de 65pb), 6, 8-13 – amostras negativas, 7 e 14 – amostras positivas.

6.3 Construção do vetor lentiviral

O shRNA, após clonagem no vetor *pSilencer 2.1*, foi amplificado com oligonucleotídeos iniciadores, contendo sítios de restrição para a enzima Pac I, gerando fragmento de 605pb (Figura 9).

PSilFor 5'GACAGTTAATTAAGTTGGGTAACGCCAG 3'

PSilRev 5'ATCTATTAATTAATGTGAGTTAGCTCAC 3'

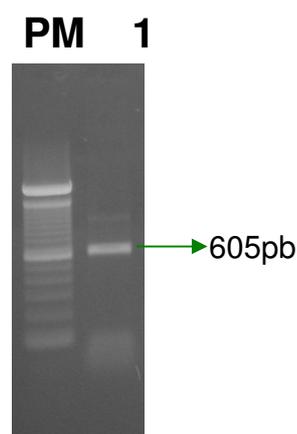


Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE durante 1 hora a 100 V, corado com brometo de etídeo (5µg/ml) e analisado sobre luz ultra-violeta. PM – peso molecular em escada de 100pb; 1 – produto da amplificação do promotor U6 e do shRNA previamente clonado para inserção do sítio para enzima de restrição Pac I.

Para verificação da inserção do produto de PCR no vetor de transferência lentiviral, foram feitas digestões com as enzimas Pac I (liberação do fragmento de 605pb), EcoRI (liberação do fragmento de 2677pb) (Figura 10A) e BamHI/HindIII para liberação do fragmento de 65pb (Figura 10B).

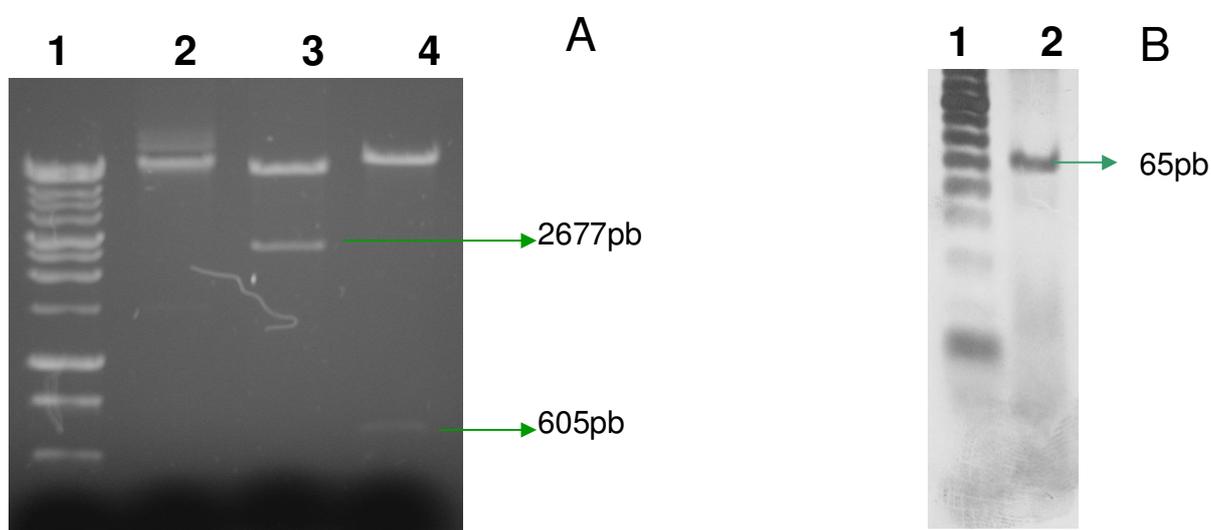


Figura 10 – A - Eletroforese em gel de agarose 2% em tampão TBE durante 1 hora a 100 V, corado com brometo de etídeo (5 μ g/ml) e analisado sobre luz ultra-violeta 1 – peso molecular em escada de 1kb (Promega), 2 – plasmídeo não digerido, 3 – plasmídeo digerido com a enzima de restrição EcoRI e liberação do fragmento de 2677pb, 4 – plasmídeo digerido com a enzima de restrição PaeI e liberação do fragmento de 605pb; B – eletroforese em gel de poliacrilamida 10% em tampão TBE durante 4 horas a 100V, corado com nitrato de prata e analisado em luz branca. 1 – peso molecular em escala de 10pb, 2 – plasmídeo digerido com as enzimas de restrição BamHI/HindIII e liberação do fragmento de 65pb.

6.4 Formação das partículas virais

6.4.1 Avaliação da eficiência dos vetores

Após a transdução, as células da linhagem C2C12 foram fotografadas (Figura 11). Posteriormente as células GFP positivas foram selecionadas por citometria de fluxo, apresentando eficiência de transdução de aproximadamente 30% (Figura 12).

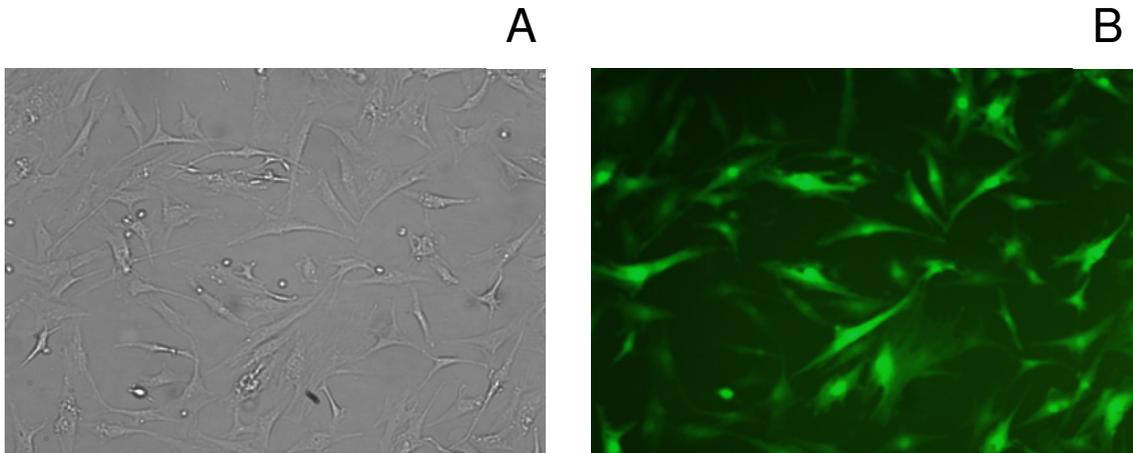


Figura 11 – A) Mioblastos murinos da linhagem C2C12; B) Mioblastos murinos transduzidos com vetor lentiviral contendo o promotor U6 para direcionar a expressão do shRNA e o promotor da ubiquitina para direcionar a expressão do gene da GFP visualizados em microscopia de epifluorescência (células CGM). 100x.

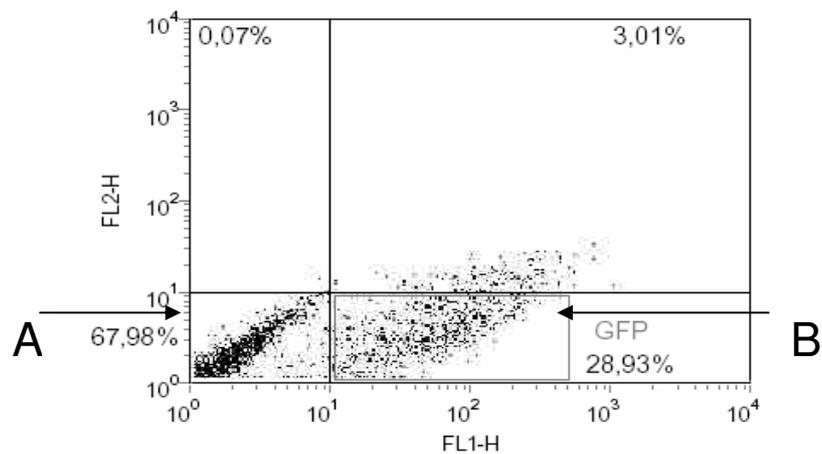


Figura 12 – Citometria de fluxo para separação dos mioblastos murinos da linhagem C2C12 transduzidos com vetor lentiviral contendo o promotor U6 para direcionar a expressão do shRNA e o promotor da ubiquitina para direcionar a expressão do gene da GFP (células CGM). A) população de células negativas; B) população de células positivas para expressão da GFP.

6.4.1.1 Avaliação da cinética de diferenciação das células C2C12 e CGM

Após a indução da diferenciação, cultivos celulares foram avaliados de maneira comparativa quanto a presença de miotúbulos (Figura 13).

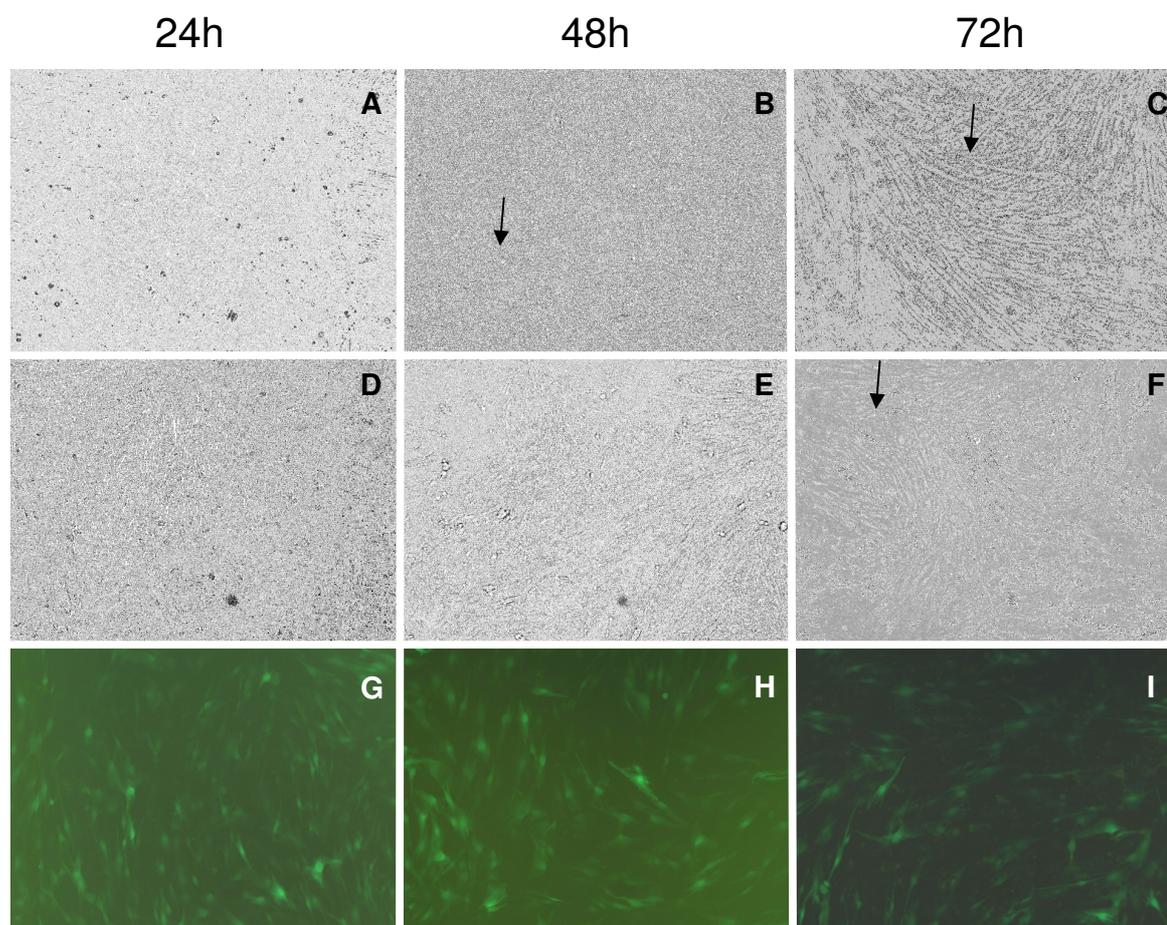


Figura 13 – Cinética de diferenciação das células C2C12 controle e CGM após diminuição do SFB (indução da diferenciação), evidenciando maior presença de miotúbulos no grupo controle. A – F) Microscópio Óptico: A) controle 24 horas; B) controle 48 horas; C) controle 72 horas; D) células CGM 24 horas; E) células CGM 48 horas; F) células CGM 72 horas; G – I) Microscópio de Epifluorescência: G) células CGM 24 horas; H) células CGM 48 horas; I) células CGM 72 horas. Aumento 100X. (→ = miotúbulos)

6.4.2 Real Time PCR

A eficiência do vetor foi analisada nas células C2C12 controle e CGM por PCR em tempo real. As curvas de amplificação e dissociação dos genes da miostatina e da GAPDH encontram-se na Figura 14. O valor médio dos Cts após amplificação e a média da diferença entre os Cts da amplificação da miostatina e da GAPDH encontram-se na Tabela 1 e Gráfico 2.

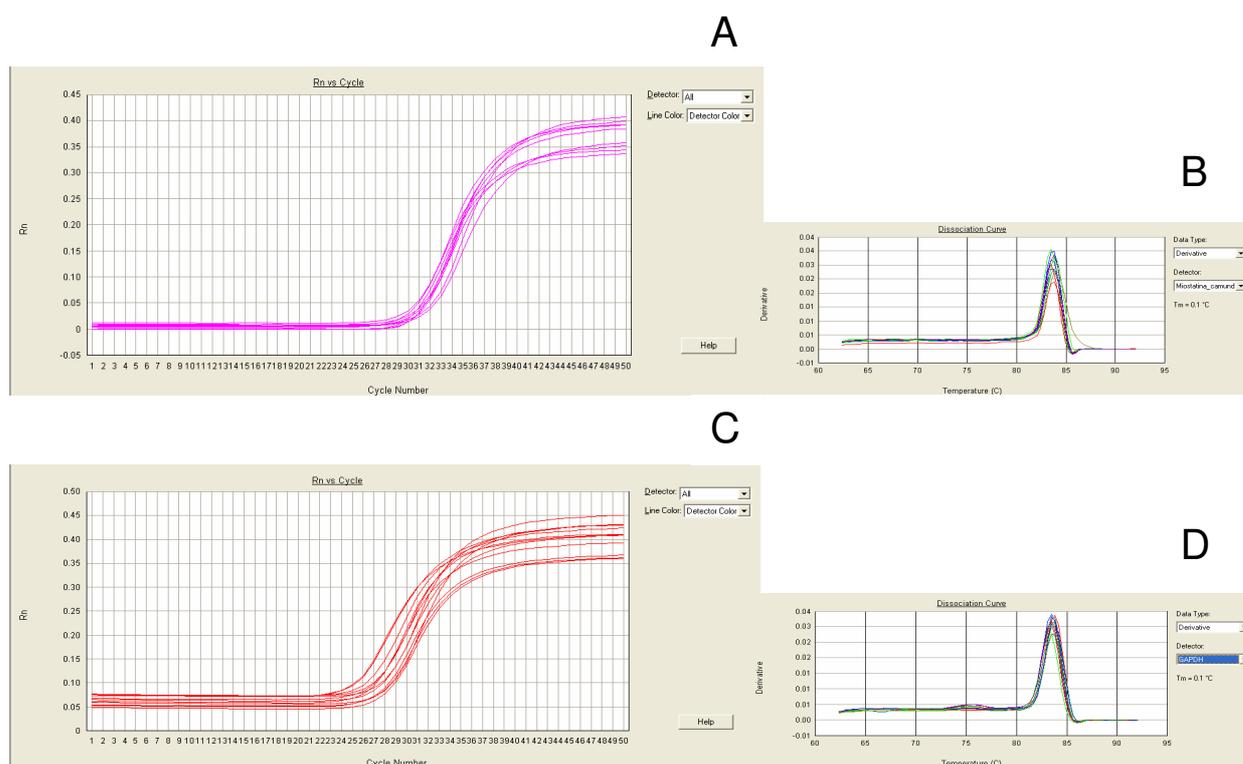


Figura 14 – A e C) Curvas de amplificação e B e D) curvas de dissociação dos genes da miostatina e da GAPDH, respectivamente.

Tabela 1 - Valor médio dos Cts após amplificação por PCR em tempo real dos genes da miostatina e da GAPDH dos cultivos de células C2C12 e CGM após 24 e 72 horas de diferenciação. São Paulo, 2006

Amostra	Gene	Tipo	Média Ct
C24	GAPDH	ENDO	25.917
C72	GAPDH	ENDO	27.32
CGM24	GAPDH	ENDO	25.994
CGM72	GAPDH	ENDO	26.823
C24	Miostatina_camundongo	ALVO	32.102
C72*	Miostatina_camundongo	ALVO	30.597
CGM24	Miostatina_camundongo	ALVO	30.841
CGM72*	Miostatina_camundongo	ALVO	31.106

C – células C2C12 sem vetor para shRNA, CGM – células C2C12 apresentando 30% da população positiva para o shRNA. * p=0.07

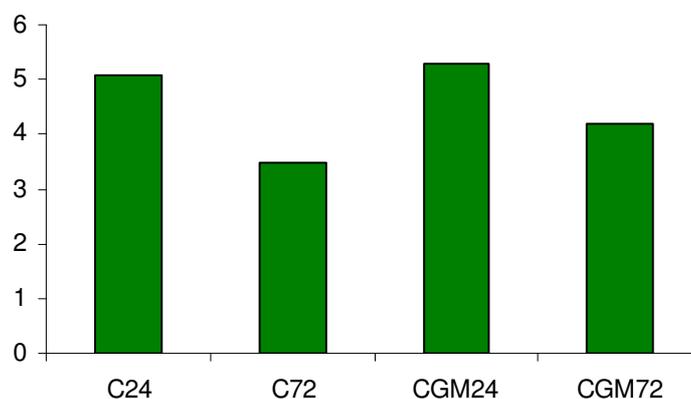


Gráfico 2 – Média da diferença de Ct entre miostatina e GAPDH nas células C2C12 e CGM após 24 e 72 horas de diferenciação.

6.4.3 Determinação da eficiência do shRNA em cultivos de células CGM após separação por citometria de fluxo

As células CGM foram separadas por citometria de fluxo e a expressão da GFP avaliada por microscopia de epifluorescência (Figura 15). O resultado da quantificação dos miotúbulos após 72 horas de diferenciação dos grupos controle e positivos para o cassete de expressão de GFP e shRNA encontra-se na Figura 16 e Gráfico 3.

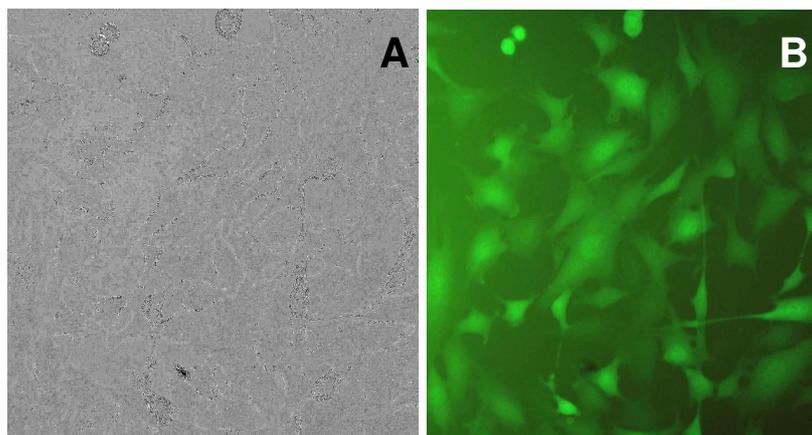


Figura 15 - Células CGM após separação por citometria de fluxo. A) microscópio óptico, B) microscópio de epifluorescência. 100x.

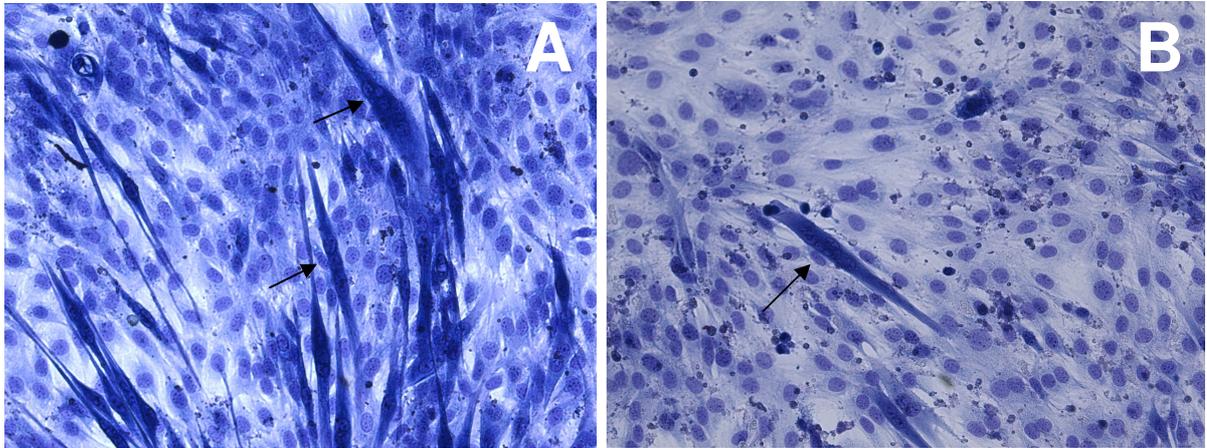


Figura 16 – A) Células C2C12 após 72 horas de diferenciação, coradas com panótico rápido e visualizadas em microscópio óptico, B) células CGM separadas por citometria de fluxo após 72 horas de diferenciação, coradas com panótico rápido e visualizadas em microscópio óptico. (→ = miotúbulo). 100x.

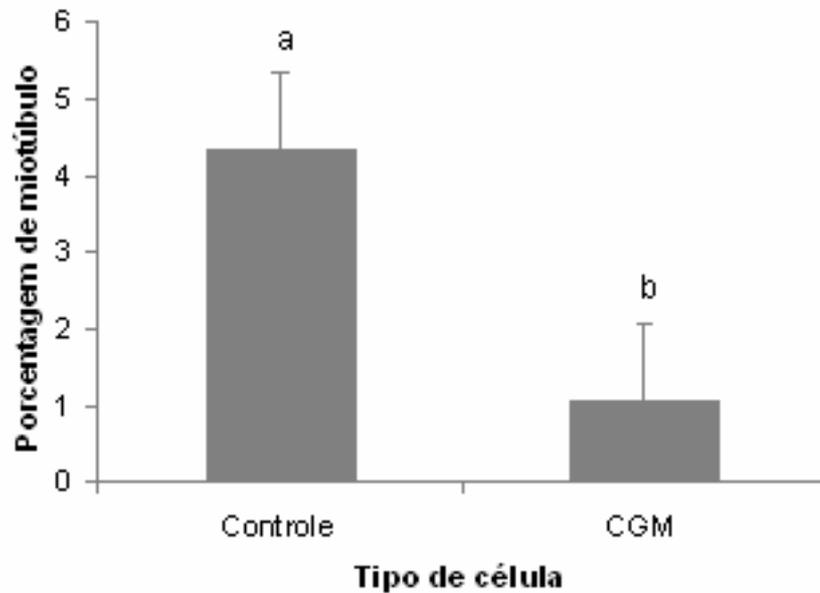


Gráfico 3 – Porcentagem de miotúbulos após 72 horas de diferenciação em células C2C12 e CGM. Letras diferentes representam $p < 0.05$. Teste de Tukey.

6.5 Produção *in vitro* de embriões transgênicos

Após 18 horas de maturação *in vitro*, os oócitos com camadas de células do cummulus expandidas (Figura 17B) tiveram as células retiradas, sendo selecionados os que mostravam o 1^o corpúsculo polar (Figura 17C).

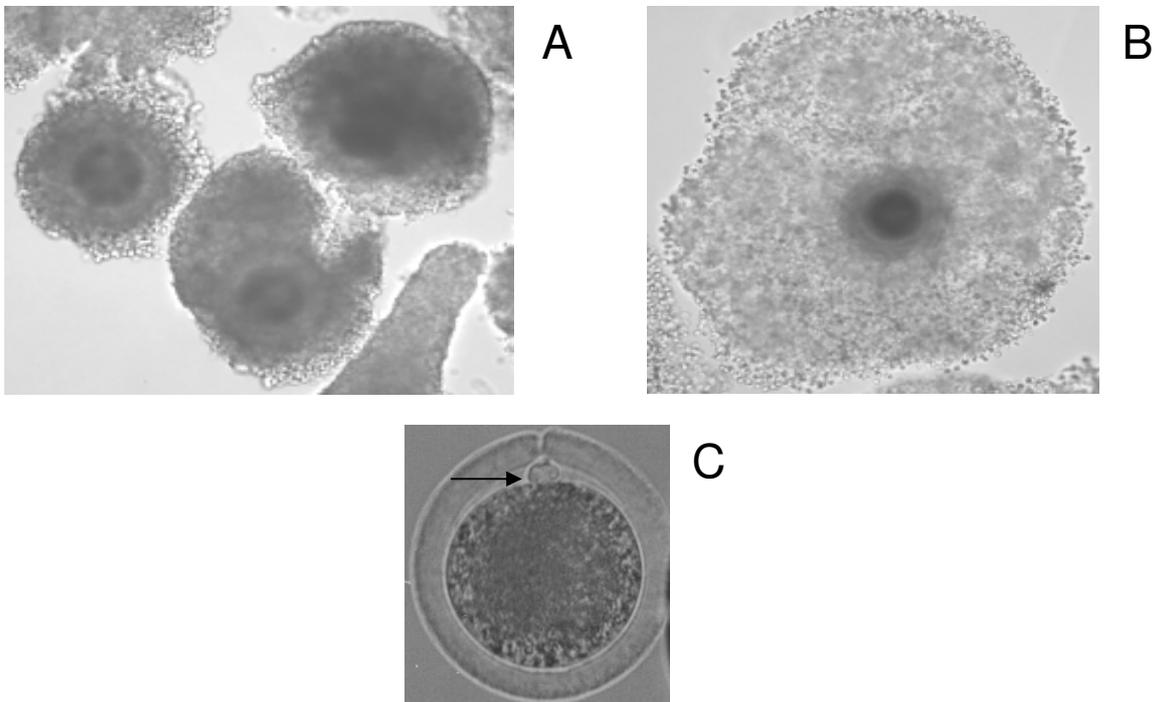


Figura 17 – A - Oócitos imaturos; B – Oócito após 18 horas de maturação; C – Oócito após remoção enzimática e mecânica das células do cumulus. (→ - 1^o corpúsculo polar). 100x.

Oócitos maduros, após remoção das células do cumulus foram selecionados, microinjetados com suspensão lentiviral, fecundados *in vitro* e cultivados. Nos dias 4 e 9 de cultivo, os embriões foram analisados por microscopia de epifluorescência quanto a expressão da GFP. Embriões apresentando fluorescência foram considerados positivos para a integração do transgene (Tabela 2 e Figura 18).

Tabela 2 – Índices de clivagem, blastocisto e embriões positivos para a expressão da GFP dos grupos controle e microinjetado. São Paulo, 2006.

	Clivagem (%)	Blastocisto (%)	Positivos (%)	Positivos após eclosão (%)
Controle	61/65 (93,81±0,68)	25/65 (38,33±2,36)	0/65 (0) ^a	0/65 (0) ^a
Microinjetados	62/65 (96,9±0,34)	29/65 (50,95±3,36)	51/65 (80,24±4,38) ^b	2/65 (3,07) ^b

Teste de Tukey

Letras diferentes entre linhas representam $p < 0.05$

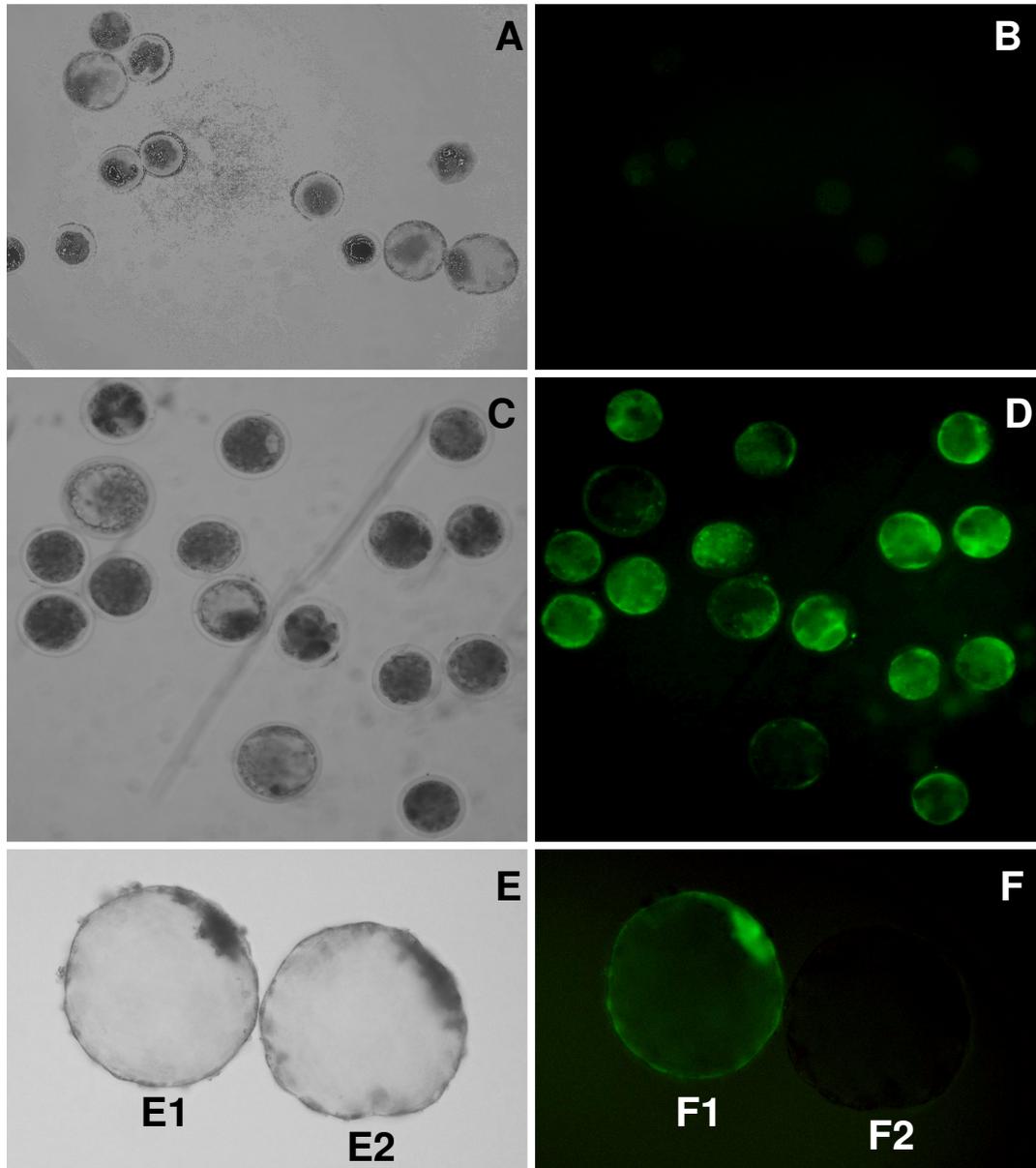
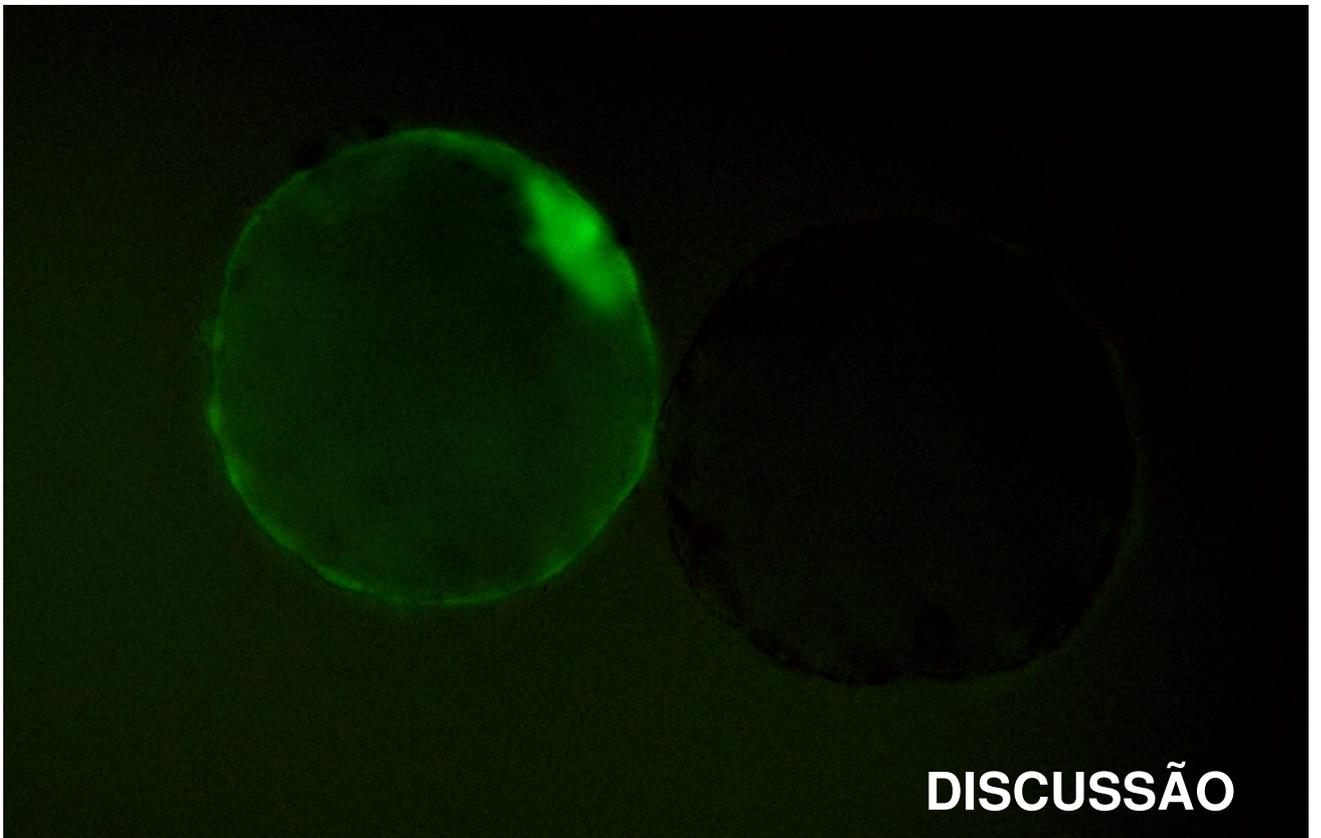


Figura 18 – Embriões produzidos *in vitro* com (experimental) ou sem (controle) microinjeção de lentivírus contendo vetor de expressão para knockdown do gene da miostatina e do gene da GFP. Microscopia óptica (A) e epifluorescência (B) dos embriões controle. Microscopia óptica (C) e epifluorescência (D) dos embriões microinjetados. Aumento de 100X. Microscopia óptica (E) e epifluorescência (F) de blastocistos eclodidos do grupo experimental (E1 e F1) e controle (E2 e F2). Aumento de 200X



DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

Devido a dificuldade da aplicação da tecnologia de *knockout* nas espécies animais, exceto em camundongos, a exploração do silenciamento gênico pós-transcricional (PTGS) via RNA de interferência (RNAi) têm sido alternativa para os animais de produção. Esta dificuldade dá-se pelo fato de que na tecnologia de *knockout*, a maior eficiência é obtida na produção de quimeras com células-tronco embrionárias (HADJANTONAKIS et al., 1998). No entanto, os resultados de obtenção de células-tronco embrionárias de animais de produção ainda são limitados. Resultados têm sido alcançados na produção de animais *knockout* pela recombinação homóloga em células somáticas e posterior uso em transferência nuclear (TN) (DAI et al., 2002; LAI et al., 2002; DENNING et al., 2001). Contudo, a obtenção de células somáticas apresentando recombinação é muito trabalhosa e as perdas embrionárias e fetais durante a gestação permanecem muito altas na técnica de TN. Os fatores que afetam o sucesso da TN não são totalmente compreendidos e a porcentagem da progênie que sobrevive não excede 1-3% sobre embriões reconstruídos (WAKAYAMA et al., 1998; WILMUT et al., 2002). Desta forma, o PTGS permite o estudo de genes em modelos biológicos, bem como a produção de animais de interesse zootécnico geneticamente modificados com melhora dos caracteres de produção.

A etapa I deste experimento demonstrou que a miostatina no músculo semitendinoso de bovinos da raça Nelore é expressa ao redor de 30 dias de gestação (Figura 7 e Gráfico 1). Resultados semelhantes foram relatados por Kambadur et al. (1997), que demonstraram que este gene em bovinos Belgian Blue e Piemontês iniciam a expressão aos 29 dias de gestação.

Oldhan et al. (2001) observaram que a miostatina apresentou pico de expressão aos 90 dias de gestação em bovinos da raça Friesian, contudo, na raça Nelore, o pico de expressão ocorreu aos 60 dias e se manteve alto até os 120 dias. Houve drástica diminuição na expressão aos 150 dias de gestação, que se manteve até os 210 dias (Figura 7 e Gráfico 1).

Animais da raça Nelore apresentaram, neste trabalho, pico de expressão da miostatina mais duradouro quando comparado àqueles de origem européia, podendo ser uma explicação do menor desenvolvimento muscular das raças zebuínas. Animais de origem européia, por estarem menos tempo sob influência do pico inibitório da miostatina, apresentariam maior desenvolvimento muscular em função do aumento do tamanho e do número de fibras musculares esqueléticas finais. Euclides Filho et al. (2001) avaliaram a eficiência de produção de carne em animais Nelore, $\frac{1}{2}$ Angus - $\frac{1}{2}$ Nelore e $\frac{1}{2}$ Simental - $\frac{1}{2}$ Nelore. Independente da dieta, os animais Nelore apresentaram pior desempenho do que os animais “meio-sangue”. Conhecendo-se a fisiologia destes animais, tornou-se possível inferir que a inibição da miostatina nas primeiras etapas do desenvolvimento (entre 60 e 120 dias de gestação) poderia melhorar a performance quanto ao desenvolvimento muscular.

Para isto, utilizou-se a tecnologia do PTSG por *small interfering RNA* (siRNA). Apesar da utilização do silenciamento gênico via siRNA em cultivos celulares e em embriões, a presença constante dessas moléculas é necessária para o silenciamento eficiente em fetos e animais adultos. Para síntese contínua, moléculas de siRNA foram sintetizadas na forma de shRNAs os quais induzem o sistema *RNA-induced silencing complex* (RISC). Estes shRNAs para o silenciamento da miostatina foram expressos nas células alvo (mioblastos e embriões) a partir de uma molécula de

DNA inserida de maneira estável no genoma sob controle de promotor constitutivo por vetores virais.

Vetores lentivirais para a introdução de DNA que gerem shRNAs de forma estável vêm sendo utilizados em cultivos celulares para estudo do mecanismo e da função de genes específicos (SCHERR et al., 2003; NAIR et al., 2005; HAO et al., 2005). Lentivírus produzidos neste experimento foram capazes de transduzir aproximadamente 30% dos mioblastos da linhagem C2C12 em cultivo (Figuras 11 e 12). Resultados preliminares de transdução demonstraram que a porcentagem de células positivas aumenta em função da maior concentração de vírus, atingindo valor máximo de aproximadamente 85% quando utilizada a proporção de 1cfu:1célula. Comparado aos métodos não virais de transfecção como lipídeos catiônicos e eletroporação, estes vetores apresentam vantagens como maior taxa de integração estável no genoma e possibilidade de transduzir células que não estejam em divisão (NALDINI et al., 1996).

Elouahabi et al. (2005) relataram que a chegada do DNA exógeno ao núcleo da célula hospedeira via lipídeos catiônicos não é eficiente, uma vez que este complexo DNA+lípídeo é internalizado por endocitose, devendo chegar à membrana perinuclear antes de ser degradado por endonucleases citoplasmáticas para então, numa taxa muito baixa, conseguir atravessá-la. No caso da eletroporação, apesar de muito utilizada em protocolos de expressão *in vivo*, promove expressão transiente e também de menor eficiência (DEAN, 2005).

Vetores virais apresentam índices superiores de internalização celular e de expressão estável do DNA exógeno inserido devido à presença do complexo de pré integração (PIC) e de envelopes virais heterólogos eficientes (DULL et al., 1998;

WHITTAKER et al., 2000). Isto não ocorre com outros métodos de transfecção, nos quais o DNA muitas vezes tem difícil acesso ao interior da célula, porém quando em seu interior, permanece não integrado e acaba sendo degradado. A maquinaria de importação nuclear medeia o transporte ativo do PIC através dos poros da membrana nuclear para que o DNA seja integrado ao genoma da célula hospedeira com auxílio da integrase (NALDINI, 1996).

Uma vez que o shRNA responsável pela inibição da miostatina seja expresso de maneira estável e associado ao vetor de expressão de GFP como repórter, as células contendo o vetor podem ser estudadas de modo a determinar sua eficiência. O uso de siRNAs para degradação de RNAm demonstram que algumas dessas moléculas sintetizadas para diferentes seqüências-alvo de um mesmo RNAm são mais eficientes que outras (Holen et al., 2002), sugerindo a existência de parâmetros que determinariam a eficiência de inibição do siRNA. O programa *Débora* (Pereira, 2005), o qual foi utilizado para desenhar o shRNA deste trabalho, considera alguns fatores determinantes para avaliar a eficiência do siRNA formado em inibir o RNAm alvo. Entre eles a localização do siRNA no alvo, que deve estar localizado na região codificante, excluindo os 100 primeiros nucleotídeos após o *start codon* e os 100 últimos antes do *stop códon*. Isto devido à possibilidade dessas regiões estarem associadas às proteínas regulatórias da tradução, dificultando o acesso do siRNA. Regiões com polimorfismos também são descartadas. O programa analisa os valores de energia livre da molécula, sendo determinante na eficiência do siRNA. Evita-se siRNAs que apresentem estruturas secundárias e para isso, utiliza-se moléculas com conteúdos de GC entre 30% e 55%. A busca por identidade é realizada pelo programa BLAST *Search for Short, Nearly Exact Matches* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>), usando sempre o oligo que será a

molécula funcional contra o banco EST (seqüências expressas) do organismo em questão. O programa *Débora* permitiu a otimização do desenho do shRNA deste trabalho, minimizando a possibilidade da síntese de molécula de siRNA não funcional ou de baixa atividade inibitória. Após esta análise, o shRNA desenhado apresentou eficiência *in silico* maior do que 90% na inibição do RNAm da miostatina.

Ao se induzir a diferenciação dos mioblastos, pôde-se avaliar a eficiência do vetor de inibição da miostatina *in vitro*. Após 24 horas da indução da diferenciação não houve diferença entre o grupo transduzido e o grupo controle, ambos não apresentaram formação de miotúbulos. No entanto, após 48 e 72 horas da indução da diferenciação, o grupo transduzido apresentou diminuição da formação de miotúbulos em relação ao controle (Figura 13).

Neste trabalho, a diminuição do número de miotúbulos formados pode ser devido a degradação do RNAm para miostatina via RNAi. Esta degradação faz com que menor quantidade de miostatina seja formada, desregulando a transição G1-S, uma vez que esta menor quantidade de miostatina disponível resultaria numa menor produção de p21cip1 e numa menor *downregulation* de Cdk2, aumentando a proliferação das células do grupo contendo o shRNA. McCroskery et al. (2003) relataram que mioblastos do grupo controle saem imediatamente do ciclo proliferativo quando a diferenciação é induzida, enquanto células *knockout* para o gene da miostatina permanecem por mais tempo no ciclo proliferativo, resultando no atraso da saída do ciclo celular. Este atraso prolonga a expressão de MyoD e atrasa o pico de expressão de marcadores de diferenciação específicos, como a miogenina, o que poderia causar diferenciação tardia. Apesar disso, Wagner et al. (2005) observaram que células-satélite dissociadas de

músculo de camundongos (6-7 meses de idade) *knockout* para o gene da miostatina proliferaram e diferenciaram em cultivo *in vitro*.

Em cultivos da linhagem C2C12 sem o vetor foi possível verificar a presença do RNAm para miostatina às 24 e 72 horas após indução da diferenciação (Tabela 1). Durante este período, também foi possível observar aumento progressivo do número de miotúbulos formados (Figura 13). Estes resultados corroboram com os apresentados por Sato et al. (2006), que verificaram aumento progressivo de expressão da miostatina de 24 a 72 horas em cultivo de mioblastos primários de fetos de galinha induzidos à diferenciação. Rios et al. (2001) verificaram expressão da miostatina às 24 horas após indução da diferenciação em células C2C12 transfectadas com cassete para expressão transiente da miostatina. Também houve aumento desta expressão às 72 horas de cultivo devido à diminuição do estímulo mitogênico. As células saíram do ciclo proliferativo devido a expressão de genes músculo-específicos, havendo posterior fusão em miotúbulos. O início da indução de expressão da miostatina causou parada do ciclo celular, evento mediado pela Cdk2 e p21cip1 que controlam a transição G1-S e G2-M (THOMAS et al., 2000). Taylor et al. (2001) verificaram que células C2C12 incubadas com miostatina recombinante apresentaram inibição da proliferação das células e síntese de DNA e proteína, dados semelhantes aos de Thomas et al. (2000) que observaram a diminuição do número de células na fase S do ciclo celular, após o tratamento com miostatina.

Neste estudo, além do RNAm sintetizado pelos mioblastos, o aumento da expressão às 72 horas também pode ser justificado pelo aumento da quantidade de miotúbulos pois, segundo Artaza et al. (2002), cultivos de miotúbulos 7 dias após a diferenciação apresentaram expressão de RNAm para miostatina, desta forma, quanto

maior a quantidade de miotúbulos maior a síntese de RNAm. A expressão de RNAm para miostatina em células CGM às 72 horas pós diferenciação foi menor quando comparada ao controle. Isto pode ser explicado pelo menor número de miotúbulos somado ao efeito inibitório do shRNA em 30% das células, o que resultaria numa menor quantidade de transcritos para miostatina.

Após as avaliações iniciais deste trabalho, células CGM foram separadas por citometria de fluxo e induzidas à diferenciação por 72 horas. Comparadas ao grupo controle, estas células apresentaram quantidade menor de miotúbulos em relação ao controle (Figura 16 e Gráfica 3), demonstrando, conforme descrito por McCroskery et al. (2003), que mioblastos *knockout* para o gene da miostatina não saem do ciclo proliferativo da mesma forma que células controle, pois não estão aptas à diferenciação no mesmo momento que as células controle. Sato et al. (2006) verificaram, em mioblastos primários de galinha tratados com siRNA para inibição do gene da miostatina, que a taxa de fusão em miotúbulos, após indução da diferenciação, era menor em relação a mioblastos controle (não tratados). Estes resultados são consistentes com os encontrados em cultivos de células satélite *knockout* para o gene da miostatina descritos por Wagner et al. (2005), que demonstraram aumento na capacidade regenerativa de músculos sem miostatina devido à maior proliferação e diferenciação celular. Estes resultados sugerem que o vetor construído neste experimento está sendo expresso de maneira estável nas células, ativando a cascata para degradação do RNAm para miostatina.

A diminuição dos transcritos da miostatina nas células C2C12 transduzidas deu-se pela presença do complexo enzimático ativado pelo mecanismo do RNAi. Uma vez sintetizados no núcleo da célula, os RNAm para shRNAs se estruturam em forma

de grampo e são carregados ao citoplasma pelo fator de exportação nuclear (Exportina5). Depois, interagem com a RNase III (DICER) que remove o *loop* intermediário formando o duplex intermediário necessário para ativar o sistema RISC, capaz de promover a *downregulation* do RNAm homólogo (CULLEN, 2005), no caso, o da miostatina.

Após validado, o vetor de inibição da miostatina foi utilizado na produção de embriões bovinos geneticamente modificados. A utilização de vetor lentiviral para produção de embriões transgênicos foi primeiramente descrita em camundongos (LOIS et al., 2002). A partir deste trabalho, diversos outros foram conduzidos, uma vez que a eficiência destes vetores é superior quando comparada aos métodos tradicionais de produção de embriões transgênicos como a microinjeção em pró-núcleo e a transferência nuclear (TN). Além disto, a técnica é mais barata, menos trabalhosa e menos invasiva (LOIS et al., 2002). Isto pode ser verificado nos índices de clivagem e de blastocisto deste trabalho, que não diferiram entre os grupos controle e microinjetado (Tabela 2).

A utilização destes vetores em embriões foi primeiramente descrita em bovinos por Hofmann et al. (2004) que relataram 83% de embriões positivos após microinjeção de vetores lentivirais em espaço perivitelínico de oócitos e posterior fecundação *in vitro*. Resultados semelhantes foram descritos por Golding et al. (2006) que obtiveram 76% de embriões positivos. Neste trabalho foram obtidos 78,41% de embriões positivos, demonstrando a alta eficiência desta metodologia (Tabela 3). Apesar da TN com células somáticas geneticamente modificadas resultar em 100% de embriões positivos, a taxa de blastocistos permanece baixa devido à ineficiência da reprogramação nuclear (HOFMANN et al., 2004; WILMUT et al., 2002). Além disto, o

tempo despendido na produção de embriões transgênicos pela microinjeção viral é menor em relação à TN.

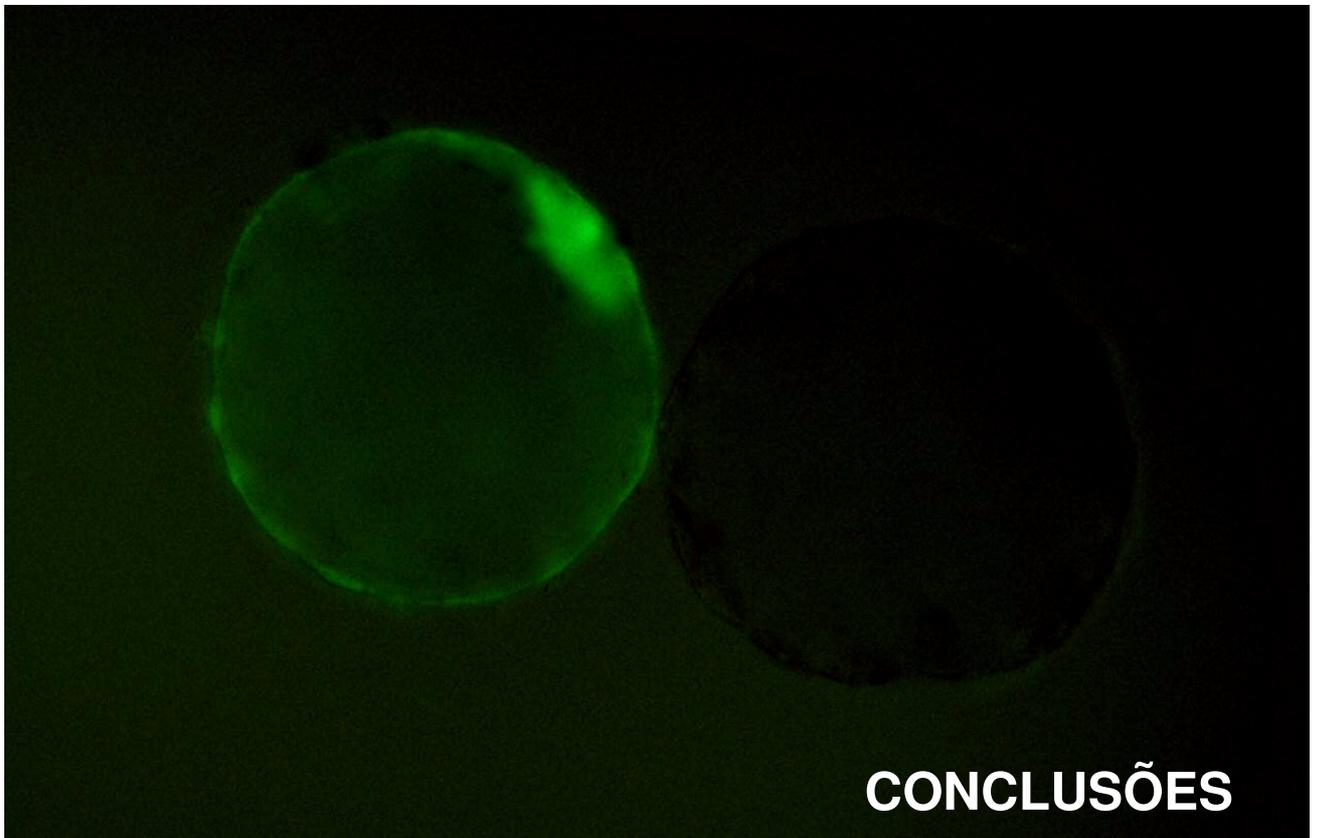
Dos embriões que apresentaram fluorescência entre o D4 e o D7 de cultivo, 3,07% continuaram emitindo fluorescência após a eclosão (Tabela 2). Porém, isto não impede que o vetor tenha sido integrado de forma estável e tenha apenas sido silenciado. He et al. (2005) observaram que células-tronco embrionárias são submetidas à regulação dinâmica do genoma durante o desenvolvimento e que a dinâmica da metilação do DNA e da modificação das histonas contribuem para o silenciamento de transgenes lentivirais. O cassete de expressão deste trabalho apresenta dois promotores distintos, um para expressão da GFP (promotor da ubiquitina C) e outro para expressão do shRNA (promotor U6). O provável silenciamento da GFP não exclui a possibilidade do promotor U6 ter permanecido ativo. O fato dos embriões terem permanecido muito tempo em cultivo até a eclosão também pode ter ativado o mecanismo de apoptose nestas células, o que bloquearia a expressão do gene marcador (GOLDING, 2006 comunicação pessoal²). HOFMANN et al. (2004), após transferirem para receptoras 5 blastocistos GFP positivos, obtiveram 4 animais transgênicos com presença do integrante pró-viral em todos os tecidos analisados, no entanto, não foram avaliados blastocistos eclodidos neste estudo.

A introdução de vetor para expressão de shRNAs via vetor lentiviral em embriões já havia sido descrita anteriormente (TISCORNIA et al., 2003, RUBINSON et al., 2003, GOLDING et al., 2006). Tiscornia et al. (2003) utilizaram shRNA para inibição da GFP em embriões de camundongos e observaram menor expressão da GFP em animais que continham o vetor carregado pelo lentivírus responsável pelo silenciamento

²GOLDING, M. C. São Paulo, 2006 (comunicação pessoal).

Em bovinos, Golding et al. (2006) utilizaram shRNA para proteína prion dirigido pelo promotor H1 ligado ao vetor para GFP cuja expressão foi dirigida pelo promotor da ubiquitina C em embriões produzidos por fecundação *in vitro*. O mesmo vetor foi utilizado para produção de cabras transgênicas por transferência nuclear com células geneticamente modificadas. Em todos os tecidos das cabras foi possível verificar a expressão da GFP, bem como do shRNA, responsável pela diminuição da proteína alvo. Assim como neste trabalho, estudos não foram realizados em fetos bovinos após transferência para receptoras, no entanto, dada a natureza do vetor em questão, é de se esperar que este apresente o mesmo comportamento que o descrito em murinos e em caprinos.

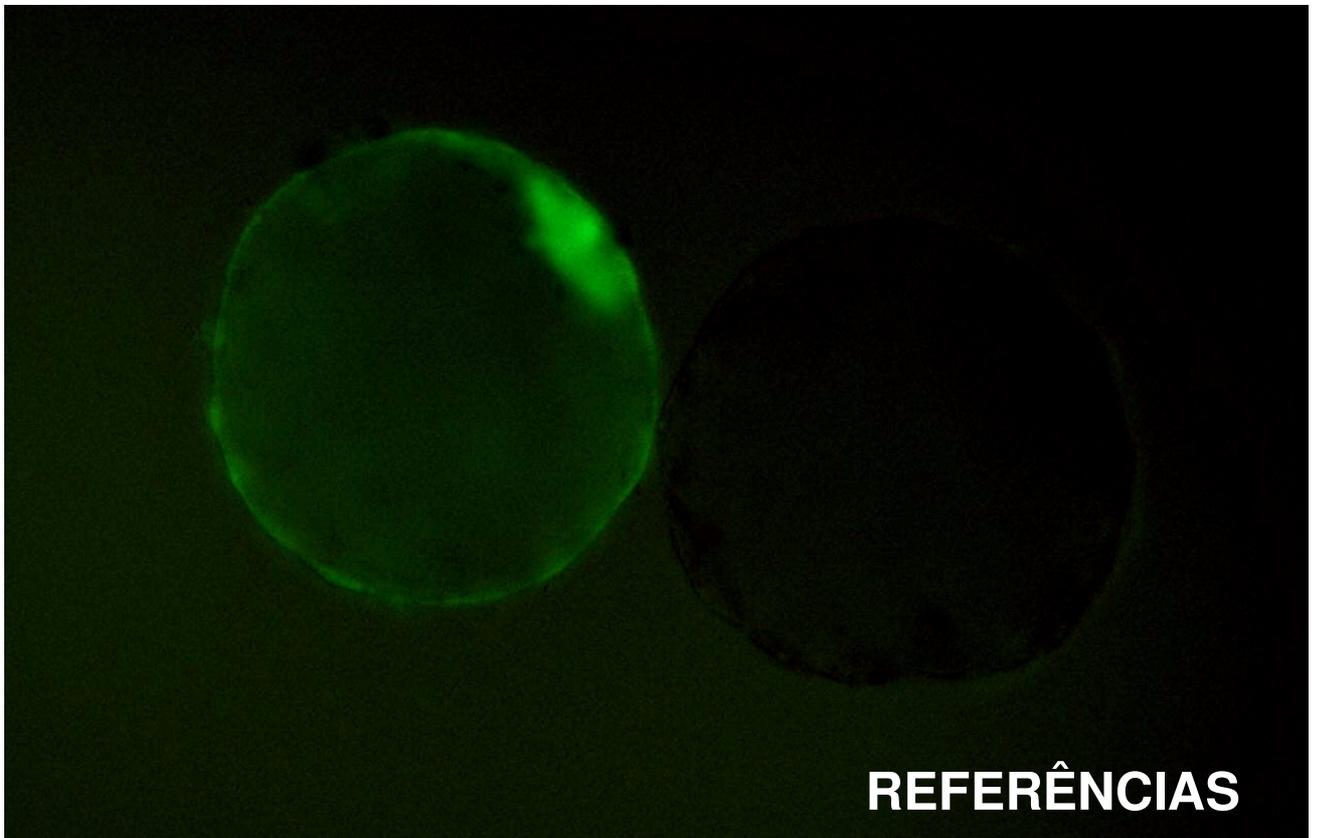
A microinjeção lentiviral direta, carreando vetor para shRNA na produção de embriões bovinos geneticamente modificados, ao invés da TN com células somáticas *knockout*, permite a aplicabilidade desta tecnologia no estudo da função de genes e no melhoramento de caracteres de produção.



8 CONCLUSÕES

Este trabalho permite concluir que:

- 1) Fetos da raça Nelore apresentam expressão de miostatina aos 30 dias de gestação, com pico entre 60 e 120 dias e queda da expressão entre 150 e 210 dias.
- 2) Vetores lentivirais carreando shRNA para inibição do gene da miostatina são efetivos na inibição da diferenciação de mioblastos murinos da linhagem C2C12.
- 3) Vetores lentivirais carreando shRNA para inibição do gene da miostatina são efetivos na produção *in vitro* de embriões bovinos geneticamente modificados.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS-TERKI, T.; BLANCO-BOSE, W.; DÉGLON, N.; PRALONG, W.; AEBISCHER, P. Lentiviral - Mediated RNA Interference. **Human Gene Therapy**, v. 13, p. 2197-2201, 2002.
- ACOSTA, J.; CARPIO, Y.; BORROTO, I.; GONZALEZ, O.; ESTRADA, M.P. Myostatin gene silenced by RNAi show a zebrafish giant phenotype. **Journal of Biotechnology**, v. 119, p. 324–331, 2005.
- ARNOLD, H.; DELLA-FERA, M.A.; BAILE, C.A. Review of myostatin history, physiology and applications. **International Archives of Bioscience**. p.1014-1022, 2001.
- ARTAZA, J. N.; BHASIN, S.; MALLIDIS, C.; TAYLOR, W.; MA, K.; GONZALEZ-CADAVID Endogenous expression and localization of myostatin and its relation to myosin heavy chain distribution in C2C12 skeletal muscle cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, p. 170-179, 2002.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBUÍNOS. Disponível em: <<http://www.abcz.org.br>>. Acesso em: 23 mar. 2006.
- BAKER, J.F.; LUNT, D.K. Comparison Of Production Characteristics From Birth Through Slaughter Of Calves Sired By Angus, Charolais Or Piedmontese Bulls. **Journal of Animal Science**, v. 68, p. 1562-1568, 1990.
- BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease the initiation step of RNA interference. **Nature**, v. 409, p. 363-366, 2001.
- BUKRINSKY, M.I.; SHAROVA, N.; DEMPSEY, M.P.; STANWICK, T.L.; BUCKINSKAYA, A.G.; HAGGERTY, S.; STEVENSON, M. Active nuclear import of human HIV type 1 pre integration complex. **Proceedings of the National Academy of Science - USA**, v. 89, p.6580-84, 1992.
- CABOT, R.A.; KÜHHOLZER, B.; CHAN, A.W.S.; LAI, L.; PARK, K.-W.; CHONG, K.-Y.; SCHATTEN,G.; MURPHY, C.N.; ABEYDEERA, L.R.; DAY, B.N.; PRATHER, R.S.; PRATHER, R.S. Transgenic Pigs Produced Using In Vitro Matured Oocytes Infected With A Retroviral Vector. **Animal Biotechnology**, v. 12, p. 205-214, 2001.
- CATIPOVIC, B. Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. **New England Journal of Medicine**, v. 351, p. 1030-1031, 2004.
- CASAS, E.; KEELE, J.W.; FAHRENKRUG, S.C.; SMITH, T.P.L.; CUNDIFF, L, v.; STONE, R.T. Quantitative Analysis of Birth, Weaning, and Yearling Weights and Calving Difficulty in Piedmontese Crossbreds Segregating an Inactive Myostatin Allele. **Journal of Animal Science**, v. 77, p. 1686-1692, 1999.

- CHAN, A.W.S.; HOMAN, E.J.; BALLOU, L.U.; BURNS, J.C.; BREMEL, R.D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 95, p. 14028-14033, 1998.
- CLARK, J.; WHITELOW, B. A future for transgenic livestock. **Nature Reviews Genetics**, v. 4, p. 825-833, 2003.
- CHRIST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embriology (Berl)**, v.191, p. 381-396, 1995.
- COLMAN, A. Somatic cell nuclear transfer in mammals: progress and applications. **Cloning**, v. 1, p. 186-200, 1999-2000.
- CULLEN, B.R. RNAi the natural way. **Nature Genetics**, v. 37, p. 1163 -1165, 2005.
- CUNNINGHAM, E. P. The application of biotechnologies to enhance animal production in different farming systems. **Livestock Production Science**, v.58, p.124, 1999.
- DAI, Y.; VAUGHT, T.D.; BOONE, J.; CHEN, S.; PHELPS, C.J.; BALL, S.; MONAHAN, J.A.; JOBST, P.M.; MCCREATH, K.J.; LAMBORN, A.E.; COWELL-LUCERO, J.L.; WELLS, K.D.; COLMAN, A.; POLEJAEVA, I.A.; AYARES, D.L. Targeted disruption of the α 1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. **Nature Biotechnology**, v. 20, p. 251 – 255, 2002.
- DEAM, D.A. Nonviral gene transfer to skeletal, smooth, and cardiac muscle in living animals. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 289, p. 233 - 245
- DENNING, C.; BURL, S.; AINSLIE, A.; BRACKEN, J.; DINNYES, A.; FLETCHER, J.; KING, T.; RITCHIE, M.; RITCHIE, W.A.; ROLLO, M.; DE SOUSA, P.; TRAVERS, A.; WILMUT, I.; CLARK, A.J. Deletion of the α (1,3)galactosyl transferase (*GGTA1*) gene and the prion protein (*PrP*) gene in sheep. **Nature Biotechnology**, v. 19, p. 559-562, 2001.
- DULL, T.; ZUFFEREY, R. KELLY, M.; MANDEL, R.J.; NGUYEN, M.; TRONO, D.; NALDINI, L.A Third Generation lentivirus vector with a conditional packaging system. **Journal of Virology**, v. 72, p. 8463-8471, 1998.
- ELOUAHABI, A.; RUYSSCHAERT, J.M. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. **Molecular Therapy**, v. 11, p. 336-47, 2005.
- EUCLIDES FILHO, K.; EUCLIDES, V.P.B.; FIGUEIREDO, G.R.; BARBOSA, R.A. Eficiência bionutricional de animais Nelore e seus mestiços com Simental e Aberdeen Angus em duas dietas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 30, p. 77-82, 2001.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION, FAO, 2005. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/>>. Acesso em: 10 abr. 2006.

- GOJO, S.; YAMAMOTO, S.; PATIENCE, C.; LEGUERN, C.; COOPER, D.K.C. Gene therapy – its potential in surgery. **Annals of the Royal College of Surgeons England**, v. 84, p. 297-301, 2002.
- GOLDING, M.C.; LONG, C.R.; CARMELL, M.A.; HANNON, G.J.; WESTHUSIN, M.E. Suppression of prion protein in livestock by RNA interference. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 103, p. 5285-90, 2006.
- GOLZIO, M.; MAZZOLINI, L.; MOLLER, P.; ROLS, M.P.; TEISSIÉ, J. Inhibition of gene expression in mice muscle by in vivo electrically mediated siRNA delivery. **Gene Therapy**, v. 12, p. 246-251, 2005.
- GRIMM, D.; PANDEY, K.; KAY, M.A. Adeno-Associated Virus Vectors for Short Hairpin RNA Expression. **Methods in Enzymology**, v. 392, p. 381-405, 2005
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J.; BROUWERS, B.; PIROTTIN, D.; MICHAUX, C.; MENISSIER, F.; ZANOTTI, M.; DUNNER, S.; GEORGES, M. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 210–213, 1998.
- GROBET, L.; ROYO, L.J.M.; PONCELET, D.; DIMITRI, P.; BROUWERS, B.; RIQUET, J.; SCHOEBERLEIN A.; DUNNER, S.; MÉNISSIER, F.; MASSABANDA, J.; FRIES, R.; HANSET, R.; GEORGES, M. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscléd phenotype in cattle. **Nature Genetics**, v. 17, p. 71 – 74, 1997.
- HADJANTONAKIS, A.K.; GERTSEINSTEIN, M.; IKAWA, M. OKABE, M. NAGY, A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cell. **Mechanisms of Development**, v. 76, p. 79-90, 1998.
- HAMMOND, S.M.; BERNSTEIN, E.; BEACH, D.; HANNON, G.J. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. **Nature**, v. 404, p. 293-296, 2000.
- HAO, D.L.; LIU, C.M.; DONG, W.J.; GONG, H.; WU, X.S.; LIU, D.P.; LIANG, C.C. Knockdown of Human *p53* Gene Expression in 293-T Cells by Retroviral Vector-mediated Short Hairpin RNA. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 37, p.779-783, 2005
- HE, J.; YANG, Q.; CHANG, L.J. Dynamic DNA methylation and histone modifications contribute to lentiviral transgene silencing in murine embryonic carcinoma cells. **Journal of Virology**, v. 79, p. 13497-508, 2005
- HOLEN, T.; AMARZGUIOUI, M.; WIIGER, M.T.; BABAIE, E.; PRYDZ, H. Positional effects of short interfering RNAs targeting the human coagulation trigger Tissue Factor. **Nucleic Acids Research**, v. 30, p.1757-66, 2002.

HOFMANN, A.; ZAKHARTCHENKO, V.; WEPPERT, M.; SEBALD, H.; WENIGERKIND, H.; BREM, G.; WOLF, E.; PFEIFER, A. Generation of Transgenic Cattle by Lentiviral Gene Transfer into Oocytes. **Biology of Reproduction**, v. 71, p. 405-09, 2004.

HOCQUETTE, J.F.; BAS, P.; BAUCHART, D.; VERMOREL, M.; GEAY, Y. Fat partitioning and biochemical characteristics of fatty tissues in relation to plasma metabolites and hormones in normal and double-musled young growing bulls. **Comparative Biochemistry and Physiology**, p. 127-138, 1999.

JACENKO, O. Strategies in generating transgenic mammals. **Methods in Molecular Biology**, v.62, p. 399-424, 1997.

JAENISCH, R. Germ line integration and Mendelian Transmission of the exogenous Moloney leukemia virus. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 73, p. 1296-1264, 1976.

JEANPLONG, F.; SHARMA, M.; SOMERS, W. G.; BASS, J. J.; KAMBADUR, R. Genomic organization and neonatal expression of the bovine myostatin gene. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 220, p. 31-7, 2001.

KAMBADUR, R.; SHARMA, M.; SMITH, T. P. L.; BASS, J.J. Mutations in myostatin (GDF8) in double muscle Belgian Blue and Piedmontese cattle. **Genome Research**, v.7, p.910-5, 1997.

KELVIN, D.J.; YAMAGUCHI, T.P.; SIMARD, G.; TAI, H.H.; SUE-A-QUAN, A.I.; SUE-A-QUAN, G.T.; CONNOLLY, J.A. A model for the modulation of muscle cell determination and differentiation by growth factors. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 67, p. 575-580, 1989.

KIM, S.; ANGEL, P.; LAFYATIS, R.; HATTORI, K.; KIM, K.Y.; SPORN, M.B.; KARIN, M.; ROBERTS, A.B. Autoinduction of Transforming Growth Factor 13 Is Mediated by the AP-1 Complex. **Molecular and Cellular Biology**, v. 10, p.1492-1497, 1990.

KISHIDA, T.; ASADA, H.; GOJO, S.; OHASHI, S.; SHIN-YA, M.; YASUTOMI, K.; TERAUCHI, R.; TAKAHASHI, K.A.; KUBO, T.; IMANISHI, J.; MAZDA, O. Sequence-specific gene silencing in murine muscle induced by electroporation-mediated transfer of short interfering RNA. **The Journal of Gene Medicine**, v. 6, p. 105-110, 2004.

LAI, L.; KOLBER-SIMONDS, D.; PARK, K.; CHEONG, H.; GREENSTEIN, J.L.; IM, G.; SAMUEL, M.; BONK, A.; RIEKE, A.; DAY, B.N.; MURPHY, C.N.; CARTER, D.B.; HAWLEY, R.J.; PRATHER, R.S. Production of α -1,3-Galactosyltransferase *Knockout* Pigs by Nuclear Transfer Cloning. **Science**, v. 295, p. 1089-1092, 2002.

LAMBETH, L.S.; MOORE, R.J.; MURALITHARAN, M.; DALRYMPLE, B.P.; MCWILLIAM, S.; DORAN, T.J. Characterisation and application of a bovine U6 promoter for expression of short hairpin RNAs. **BMC Biotechnology**, v. 5, 2005.

- LEE S.J.; MCPHERRON, A.C. Regulation of myostatin activity and muscle growth. **Proceedings of the National Academy of Science – USA**, v. 98, p. 9306–9311, 2001.
- LOIS, C.; HONG, E. J.; PEASE, S.; BROWN, E. J.; BALTIMORE, D. Germiline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. **Science**, v. 295, p. 868-872, 2002.
- MCCREATH, K.J.; HOWCROFT, J.; CAMPBELL, K.H.; COLMAN, A.; SCHNIEKE, A.E, KIND, A.J. Production of gene-targeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. **Nature**, v. 2, p.408, 2000.
- MCCROSKERY, S.; THOMAS, M.; MAXWELL, L.; SHARMA, M.; KAMBADUR, R. Myostatin negatively regulates satellite cell activation and self-renewal. **Journal of Cell Biology**, v. 162, p. 1135-1147, 2003.
- MCPHERRON, A. C.; LAWLER, A.M.; LEE, S. J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. **Nature**, v. 387, p.83-90, 1997.
- 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 – 61, 1997.
- MENG, B.; ZHU, D. Functional study of myostatin gene by RNAi technology. **Proceedings of the Seventh International Human Genome Meeting**, p.216, 2002.
- MINOTTI, S.; SCICCHITANO, M.; NERVI, C.; SCARPA, S.; LUCARELLI, M.; MOLLNARO, M.; ADAMO, S. Vasopressin and Insulin-like Growth Factors Synergistically induce myogenesis in Serum-free Medium. **Cell Growth & Differentiation**, v. 9, p. 155-163, 1998.
- NALDINI, L.; BLOMER, U.; GALLAY, P.; ORY, D.; MULLIGAN, R.; GAGE, F.H.; VERMA, I.M.; TRONO, D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by lentiviral vector. **Science**, v. 272, p. 263-7, 1996.
- NAIR, A.R.; SCHLIEKELMAN, M.; THOMAS, M.B.; WAKEFIELD, J.; JURGENSEN, S.; RAMABHADHRAN, R. Inhibition of p53 by lentiviral mediated shRNA abrogates G1 arrest and apoptosis in retinal pigmented epithelial cell line. **Cell Cycle**, v. 4, p. 697-703, 2005.
- NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION. Banco de dados de genes. Disponível em: <[http:// www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)>. Acesso em: 10 mar. 2003.
- OLDHAM, J.M.; MARTYN, J.A.K.; SHARMA, M.; JEANPLONG, F.; KAMBADUR, R.; BASS, J.J. Molecular expression of myostatin and MyoD is greater in double-muscle than normal-muscle cattle fetuses. **American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, p. 1488-1493, 2001.

- PEREIRA, T.C. **Estudo de possíveis aplicações médicas da interferência por RNA**. 197 f. Tese em Doutorado em Genética e Biologia Molecular. Instituto de Biologia, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo, 2005.
- PFAFFL, M.W.; HORGAN, G.W.; DEMPFLER, L. Relative expression software tool (REST[®]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. **Nuclei Acids Research**, v. 30, disponível em: <<http://nar.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 10 maio 2006.
- PICARD, B.; GAGNIERE, H.; ROBELIN, J.; GEAY, Y. Comparison of the foetal development of muscle in normal and double-muscled cattle. **Journal of muscle research and cellular motility**, v. 16, p. 629-39, 1995.
- PINKERT, C.A.; MURRAY J.D. Transgenic Farm Animals *em* **Transgenic Animals in Agriculture** ed. CAB International, NY. 1999.
- POTTS, J. K.; ECHTERNKAMP, S.E.; SMITH, T.P.L.; REECY, J.M. Characterization of gene expression in double-muscled and normal-muscled bovine embryos. **Animal Genetics**, v. 34, p. 438–444, 2003.
- RAMAKER, C.; RUIJTER, J.M.; DEPREZ, R.H.L.; MOORMAN, A.F.M. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. **Neuroscience Letters**, v. 339, p. 62–66, 2003.
- RIOS R.; CARNEIRO, I.; ARCE, V.M.; DEVESA, J. Myostatin regulates cell survival during C2C12 myogenesis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, p. 561-566, 2001.
- RIOS R.; CARNEIRO, I.; ARCE, V.M.; DEVESA, J. Myostatin is an inhibitor of myogenic differentiation. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**, v. 282, p. 993-9, 2002.
- ROBELIN, J.; LACOURT, A.; BECHET, D.; FERRARA, M.; BRIAND, Y.; GEAY, Y. Muscle differentiation in the bovine fetus: a histological and histochemical approach. **Growth, Development and Aging**, v. 55, p. 151-160, 1991.
- ROE, T.; REYNOLDS, T.C.; YU, G.; BROWN, P.O. Integration of murine leukemia virus DNA depends on mitosis. **EMBO J**, v. 12, p. 2099 - 108, 1993.
- RUBINSON, D.A.; DILLON, C.P.; KWIATKOWSKI, A, v.; SIEVERS,C.; YANG,L.; KOPINJA, J.; ROONEY, D.L.; IHRIG, M.M.; McMANUS, M.T.; GERTLER, F.B.; SCOTT, M.L.; VAN PARIJS, L. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. **Nature Genetics**, v. 33, p. 401-406, 2003.

SATO, F.; KUROKAWA, M.; YAMAUCHI, N.; HATTORI, M. Gene silencing of myostatin in the differentiation of chicken embryonic myoblasts by small interfering RNA. **American Journal of Physiology - Cell Physiology**. *In press*, 2006.

SCHERR, M.; BATTMER, K.; GANSER, A.; EDER, M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. **Cell Cycle**, v. 2, p. 251 - 257, 2003.

SMITH, T.H.; KACHINSKY, A.M.; MILLER, J.B. Somite subdomains, muscle origins, and the four muscle regulatory proteins. **Journal of Cell Biology**, v. 127, p.95-105, 1994.

SMITH, T.P.; LOPEZ-CORRALEZ, N.L.; KAPPES, S.M.; SONSTEGARD, T.S. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 742 - 4, 1997.

SMITH, J.A.; LEWIS, A.M.; WIENER, P.; WILLIAMS, J.L. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. **Animal Genetics**, v. 31, p. 306-9, 2000.

STEWART, S.A.; DYKXHOORN, D.M.; PALLISER, D.; MIZUNO, H.; YU, E. Y.; AN, D. S.; SABATINI, D.M.; CHEN, I.S.; HAHN, W.C.; SHARP, P.A.; WEINBERG, R.A.; NOVINA, C.D. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. **RNA**, v. 9, p. 493-501, 2003.

STICE, S.L.; RZUCIDLO, S.J. Increasing cloning efficiencies requires a better understanding of developmental abnormalities and gene expression in manipulated embryos. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 285-89, 2001.

TAYLOR, W. E.; BHASIN, S.; ARTAZA, J.; BYHOWER, F.; AZAM, M.; WILLARD JR, D. H.; KULL JR, F. C.; GONZALEZ-CADAVID, N. Myostatin inhibits cell proliferation and protein synthesis in CC12 muscle cells. **American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism**, v. 280, p. 221 - 228, 2001.

THOMAS, M.; LANGLEY, B.; BERRY, C.; SHARMA, M.; KIRK, S.; BASS, J.; KAMBADUR, R. Myostatin, a Negative Regulator of Muscle Growth, Functions by Inhibiting Myoblast Proliferation. **The Journal Of Biological Chemistry**, v. 275, p. 40235-40243, 2000

TISCORNIA, G.; SINGER, O.; IKAWA, M.; VERMA, I.M. A general method for gene *knockdown* in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 100, p.1844-1848, 2003.

VAN REENEN, C.G.; MEUWISSEN, T.H.; HOPSTER, H.; OLDENBROEK, K.; KRUIP, T.H.; BLOKHUIS, H.J. Transgenesis may affect farm animal welfare: a case for systematic risk assessment. **Journal of Animal Science**, v. 79, p.1763-79, 2001.

VAN DE WETERING, M.; O Ving, I.; MUNCAN, V.; FONG, M.T.P.; BRANTJES, H.; VAN LEENEN, D.; HOLSTEGE, F.C.P.; BRUMMELKAMP, T.R.; AGAMI, R.; CLEVERS, H. Specific inhibition of gene expression using a stably integrated, inducible small-interfering-RNA vector. **EMBO reports**, v. 4, p. 609-615 2003.

WAGNER, K. R.; LIU, X.; CHANG, X.; ALLEN, R. E. Muscle regeneration in the prolonged absence of myostatin. **Proceedings of National Academy of Science – USA**, v. 102, p. 2519-2524, 2005.

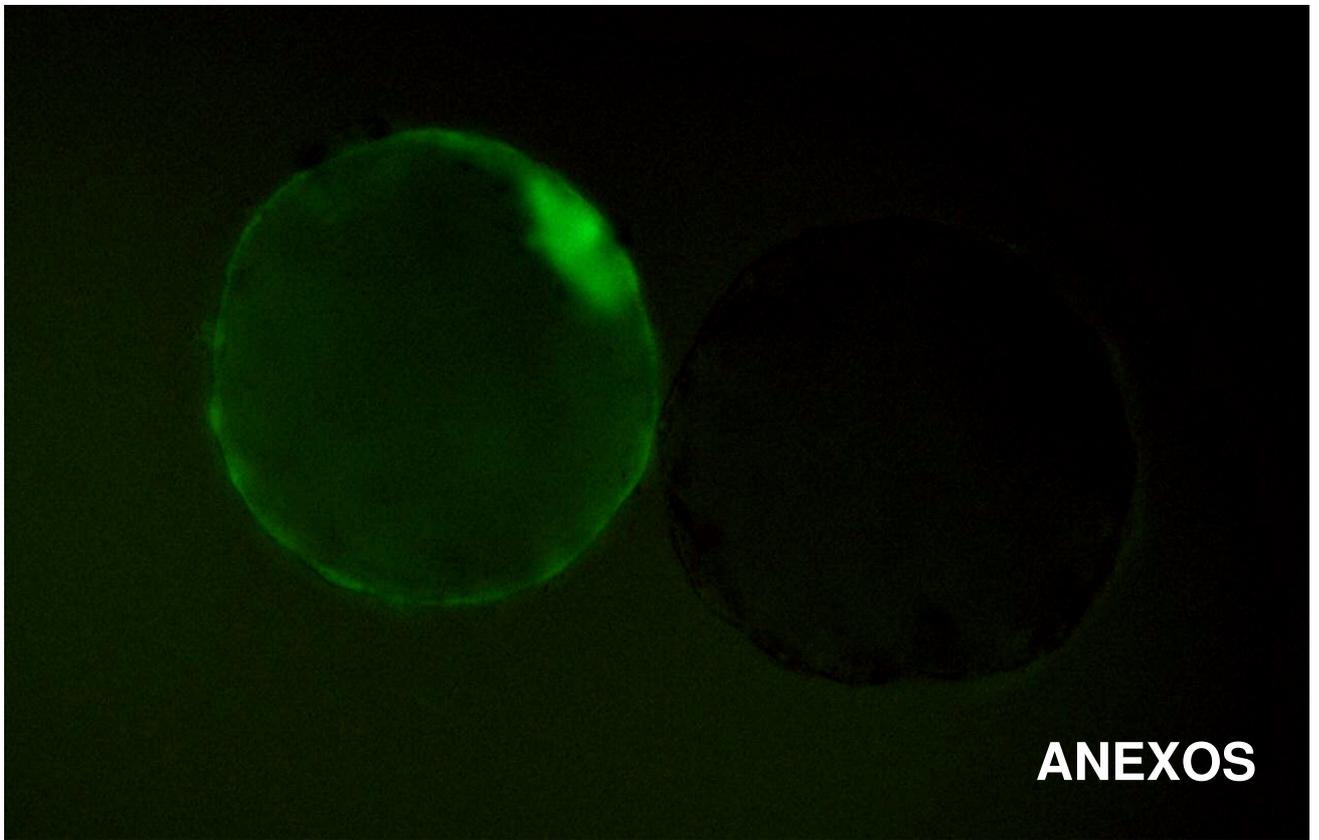
WAKAYAMA, T.; PERRY, A.C.F.; ZUCCOTTI, M.; JOHNSON, K.R.; YANAGIMACHI, R. Full-term development of mice from enucleated oocytes injected with cumulus cell nuclei. **Nature**, v. 394, p. 369–374, 1998.

WEGNER, J.; ALBRECHT, E.; FIEDLER, I.; TEUSCHER, F.; PAPSTEIN, H.-J.; ENDER, K. Growth- and breed-related changes of muscle fiber characteristics in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 1485-1496, 2000.

WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; CASAS, E.; CUNDIFF, L, V.; KOOHMARAIE, M. The effects of Piedmontese inheritance and myostatin genotype on the palatability of longissimus thoracis, gluteus medius, semimembranosus, and biceps femoris. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 3069-3074, 2001.

WHITTAKER, G.R.; KANN, M. HELENIUS, A. Viral Entry into the nucleus. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 16, p. 627-51, 2000.

WILMUT, I.; BEAUJEAN, N.; DE SOUSA, P.A.; DINNYES, A.; KING, T.J.; PATERSON, L.A.; WELLS, D.N.; YOUNG, L.E. Somatic cell nuclear transfer. **Nature**, v. 419, p. 583-586, 2002.



ANEXO A

GEL DE AGAROSE

Agarose	1%
Tampão TBE 1x	q.s.p. 100ml
Brometo de Etídeo	10ug/mL

- Aquecer até dissolução da agarose, despejar em cuba apropriada e aguardar até solidificar.

ANEXO B

TAMPÃO TE

Tris – base	1M
Ácido Bórico	1M
EDTA-Na ₂ .2H ₂ O	20mM
Água	

ANEXO C

TAMPÃO TBE

Tris – base	1M
Ácido Bórico	1M
EDTA-Na ₂ .2H ₂ O	20mM
Água	

ANEXO D

MEIO DE CULTURA LB

Bactotriptona	10g
Extrato de Levedura	5g
NaCl	5g
Água	1000mL
- Autoclavar por 20 minutos	

ANEXO E

MEIO DE CULTURA LB-ÁGAR

Bactotriptona	10g
Extrato de Levedura	5g
NaCl	5g
Ágar	15g
Água	1000mL
- Autoclavar por 20 minutos	

ANEXO F

SOLUÇÃO FIXADORA

Etanol	10%
Ácido Acético	5%
Água	

ANEXO G

SOLUÇÃO CORANTE

NaOH	3%
Formaldeído	0.75%
Água	

ANEXO H

SOLUÇÃO REVELADORA

NaOH	3%
Formaldeído	0.75%
Água	

ANEXO I

MEIO DE CULTURA

DMEM	90%
Soro Fetal Bovino	10%
Ampicilina	200U/mL
Streptomicina	200ug/mL
- Filtrar em 0,22 µm	

ANEXO J

MEIO DE LAVAGEM

M-199 com HEPES	90%
Soro Fetal Bovino	10%
Piruvato 0.2Mm	10uL
Kanamicina ou Gentamicina	12.5ug
- Filtrar em 0,22 µm	

ANEXO L

MEIO DE MATURAÇÃO

M 199 com BICARBONATO	4,5mL
SFB	0,5mL
Piruvato (2,2mg/mL)	10µL
Gentamicina (0,05mg/mL)	25µL
FSH (Foltropin)	2.5ug
LH (Chorulon)	25UI
- Filtrar em 0,22 µm	
Estradiol (Sigma)	102ug

ANEXO M

MEIO DE CULTIVO - SOF Estoque (g/100mL Água MiliQ)

NaCl	0,6294
KCl	0,0534
KH ₂ PO ₄	0,0162
NaHCO ₃	0,2106
Na lactato	0,0370
Piruvic acid	0,0034
Phenol red	0,00013
L-glutamina	0,0146
MgCl ₂ 7H ₂ O*	0,0098
CaCl ₂ *	0,0252

*Pesar separadamente

MEIO DE CULTIVO - SOF USO

SOF estoque	4,6mL
SFB	0,25mL
Aminoácidos essenciais	100µL
Aminoácidos não essenciais	50µL
- Filtrar em 0,22 µm	

ANEXO N

PBS SEM CÁLCIO E MAGNÉSIO

NaCl	10g
KCl	0,25g
Na ₂ PO ₄	1,44g
KH ₂ PO ₄	0,25g
H ₂ O MilliQ q.s.p.	1mL

- Filtrar em 0,22 µm

ANEXO O

SOLUÇÃO DE TRIPSINA

Tripsina	0,1g
EDTA	0,029g
PBS sem cálcio e magnésio	100mL

- Filtrar em 0,22 µm

ANEXO P

SOLUÇÃO DE HIALURONIDASE

Hialuronidase	2mg
PBS	q.s.p 1mL

- Filtrar em 0,22 µm

ANEXO Q

MEIO FIV GOTA

Meio FIV	3,640mL
Heparina	100mg/mL
Penicilamina	2,7µg/mL
Hipotaurina	1µg/mL
Epinefrina	0,33µg/mL

MEIO FIV

TALP STOCK	10mL
BSA fat free	0,6%
Piruvato	22µg/mL
Gentamicina	50µg/mL

Meio TALP STOCK

NaCL	10mg/mL
KCl	0,24mg/mL
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,1mg/mL
NaH ₂ PO ₄	0,041mg/mL
NaHCO ₃	2,1mg/mL
CaCl ₂ .2H ₂ O	0,3mg/mL
Acido Láctico	1,43µL/mL
Vermelho Fenol	10µg/mL

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)