

Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz
Centro de Energia Nuclear na Agricultura

Identificação de microRNAs na musculatura esquelética de
Gallus gallus

Ana Paula Dini Andreote

Piracicaba
2009

Ana Paula Dini Andreote
Bióloga

Identificação de microRNAs na musculatura esquelética de
Gallus gallus

Dissertação apresentada para a obtenção do
título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Biologia na
Agricultura e no Ambiente.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho

Piracicaba
2009

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Andreote, Ana Paula Dini

Identificação de microRNAs na musculatura esquelética de *Gallus gallus* / Ana Paula Dini Andreote; orientador Luiz Lehmann Coutinho. - - Piracicaba, 2009.

87 p.: fig.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Biologia na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Expressão gênica 2. Fibras musculares 3. Frangos 4. Reação em cadeia por polimerase 5. RNA I. Título

CDU 577.218:591.473.3

DEDICO

à minha mãe, Fátima; e aos meus irmãos, Fernando e Francisco.

OFEREÇO

ao meu amor, Felipe Cardena.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

A Deus.

A minha mãe, Maria de Fátima Dini, pelo apoio e paciência.

Aos meus irmãos Fernando D. Andreote e Francisco D. Andreote, pelo exemplo e pelas dicas valiosas.

Ao Felipe Cardena, pelo amor, carinho e companheirismo.

Ao Prof. Luiz L. Coutinho, pela oportunidade e orientação.

Aos órgãos de financiamento FAPESP e CNPq.

A Embrapa - Suínos e Aves.

A Érika C. Jorge, pelas idéias e pelo auxílio.

A Helena J. Alves, pela amizade e ensinamentos.

A Kerli Ninov, pela ajuda, amizade e apoio nos momentos difíceis.

Aos colegas Heloíse Milano, Karina Patrício, Marcelo L. Marchesin e Millor F. do Rosário pelo apoio e companhia diária.

Ao Alexandre S. Soares, pela ajuda valiosa durante a criação e o abate dos animais.

Aos técnicos Nirlei A. Silva e Jorge Andrade pelo auxílio e amizade.

Aos amigos queridos, Ana Paula, Jaime (Passarinho), Leila (Iaia), Paula (Bell) e Raul, por estarem sempre ao meu lado, incondicionalmente.

A todos os colegas de laboratório, os que já seguiram seus caminhos e os que começam a trilhá-lo agora, por participarem deste momento da minha vida.

E a todos os que colaboraram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

ANDREOTE, A.P.D. **Identificação de microRNAs na musculatura esquelética de *Gallus gallus***. 2009. 87f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

Os microRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não codificadores, de cerca de 20 bases de comprimento, capazes de regular negativamente a expressão gênica após a transcrição. A ação regulatória destas moléculas é indispensável para o funcionamento adequado de diversos processos biológicos, dentre eles o desenvolvimento e a manutenção da musculatura esquelética. Com o objetivo de caracterizar a população de miRNAs presentes na musculatura esquelética adulta de frangos, foi construída uma biblioteca de miRNAs a partir do músculo peitoral de indivíduos jovens (21 dias pós-eclosão). Um total de 576 clones foi sequenciado e as sequências obtidas foram agrupadas por similaridade em 98 grupos, dentre os quais 47 corresponderam à miRNAs conhecidos, 30 à outros tipos de RNA e seis à possíveis novos miRNAs. Estes dados poderão subsidiar estudos funcionais subsequentes, que visem entender a função exercida por cada uma destas moléculas na musculatura esquelética. Buscando-se associar a ocorrência e expressão dos miRNAs ao controle da miogênese, foi analisada a expressão de três miRNAs identificados na biblioteca (miR-125b, miR-221 e miR-206), envolvidos na regulação do balanço entre proliferação e diferenciação celular, mecanismo determinante da miogênese. A análise foi realizada por *PCR* quantitativa em diferentes estádios do desenvolvimento (nove e 17 dias embrionário e 21 dias pós-eclosão) e entre duas linhagens de frango com potencial divergente para crescimento e ganho de massa muscular. Não houve diferença significativa na expressão dos miRNAs entre as linhagens em nenhum dos estádios aferidos, entretanto, foi possível traçar a ontogenia destas moléculas ao longo do desenvolvimento do animal, o que permitiu inferências sobre as condições morfológicas e fisiológicas das células musculares em cada um dos estádios analisados. Por fim, com o objetivo de associar os dados de expressão obtidos para os miRNAs, à variações na expressão de genes alvo, aferimos a expressão de três genes: *SRF*, *Fstl* e *Polal*; onde o primeiro é regulado pelo miR-133a (cuja expressão não foi aferida devido à questões metodológicas) e os dois últimos pelo miR-206. A análise foi feita também por *PCR* quantitativa, entre as linhagens e em diferentes estádios do desenvolvimento. Foi possível visualizar, apenas nos estádios embrionários, a relação entre a expressão do miR-206 e seus genes alvo, com uma coerência entre o aumento na expressão do miR-206 e a diminuição na expressão de *Polal* e *Fstl*. A determinação do perfil de expressão dos três genes ao longo do desenvolvimento muscular permitiu inferências sobre a ação destas moléculas no balanço entre proliferação e diferenciação nas linhagens de corte e postura.

Palavras chave: *PCR* quantitativa, expressão gênica, biblioteca de microRNAs.

ABSTRACT

ANDREOTE, A.P.D. **Identification of microRNAs from *Gallus gallus* skeletal muscle.** 2009. 87f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura/Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2009.

MicroRNAs (miRNAs) represent a class of small and noncoding RNAs, about 20-nucleotides long that negatively regulate gene expression posttranscriptionally. The regulatory action of these molecules is essential for the proper functioning of various biological processes, including the development and maintenance of skeletal muscles. To identify miRNAs that might be important for the skeletal muscle development, we constructed a miRNA library from pectoral skeletal muscle of 21° days after birth chickens. A total of 576 clones were sequenced and these sequences were collapsed into 98 clusters. Sequence analysis identified 47 small RNAs that show significant similarities with published miRNAs, 30 with others noncoding RNAs and six sequences clusters could be identified as potentially novel miRNAs. These data may support subsequent functional studies aimed at understanding the function performed by each of these molecules in skeletal muscle of chicken. To further associate the miRNA presence with the gene expression in the controlling of myogenesis the expression patterns of three miRNAs identified in the library (miR-125b, miR-221 e miR-206) were analyzed. These miRNAs are involved in the balance between proliferation and differentiation mechanisms that control myogenesis. The expressions of these miRNAs were measured using quantitative RT-PCR. We analyzed samples from two embryos stages (9 and 17 days) and one adult stage (21° days after birth) in two chicken lines with different potential to growth and gain of muscle mass. There were no significant differences between the lines about these miRNAs expression. But, we could predict an overview of these miRNAs expressions during the muscle development of chicken, which allowed inferences about the physiologic and morphologic conditions of the muscles cells in each analyzed stage. Also, to further associate the miRNAs results to variations in the target genes expressions, we analyzed the expression of three genes: *SRF*, *Fstl* e *Pola1*. The first one is target of miR-133a (not analyzed due to methodological problems), and the others are target of miR-206. We analyzed by quantitative RT-PCR different stages and two chicken lines. It was possible to observe, only in the earlier stages, a relationship between the miR-206 expression and the *Pola1* and *Fstl* expression, with a consistency between the increased expression of mir-206 and decrease in expression of *Pola1* and *Fstl*. The determination of the profile of these three gene expressions during the muscle development allowed inferences about the action of these molecules in the balance between proliferation and differentiation process in chicken strains for broiler and layer.

Keywords: quantitative PCR, gene expression, miRNAs libraries.

SUMARIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Os microRNAs	12
2.1.1 Biogênese dos miRNAs	13
2.1.2 Os miRNAs e a repressão da expressão gênica	15
2.2 A musculatura esquelética (ME)	19
2.2.1 Origem embrionária da ME	20
2.2.2 Desenvolvimento da ME	23
2.3 Os miRNAs e a miogênese	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 Material biológico utilizado no estudo	30
3.2 Incubação dos ovos, criação dos animais e coleta do tecido	30
3.3 Obtenção do RNA total	31
3.4 Construção da biblioteca de microRNAs (miRNAs)	31
3.4.1 Isolamento da fração enriquecida em pequenos RNAs	31
3.4.2 Ligação dos adaptadores	32
3.4.3 Transcrição reversa e <i>PCR</i>	33
3.4.4 Clonagem, extração do DNA plasmidial e sequenciamento	33
3.4.5 Análise das seqüências	35
3.5 Análise da expressão dos miRNAs por <i>PCR</i> quantitativa	35
3.5.1 Síntese de cDNA	37
3.5.2 <i>PCR</i> quantitativa	37
3.6 Análise da expressão dos genes <i>SRF</i> , <i>Fstl1</i> e <i>Polal</i> por <i>PCR</i> quantitativa	37
3.6.1 Desenho dos <i>primers</i>	38
3.6.2 Síntese de cDNA	38
3.6.3 <i>PCR</i> quantitativa	39
3.7 Análises dos resultados de expressão gênica	39
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Biblioteca de miRNAs	41
4.1.1 miRNA conhecidos identificados na biblioteca	41
4.1.2 Outros RNAs identificados na biblioteca	47
4.1.3 Possíveis novos miRNAs identificados na biblioteca	47

4.2 Expressão dos miRNAs miR-125b, miR-221 e miR-206 em linhagens de Corte (TT) e Postura (CC)	50
4.3 Expressão dos genes <i>SRF</i> , <i>Fstl1</i> e <i>Polal</i> em linhagens de Corte (TT) e Postura (CC)	54
5 CONCLUSÕES	59
REFERÊNCIAS	61
ANEXOS	80
Anexo A	81
Anexo B	82
Anexo C	84
Anexo D	87

1 INTRODUÇÃO

A musculatura esquelética (ME) é o principal componente da massa corpórea dos vertebrados, correspondendo a aproximadamente 50% de seu peso na maioria das espécies (GREFTE et al. 2007). Em espécies domésticas, a ME contribui com a carne, que é fonte de aminoácidos essenciais para o consumo humano e importante produto da agroindústria mundial. Biologicamente, esse tecido tem função estrutural e motora, dando a sustentação necessária para o corpo e permitindo, através de sua propriedade de contração voluntária, o deslocamento dos animais (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

Todo o conhecimento obtido sobre o desenvolvimento e a manutenção deste tecido tem permitido a geração de ferramentas importantes nas áreas de melhoramento genético animal, com vistas no aumento da produtividade avícola; e médica, no tratamento de doenças, como as atrofias e distrofias musculares. Nestes estudos, *Gallus gallus* tem sido extensivamente aplicado como organismo modelo, devido: à facilidade na manipulação de embriões, uma vez que o desenvolvimento embrionário ocorre *in ovo*; ao fato da espécie ter sido a primeira espécie doméstica a ter seu genoma seqüenciado (HILLIER et al., 2004), o que gerou um leque amplo de possibilidades de estudos; e, ao fato da espécie estar numa posição estratégica, evolutivamente, que lhe confere a propriedade de ponte entre mamíferos e outros vertebrados.

O desenvolvimento da musculatura esquelética em vertebrados é um processo que envolve inúmeros eventos e requer a ação coordenada de um conjunto de genes específicos, que devem ser induzidos ou inibidos com uma especificidade local e temporal. Para isto, é necessário que haja uma conexão entre os programas reguladores da expressão gênica, em grande parte executados por fatores de transcrição, e as vias de transdução de sinal, ativadas por fatores de crescimento e hormônios (KUNINGER et al., 2004). As principais vias de controle determinantes do fenótipo muscular já foram caracterizadas, como para os genes das famílias: *SHH* (*Sonic Hedgehog proteins*) e *WNT*, importantes nos estágios iniciais da embriogênese, durante a formação das estruturas precursoras da musculatura; *MRF* (*Myogenic regulatory factor*), fatores de transcrição fundamentais durante a proliferação e diferenciação das células musculares; *PAX* (*Paired type homeodomain*), atuantes durante o desenvolvimento e manutenção da musculatura esquelética.

No entanto, o conhecimento ainda é bastante limitado em relação à regulação da expressão destes genes num nível pós-transcricional.

A detecção e a quantificação do nível de expressão dos transcritos (genômica funcional) ou das proteínas (proteômica), e a regulação transcricional de uma via molecular completa, determinante um processo biológico, representam informações funcionais que complementam aquelas obtidas a partir das seqüências (genômica), porque revelam os genes/transcritos que são co-expressos espacial e temporalmente e as relações existentes entre eles. Contribui para a compreensão do processo biológico de interesse e conseqüentemente, para orientar a seleção dos alvos para pesquisas em biotecnologia.

A descoberta, nas últimas décadas, de ribo-moléculas capazes de operar na regulação da expressão gênica, tem gerado uma gama imensa de possibilidades para o entendimento dos mecanismos responsáveis pelo controle de processos biológicos complexos, como a miogênese. Distintas classes de pequenos RNAs têm sido descritas em associação às mais diversas vias de controle dentro da célula. Essas classes incluem os microRNAs ou miRNAs, siRNAs (*Small interfering RNAs*), rasiRNAs (*Repeat-associated-siRNA*), piRNAs (*Piwi-interacting small RNA*), entre outros (ANEXO A).

Em meio a esta comunidade de pequenos RNAs regulatórios, os miRNAs correspondem à classe mais abundante e mais conservada ao longo da evolução. Estas moléculas podem ser expressas em altos níveis, chegando a mais de dez mil cópias por célula, e cerca de 10% das famílias de miRNAs identificadas em invertebrados são totalmente conservadas em organismos superiores (LIM et al., 2003).

Os miRNAs são pequenos RNAs com cerca de 20 bases que atuam na regulação negativa da expressão gênica. Estes pequenos RNAs, ao se associam às moléculas de RNA mensageiro por complementaridade de seqüência, impedem sua tradução (BARTEL et al., 2004; PILLAI; BHATTACHARYYA; FILIPOWICZ, 2006; FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008).

O primeiro miRNA foi identificado em 1993, por Lee, Feinbaum e Ambros. Contudo, o *boom* de estudos associando os miRNAs ao desenvolvimento muscular se deu mais de uma década depois, no ano de 2006. Chen et al. (2006) estabeleceram as vias de ação dos miRNAs miR-1 e miR-133 no balanço entre proliferação e diferenciação de células musculares. Sweetman et al. (2006) caracterizaram o perfil de expressão de diversos miRNAs em embriões de frango, evidenciando a presença do miR-206 em estruturas precursoras da musculatura, durante a embriogênese. Kim et al. (2006) e Naguibneva et al. (2006) associaram, respectivamente, o miR-206 e o miR-181 à ativação da diferenciação de células musculares. Deste mesmo ano datam os trabalhos que descrevem genes da família *MRF*

atuando na regulação da expressão de miRNAs músculo-específicos (RAO et al., 2006; ROSENBERG et al., 2006).

A associação do miRNA ao RNAm alvo se dá por complementaridade entre suas seqüências, o que permite, através de análises de seqüência realizadas com ferramentas de bioinformática, inferências sobre os possíveis RNAs mensageiros alvos de um miRNA. Além disso, muitos miRNAs apresentam um padrão de expressão tecido-específico. Desta forma, ao se conhecer quais os miRNAs presentes num determinado tecido, num momento específico, uma ampla gama de possibilidades se abre para estudos funcionais que permitirão identificar quais genes estão sendo reprimidos por um determinado miRNA sob certas condições e como isto pode estar determinando o fenótipo observado.

Neste sentido, este trabalho teve como objetivo caracterizar a população de miRNAs existente na musculatura esquelética peitoral de frangos adultos e analisar a expressão de algumas destas moléculas em diferentes momentos do desenvolvimento muscular.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Os microRNAs

Os microRNAs (miRNAs) são moléculas de cerca de 20 nucleotídeos de comprimento, com capacidade de regular negativamente a expressão gênica após a transcrição do RNA mensageiro (RNAm). Constituem a classe de RNAs pequenos (< 50 bases) mais abundantes nos animais. Esses pequenos RNAs se ligam à região 3' não traduzida (UTR – do inglês: *untranslated region*) de RNAs mensageiros maduros pela complementaridade entre suas seqüências, e esta ligação pode impedir que a tradução ocorra temporariamente ou definitivamente.

O primeiro representante deste grupo foi identificado em 1981 por Chalfie, Horvitz e Sulston, trabalho aprofundado posteriormente por Ambros (1989). Esses autores, estudando o controle temporal do desenvolvimento larval de *C. elegans*, observaram que mesmo havendo moléculas de RNAm do gene LIN-14 no meio, a proteína correspondente à esta seqüência não era encontrada quando moléculas lin-4 também estivessem presentes. Concluiu-se que de alguma forma, o lin-4 causava uma interferência no processo de tradução, provavelmente impedindo ou retardando a ação dos ribossomos. Anos mais tarde, em 1993, Lee, Feinbaum e Ambros, e Wightman e Ruvkum descobriram que o lin-4 era um pequeno RNA funcional. Somente sete anos após a descoberta deste primeiro miRNA foi descrito o segundo, o lin-7, também identificado em trabalhos com o nematóide *C. elegans* (REINHART et al., 2000).

Desde então, o número de miRNAs identificados vem crescendo a cada ano. Segundo o banco de dados miRBase, no décimo mês do ano de 2002, cerca de 500 miRNAs haviam sido identificados. Este número dobrou no ano de 2004 e no final de 2008 o número de miRNAs depositados no banco já alcançava a marca de 8273 seqüências de miRNAs maduros (*Release 12.0*, Set. 2008).

Estas moléculas já foram associadas a diversos processos biológicos, como: proliferação e diferenciação celular (TSUCHIYA; OKUNO; TSUJIMOTO, 2006; VASUDEVAN; TONG; STEITZ, 2008), tumorigênese (HWANG; MENDELL, 2006), morfogênese do cérebro (GIRALDEZ et al., 2005), secreção de insulina (POY et al., 2004), defesa viral (LECELLIER et al., 2005), neurogênese (KRICHEVSKY et al., 2006), hematopoiese (CHEN et al., 2003), diferenciação de células-tronco (HATFIELD et al., 2005), desenvolvimento muscular (revisado por CALLIS et al., 2008), entre outros.

Os miRNAs podem ser expressos em altos níveis, chegando a cerca de dez mil cópias por célula, e podem atuar nas vias de controle de centenas de RNAs mensageiros alvos (LIM et al., 2003). Plantas possuem cerca de 120 genes que codificam miRNAs (revisado por JONES-RHOADES; BARTEL, D.P.; BARTEL, B., 2006), invertebrados cerca de 150 (ARAVIN et al., 2003; RUBY et al., 2006), e humanos perto de 500 (LANDGRAF et al., 2007), os quais são expressos de acordo com o tipo celular e/ou o estágio de desenvolvimento do organismo. Essas moléculas foram também identificadas em organismos mais basais, como algas (MOLNÁR et al., 2007), e até em vírus (PFEFER, 2004).

Assim, esta classe de pequenos RNAs não codificadores e funcionais constitui uma nova e rica fonte de informações para melhor compreendermos as vias de regulação da expressão gênica, nos mais diversos processos biológicos, nos mais diversos organismos.

2.1.1 Biogênese dos miRNAs

Geralmente, os miRNAs estão posicionados em regiões não codificadoras (intergênicas) do genoma e são transcritos pela DNA polimerase II como unidades mono ou policistrônicas independentes (TANZER; STADLER, 2004). Assim como os RNAs mensageiros, os precursores de miRNAs (pri-miRNAs) sofrem um processamento no qual recebem as terminações cap 5' e cauda poliA (BRACHT et al., 2004; CAI; HAGEDORN; CULLEN, 2004).

Após a transcrição, os pri-miRNAs organizam-se em uma conformação característica conhecida como grampo (*hairpin*) (Figura 1). A conformação em grampo é reconhecida pela endonuclease *Drosha* RNase-III, ainda dentro do núcleo celular. Esta enzima contém um domínio de ligação à fita dupla (dsRNA - do inglês *double-strand* RNA), uma seqüência amino-terminal e dois domínios RNase-III (LEE et al., 2003), que atuam promovendo a primeira clivagem dos pri-miRNAs liberando estruturas de 60-70 nucleotídeos de comprimento, em fita dupla, denominadas pré-miRNAs (LEE, et al., 2002). Estudos sugerem que a eficiência do processamento da enzima depende do tamanho do *loop* terminal e das seqüências de bases que flanqueiam seu sítio de clivagem (LEE et al., 2003; ZENG; CULLEN, 2003).

Os pré-miRNAs clivados são transportados ao citoplasma pelas enzimas *Exporting-5* via um mecanismo dependente de *Ran-GTP* (YI et al., 2003; BOHNSACK; CZAPLINSKI; GORLICH, 2004; LUND et al., 2004).

Uma vez no citoplasma, ocorre uma segunda clivagem, resultando em fragmentos de RNA fita dupla com complementaridade imperfeita, correspondente ao miRNA e sua fita complementar (miRNA:miRNA*) (HUTVAGNER et al., 2001; KETTING et al., 2001; GRISHOK et al., 2001). A responsável por esta segunda clivagem é a enzima *Dicer*, cuja estrutura contém domínios de helicase, um domínio PAZ, dois domínios RNase-III e um domínio de ligação a fita dupla (BERNSTEIN et al., 2001). O domínio PAZ parece interagir com o RNA exatamente no local onde houve a clivagem pela enzima *Drosha* (DOSTIE et al., 2003; LINGEL et al., 2003; SONG et al., 2003).

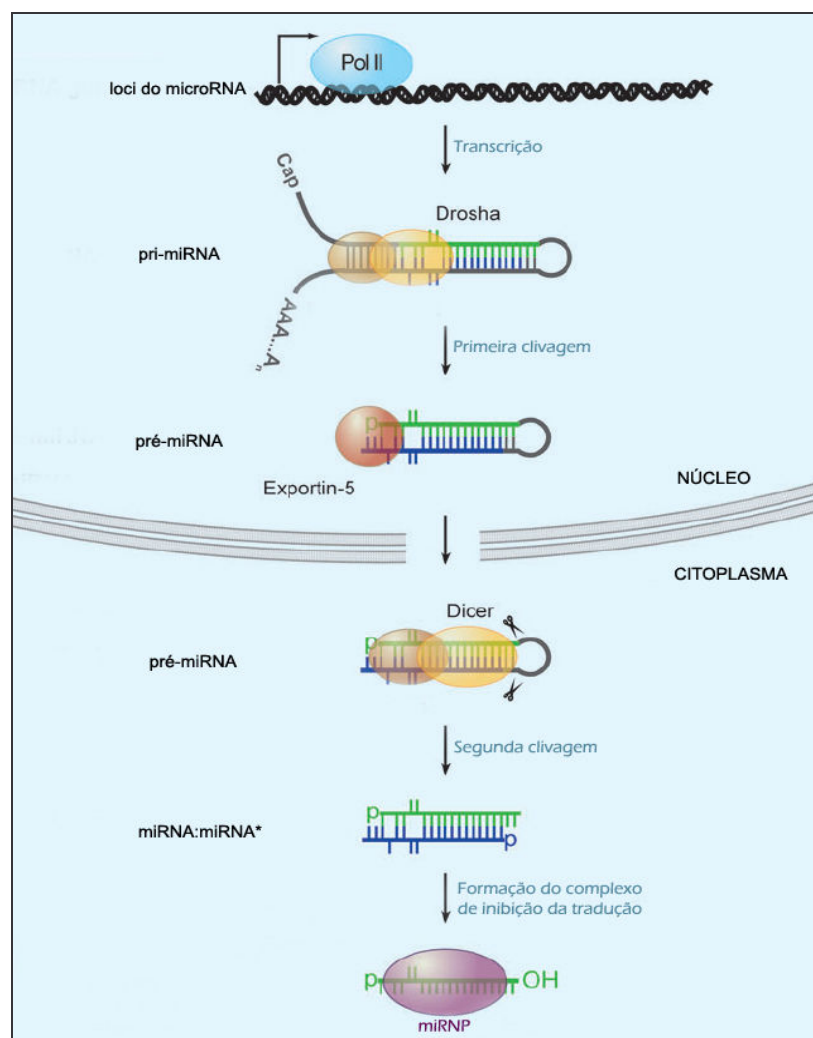


Figura 1. Biogênese dos miRNAs. Modificado de Bushati e Cohen, 2007.

Geralmente, apenas uma das fitas é selecionada para atuar como miRNA, enquanto a fita complementar é degradada (FILIPOWICZ et al., 2005; RANA, 2007). Contudo, às vezes ambas geram miRNAs maduros (BUSHATI; COHEN, 2007; RANA, 2007). O miRNA maduro é então incorporado a um complexo ribonucleoprotéico (miRNP),

às vezes referido como complexo de silenciamento gênico induzido por miRNA (miRISC - do inglês *miRNA-induced gene silencing complex*), responsável pela repressão da tradução (SCHWARZ; ZAMORES, 2002; TANG, 2005).

A família de proteínas melhor caracterizada deste complexo corresponde às proteínas Argonautas. Em mamíferos, *Ago2* é a principal componente do complexo miRISC (LIU et al., 2004), mediando a transferência do miRNA maduro para dentro do complexo de silenciamento (HAMMOND et al., 2001), o pareamento entre miRNA:RNAm (PILLAI, 2005) e atuando na clivagem do RNAm alvo (RUBY; JAN; BARTEL, 2007). O mecanismo exato pelo qual o complexo *Ago*/miRNA reprime a tradução ou promove a degradação do RNAm ainda não é totalmente conhecido, mas sabe-se que envolve o recrutamento de proteínas adicionais, como por exemplo, as *GW182* (JACKSON; STANDART, 2007).

Outra população de miRNAs provém de íntrons de pré-RNAs mensageiros e sua expressão esta associada à expressão de seu “gene hospedeiro” (KIM, Y.K.; KIM, V.N., 2007). A terminação 3’ da estrutura precursora destes “mirtrons” coincide com um sítio de *splicing* 3’ do RNAm hospedeiro e sua liberação ocorre durante o processamento (*splicing*) do pré-RNAm hospedeiro (BEREZIKOV et al., 2007; RUBY; JAN; BARTEL, 2007).

Os miRNAs intronicos (mirtrons) são similares estruturalmente e funcionalmente aos descritos previamente, porém necessitam dos componentes do *splicing* para sua biogênese (LIN et al., 2003; YING; LIN, 2004). Estas moléculas entram na via de processamento dos miRNAs durante o transporte do núcleo ao citoplasma, realizado pela proteína *Exportin-5* (YI et al., 2003).

Raramente, o miRNA pode estar localizado total ou parcialmente em éxons de transcritos já conhecidos, geralmente nas regiões não traduzidas 3’ e 5’ UTRs, como é o caso, por exemplo, do miR-198, localizado dentro da seqüência do gene Folistatina-1 (*Fstl1* – do inglês: *Follistatin like-1*) (CULLEN, 2004).

2.1.2 Os miRNAs e a repressão da expressão gênica

Os miRNAs têm a capacidade de regular negativamente a expressão gênica pela complementaridade de seqüência entre o miRNA e um determinado RNAm alvo. Os sítios de ligação dos miRNAs estão presentes, com raras exceções, na região 3’ UTR dos RNAs mensageiros (NIELSEN et al., 2007). Entretanto, Lytle, Yario e Steitz (2007) demonstraram que a repressão da expressão também ocorre se o sítio de ligação for posicionado na região 5’ UTR.

A interação miRNA:RNAm pode ser afetada por diversos fatores. Uma complementaridade contínua dos nucleotídeos de 2 a 8 é essencial para que a interação miRNA:RNAm ocorra, sendo esta região denominada *seed region* (DOENCH; SHARP, 2004; LEWIS; BURGE; BARTEL, 2005; GRIMSON et al., 2007). Alças e pareamentos GU nesta região afetam a estabilidade da interação. Já a presença de resíduos de A nas posições flangeadoras da *seed region* (nucleotídeos 1 e 9) do RNAm, e uma complementaridade na região próxima à extremidade 3' do miRNA (nucleotídeos de 13 a 16), podem favorecer a interação (DOENCH; SHARP, 2004; BRENNECKE et al., 2005; GRIMSON et al., 2007).

Em plantas, os miRNAs apresentam uma complementaridade total ou muito alta com o RNAm alvo e a repressão da expressão gênica é gerada pela degradação do RNAm através do mecanismo de RNA interferência (RNAi) (JONES-RHOADES; BARTEL, D.P.; BARTEL, B., 2006). Em animais, com raras exceções, os miRNAs apresentam um pareamento imperfeito com seus genes alvos, podendo determinar tanto a repressão da expressão gênica via a degradação do RNAm quanto via inibição temporária de sua tradução (DOENCH; SHARP, 2004; LYTLE; YARIO; STEITZ, 2007; NIELSEN, et al., 2007).

O mecanismo exato de inibição da tradução em animais ainda não está bem estabelecido. Contudo, sabe-se que a inibição pode ocorrer tanto na fase pré-traducional, quanto durante a tradução (Figura 2) (PETERSEN et al., 2006; MATHONET et al., 2007; WILLIAMS, 2008; FILIPOWICZ; BHATTACHARYYA; SONENBERG, 2008).

A tradução se inicia com um dobramento do RNAm através de um complexo protéico que reconhece as terminações cap 5' (m⁷GpppN) e cauda poliA. Resumidamente, proteínas da família *eIF* (fatores de iniciação) reconhecem ambas as extremidades do RNAm e se associam a elas, provocando uma circularização da molécula, o que facilita o acoplamento e o deslizamento do ribossomo na tradução (DERRY et al., 2006). Qualquer fator que impeça esta circularização, seja por se associar à região 3' UTR ou por se ligar diretamente à terminação cap 5', acaba por impedir a associação do ribossomo e, consequentemente, inibe a tradução (CHO et al., 2005).

Pillai et al. (2005) elucidaram a via de inibição do miRNA let-7 durante o início da tradução. A ligação deste miRNA ao RNAm alvo interferiria no reconhecimento da terminação cap 5' pelos fatores de iniciação (*eIFs*), impedindo seu acoplamento ao RNAm. Estudos com genes *reporters* em cultura celular, demonstraram que a ligação dos miRNAs às regiões 3' UTRs dos RNAs mensageiros alvos impedia a ligação do fator de iniciação *eIF4E* à molécula (HUMPHREYS et al., 2005). Mais tarde, Kiriakidou et al. (2007) sugeriram que a proteína *Ago2* poderia se ligar diretamente à terminação cap 5' do RNAm, prevenindo o

recrutamento do fator de iniciação *eIF4E*. Todos estes exemplos apóiam a hipótese de que os miRNAs atuariam impedindo a circularização inicial do RNAm, evento fundamental para o início da tradução.

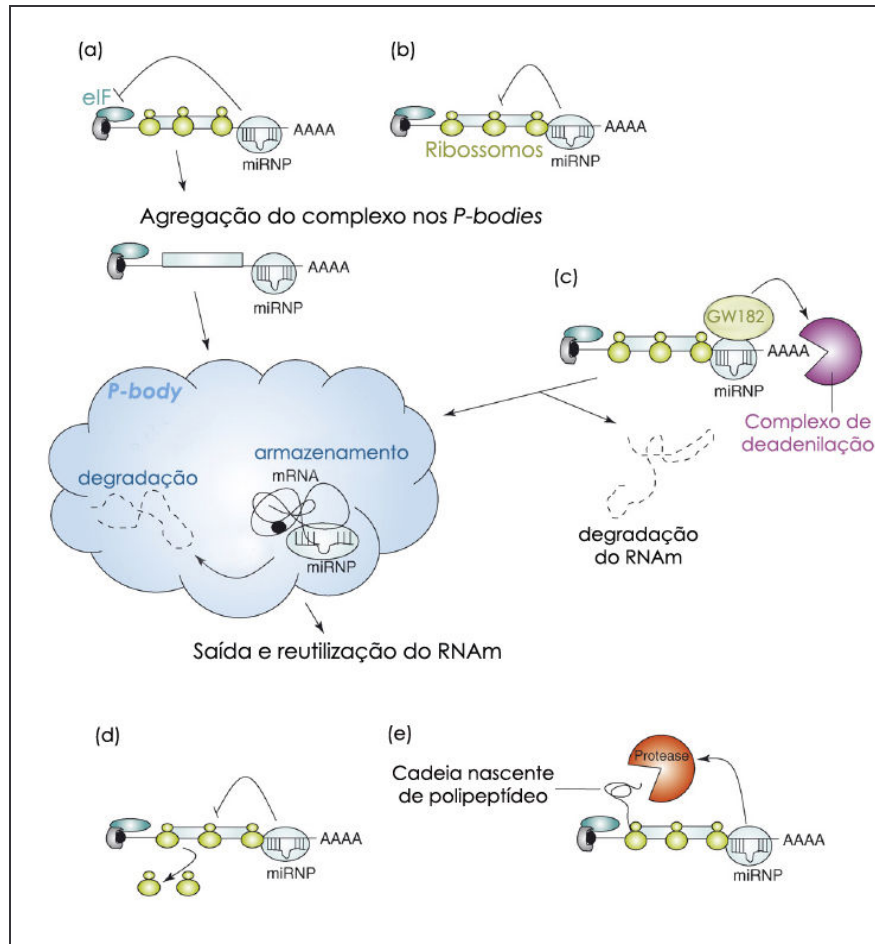


Figura 2: Possíveis mecanismos de repressão gênica pós-transcricional via miRNAs em células animais. Modificado de Pillai; Bhattacharyya e Filipowicz, 2006. De a – c temos os mecanismos de repressão no início da tradução. A ligação do complexo miRNP pode afetar o reconhecimento da terminação cap 5' pelo aparato traducional (a), pode atuar sobre a ligação das subunidades ribossomais (b), além de induzir a degradação da cauda poliA (c). RNAs mensageiros inibidos nesta fase são levados aos *P-bodies* para armazenamento e/ou degradação. Uma vez iniciada a tradução, a inibição ainda pode ocorrer via *Ribosome "drop-off"* (d) e pela degradação das cadeias nascentes de polipeptídeo por proteases (e).

Um mecanismo alternativo para a inibição via miRNAs na fase pré-traducional foi proposto por Chendrimada et al. em 2007. Neste modelo, a inibição estaria ocorrendo através do bloqueio da ligação entre as subunidades ribossomais e o RNAm.

Apesar de a cauda poliA ter um importante papel na estabilidade do RNAm (WILUSZ; WORMINGTON; PELTZ, 2001), informações quanto à sua essencialidade para a

repressão da tradução via miRNAs ainda são conflitantes (PILLAI et al., 2005; HUMPREYS et al., 2005). Estudos têm demonstrado que a repressão de muitos RNAs mensageiros alvos de miRNAs está associada à sua desestabilização (GIRALDEZ et al., 2006; WU; FAN; BELASCO, 2006). Jing et al. (2005) e Wu, Fan e Belasco (2006) demonstraram que os miRNAs participam da deadenilação de RNAs mensageiros. Segundo o modelo proposto, o RNAm alvo sofreria uma desestabilização através da degradação da cauda poliA (PARKER; SONG, 2004), processo este geralmente seguido pela perda também da terminação cap 5' e degradação do RNAm (BEHM-ANSMANT et al., 2006; STANDART; JACKSON, 2007).

Trabalhos recentes têm descrito uma correlação entre a repressão da tradução via miRNAs e a localização destes em determinadas regiões citoplasmáticas conhecidas como *P-bodies*. Essas regiões são sítios de repressão da tradução, onde os RNAs mensageiros podem ser degradados e/ou estocados, sendo impedidos de interagir com a maquinaria traducional e ribossomos (WILLIAMS, 2008). Têm-se demonstrado que esta região acumula proteínas Argonautas, miRNAs e RNAs mensageiros reprimidos por miRNAs (LIU et al., 2005; PILLAI et al., 2005; SEM; BLAU, 2005). A via de repressão por miRNAs deve ter uma função muito importante na formação e manutenção dos *P-bodies*, uma vez que, quando a biogênese dos miRNAs foi totalmente inibida, o número e o tamanho dos *P-bodies* foi extremamente reduzido (PAULEY et al., 2006).

Olsen e Ambros (1999) e Seggerson, Tang e Moss (2002), em estudos com *C. elegans*, se depararam com um cenário incompatível com o modelo de inibição durante o início da tradução. Eles observaram que apesar de haver uma redução nos níveis das proteínas dos genes LIN-14 e LIN-28 (ambos regulados pelo miRNA lin-4) durante alguns estádios do desenvolvimento larval, seus respectivos RNAs mensageiros permaneciam associados à polissomos, cenário característico de tradução ativa. Estes dados sugeriram a existência de outro momento de repressão, após o início da tradução. O modo como os miRNAs atuam neste ponto ainda não está definido, mas há indícios de que envolva a degradação da cadeia de aminoácidos recém formada por proteases (NOTTROT; SIMARD; RICHTER, 2007). Além disso, Petersen et al. (2006) propuseram o modelo de *Ribosome drop-off*, onde os ribossomos responsáveis pela tradução dos RNAs mensageiros ligados aos complexos RNPs são induzidos a terminar a tradução precocemente.

2.2 A musculatura esquelética

A unidade funcional da ME são as miofibras ou fibras musculares, formadas a partir de um conjunto de células alongadas e multinucleadas, oriundas da fusão de várias células precursoras de musculatura (mioblastos). Seu citoplasma é preenchido de miofibrilas, formadas a partir de inúmeras cópias de proteínas contrácteis, cujas maiores representantes correspondem às miosinas e actinas. Estas se encontram organizadas de modo a gerar uma estrutura funcional, denominada sarcômero, responsável pela contração muscular (Figura 3) (GREFTE et al., 2007). As miofibras são ligadas entre si pelo tecido conjuntivo. Este tecido permite que a força de contração gerada por cada fibra individualmente, atue sobre o músculo inteiro, e que a força de contração do músculo seja transmitida para os tendões, ligamentos e ossos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

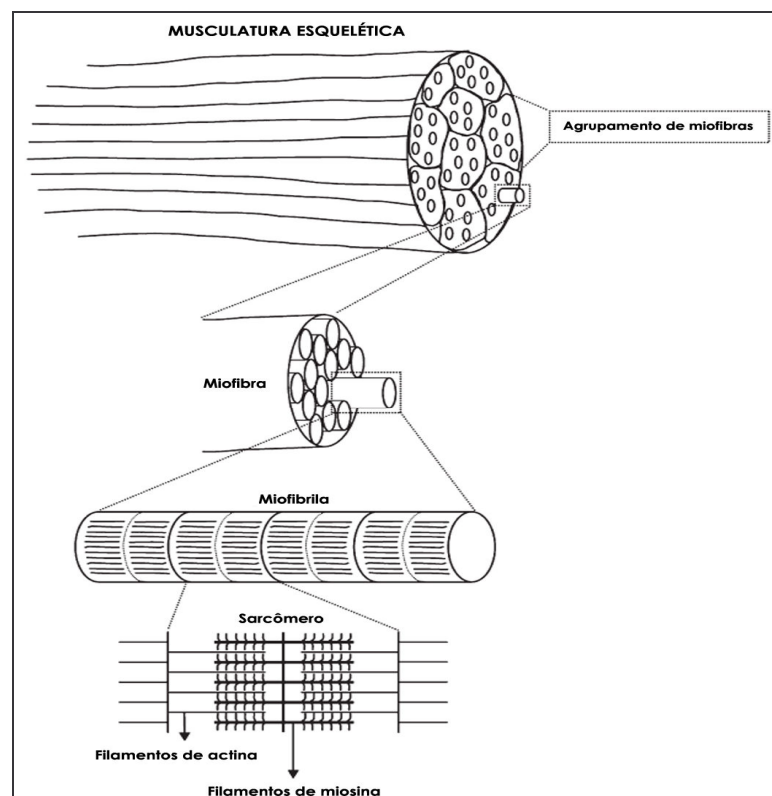


Figura 3. Organização estrutural da musculatura esquelética.

Modificado de Grefte et al., 2007.

A dimensão das fibras musculares varia de acordo com diversos fatores, como por exemplo: o músculo em questão, a idade do animal, o sexo, a nutrição. Porém, de modo geral, o diâmetro de uma miofibrila adulta varia de 10 a 100 μm , podendo chegar a 30 cm de comprimento. Já o tamanho de um músculo maduro depende do número de fibras musculares,

da dimensão (comprimento e diâmetro) destas fibras, e da quantidade de tecido conjuntivo depositado entre as fibras (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 1999).

O desenvolvimento da ME (miogênese) é um processo intrincado, que tem início nas primeiras fases da embriogênese e que segue durante toda a vida do animal. No início, o crescimento da musculatura se dá, principalmente, por hiperplasia, ou proliferação celular. Mais tarde, em um determinado momento, a proliferação cessa e as células se diferenciam. A partir deste momento, praticamente todo o crescimento muscular é determinado pelo aumento do volume celular (hipertrofia). Ainda, outro momento de miogênese pode ocorrer através da fusão de novas células na musculatura madura, processo protagonizado pelas chamadas células satélites.

2.2.1 Origem embrionária da ME

Morfologicamente, a ME do tronco e membros dos vertebrados provém de estruturas embrionárias denominadas somitos, que são aglomerados de células originadas após a segmentação do mesoderma paraxial ao longo do eixo antero-posterior do embrião (CHRIST; ORDAHL, 1995; POURQUIE, 2001). Os somitos formam-se aos pares, em ambos os lados da coluna vertebral e amadurecem no sentido crânio-caudal, de modo que os somitos próximos à cabeça se formam antes que os somitos caudais (ARNOLD; BRAUN, 2000).

A compartimentalização dos somitos gera diferentes camadas, responsáveis pela origem de inúmeras estruturas corporais. As células da região ventral sofrem uma epitelização e formam uma camada denominada esclerótomo, que dará origem às vértebras e cartilagens do corpo. Já as células da porção dorsal, originam o dermomiótomo, camada responsável pela formação da derme, derivados vasculares e da musculatura corporal (Figura 4) (CHRIST; ORDAHL, 1995; STOCKDALE; NIKOVITS JUNIOR; CHRIST, 2000).

Genes da família *PAX* (*Paired type homeodomain*) estão associados à determinação desta compartimentalização dorso-ventral. *Pax-1* e *Pax-9* são expressos na porção ventral do somito, enquanto *Pax-3* e *Pax-7* são expressos na porção dorsal (BRAND-SABERI et al., 1993; GOULDING; LUMSDEN; PAQUETTE, 1994; WILLIAMS; ORDAHL, 1994; EBENSPERGER et al., 1995).

Concomitantemente à maturação dos somitos, ocorre uma segunda compartimentalização, agora no sentido médio-lateral. O dermomiótomo se estende lateralmente para a região ventral, dando origem a dois subdomínios: o epaxial (região dorso-medial adjacente ao tubo neural), e o hipaxial (região da borda ventro-lateral) (STOCKDALE;

NIKOVITS JUNIOR; CHRIST, 2000; BUCKINGHAM et al., 2003). A porção epaxial dará origem à musculatura intercostal e das paredes do corpo. Já a porção hipaxial, que corresponde aos precursores migratórios, dará origem a musculatura esquelética, parede abdominal, tórax, membros e língua (BIRCHMEIER; BROHMANN, 2000).

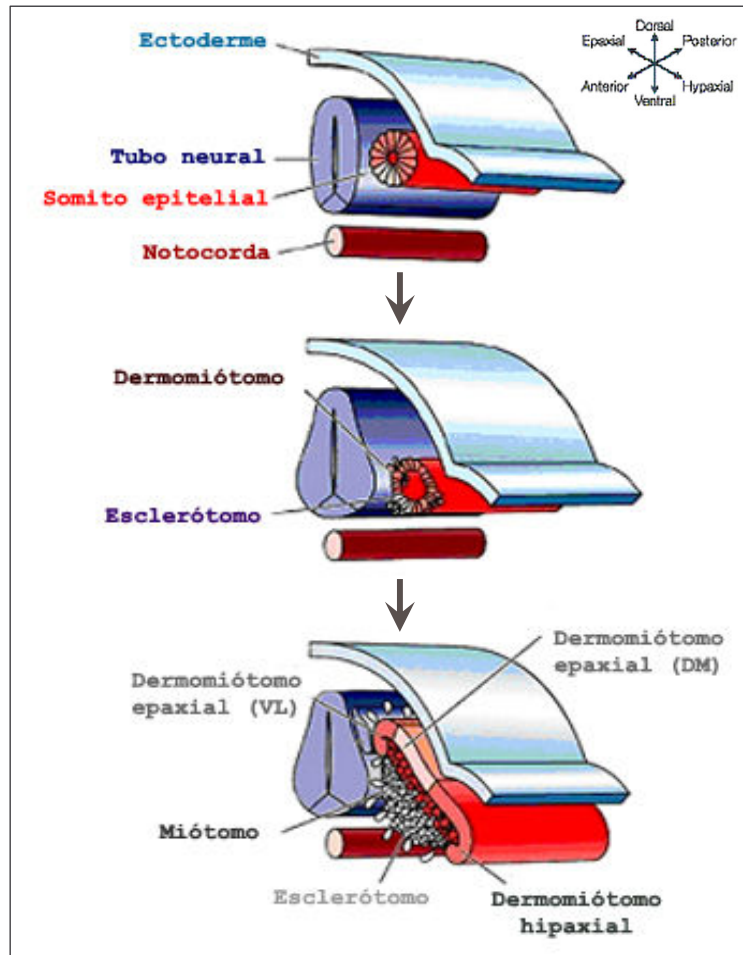


Figura 4. Representação esquemática da somitogênese.

Modificado de Gilbert (2006). DM = dorso-medial e VL = ventro-lateral.

A determinação da porção epaxial é regulada por sinais oriundos das estruturas axiais do embrião. Rong et al. (1992) demonstraram que a remoção completa do tubo neural e da notocorda impede a formação da musculatura epaxial. Dentre as moléculas sinalizadoras liberadas por estas estruturas, destacam-se as proteínas da família *SHH* (*Sonic hedgehog proteins*), liberadas pela notocorda e porção ventral do tubo neural (FAN; TESSIER-LAVIGNE, 1994).

Já a especificação das células musculares hipaxiais não é influenciada por sinais advindos do tubo neural e notocorda. Contudo, sinais provenientes da ectoderme

superficial são requeridos para a sua determinação e desenvolvimento (SCHMIDT et al., 2001; BRYSON-RICHARDSON; CURRIE, 2008).

A sinalização pelas vias *WNTs* é importante tanto para a formação da musculatura epaxial (sinais advindos do tubo neural), quanto para a formação da musculatura hipaxial (sinais provenientes da ectoderme superficial). *Wnt-1*, produzida na porção dorsal do tubo neural, induz a miogênese através da ativação de *Myf-5*, entretanto, *Wnt-7A*, produzida pela ectoderme, ativa preferencialmente *MyoD* (TAJBAKHS; BUCKINGHAM, 2000).

Um ponto chave na formação da musculatura esquelética é o surgimento do miótomo, primeiro músculo embrionário. Esta camada é formada por ondas sucessivas de deposição de mioblastos que delaminam das extremidades do dermomiótomo (SCAAL et al., 2004). As células do miótomo derivam do dermomiótomo por meio de sinais provenientes do tubo neural, da notocorda e dos mesodermas intermediário e paraxial, sob controle também das proteínas das famílias *WNT* e *SHH* (DIETRICH; SCHUBERT; LUMSDEN, 1997). Células desta camada são caracterizadas por serem mononucleadas, não proliferativas, e por apresentarem a expressão de proteínas músculo-específicas (HAWKE; GARRY, 2001; FOSCHINI; RAMALHO; BICAS, 2004).

A determinação do fenótipo muscular está associada à expressão de genes da família dos fatores miogênicos (*MRFs* – do inglês: *Myogenic regulatory factors*) (DAVIS; WEINTRAUB; LASSAR, 1987; BRAUN et al., 1989a, b; EDMONDSON; OLSON, 1989; RHODES; KONIECZNY, 1989; WRIGHT; SASSON; LIN, 1989; MINER; WOLD, 1990). Esta família de fatores de transcrição é formada por proteínas que possuem o domínio bHLH (domínio hélice-alfa-hélice e domínio básico de interação com o DNA) (PURI; SARTORELLI, 2000). Estas moléculas controlam a determinação e diferenciação dos mioblastos através de sua ligação a seqüências específicas conhecidas como *E-box* (CANNTG), presentes em *enhancers* de genes músculo-específicos (CHANOINE; GASPERA; CHARBONNIER, 2004; TAPSCOTT, 2005). A ativação da expressão gênica pelos fatores miogênicos é dependente de sua associação com outras moléculas, como os membros da família *MEF2* (NAYA; OLSON, 1999). Fazem parte desta família os fatores de transcrição: *MyoD*, *Myf5*, *MRF4* e Miogenina. *MyoD* e *Myf5* apresentam certa redundância genética, mas com atuação em vias regulatórias distintas na determinação e proliferação dos mioblastos. Já Miogenina e *MRF4*, e também *MyoD*, possuem uma função mais tardia, durante a diferenciação celular (revisado por POWNALL; GUSTAFSSON; EMERSON JUNIOR, 2002).

Enquanto os precursores da musculatura epaxial expressam proteínas musculares imediatamente após a compartimentalização dos somitos, os precursores da musculatura hipaxial precisam deixar o dermomiótomo e migrar para seus sítios-alvo antes de iniciarem o programa miogênico (BIRCHMEIER; BROHMANN, 2000). O mecanismo molecular que determina o processo migratório foi estudado em membros e envolve um receptor transmembrana de tirosina quinase (*c-met*) e o ligante *SF/HGF* (*scatter factor/hepatocyte growth factor*) (BLADT et al., 1995; DIETRICH et al., 1998), além disto, os genes *Pax-3*, *Msx-1* e *Lbx-1* também estão associados ao processo (BOBER et al., 1994; EPSTEIN et al., 1996; BROHMANN; JAGLA; BIRCHMEIER, 2000).

2.2.2 Desenvolvimento da ME

Uma vez localizadas na região alvo, as células precursoras de musculatura (mioblastos) iniciam uma fase de proliferação celular. Após a etapa mitótica, os mioblastos começam a sintetizar proteínas miofibrilares e a se fundir, formando os miotubos. Este processo, caracterizado por inúmeras modificações moleculares, tem início com o reconhecimento e alinhamento de mioblastos adjacentes. Em seguida, surgem junções entre estas células, que se ampliam gradativamente, culminado na fusão de suas membranas e citoplasmas (revisado por GREFTE et al, 2007). Em um próximo momento, as células alongadas e multinucleadas irão se agrupar para formar a fibra muscular madura (Figura 5).

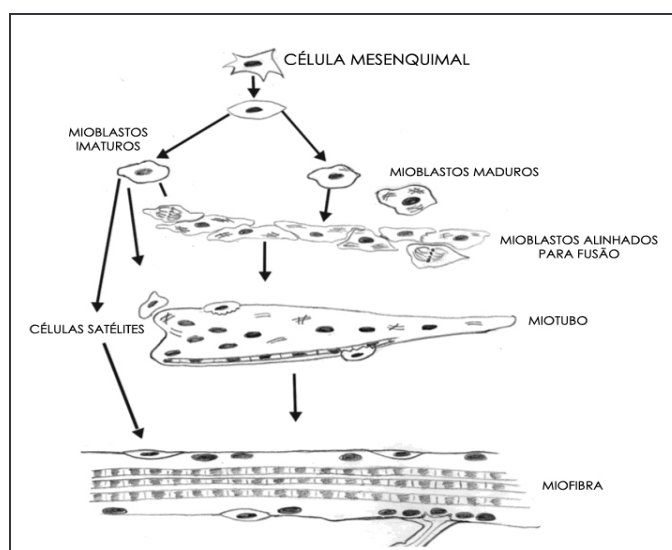


Figura 5. Esquema representativo da formação das miofibras.

Modificado de Junqueira e Carneiro, 1999.

Assim que a diferenciação se inicia, a proliferação cessa, de modo que grande parte do crescimento muscular que ocorre após o nascimento ou eclosão é devida principalmente ao aumento em volume das fibras musculares, por hipertrofia muscular, e não pelo aumento no número de células (MOSS, 1968). Deste modo, a formação do tecido muscular é determinada por um balanço entre proliferação e diferenciação celular.

O controle do balanço proliferação *versus* diferenciação é decisivo no sucesso da miogênese. O crescimento embrionário dos músculos do tronco e membros requer a manutenção da expressão de *Pax-3* nas células precursoras miogênicas em proliferação (AMTHOR, et al., 1998). Durante o desenvolvimento, proteínas *BMPs* (*Bone morphogenetic proteins*) derivam da ectoderme e agem na manutenção da expressão de *Pax-3*, garantindo a continuidade da proliferação celular. O gene *BMP-4*, além de sua atividade na proliferação, está associado à expressão dos genes *Noggin*, as quais antagonizam o próprio *BMP-4*. Este exemplo de *feed-back* negativo ilustra um dos mecanismos de controle do balanço entre proliferação e diferenciação celular da miogênese (AMTHOR; CHRIST; PATEL, 1999).

Um próximo momento de desenvolvimento muscular é o crescimento. Entre os fatores de crescimento mais estudados estão os membros das famílias de fatores de crescimento *TGF- β* (*Transforming growth factors-beta*), fatores de crescimento do fibroblasto (*FGF* – do inglês: *Fibroblast growth factors*) e fatores de crescimento similares à insulina (*IGF* – do inglês: *Insulin-like growth factors*).

Os *FGFs* e os *IGFs* estão envolvidos no controle da proliferação e diferenciação de diversas linhagens miogênicas (DUCLOS; WILKIE; GODDARD, 1991; VENKATESWARAN et al., 1995). *FGF-2* é um forte inibidor da diferenciação, tanto por induzir a proliferação celular (DOLLENMEIER; TURNER; EPPENBERGER, 1981), quanto por controlar negativamente a expressão de Miogenina (BRUNETTI; GOLDFINE, 1990). Já a via do *IGF-1* está associada à expressão de diversas proteínas músculo-específicas (FLORINI et al., 1991; FLORINI; EWTON, 1992), e a super-expressão deste gene resulta em hipertrofia muscular (VANDERBURGH et al., 1991; COLEMAN et al., 1995).

Membros da família *TGF- β* têm sido associados à inibição da diferenciação terminal em culturas celulares, pela sua via de ação sobre os fatores miogênicos (MASSAGUE et al., 1986; OLSON et al., 1986). Um dos principais genes da família *TGF- β* é a Miostatina, uma proteína reguladora negativa do crescimento muscular (McPHERRON; LAWLER; LEE, 1997; ZHU et al., 2000). Uma mutação neste gene é responsável pelo fenômeno de musculatura dupla, observado em bovinos da raça *Belgian Blue*, por McPherron e Lee (1997). Ratos mutantes nulos em miostatina apresentam um aumento significativo na

massa muscular, tanto pelo maior número, quanto pelo maior tamanho das miofibras (McPHERRON; LAWLER; LEE, 1997). A Miostatina também está associada à redução da expressão de *Pax-3* no embrião, favorecendo a diferenciação celular (AMTHOR, 2002).

Depois de constituída, a musculatura adulta ainda pode desempenhar um último momento de miogênese. A ME abriga células indiferenciadas e mononucleadas, localizadas na periferia das fibras musculares maduras, entre a lâmina basal e o sarcolema (MAURO, 1961) (Figura 5). Estas células, conhecidas como células satélites (CS) permanecem quiescentes até que algum estímulo, como uma injúria, agressão ou o próprio crescimento do animal, ativem-nas para que se proliferem e se diferenciem (revisado por DODSON et al., 1996). Estas células são, portanto, consideradas as responsáveis pelo reparo e também pelo crescimento do tecido muscular adulto.

Informações sobre as vias de ativação das CS ainda são escassas, contudo um gene marcador muito citado em literatura para CS é o *Pax-7* (SEALE et al., 2000; OLGUIN; OLWIN, 2004; KUANG et al., 2006; ZAMMIT et al., 2006). Ratos adultos mutantes nulos para *Pax-7* apresentaram um número muito reduzido de CS. Entretanto, o mutante recém nascido apresentava um número relativamente normal. Estes sugeriu a importância de *Pax-7* para a manutenção das CS, que, em sua ausência, são levadas à apoptose (SEALE et al., 2000; RELAIX et al., 2006).

Na tentativa de desvendar os mecanismos responsáveis pela ativação das CS, a primeira hipótese a ser levantada seria a de que os mesmos genes responsáveis pela determinação dos mioblastos no embrião poderiam estar regulando também as CS na musculatura adulta. Pensando nisso, alguns pesquisadores analisaram o papel dos fatores miogênicos (*MRFs*) no mecanismo de ativação das CS, embora o papel funcional dos *MRFs* na musculatura esquelética após o nascimento não ser totalmente claro. Observaram que *MyoD* foi expresso em elevados níveis no músculo em regeneração e de neonatos (KOISHI et al., 1995) e que em CS onde a expressão de *MyoD* foi inibida houve uma redução na capacidade de diferenciação (CORNELISON et al., 2000), o que permite inferir sobre a importância de *MyoD* na diferenciação de CS. Já o fator miogênico *Myf-5* foi expresso tanto em CS quiescentes (BEAUCHAMP et al., 2000), quanto nas ativadas (COOPER et al., 1999), demonstrando não participar do processo de ativação das CS. A Miogenina foi expressa somente nas CS ativadas (GROUNDS et al., 1992), podendo ser utilizada como ponto de partida para estudos que buscam entender melhor os mecanismos de quebra de quiescência das CS.

2.3 Os miRNAs e a miogênese

A miogênese é um processo biológico complexo que exige um mecanismo dinâmico de controle, que pode ser realizado em diversos momentos no caminho do DNA até a proteína funcional. Dentre as inúmeras vias de controle da miogênese, a via dos miRNAs vem ganhando uma atenção especial devido: (1) ao enorme potencial regulatório destas moléculas, pois um único miRNA pode regular dezenas de RNAs mensageiros diferentes, e um único RNA mensageiro poder ser regulado por dezenas de miRNAs distintos; (2) ao fato de muitos miRNAs terem sido identificados no tecido muscular e de muitos destes serem especificamente, ou preferencialmente, expressos neste tecido (os chamados *myomirs* - *myo* = músculo + *mirs* = miRNAs); e (3) à descoberta da ocorrência de alterações no padrão de expressão dos miRNAs em distúrbios musculares, como hipertrofias e arritmias cardíacas, e atrofia e distrofias musculares.

O conceito de que os miRNAs possuem um padrão tecido-específico de expressão foi primeiramente suportado pela descoberta de que os miRNAs miR-1, miR-122a e miR-124a são expressos exclusivamente no músculo, fígado e cérebro, respectivamente (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Sempere et al. (2004) confirmaram e expandiram estes resultados no mesmo trabalho onde descreveram a expressão dos miRNAs miR-1, miR-133a e miR-206, e sua expressão altamente enriquecida nas musculaturas esquelética e cardíaca. Os trabalhos de expressão desenvolvidos até os dias atuais revelaram que o tecido muscular, juntamente com o tecido cerebral e do pâncreas, possuem a maioria dos miRNAs tecido-específicos já descritos (LEE et al., 2008).

A especificidade da expressão dos miRNAs em cada tecido é gerada por uma via de controle que ainda está sendo determinada para os diferentes processos biológicos. Dentro da oncologia, estas vias estão sendo amplamente esclarecidas. Estudos demonstraram que muitos miRNAs são induzidos e/ou reprimidos de acordo com a condição ambiental a que estão sujeitos, associando o controle da expressão destes miRNAs ao fenômeno de epigenética (revisado por CHUANG; JONES, 2007; ROUHI et al., 2008).

A regulação da expressão dos miRNAs no músculo parece ser amplamente controlada por vias de transcrição muito bem estabelecidas dentro do programa miogênico, envolvendo os fatores de transcrição *SRF*, *Twist*, *MEF2* e miocardina (SOKOL; AMBROS, 2005; ZHAO; SAMAL; SRIVASTAVA, 2005; CHEN et al., 2006). Além disto, trabalhos desenvolvidos por Rao et al. (2006) e Rosemberg et al. (2006) demonstraram que *MRFs* estão

associados à regulação da expressão de miRNAs músculo-específicos, ao descreverem *MyoD* como ativador da expressão de miR-1 e miR-206.

A importância destes pequenos RNAs para o desenvolvimento muscular foi demonstrada inicialmente por Sokol e Ambros (2005), os quais observaram que uma depleção do miR-1 causava a morte prematura durante o segundo instar em *Drosophila*, por uma falha no desenvolvimento muscular. Mas, um dos exemplos mais extremos da importância da regulação via miRNAs na musculatura esquelética foi obtido por Clop et al. (2006). Em um estudo que visava esclarecer as bases genéticas do fenômeno de musculatura dupla observado em ovelhas da raça *Texel*, foi realizado um mapeamento que localizou um QTL (*Quantitative trait locus*) num intervalo do cromossomo 2, o qual continha o gene da miostatina. Comparando a seqüência do gene da miostatina destes animais, com um grupo controle, os autores observaram que não havia nenhum polimorfismo no quadro aberto de leitura (ORF – do inglês: *open reading frame*) do gene, mas havia sim uma permuta de um único nucleotídeo, G por A, em sua região 3' UTR. Eles descobriram que esta alteração criava um sítio de reconhecimento para os miRNAs miR-1 e miR-206, e ambos, altamente expressos na musculatura esquelética, regulavam negativamente a expressão da miostatina, gerando o fenótipo muscular observado nos animais.

A maioria dos estudos realizados até o momento para a determinação dos genes alvos da repressão por miRNAs utilizam técnicas de microarranjo, e de superexpressão e silenciamento de miRNAs *in vitro* e *in vivo*. Mas, de modo geral, para se conhecer a função de um miRNA o primeiro passo é determinar quais os genes passíveis de serem regulados por ele. Neste sentido, a bioinformática vem gerando informações valiosas através da comparação entre as seqüências dos miRNAs maduros e das regiões 3' UTR de inúmeras seqüências gênicas. Contudo, esta análise apenas gera um grande número de possibilidades que devem ser testadas em estudos funcionais complementares, uma vez que possui uma natureza relativamente simples, pois ignora o fato de existir uma comunidade de moléculas específicas de cada meio celular que pode vir a interagir com o miRNA, modulando sua ação. Além disto, ainda não estão esclarecidos todos os mecanismos de repressão utilizados pelos miRNAs, e, talvez uma análise simples de complementaridade de seqüência não seja suficiente para se determinar os alvos reais de um miRNA.

Os miRNAs associados ao desenvolvimento muscular cujas funções foram melhor caracterizadas até o momento são o miR-1, miR-133, miR-181, miR-206 e miR-214.

A importância do miR-214 para a determinação da ME vem sendo descrita por trabalhos realizados em *zebrafish*. Este miRNA é expresso nos estágios iniciais da

segmentação dos somitos e sua ação está associada à regulação negativa do gene *Su(fu)*, da via de sinalização *Hedgehog*. Em peixes, a inibição deste gene resulta em uma redução ou perda de fibras musculares de contração lenta (INGHAM, 2007; FLYNT et al., 2007).

O miR-181, apesar de importante na musculatura, é expresso em diversos tecidos, não apenas no muscular. Naguibneva et al. (2006) demonstraram que o miR-181, altamente expresso durante a diferenciação celular, participa do estabelecimento do fenótipo muscular. Estes autores sugeriram que o miR-181 regula a expressão de transcritos de *Hox-A11*, um repressor de *MyoD*. Ao permitir a presença de *MyoD*, o miR-181 favorece o estabelecimento da diferenciação celular durante a miogênese.

De todos os *myomirs* conhecidos, o miR-206 é o único exclusivamente expresso na musculatura esquelética e o único encontrado somente em vertebrados (McCARTHY et al., 2008). Este fato vem fazendo com que esta molécula seja considerada uma das responsáveis pela complexidade do sistema muscular dos organismos superiores. Kim et al. (2006) super-expressaram este miRNA em mioblastos, e, por uma análise de microarranjo visualizaram os genes cuja expressão foi reduzida após esta alteração. Dentre estes genes, *Polal* (subunidade α catalítica da DNA polimerase) e *Cx43* (proteína de junção/conexina 43) tiveram sua expressão reduzida. Segundo os autores, ao reduzir a expressão de uma subunidade da DNA polimerase, o miR-206 geraria uma diminuição na divisão celular, favorecendo a progressão da miogênese, ou a diferenciação celular. Em um trabalho posterior, Anderson, Catoe e Werner (2006) forneceram dados que re-afirmaram a regulação de *Cx43* pelo miR-206 durante a fusão dos mioblastos em miotubos. Este gene atua na formação das junções neuromusculares e tem sido descrito como importante para a diferenciação celular *in vitro* e para a regeneração muscular (ARAYA et al., 2005).

Outro gene alvo do miR-206 é a Folistatina-1 (*Fstl1* – do inglês: *Follistatin-like 1*). Rosemberg et al. (2006) demonstraram que *MyoD* induz a expressão de miR-206, que por sua vez, regula negativamente *Fstl1*. A relação deste gene com o desenvolvimento da musculatura ainda não é totalmente conhecida, mas é proposto que possua uma via importante no controle da proliferação celular, uma vez que foi descrito como supressor tumoral (CHAN et al., 2009), e inibidor de proliferação e migração de células dos vasos sanguíneos (LIU et al., 2006). Ainda, os genes *Utr* (utrofina) e *ER α* (receptor de estrógeno alfa) são alvos da regulação do miR-206 (MIURA; JASMIN, 2006; ADAMS; FURNEAUX; WHITE, 2007).

Outro *myomir* importante é o miR-1, um dos miRNAs mais conservados ao longo da evolução. Dentre os alvos do miR-1 experimentalmente verificados por Chen et al. (2006), temos a histona deacetilase 4 (*HD4C4*), um repressor do fator de transcrição *MEF2-C*.

Ao inibir a *HD4C4*, o miR-1 permite que *MEF2-C* seja expresso e se associe aos *MRFs*, favorecendo a progressão da miogênese. Ainda, dentre os possíveis alvos do miR-1 sugeridos por ferramentas de bioinformática estão os genes: *c-met*, *HGF*, *IGF-1* e *LIF*, todos relevantes na determinação do fenótipo muscular (McCARTHY; ESSER, 2007).

Já o miR-133 inibe o fator de resposta ao soro (*SRF* – do inglês: *Serum response factor*), um gene crucial para diferenciação e crescimento celular (CHEN et al., 2006). Ao inibir um gene favorável à diferenciação, o miR-133 favorece a proliferação celular. Este miRNA foi associado também à hipertrofia, na musculatura cardíaca (CARÉ, et al., 2007). Uma informação interessante é que apesar do miR-1 e miR-133 determinarem efeitos opostos (proliferação *versus* diferenciação), estes miRNAs derivam da mesma molécula precursora e são transcritos juntos, em duas regiões policistrônicas que codificam o cluster miR-1/miR-133 no genoma dos vertebrados (CHEN et al., 2006). Este cenário ilustra a sutileza dos mecanismos de controle do balanço proliferação *versus* diferenciação durante a miogênese e marca a presença destes pequenos RNAs neste mecanismo.

Recentemente, Sun et al. (2008) descreveram outro miRNA importante para o desenvolvimento muscular, o miR-24. Neste trabalho, foi demonstrado que membros da família *TGF- β* podem regular a expressão deste miRNA e afetar a diferenciação dos mioblastos em miotubos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material biológico utilizado no estudo

Para este estudo foram utilizados organismos provenientes de duas linhagens de *G. gallus*, uma de corte (TT) e outra de postura (CC). Estas linhagens foram desenvolvidas dentro do Programa de Melhoramento Genético da EMBRAPA – Suínos e Aves (Concórdia – SC) e apresentam composições genéticas distintas. A linhagem de corte teve sua origem a partir do cruzamento das raças *Cornish*, *Hamshire* e *White Plymouth Rock*, enquanto a linhagem de postura foi originada da raça *White Leghorn*. A linhagem TT é uma linha cuja seleção foi efetuada com o objetivo de melhorar o peso corporal, a conversão alimentar, os rendimentos de carcaça e partes, entre outras. Já a linhagem CC foi selecionada para melhorar, dentre outras características, a produção e o peso dos ovos, a conversão alimentar e a redução do peso corporal (FIGUEIREDO et al., 2003 a,b).

O tecido selecionado para o estudo foi o músculo peitoral (*Pectoralis major*), principalmente, devido à sua importância econômica como a carne mais nobre do frango.

3.2 Incubação dos ovos, criação dos animais e coleta do tecido

Ovos férteis das linhagens de corte (TT) e postura (CC) foram incubados a 37,8 °C em atmosfera umidificada. As coletas da musculatura peitoral dos embriões foram realizadas após 9 dias e 17 dias de incubação, para a obtenção de animais nos estádios E35 e E43, segundo Hamburger e Hamilton (1951).

Já as amostras provenientes de animais adultos foram coletadas no 1º, 21º e 42º dias após a eclosão. Durante este período, os animais foram abrigados em galpão aquecido e alimentados do 1º ao 21º dia de idade com ração para desenvolvimento inicial (22% de proteína bruta, 2% de extrato etéreo, 6% de matéria fibrosa, 10% de matéria mineral, 1,5% de cálcio, e 0,5% de fósforo). E após este período, alimentados com a ração final (19% de proteína bruta, 2,5% de extrato etéreo, 5% de matéria fibrosa, 8% de matéria mineral, 1,4% de cálcio e 0,5% de fósforo).

Todas as amostras de tecido coletadas foram identificadas e imediatamente congeladas em nitrogênio líquido, em seguida foram armazenadas a -80 °C. Estas amostras foram utilizadas em experimentos distintos: na construção da biblioteca de miRNAs, na quantificação da expressão de miRNAs e na quantificação da expressão gênica.

3.3 Obtenção do RNA total

Os tecidos foram macerados em nitrogênio líquido, com auxílio de almofarizes e pistilos e imediatamente transferidos para o Trizol (*Invitrogen*), seguindo a proporção sugerida pelo fabricante (1 mL de Trizol para cada 100 mg de tecido). Passados 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, adicionou-se 200 μ L de clorofórmio, agitou-se vigorosamente e incubou-se novamente por mais 5 minutos, seguidos de uma centrifugação (12.000 x g, 15 minutos, 4 °C). O sobrenadante foi então transferido para um microtubo limpo e iniciou-se a precipitação do RNA total com 500 μ L de isopropanol, vortexado-se e incubando-se por 10 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram novamente centrifugadas (12.000 x g, 10 minutos, 4 °C) e o RNA total lavado com 1 mL de etanol 75% (em água tratada com DEPC – 0,01% dietilpirocarbonato). Centrifugou-se novamente as amostras (7.500 x g, 5 minutos, 4 °C) e após remoção completa do etanol o RNA total foi ressuspendido em água livre de RNAses.

Após a extração, o RNA total foi quantificado por meio de espectrofotometria (leitura de absorbância a 260 nm) e visualizado em gel de agarose 1% para comprovar sua integridade.

3.4 Construção da biblioteca de microRNAs (miRNAs)

A biblioteca foi construída utilizando o *kit miRCat microRNA Cloning (IDT)*.

3.4.1 Isolamento da fração enriquecida em pequenos RNAs

A construção da biblioteca foi iniciada a partir de 500 μ g de RNA total, obtidos de um *pool* de 8 animais com 21 dias da linhagem de corte (TT).

Inicialmente, uma fração contendo o RNA de baixo peso molecular foi obtida após a precipitação da fração de maior peso molecular em solução contendo 2% de PEG 8.000 e NaCl 0,5 M. A fração de baixo peso molecular foi então precipitada em 2,5 volumes de etanol 100% a -80 °C *overnight*. Após centrifugação a 16.000 x g, 4 °C, 30 minutos, o RNA foi lavado em etanol 75% (em 25% de água livre de RNAses), as amostras foram novamente centrifugadas (7.500 x g, 10 minutos, 4°C) e após remoção completa do etanol o RNA total foi ressuspendido em água livre de RNAses.

Seguiu-se com a separação dos RNAs por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida 15%. Os fragmentos entre 15 e 30 bases (fração que contém os miRNAs) foram cortados e eluídos do gel utilizando o sistema de eletroforese *Flashpage* (Ambion). O RNA eluído foi precipitado utilizando 10% de NaOAc 3M, pH 5,2; 5 µg de glicogênio e 2,5 volumes de etanol 100% a -80°C *overnight*. As amostras foram novamente centrifugadas a 16.000 x g, 30 minutos, 4°C, em seguida o RNA foi lavado em etanol 75% (em água livre de RNAses), as amostras foram centrifugadas (7.500 x g, 10 minutos, 4°C) e após remoção completa do etanol o RNA total foi ressuscitado em água livre de RNAses.

3.4.2 Ligação dos adaptadores

Depois de obtida a fração enriquecida em pequenos RNAs, foram adicionados adaptadores em ambas as extremidades dessas moléculas, em duas reações separadas. Primeiramente, um adaptador (5' AppCTGTAGGCACCATCAAT/3ddC/ 3') foi adicionado na extremidade 3', na reação: 10 µL do RNA recuperado, 50 µM do adaptador 3', 2 µL do 10X *Ligation Buffer*, 6 µL do *Ligation Enhancer*, na presença de 1U de T4 RNA Ligase. Essa reação foi incubada a 22 °C por duas horas. Após esse período, os seguintes reagentes foram adicionados para a precipitação: 80 µL de IDTE (10 mM Tris, pH 7.5; 0,1 mM EDTA), 30 µg de glicogênio, 10% de NaOAc 3 M, 2,5 volumes de etanol 100%. Após incubação a -80 °C por 30 minutos, o material foi centrifugado a 16.000 x g, 4 °C, por 10 minutos e ressuscitado em água livre de RNAses.

A amostra foi aplicada em um gel desnaturante de poliacrilamida 10%. Os fragmentos com cerca de 40 bases (fração que contém os miRNAs ligados aos adaptadores) foram cortados e eluídos do gel utilizando o sistema de eletroforese *Flashpage* (Ambion). O RNA recuperado foi novamente precipitado e ressuscitado em água. Em seguida, o adaptador 5' (5' GGAATUCUCGGGCACCAAGGU 3') foi adicionado em reação: 10 µL do RNA recuperado, 50 µM do adaptador 5', 2 µL do 10X *Ligation Buffer*, 6 µL do *Ligation Enhancer*, 5U de T4 RNA Ligase e 20 mM de ATP. Essa reação foi incubada à 22 °C por duas horas. Após esse período adicionou-se para a precipitação: 80 µL de IDTE (pH 7,5), 30 µg de glicogênio, 10% de NaOAc 3 M, 2,5 volumes de etanol 100%. Após incubação a -80 °C por 30 minutos, o material foi centrifugado a 16.000 x g, 4°C, por 10 minutos e ressuscitado em água.

3.4.3 Transcrição reversa e PCR

Após a ligação dos adaptadores em ambas as extremidades das moléculas de RNA, iniciou-se a transcrição reversa a partir de: 10 μ M de um *primer* complementar à seqüência do adaptador 3' ($5'$ GATTGATGGTGCCTACAG $3'$), do RNA recuperado, 200U de *SuperScript III RT (Invitrogen)*, 10 mM de dNTPs, 0,1 M DTT, 4 μ L de *5X First Strand Buffer*, e 40 U de *RNase-OUT*, em um volume final de 20 μ L. A reação foi incubada a 50 °C por uma hora, em seguida a 70 °C por 15 minutos.

O material foi amplificado em uma reação contendo: 3 μ L de cDNA, 5 μ L do tampão de PCR 10X (Tris-HCl 20 mM, pH 8,4; KCl 50 mM), 3 mM de MgCl₂, 10 mM de dNTPs, 10 μ M do *primer* direto ($5'$ TGGAATTCTCGGGCACC $3'$), 10 μ M do *primer* reverso ($5'$ GATTGATGGTGCCTACAG $3'$) e 5 U de *Taq* polimerase, em um volume final de 50 μ L. As condições da PCR foram: 95 °C por 10 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 52 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos; e extensão final de 72 °C por 10 minutos.

Cerca de 10 μ L do produto da PCR foram aplicados em gel de agarose 2% para confirmar a presença de um fragmento amplificado de cerca de 60 bases, correspondente a um miRNA de cerca de 20 bases contendo adaptadores de 22 e 21 bases, ligados em cada uma de suas extremidades.

3.4.4 Clonagem, extração do DNA plasmidial e sequenciamento

Prontamente após a amplificação, 1 μ L (cerca de 5 ng) do produto obtido na reação foi utilizado para a ligação em 50 μ g de pGEM-T *Easy Vector*, com o auxílio de 3 U de T4 DNA ligase. A reação foi mantida a 4 °C *overnight* e em seguida 2 μ L foram adicionados a 100 μ L de células eletrocompetentes para a transformação por eletroporação (a 1,8 kV). Após o choque, as bactérias eletroporadas foram recuperadas em 900 mL de meio de cultura SOC e a cultura foi incubada a 37 °C por 1 hora sob agitação. Depois desse período, 100 μ L da cultura foi inoculada em placas de Petri contendo LB ágar, ampicilina (50 μ g/mL) e X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactosídeo) 2%; e incubadas em estufa a 37 °C *overnight*.

As colônias transformadas foram inoculadas em meio *Circle grow* com ampicilina (100 μ g/mL) e incubadas a 37 °C por 22 horas sob agitação constante. Em seguida,

as células foram sedimentadas a 3.200 x g por 6 minutos a 20 °C e o sobrenadante descartado por inversão. Ao *pellet* formado, adicionou-se 240 µL de GET (glicose 20%; EDTA 0,5 M, pH 8,0; Tris-HCl 1M, pH 7,5). Após nova centrifugação, descartou-se novamente o sobrenadante. O *pellet* foi ressuspensionado novamente em 80 µL de GET e 60 µL foram transferidos para uma microplaca contendo 1,5 µL de RNase (20 mg/mL). Adicionou-se ao meio, uma solução de NaOH 0,2 M com SDS 1%, e, após 10 minutos de incubação a temperatura ambiente, acrescentou-se 60 µL de acetato de potássio 3 M. Incubou-se então a 90 °C, por 30 minutos. Em seguida, a placa foi resfriada em gelo por 10 minutos e submetida à centrifugação a 3.200 x g por 4 minutos a 4 °C. A solução foi então filtrada em uma placa Millipore (MAGV N22). Ao material filtrado adicionou-se 110 µL de isopropanol e centrifugou-se por 3.200 x g por 45 minutos a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado com etanol 70%. Após evaporação de todo o etanol, o DNA foi ressuspensionado em 40 µL de água miliQ estéril.

As amostras foram quantificadas em gel e cerca de 200 ng de DNA foram seqüenciados em reações contendo 5 µM do *primer* M13 (direto), 3 µL de tampão *save money* (200 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM MgCl₂) e 2 µL do *kit Big Dye*, contendo a enzima *AmpliTaq* DNA polimerase, para um volume final de 10 µL, seguindo protocolo modificado dos fabricantes do *kit Big Dye Terminator* da Applied Biosystems. A reação de seqüenciamento ocorreu em 25 ciclos de 20 segundos a 95 °C, 15 segundos a 50 °C e 1 minuto a 60 °C.

Após o seqüenciamento, as reações foram purificadas com a adição de acetato de sódio 1,5 M com EDTA 0,25 M e precipitadas com 60 µL de etanol absoluto. Após centrifugação a 3200 x g a 4 °C por 45 min., o sobrenadante foi descartado por inversão e o *pellet* lavado com etanol 70%. Após secagem por 1 hora a temperatura ambiente protegido da luz, o *pellet* foi ressuspensionado em 3 µL de tampão de corrida (5 formamida: 1 tampão de corrida). As amostras foram desnaturadas a 98 °C por 2 min e a eletroforese realizada em aparelho de seqüenciamento automático *ABI3100* (*Applied Biosciences*).

3.4.5 Análise das sequências

As seqüências obtidas foram analisadas de modo a se identificar as porções correspondentes ao vetor e aos adaptadores 5´ e 3´. Em seguida, a seqüência inserida entre os adaptadores foi submetida ao alinhamento contra o banco de miRNAs miRBase (<http://miRNA.sanger.ac.uk>). Com isso, foi possível identificarmos três grupos de seqüências: (1) aquelas correspondentes a miRNAs já descritos em *Gallus gallus*, (2) aquelas correspondentes a miRNAs já descritos em outras espécies e não descritos em *G. gallus*, e (3) aquelas não identificadas no miRBase.

As seqüências que não foram identificadas no miRBase foram submetidas ao BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) e a bancos de RNAs específicos, para a remoção de possíveis seqüências correspondentes a outros tipos de RNAs pequenos, como: RNAs ribossomais – *The european ribiossomal database* (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/rRNA/>); transportadores - *tRNAscan-SE Web Server* (<http://lowelab.ucsc.edu/tRNAscan-SE/>) e *Genomic tRNA database* (<http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/>); snoRNAs (*small nucleolar RNAs*): (<http://www-snorma.biotoul.fr>); e piRNAs (*Piwi interacting RNA*): (<http://piRNAbank.ibab.ac.in>).

As sequências não encontradas nos bancos de pequenos RNAs (consideradas possíveis novos miRNAs) foram submetidas ao alinhamento contra o genoma do frango, onde foi feita sua localização genômica e a identificação das porções flanqueadoras da seqüência. Com essa informação, foram submetidas ao *software mfold* (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>) para análise de possíveis estruturas secundárias a serem formadas por essa região genômica, uma vez que miRNAs provêm de estruturas em forma de grampo (LEE et al., 2002; BARTEL, 2004).

3.5 Análise da expressão dos miRNAs por PCR quantitativa

Com o objetivo de: (1) associar a ocorrência de microRNAs ao controle do desenvolvimento da musculatura esquelética; e (2) analisar a expressão relativa destes miRNAs entre linhagens com potenciais divergentes de crescimento muscular (corte e postura); foi feita a quantificação da expressão de alguns miRNAs por PCR quantitativa. Inicialmente, foram selecionados para a análise miRNAs que foram identificados na biblioteca, com funções já descritas em literatura e relevantes para a compreensão da miogênese. Todavia, houve uma limitação quanto à metodologia a ser aplicada. Devido à

complexidade metodológica para a síntese de cDNAs provenientes de microRNAs maduros, que não possuem a cauda poliA, optamos por usar um *kit* comercial (*mirVana qRT-PCR miRNA Detection kit - Applied*), desenvolvido para quantificação da expressão de miRNAs em humanos. Assim, somente estariam disponíveis para nossas análises, miRNAs que apresentassem 100% de identidade entre *G. gallus* e *H. sapiens*. Para determinar quais seriam estes miRNAs, foram gerados alinhamentos entre os miRNAs maduros das duas espécies (Figura 6).

<u>miR-206</u>	
UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	gga-miR-206
UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG	hsa-miR-206
<u>miR-1</u>	
UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUA	gga-miR-1
UGGAAUGUAAAGAAGUAUGUAU	hsa-miR-1
<u>miR-133a</u>	
UUGGUCCCCUUCAACCAGCUGU	gga-miR-133a
UUGGUCCCCUUCAACCAGCUG	hsa-miR-133a
<u>miR-181a</u>	
AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	hsa-miR-181a
AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	gga-miR-181a
<u>miR-125b</u>	
UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	gga-miR-125b
UCCUGAGACCCUAACUUGUGA	hsa-miR-125b
<u>miR-221</u>	
AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	gga-miR-221
AGCUACAUUGUCUGCUGGGUUUC	hsa-miR-221

Figura 6. Alinhamento das seqüências correspondentes aos miRNAs maduros (miRBase) pré-selecionados para as análises de expressão. As áreas em destaque se referem às bases que diferem entre *G. gallus* (gga) e *H. sapiens* (hsa).

Observamos que dentre os miRNAs pré-selecionados, somente o miR-206, miR-181a, miR-125b e miR-221 foram idênticos entre as duas espécies, e, poderiam então, ser utilizados para as análises. Porém, não analisamos o miR-181a, já que a empresa ainda não havia desenvolvido os *primers* para este miRNA, e tentamos analisar o miR-133a, cuja diferença entre humanos e frangos era relativamente pequena. Entretanto, infelizmente a amplificação foi sempre inespecífica, de modo que tivemos que desconsiderá-lo das análises.

Desta forma, a expressão dos miRNAs miR125-b, miR-221 e miR-206, foram analisadas por *PCR* quantitativa entre as linhagens de corte (TT) e postura (CC) em três idades: 9 e 17 dias embrionário, E35 e E43 respectivamente, e 21 dias pós-eclosão. Para as

reações de amplificação foi utilizado o *kit mirVana qRT-PCR miRNA Detection (Applied)*. O experimento foi conduzido com amostras provenientes de 8 animais de cada linhagem (CC e TT) para cada uma das idades analisadas. Como gene referência foi utilizado o 5S.

3.5.1 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi conduzida a partir de 25 ng de RNA total, 2 µL de *RT Buffer 5X*, 1 µL de *primer RT 1X*, e 0,4 µL do *mix* de enzimas, para um volume final de 10 µL. A reação foi incubada a 37 °C por 30 min., seguindo a 95 °C por 10 min. O cDNA foi então armazenado a -20 °C.

3.5.2 PCR quantitativa

A reação de *PCR* foi realizada com todo o produto da reação de síntese de cDNA, 5 µL de *PCR buffer 5X*, 0,5 µL de *primers*, e ~ 3U de *SuperTaq DNA* polimerase (*Ambion*). Em condições de desnaturação inicial a 95 °C por 3 min., e 40 ciclos de amplificação a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 30 segundos.

A especificidade da reação foi comprovada por eletroforese em gel do produto amplificado e pelo pico único da Curva de *Melting* (ANEXO B).

3.6 Análise da expressão dos genes *SRF*, *Fstll* e *Pola1* por *PCR* quantitativa

SRF, *Fstll* e *Pola1* foram selecionados para análise por serem alvos de repressão dos miRNAs miR-133 e miR-206, dois dentre os mais citados na literatura em associação com o desenvolvimento muscular, e por terem genes alvos de repressão bem estabelecidos e determinados experimentalmente (ANDERSON; CATOE; WERNER, 2006; CHEN et al., 2006; KIM et al., 2006; ADAMS; FURNEAUX; WHITE, 2007; CARÈ et al., 2007; McCARTHY; ESSER, 2007). O miR-133 inibe a expressão do fator de transcrição *SRF* (*Serum response factor* – Fator de resposta ao soro), enquanto o miR-206 regula negativamente a expressão de *Fstll* (*Follistatin like-1*; Folistatina-1) e *Pola1* (*DNA polymerase alpha catalytic subunit*- subunidade α catalítica da DNA polimerase).

3.6.1 Desenho dos primers

Os pares de *primers* para cada um dos genes, mais o gene referência (*GAPDH* - Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase) (Tabela 1), foram desenhados com base em seqüências completas de mRNA correspondentes descritas no *GenBank* (www.ncbi.nlm.nih.gov), utilizando-se o programa *Primer3Input* (http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer/primer3_www.cgi). Os *primers* foram avaliados quanto a qualidade utilizando-se o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>).

Tabela 1. Características dos *primers* utilizados para a amplificação dos genes *SRF*, *Fstl1*, *Polal* e *GAPDH*.

Gene	ID	Seqüência dos primers	Tamanho do produto amplificado
<i>SRF</i>	396103	D: 5'- CGAGACTGGGATTTGAACG - 3' R: 5'- CACAGACACCCTCAGCAATG - 3'	110 pb
<i>Fstl1</i>	395349	D: 5'- GGCGAGAATCGTCATCAAAG - 3' R: 5'- GCTGGCTGGAAGGAGAGA - 3'	105 pb
<i>Polal</i>	418593	D: 5'- GCCAAACAAAAATACCACACC - 3' R: 5'- ACCCCAATCTCCTTCCACTT - 3'	116 pb
<i>GAPDH</i>	374193	D: 5'- AACAGAGACATTGGGGGTTG - 3' R: 5'- TGGAGAGATGGCAGAGGTG - 3'	142 pb

SRF = Fator de resposta ao soro, *Fstl1* = Folistatina-1, *Polal* = subunidade α catalítica da DNA polimerase e *GAPDH* = Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase. ID = Identificação da seqüência gênica no *ncbi* (*Gene ID*).

3.6.2 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi feita com o kit *SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix* (*Invitrogen*), seguindo instruções do fabricante. Inicialmente, foram adicionados a 3 μ g de RNA total, 0,5 μ g de oligo d(T) e 1 μ L de *annealing buffer*, em um volume de 8 μ L. Após incubação a 65 °C por 5 minutos e resfriamento em gelo, foi adicionado 10 μ L de 2X *First strand reaction mix* e 2 μ L do mix de enzimas (*SuperScriptII* e *RNaseOUT*). A reação foi incubada por 50 minutos a 50 °C e 5 minutos a 85 °C. O cDNA foi armazenado a -20 °C.

3.6.3 PCR quantitativa

Cerca de 10 ng de cDNA foram utilizados para a reação de amplificação em volume final de 20 μL com: 0,2 mM de dNTP mix, 0,4 μM de cada um dos *primers* (direto e reverso), 2 mM de MgCl_2 , 0,2 μg de BSA, ~ 2U da enzima *Taq Platinum* DNA polimerase (*Invitrogen*), 4 μL de *Sybr Mix* (para 50 μL : 25 μL de *buffer* de PCR 10X, 6,25 μL de DMSO – *Dimethyl sulfoxide* SIGMA e 0,5 μL de *Sybr green* 10.000 X *Invitrogen*). O programa utilizado para a amplificação das amostras foi composto de desnaturação inicial a 95 °C por 3 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 10 segundos, anelamento a 55 °C por 10 segundos, extensão a 72 °C por 10 segundos; e resfriamento final a 40 °C por 30 segundos.

A especificidade da reação foi comprovada por eletroforese em gel do produto amplificado e pelo pico único da Curva de *Melting* (ANEXO B).

3.7 Análises dos resultados de expressão gênica

Os resultados da expressão relativa entre as linhagens de corte (TT) e postura (CC), dos miRNAs e dos genes, foram analisados segundo metodologia proposta por Pffafli (2001), onde a expressão relativa entre dois tratamentos é determinada pela razão (eq. 1):

$$\text{Expressão relativa} = R = \frac{E_{\text{gene/miRNA alvo}}^{(\text{Ct gene alvo CC} - \text{TT})}}{E_{\text{gene referência}}^{(\text{Ct gene referência CC} - \text{TT})}} \quad (1)$$

Onde,

E = Eficiência de amplificação do *primer*.

Ct (*Threshold cycle*) = o ciclo de PCR no qual foi detectado o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal.

Para calcular a eficiência de amplificação dos iniciadores, foram construídas curvas padrão de diluição em série de cDNA (ANEXO C). A partir dos resultados obtidos, foi produzido um gráfico do Ct *versus* o \log_{10} das concentrações da diluição em série. Foi feita então uma regressão linear para determinar o coeficiente angular da reta (*slope*), que foi usado

no cálculo da eficiência de amplificação utilizando-se a fórmula determinada por Rasmussen (2001) (eq. 2):

$$\text{Eficiência} = 1 - [10^{(-1/\text{slope})}] \quad (2)$$

Para o cálculo das razões foi utilizado o programa REST (*Relative Expression Software Tool*) (PFAFFL; HORGAN; DEMPFLER, 2002).

O nível de significância para qualquer diferença obtida entre os grupos foi avaliado por análises não-paramétricas usando o mesmo *software*, testando a significância pelo teste de casualização através da realocação fixa aos pares (*Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test*). Para todas as análises o nível de significância atribuído foi de $P < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Biblioteca de miRNAs

A população de miRNAs maduros presentes no transcriptoma das células musculares de frangos jovens (21 dias pós-eclosão) foi caracterizada através da construção de uma biblioteca. Um total de 576 clones foi processado e 450 sequências de qualidade foram obtidas (Tabela 2). Destas, parte corresponderam a clones que não abrigavam fragmentos inseridos na seqüência do vetor (falsos positivos), restando 361 sequências para serem analisadas. Estas sequências foram agrupadas em 98 grupos e avaliadas através de diversos critérios para melhor determinar sua correspondência às sequências de miRNAs maduros.

Tabela 2. Características descritivas da biblioteca de miRNA obtida a partir da musculatura peitoral de frangos com 21 dias após a eclosão.

Tecido	Seq. de qualidade ^a	Seq. Únicas ^b	Índice de Novidade (%)	miRNAs conhecidos (n)	miRNAs conhecidos (% de ^a)
Músculo peitoral	361	98	27	47	83,4

Seq. = seqüências; n = número. O índice de novidade foi estimado como a porcentagem de seqüências únicas (b) em relação ao número de seqüências de qualidade (a). Os miRNAs conhecidos foram determinados em comparação com o banco de dados miRBase.

4.1.1 miRNA conhecidos identificados na biblioteca

Os miRNAs foram identificados e tiveram sua localização genômica determinada por meio de análise no miRBase (<http://miRNA.sanger.ac.uk>) (Tabela 3). Dos 98 grupos obtidos, 47 foram correspondentes a miRNAs conhecidos. Destes, 40 haviam sido descritos em *G. gallus* e 7 descritos em bovinos (*bta*), humanos (*hsa*) e ornitorrinco (*oan*).

Buscando-se a localização genômica dos miRNAs ainda não descritos em *G. gallus*, foi feita uma busca no genoma do frango através da ferramenta BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast). Foi possível localizarmos apenas a seqüência dos miRNAs miR-363, no cromossomo 1, no íntron 2 de um gene precursor de Miociclina (ENSGALT00000033904), e do miR-1335, inserido na seqüência de uma proteína hipotética (LOC769666), no cromossomo 1. O fato dos outros miRNAs não terem sido localizados no genoma de *G. gallus* se deve, provavelmente, à montagem da versão atual do genoma do frango.

Dentre os miRNAs identificados na biblioteca, foi possível notar a alta ocorrência dos miRNAs: miR-133a (98 clones), miR-1 (23 clones), miR-1335 (23 clones) e miR-126* (22 clones).

Pode-se destacar que cerca de 30% das seqüências obtidas foram correspondentes ao miR-133a. A família 133 de miRNAs é altamente conservada entre os vertebrados, e sua expressão é exclusiva das musculaturas esquelética e cardíaca (SEMPERE et al. 2004; LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Os membros dessa família foram associados à indução da proliferação celular durante a miogênese (CHEN et al., 2006), hipertrofia da musculatura esquelética (McCARTHY; ESSER, 2007) e cardíaca (CARÈ et al., 2007) e apoptose (XIAO et al., 2007). A alta ocorrência deste miRNA na biblioteca corrobora com os trabalhos que o identificam como importante ferramenta da regulação da expressão gênica para o desenvolvimento e a manutenção do tecido muscular.

Outro miRNA essencial no desenvolvimento muscular é o miR-1, cuja ocorrência foi de 6,4% dentre os miRNAs identificados na biblioteca (23 clones). Este miRNA está entre os mais bem caracterizados em trabalhos que agregam miogênese e miRNAs, e está envolvido com a indução da diferenciação celular (CHEN et al., 2006). O gene regulado por este miRNA é a Histona deacetilase 4 (*HDAC4*), conhecido repressor transcricional de *MEF2* (LU et al., 2000). Os *MEF2* são fatores de transcrição que se associam aos fatores miogênicos durante sua atuação na diferenciação celular. Uma vez inibindo *HDAC4*, o miR-1 impede que *MEF2* seja reprimido por ele, favorecendo associação destes genes aos fatores miogênicos e a determinação da diferenciação celular. Um trabalho recente (LIU et al., 2007) identificou a ação de *MEF2* na indução da transcrição do cluster miR-1/miR-133 em células musculares de embriões de ratos. Deste modo, *MEF2* induz a expressão do miR-1 e este garante que *MEF2* não seja reprimido, ao inibir *HDAC4*.

Um ponto importante se refere ao miR-1335, ainda não identificado em frango, porém com ocorrência relativamente alta na biblioteca (6,4%). Não se sabe ainda as vias de regulação afetadas por este miRNA em frangos, pois este miRNA foi identificado na construção do genoma do ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) (WARREN et al., 2008). Diversos estudos de genômica têm sido realizados com estes animais, devido a sua importância para a compreensão da evolução dos vertebrados superiores. Após o sequenciamento do seu genoma em 2008 (WARREN et al., 2008), um trabalho complementar analisou a conservação das famílias de pequenos RNAs regulatórios entre esta espécie e outros vertebrados, o que permitiu um vislumbre sobre a evolução destas moléculas entre alguns grupos de vertebrados superiores (MURCHISON et al., 2008).

O miR-126* também teve uma alta ocorrência na biblioteca (22 clones), todavia, ainda não se sabe a função deste miRNA na musculatura esquelética. Um dado interessante é que os miRNAs miR126 e miR126*, assim como miR-199 e miR-199* são transcritos juntos, a partir de um mesmo grampo precursor. Porém, a ocorrência do miRNA maduro de cada um destes pares de miRNAs foi diferente na biblioteca. Este fato pode estar evidenciando o processamento diferencial de ambos os braços da molécula precursora dos miRNAs, ajustável de acordo com a funcionalidade das células.

Tabela 3. Identificação e localização genômica dos miRNAs presentes em tecido muscular de frango com 21 dias após a eclosão. (continua)

miRNA	NC	Localização no genoma (Cr: posição em Mb [fita])	Loci	Descrição do gene hospedeiro
gga-miR-133a	98	2: 105670357-105670443 [-], 20: 8119054-8119149 [+]	In 12, Ig	<i>E3 ubiquitin-protein ligase MIB</i>
gga-miR-1a	23	2: 105673483-105673567 [-], 20: 8107831-8107901 [+]	In 13, Ig	
<i>oan-miR-1335</i>	23	1: 41417-41443 [-]	-	<i>Hypothetical protein - LOC769666</i>
gga-miR-126*	22	17: 8431742-8431825 [-]	In 7	<i>EGF-like domain-containing protein 7 precursor</i>
gga-miR-126	14			
gga-miR-26a	13	2: 4467516-4467592 [+]	In 5	<i>CTD small phosphatase-like protein</i>
<i>hsa-miR-27a</i>	12	-	-	-
gga-miR-199	12	17: 5667150-5667243 [+]	In 2 In 15	Sem descrição <i>Dynamain-1</i>
gga-miR-199*	2			
gga-miR-125b	9	1: 102457647-102457736 [+]	In 7	Sem descrição
gga-miR-181a	6	8: 2001561-2001664 [+], 17: 10218497-10218587 [+]	Ig, Ig	-
gga-miR-20b	5	4: 3970047-3970131 [-]	Ig	-
gga-miR-221	5	1: 114218926-114219024 [+]	Ig	-
gga-miR-30a-5p	5	3: 85102239-85102310 [+]	Ig	-
gga-miR-20a	4	1: 152248306-152248403 [-]	Ig	-
gga-miR-16	4	1: 173700351-173700434 [-], 9: 23742791-23742884 [-]	Ig, In 4	<i>SMC4 structural maintenance of chromosomes 4-like 1</i>

(continua)

miRNA	NC	Localização no genoma (Cr: posição em Mb [fita])	Locí	Descrição do gene hospedeiro
gga-miR-21	3	19: 7322072-7322168 [+]	Ig	-
<i>hsa-miR-214*</i>	3	-	-	-
<i>hsa-miR-425</i>	2	-	-	-
gga-let-7j	2	26: 1442697-1442779 [-]	Ig	-
gga-let-7a	2	1: 73421272-73421347 [+], 12: 6302911-6303000 [-], 24: 3380993-3381064 [+]	Ig, Ig, Ig	-
gga-miR-130a	2	15: 408399-408481 [-]	Ig	-
gga-miR-206	2	3: 110390439-110390514 [-]	Ig	-
gga-miR-34a	2	21: 3251514-3251622 [-]	Ig	-
gga-miR-451	2	19: 5823968-5824036 [-]	Ig	-
gga-miR-92	2	1: 152248070-152248147 [-]	Ig	-
gga-let-7b	1	1: 73422101-73422185 [+]	Ig	-
gga-let-7c	1	1: 102425086-102425169 [+]	In 7	Sem descrição
gga-let-7i	1	1: 34895687-34895770 [+]	Ig	-
gga-miR-135a	1	12: 2830742-2830829 [-], 1: 48192659-48192758 [+], 26: 1925942-1926037 [-]	Ig	-
gga-miR-140	1	11: 21030641-21030735 [+]	In 16, In 17	<i>Hypothetical protein</i> - LOC415868

(conclusão)

miRNA	NC	Localização no genoma (Cr: posição em Mb [fita])	Loci	Descrição do gene hospedeiro
gga-miR-142-5p	1	19: 496983-497070 [-]	Ig	-
gga-miR-15a	1	1: 173700493-173700575 [-]	Ig	-
gga-miR-15c	1	4: 4049055-4049130 [-]	Ig	-
gga-miR-17-5p	1	1: 152248781-152248865 [-]	Ig	-
gga-miR-181b	1	8: 2001750-2001838 [+], 17: 10220137-10220221 [+]	Ig	-
gga-miR-18a	1	1: 152248626-152248718 [-]	Ig	-
gga-miR-18b	1	4: 3970228-3970311 [-]	Ig	-
gga-miR-222	1	1: 114216027-114216124 [+]/ 1: 114218422-114218519 [+]	Ig	-
gga-miR-30d	1	2: 148337263-148337326 [-]	Ig	-
gga-miR-30e	1	23: 5248414-5248509 [+]	In 4	<i>Nuclear transcription factor Y subunit gamma</i>
gga-miR-365	1	14: 764271-764355 [+], 18: 6437296-6437391 [+]	In 2	Sem descrição
gga-miR-454	1	15: 399833-399953 [-]	Ig	-
<i>hsa-miR-363</i>	1	8: 4739550-4739659 [+]	In 2	<i>Myocilin precursor</i>
<i>hsa-miR-26b*</i>	1	-	-	-

NC = número de clones; In = intrônico; Ig = intergênico. *Em itálico* = miRNAs ainda não descritos em *G. gallus*.

4.1.2 Outros RNAs identificados na biblioteca

Das 98 seqüências distintas, 51 não foram identificados no banco de miRNAs (miRBase). Estas foram submetidas à análise de BLASTN e BLAST contra o genoma de *G. gallus* para uma possível identificação e/ou para a determinação de sua localização genômica. Além disso, foram feitas buscas em bancos de dados de outros pequenos RNAs não codantes.

Esta análise resultou na identificação de 30 outros tipos de RNAs (ANEXO D). Destes, um foi correspondente a um RNA transportador (RNAt) e 29 foram similares a frações de RNAs ribossomais (rRNAs). Considerando que: (1) os rRNAs correspondem à cerca de 80% do RNA total da célula; e (2) as seqüências com similaridade a rRNAs apresentaram em média 25 bases de comprimento, e um rRNA eucarioto tem de 120 a 4700 nucleotídeos de comprimento (ALBERTS et al., 2004); uma possibilidade é que estas seqüências correspondem a produtos de degradação destes RNAs mais abundantes.

Outras vinte e uma seqüências não foram identificadas. Destas, onze apresentaram similaridade a regiões genômicas ainda não caracterizadas de vertebrados (ANEXO D) e seis foram localizadas no genoma do frango e consideradas como possíveis novos miRNAs.

4.1.3 Possíveis novos miRNAs identificados na biblioteca

Como mencionado anteriormente, miRNAs maduros provêm de estruturas onde a complementaridade de bases da seqüência do RNA precursor causa uma conformação conhecida como *hairping* (grampo). Considerando a possibilidade das seis seqüências posicionadas no genoma do frango, mas não identificadas (Tabela 4) se referirem a novos miRNAs, foi feita uma análise dos possíveis dobramentos do RNA de origem destas seqüências. Para isso, um fragmento de cerca de 100 nucleotídeos (incluindo a seqüência clonada e suas regiões franqueadoras) foi obtido a partir do alinhamento gerado pelo BLAST da seqüência contra o genoma de *G. gallus* e *H. sapiens* e submetido ao *software* mFOLD (<http://mfold.bioinfo.rpi.edu>) (ZUKER, 2003). Segundo os dobramentos preditos pelo *software*, das seis seqüências não identificadas, três podem vir a formar precursores em forma de grampo (Figura 7).

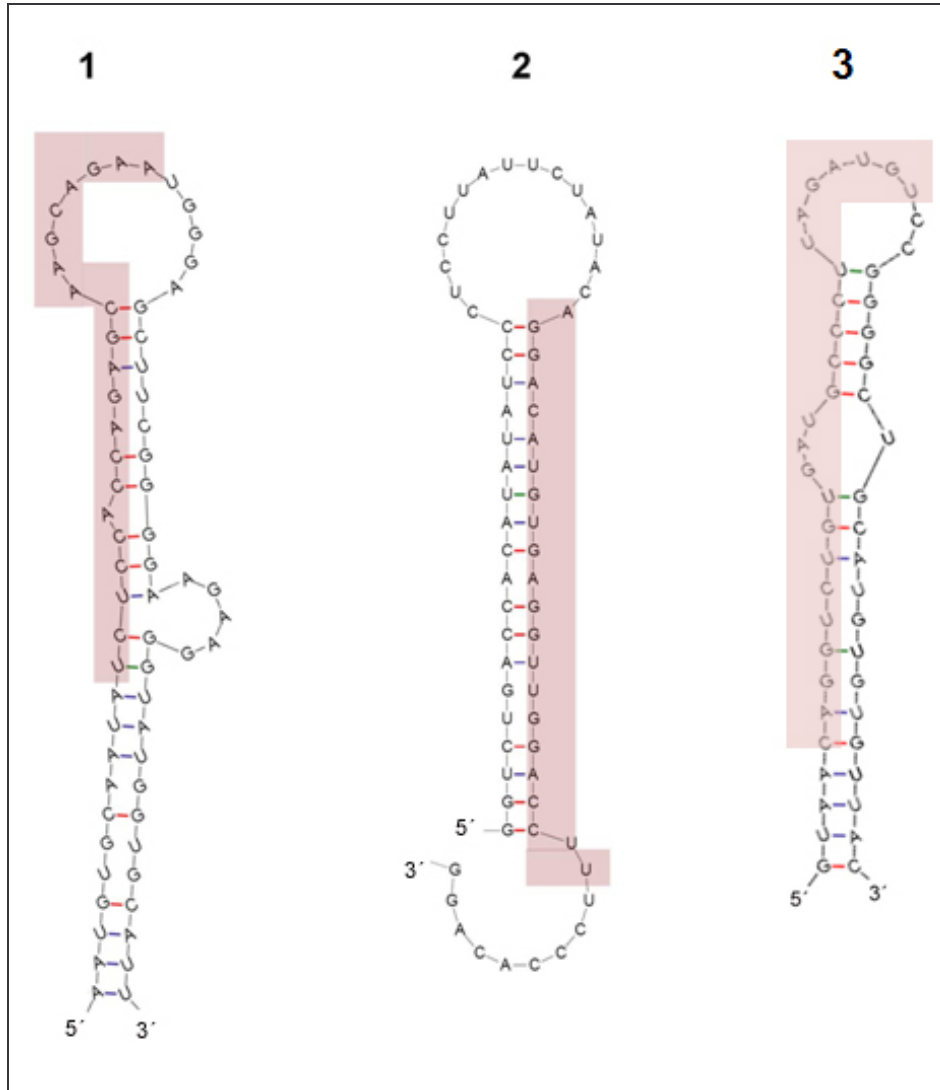


Figura 7. Dobramentos dos pré-miRNAs preditos pelo programa mFOLD. As áreas em destaque se referem às sequências dos miRNAs maduros. 1 e 2 = sequências referentes ao genoma de *G. gallus*; 3 = sequência referente ao genoma de *H. sapiens*.

Tabela 4. Possíveis novos miRNAs identificados na biblioteca obtida de tecido muscular de frango de 21 dias após a eclosão.

miRNA	NC	Gga	Fita	Início	Término	Hsa	E	ΔG
ACAGCGGTAAGGCTGTGTAGCTGGCA	5	Cr. 12	-	5706521	5706546	-	-	-
TTCTGCTTGCTCTGGTGGAGA	2	Cr. 2	-	16283187	16283207	Cr. 9	1	-23,0
AGGACATGTGAGGTTGGACCTT	2	Cr. 22	+	1347995	1348016	-	2	-48,1
CAGGTCGTGTATGCCCTTAGATGT	2	Cr. 1	-	15771	15794	Cr. 7, 12, 14	3	-35,6
CACTCGAAGATGAGCTGTGTTTGC	1	Cr. 7	-	7502194	7502217	-	-	-
GTAAAAAGCTCGTAGTTGGATC	1	Cr. 1	-	16589	16611	Cr. 2, 7, 12	-	-
				2831712	2831734			

NC = número de clones. Gga = Localização cromossomal no genoma do frango segundo BLAST; Início e Término em Mb.

Cr. = Cromossomo. Hsa = Localização cromossomal no genoma humano segundo BLAST; E = Estrutura (Figura 7); ΔG = Energia livre da estrutura calculada pelo mFOLD.

4.2 Expressão dos miRNAs miR-125b, miR-221 e miR-206 em linhagens de Corte (TT) e Postura (CC)

As pesquisas desenvolvidas no Laboratório de Biotecnologia Animal da ESALQ-USP (Piracicaba, SP) procuram investigar as vias moleculares associadas ao programa miogênico. Para isso, utilizam como modelo biológico duas linhagens de frango obtidas após anos de seleção para fins distintos (corte e postura), e que possuem potencial divergente para crescimento muscular.

Diversos trabalhos foram desenvolvidos com as linhagens de corte e postura com o objetivo de identificar e caracterizar genes determinantes do desenvolvimento muscular. A expressão dos fatores miogênicos *MyoD*, *Myf5*, *MRF4* e Miogenina foi quantificada entre as linhagens (ALVARES, 2001; ALVES, 2004; MARCHESIN, 2008); polimorfismos foram identificados nas seqüências codificadoras desses genes (ANJOS, 2004); etiquetas de seqüências expressas (ESTs - do inglês: *expressed sequence tags*) foram identificadas nos tecidos precursores de músculo (somitos), nos membros em desenvolvimento (JORGE et al., 2004) e na musculatura peitoral (ALVES, 2004); microarranjos foram utilizados para a quantificação em larga escala da expressão gênica diferencial (JORGE, 2006).

Considerando o papel fundamental de alguns miRNAs para a miogênese e visando-se encontrar possíveis miRNAs associados às diferenças fenotípicas observadas entre a musculatura esquelética das duas linhagens, foram selecionados para a análise de expressão gênica microRNAs identificados na biblioteca cuja função está envolvida com os fenômenos de proliferação e diferenciação celular, eventos fundamentais no controle da miogênese. Inicialmente foram selecionados os miRNAs miR-206, miR-1, miR-133a, miR-181, miR-125b e miR-221. Entretanto, devido a questões metodológicas (ver tópico 3.5), foram analisados somente os miRNAs miR-125b, miR-221 e miR-206.

A hipótese aqui testada é que uma expressão diferencial destes miRNAs entre as linhagens estaria associada à determinação das nítidas diferenças observadas quanto ao potencial de deposição muscular entre as aves destas linhagens.

Não houve diferença significativa na expressão de miR-125b entre as linhagens de corte e postura (Tabela 5). No entanto, diferenças significativas foram observadas durante a ontogenia (Figura 8). Uma menor expressão foi observada aos nove dias embrionário (E35), seguida de um aumento de expressão no estágio seguinte de 17 dias ainda embrionário (E43); que se mantém até a fase adulta.

O miR-125b é homólogo ao lin-4 de *C. elegans* (LAGOS-QUINTANA et al., 2002). Esta molécula é uma inibidora do ciclo celular, e já foi descrita como supressora de tumor em diversos tipos de cânceres (IORIO et al., 2005; LEE et al., 2005; SCOTT et al., 2007; VISIONE et al., 2007). Sua capacidade de inibição da proliferação celular também foi observada em células tronco mesenquimais de ratos, por Mizuno et al. (2008). Observou-se que a expressão deste miRNA é induzida durante a diferenciação de células em cultura, e sua expressão é maior em células diferenciadas em relação às indiferenciadas (LEE et al., 2005; MIZUNO et al., 2008). Uma vez que a parada no ciclo celular é pré-requisito para o início do programa de diferenciação em diversos tipos celulares, incluindo em músculo, este miRNA pode estar controlando a expressão gênica de modo a levar à ativação de genes do programa de diferenciação.

Sendo o miR-125b um inibidor de proliferação celular, os dados obtidos sugerem que a transição entre o estágio de proliferação de mioblastos e o programa de diferenciação esteja ocorrendo entre as idades de nove e 17 dias de desenvolvimento embrionário. A expressão menor de um inibidor do ciclo celular em aves com nove dias indica que nesta idade ainda esteja ocorrendo divisão celular dos mioblastos, e que aos 17 dias já esteja ocorrendo a parada do ciclo celular, com a atuação do miR-125b para o início do programa de diferenciação dos mioblastos em fibras musculares. Estes dados são coerentes com os obtidos em cortes histológicos da musculatura destas aves ao longo das mesmas idades (PATRÍCIO, em fase de elaboração).

O miR-221 também foi descrito com participação no controle do ciclo celular, porém com função antagônica ao miR-125b. O miR-221 regula negativamente o transcrito codificador da proteína *p27*. A *p27*, assim como *p21* e *p57*, é membro da família *Cip/Kip* de inibidores de quinases dependentes de ciclina (*CDKs*). Estas proteínas inibem a atividade das *CDKs*, que são fundamentais na progressão do ciclo celular da fase G1 à S, durante a divisão celular (KALDIS, 2007). Ao regular a expressão de *p27*, o miR-221 impede que as *CDKs* sejam inibidas por ela, de modo que a proliferação celular é favorecida.

A ação de um miRNA sobre um transcrito inibidor de proliferação celular é coerente com os resultados da alta expressão deste miRNA em diversos tipos de cânceres (LE SAGE et al., 2007; VISIONE et al., 2007). Estudos funcionais demonstraram que a expressão deste miRNA tem ligação com os pontos de checagem do ciclo celular, que garantem a sobrevivência das células e afirmam sua competência para a entrada na fase S (MEDINA et al., 2008). Outros genes regulados pelo miR-221 são o *Survivin-1 homolog BIRC1*, um marcador de neurodegeneração e inibidor da proteína apoptótica *NIAP* (LUKIW et al., 2009),

e o Receptor de estrógeno α ($ER\alpha$) (ZHAO et al., 2008), sendo este último, também inibido pelo miR-206 (MIURA; JASMIN, 2006; ADAMS; FURNEAUX; WHITE, 2007).

O miR-221 também não apresentou diferença de expressão entre as linhagens de corte e postura (Tabela 5). Todavia, ao longo do tempo, a expressão do miR-221 diminuiu gradativamente, sendo esta diminuição mais acentuada após o nascimento (Figura 8). Estes resultados quantitativos indicaram uma associação significativa deste miRNA com a diminuição da taxa de proliferação que ocorre durante o desenvolvimento muscular em função da transição para o programa de diferenciação.

Tabela 5. Expressão relativa da linhagem de postura (CC) em relação à de corte (TT), nos diferentes estádios analisados.

	E	Estádios	Razão CC/TT	Erro padrão	95% IC	P(H1)	Resultado
<i>miR-125b</i>	1	E35	1,320	0,625 - 2,669	0,392 - 3,725	0,458	-
		E43	0,936	0,640 - 1,451	0,282 - 2,009	0,879	-
		21 dias	1,641	0,857 - 3,450	0,433 - 5,037	0,359	-
<i>miR-221</i>	0,87	E35	0,982	0,680 - 1,370	0,497 - 2,144	0,955	-
		E43	1,307	0,826 - 1,934	0,657 - 3,070	0,515	-
		21 dias	1,596	0,885 - 2,942	0,635 - 4,793	0,392	-
<i>miR-206</i>	0,81	E35	1,012	0,539 - 2,222	0,253 - 3,188	0,975	-
		E43	0,591	0,338 - 1,048	0,231 - 1,202	0,100	-
		21 dias	1,284	0,585 - 2,979	0,304 - 4,064	0,659	-
<i>5S</i>	0,83	E35	1	0,768 - 1,336	0,633 - 1,761	1	-
		E43	1	0,761 - 1,359	0,635 - 1,784	1	-
		21 dias	1	0,667 - 1,508	0,455 - 1,886	1	-

E = Eficiência de amplificação; IC = Intervalo de confiança; P(H1) = Probabilidade da diferença na expressão observada entre as linhagens ser devido ao acaso. E35 = Por volta de 9 dias embrionário; E43 = Por volta de 17 dias embrionário.

O miR-206 foi associado à diferenciação celular pela capacidade de reprimir o gene *Polal*, que codifica uma das subunidades da DNA polimerase (KIM et al., 2006). Ao reduzir a expressão de uma subunidade da DNA polimerase, o miR-206 geraria uma

diminuição na divisão celular, favorecendo a progressão da miogênese, ou a diferenciação celular.

Assim como para miR-125b e miR-221, a expressão relativa de miR-206 entre a musculatura peitoral das aves de corte e postura também não apresentou diferenças significativas (Tabela 5). Entretanto, o miR-206 apresentou um pico de expressão aos 17 dias embrionários (E43) (Figura 8). Este dado, assim como os dados obtidos para o miR-125b, sugerem que neste estágio do desenvolvimento está ocorrendo um conjunto de alterações na composição das moléculas reguladoras da expressão gênica de modo a favorecer o início do programa de diferenciação celular.

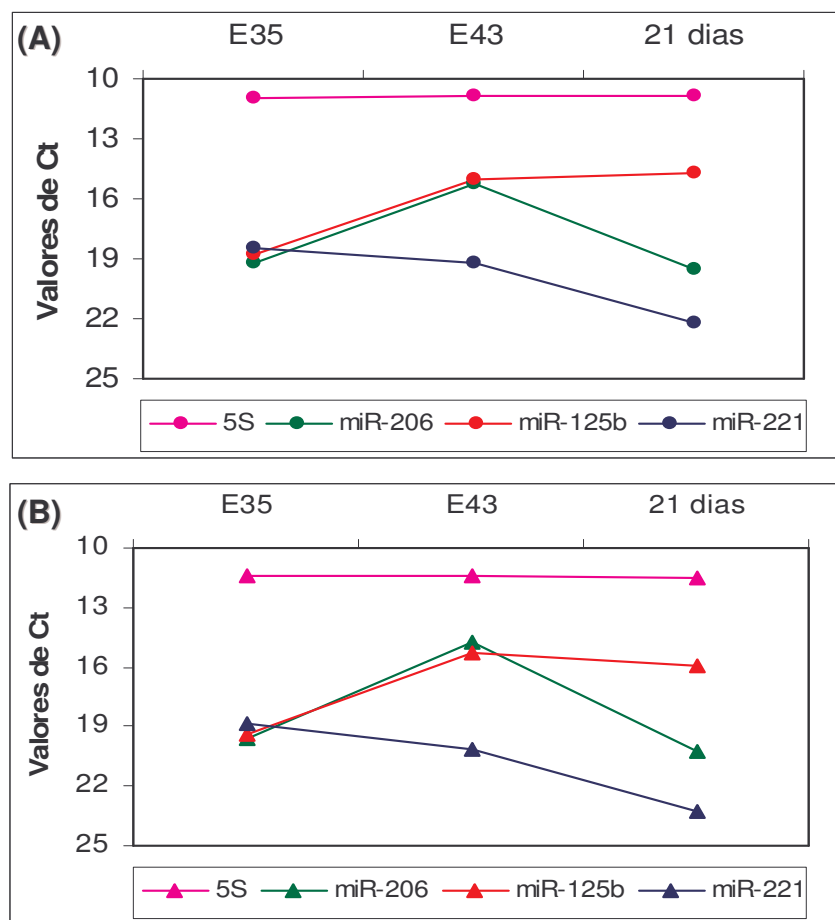


Figura 8. Ontogenia dos miRs miR-206, miR-125b e miR-221 nas linhagens (A) de postura (CC) e (B) de corte (TT). Onde: $\Delta Ct = Ct \text{ miRNA alvo} - Ct \text{ gene referência (5S)}$.

4.3 Expressão dos genes *SRF*, *Fstl1* e *Pola1* em linhagens de Corte (TT) e Postura (CC)

Foi analisada a expressão dos transcritos que codificam o fator de resposta ao soro (*SRF* – do inglês: *Serum response factor*), Folistatina-1 (*Fstl1*, - do inglês: *Follistatin like-1*) e a subunidade α catalítica da DNA polimerase (*Pola1* – do inglês: *DNA polymerase alpha catalytic subunit*). Estes genes foram selecionados por serem descritos como alvos da regulação dos dois miRNAs mais citados em trabalhos que associam estas moléculas à miogênese, o miR-133 e miR-206. O objetivo destas análises, inicialmente, era relacionar as variações observadas na expressão dos miRNAs, com as variações na expressão de seus genes alvo. Contudo, esta abordagem foi possível para os genes *Fstl1* e *Pola1*, ambos inibidos pelo miR-206, mas não para o gene *SRF*, que é regulado pelo miR-133, o qual não foi possível aferirmos a expressão devido a questões metodológicas (ver tópico 3.5).

A expressão do gene *SRF* não variou entre as linhagens, em nenhum dos estádios de desenvolvimento analisados (Tabela 6). Este dado pode indicar: (1) que este gene não é diferencialmente expresso entre as linhagens e que, portanto, não é determinante das diferenças fenotípicas observadas entre as linhagens de corte e postura; ou (2) que este gene colabora sim, para as diferenças fenotípicas observadas, mas que sua regulação pode estar ocorrendo em outro momento, não ao nível de RNA mensageiro, no qual aferimos a expressão gênica.

O *SRF* é um fator de transcrição associado à ativação de uma variedade de genes, incluindo genes expressos nos estádios iniciais da embriogênese, na neurogênese, e na miogênese. *SRF* desempenha papel fundamental na ativação de genes músculo-específicos, como as β -actinas, distrofinas, miosinas, entre outros (revisado por CHAI; TARNAWSKI, 2002). Este gene atua positivamente sobre a diferenciação de linhagens miogênicas. Estudos *in vitro* descreveram que na ausência de *SRF* há um bloqueio na fusão celular e uma redução na expressão de marcadores músculo-específicos, impedindo a diferenciação dos mioblastos em miotubos (VANDROMME et al., 1992; GAUTHIER-ROUVIERE et al., 1996; SOULEZ et al., 1996; SCHRATT et al., 2001).

Devido à sua atuação na diferenciação celular, era esperado um aumento na expressão de *SRF* ao longo do desenvolvimento. Entretanto, ao analisarmos a ontogenia de *SRF*, notamos que sua expressão é constante durante todo o desenvolvimento do animal (Figura 9).

Tabela 6. Expressão relativa da linhagem de postura (CC) em relação à de corte (TT), nos diferentes estádios analisados.

Gene	E	Estádios	Razão CC/TT	Erro padrão	95% IC	P(H1)	Resultado*
<i>SRF</i>	0,82	E35	0,996	0,516 - 1,947	0,245 - 3,071	0,988	-
		E43	1,597	0,943 - 2,613	0,626 - 4,323	0,12	-
		1 dia	0,808	0,602 - 1,150	0,495 - 1,334	0,573	-
		21 dias	0,807	0,444 - 1,461	0,258 - 2,572	0,427	-
		42 dias	1,339	0,697 - 2,341	0,434 - 4,350	0,334	-
<i>Fstll</i>	0,96	E35	1,646	0,773 - 3,065	0,476 - 4,841	0,053	-
		E43	4,179	1,599 - 10,084	0,641 - 21,873	0,002	<i>UP</i>
		1 dia	0,794	0,472 - 1,219	0,268 - 2,068	0,507	-
		21 dias	0,725	0,225 - 1,910	0,106 - 5,035	0,418	-
		42 dias	0,713	0,340 - 1,441	0,175 - 3,620	0,323	-
<i>Polal</i>	1	E35	1,331	0,645 - 2,873	0,360 - 5,394	0,277	-
		E43	1,480	1,024 - 1,970	0,811 - 6,221	0,276	-
		1 dia	1,083	0,740 - 1,734	0,380 - 3,363	0,825	-
		21 dias	0,614	0,346 - 1,024	0,238 - 1,440	0,033	<i>DOWN</i>
		42 dias	0,468	0,233 - 1,187	0,056 - 2,245	0,038	<i>DOWN</i>
<i>GAPDH</i>	1	E35	1	0,639 - 1,494	0,450 - 1,915	1	-
		E43	1	0,605 - 1,668	0,352 - 2,609	1	-
		1 dia	1	0,802 - 1,310	0,729 - 1,654	1	-
		21 dias	1	0,828 - 1,232	0,667 - 1,470	1	-
		42 dias	1	0,865 - 1,202	0,761 - 1,333	1	-

E = Eficiência de amplificação; IC = Intervalo de confiança; P(H1) = Probabilidade da diferença na expressão observada entre as linhagens ser devido ao acaso. E35 = Por volta de 9 dias embrionário; E43 = Por volta de 17 dias embrionário. *Resultado de CC em relação à TT. *UP* = Mais expresso, *DOWN* = Menos expresso.

Dois dos alvos do miR-206 melhor caracterizados e cuja função é mais relevante para a compreensão do controle da miogênese são os genes *Fstll* e *Polal*.

Pola1 codifica uma subunidade da enzima DNA polimerase, sendo essencial na replicação do material genético durante a fase S. Esta via de regulação foi associada à inibição da proliferação celular, pois, ao reduzir a expressão de *Pola1*, a célula restringe a replicação do DNA, o que conseqüentemente, impede que a célula se duplique, retardando o evento de proliferação celular (KIM et al., 2006). Observamos que o perfil de expressão deste gene ao longo do tempo é similar ao do miR-221, com uma maior expressão nos estádios iniciais e tendendo a uma menor expressão nos estágios finais. Sendo ambos associados ao evento de proliferação celular, estes dados ilustram a diminuição da taxa de proliferação celular à medida que passa a ocorrer a diferenciação das células musculares.

A expressão do gene *Pola1* foi maior na linhagem de corte em relação à de postura nas idades de 21 e 42 dias pós-eclosão (Tabela 6). Nesta fase do desenvolvimento, o animal passa por um crescimento intenso, sendo que o peso do frango de corte adulto (42 dias) tende a ser de quatro a cinco vezes maior do que uma ave poedeira de mesma idade (LEDUR et al., 2000). Uma maior expressão de *Pola1* neste período (de 21 a 42 dias), na linhagem de corte em relação à de postura, pode indicar que nesta linhagem há uma predisposição maior para a proliferação de células satélites e que esta tendência seja mais sutil na linhagem de postura.

A *Fstll*, também referida como *TSC-36* ou *Flik*, foi primeiramente identificada em linhagens osteoblásticas como produto induzido de *TGF β -1* (SHIBANUMA et al., 1993). O padrão de expressão de *Fstll* já foi caracterizado nos estádios iniciais de desenvolvimento tanto nas estruturas mesodérmicas (PATEL et al., 1996; TOWERS et al., 1999), quanto durante a somitogênese (AMTHOR et al., 1996). Entretanto, a função e os mecanismos de ação deste gene durante o desenvolvimento da musculatura esquelética ainda não estão totalmente esclarecidos.

A *Fstll* foi descrita como essencial para a formação do miocárdio, devido ao seu padrão de expressão neste órgão (BRAND, 2003; SOMI et al., 2004; VAN DEN BERG, 2007). Mas, o papel da *Fstll* como gene supressor de tumor é a que mais pode nos auxiliar na compreensão da função deste gene no balanço proliferação *versus* diferenciação celular. Este gene foi primeiramente associado a cânceres em 2001, por Hodgson et al.. Outros trabalhos descreveram uma redução na expressão deste gene em células cancerígenas em relação às células sadias (HAMBROCK et al., 2004; MASHIMO et al., 1997; SUMITOMO et al., 2000). Em 2006, Liu et al. a identificaram como inibidora de proliferação e migração de células dos vasos sanguíneos. Por fim, um trabalho recente desenvolvido por Chan et al. (2009) observou uma baixa expressão de *Fstll* em cânceres de endométrio e ovário. Estes

pesquisadores notaram ainda, que, ao introduzirem mais cópias de *Fstll* nas células com baixa expressão deste gene, ocorria uma redução na proliferação celular e um aumento na apoptose. Estes trabalhos permitiam identificar a *Fstll* como gene supressor de tumor, e, portanto, como potencial agente na inibição da proliferação celular.

A expressão de *Fstll* foi maior em animais da linhagem de postura (CC) em relação à de corte (TT) aos 17 dias do desenvolvimento embrionário (E43). Considerando este gene como um inibidor da proliferação celular, este dado pode estar sugerindo que a linhagem de postura cessa a fase de proliferação celular antes da linhagem de corte, determinando um menor número de células musculares nesta linhagem. Portanto, estes dados nos permitem inferir sobre a ação de *Fstll* sobre a regulação diferencial do balanço entre proliferação e diferenciação celular entre as linhagens.

Em relação à ontogenia, observamos uma expressão maior de *Fstll* aos 9 dias embrionários (E35) em relação a todos os outros estádios analisados. Um trabalho realizado em embriões de bovinos analisou a expressão de *Fstll* em diferentes estádios do desenvolvimento do músculo *longissimus*. Assim como no presente trabalho, os autores observaram uma menor expressão de *Fstll* em tecidos musculares nos estádios mais avançados de diferenciação (LEHNERT et al., 2007). Assim, apesar de as vias de regulação de *Fstll* na musculatura esquelética ainda não estarem bem estabelecidas, os resultados obtidos por este trabalho vêm adicionar mais informações sobre o papel do gene *Fstll* na determinação da miogênese.

Por fim, do estágio E35 ao E43 foi possível visualizar a relação entre a expressão do miR-206 e seus genes alvo, com uma coerência entre o aumento na expressão do miR-206 e a diminuição na expressão de *Polal* e *Fstll*. Entretanto, após este estágio não observamos mais esta relação. Isto pode estar ocorrendo: (1) ou porque a inibição realizada por este miRNA não implica na degradação do RNAm, de modo que identificamos sua presença apesar dele não estar ativo naquele momento; ou (2) pelo fato da complexidade de ação deste *myomir*, que pode estar regulando inúmeros outros genes alvo além dos selecionados para o presente trabalho; ou ainda (3) porque a regulação destes genes depende também de outros fatores, além da inibição via miR-206.

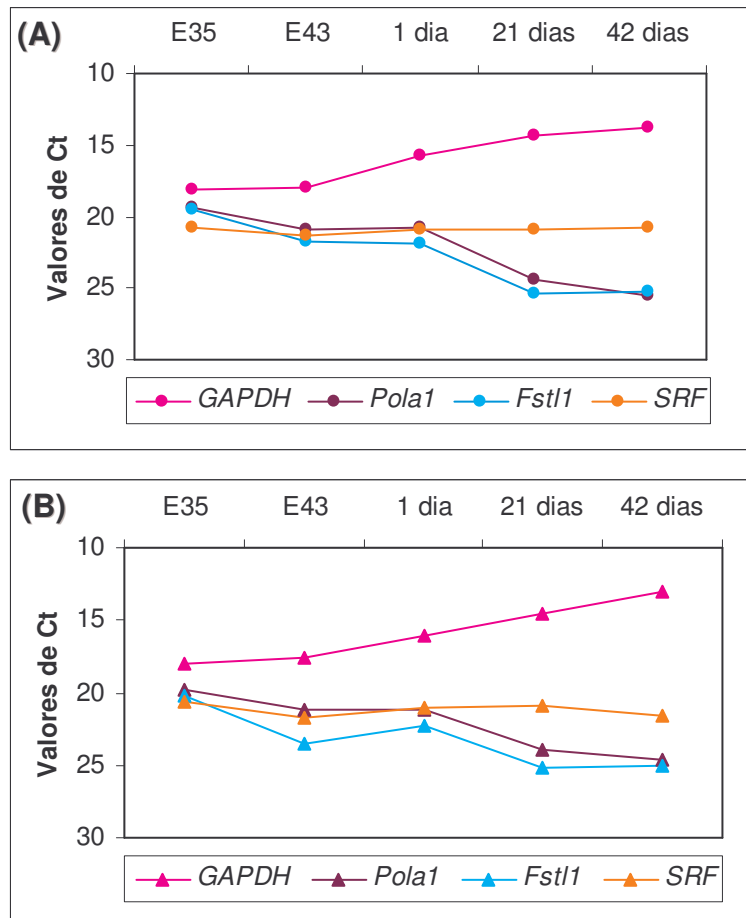


Figura 9. Ontogenia dos genes *GAPDH*, *SRF*, *Fstl1* e *Pola1* na linhagem de postura (CC) (A) e de corte (TT) (B).

5 CONCLUSÕES

- Foram identificados na musculatura peitoral de frangos jovens: 47 miRNAs conhecidos, sete miRNAs que ainda não haviam sido descritos em *G. gallus*, e seis seqüências candidatas a corresponderem a novos miRNAs. Estes dados poderão subsidiar trabalhos posteriores que busquem por possíveis genes alvos a serem regulados por estes miRNAs no tecido muscular, e/ou estudos funcionais para a determinação das vias de ação destas moléculas na musculatura esquelética.
- Os miRNAs miR-125b, miR-221 e miR-206 não foram diferencialmente expressos entre as linhagens de corte e postura, o que sugere que estes miRNAs não estão associados às vias de regulação que determinam o fenótipo muscular divergente entre as linhagens.
- O gene *SRF* não foi diferencialmente expresso entre as linhagens, o que pode indicar que: (1) este gene não atua na determinação das diferenças fenotípicas existentes entre as linhagens; ou (2) este gene determina sim as diferenças fenotípicas observadas, entretanto, que sua regulação ocorre num outro momento da expressão gênica.
- O gene *Fstl1* apresentou uma maior expressão na linhagem de postura em relação à de corte em embriões no estágio E43, sugerindo que a parada da proliferação e início da diferenciação celular ocorra mais precocemente na linhagem de postura em relação à de corte.
- O gene *Pola1* não apresentou expressão diferencial entre as linhagens nos estádios iniciais do desenvolvimento, mas sua expressão foi maior na linhagem de corte em relação à de postura em animais jovens (21 dias) e adultos (42 dias).
- Foi possível traçarmos a ontogenia dos miRNAs miR-125b, miR-221 e miR-206, e dos genes *SRF*, *Fstl1* e *Pola1* durante o desenvolvimento da musculatura esquelética peitoral. O perfil de expressão foi similar entre as linhagens de corte e postura e deu indícios sobre

a função destas moléculas no balanço entre proliferação e diferenciação das células musculares.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, B.D.; FURNEAUX, H.; WHITE, B.A. The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ER alpha) and represses ER alpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v.21, p.1132-1147, 2007.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Molecular biology of the cell**. 4. ed. New York: Garland Science, 2004. 1463p.
- ALVARES, L.E. **Quantificação da expressão dos fatores miogênicos e de Pax-3 durante o desenvolvimento embrionário de aves**. 2001. 132f. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Rio Claro, 2001.
- ALVES, H.J. **Identificação e caracterização de seqüências expressas (EST) na musculatura peitoral de frangos de corte**. 2004. 103f. Tese (Doutorado) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- AMBROS, V. A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to adult developmental switch in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v.57, p.49-57, 1989.
- AMTHOR, H.; CHRIST, B.; PATEL, K. A molecular mechanism enabling continuous embryonic muscle growth - a balance between proliferation and differentiation. **Development**, Cambridge, v.126, n.5, p.1041-1053, 1999.
- AMTHOR, H.; CHRIST, B.; WEIL, M.; PATEL, K. The importance of timing differentiation during limb muscle development. **Current Biology**, London, v.8, n.11, p.642-652, 1998.
- AMTHOR, H.; CONNOLLY, D.; PATEL, K.; BRAND-SABERI, B.; WILKINSON, D.G.; COOKE, J.; CHRIST, B. The expression and regulation of follistatin and follistatin-like gene during avian somite compartmentalization and myogenesis. **Developmental Biology**, New York, v.178, p.343-362, 1996.
- AMTHOR, H.; HUANG, R.; MCKINNELL, I.; CHRIST, B.; KAMBADUR, R. *et al.* The regulation and action of myostatin as a negative regulator of muscle development during avian embryogenesis. **Developmental Biology**, New York, v.251, p.241-257, 2002.
- ANDERSON, C.; CATOE, H.; WERNER, R. MIR-206 regulates connexin-43 expression during skeletal muscle development. **Nucleic Acids Research**, London, v.34, n.20, p.5863-5871, 2006.
- ANJOS, C.S. **Investigação de polimorfismos nos genes dos fatores miogênicos e miostatina como marcadores moleculares para características quantitativas em *Gallus gallus***. 2004. 109f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal e Pastagens) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.
- ARAVIN, A.; GAIDATZIS, D.; PFEFFER, S.; LAGOS-QUINTANA, M.; LANDGRAF, P.; IOVINO, N.; MORRIS, P.; BROWNSTEIN, M.J.; KURAMOCHI-MIYAGAWA, S.; NAKANO, T.; CHIEN, M.; RUSSO, J.J.; JU, J.; SHERIDAN, R.; SANDER, C.; ZAVOLAN,

M.; TUSCHL, T. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. **Nature**, London, v.442, p.203-207, 2006.

ARAVIN, A.; LAGOS-QUINTANA, M.; YALCIN, A.; ZAVOLAN, M.; MARKS, D.; SNYDER, B.; GAASTERLAND, T.; MEYER, J.; TUSCHI, T. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. **Developmental Cell**, Amsterdam, v.5, p.337-350, 2003.

ARAYA, R.; ECKARDT, D.; MAXEINER, S.; KRUGER, O.; THEIS, M.; WILLECKE, K.; SAEZ, J.C. Expression of connexins during differentiation and regeneration of skeletal muscle: functional relevance of connexin 43. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.118, p.27-37, 2005.

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

BARTEL, D.P. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism, and function. **Cell** Cambridge, v.116, p.281-297, 2004.

BEAUCHAMP, J.R.; HESLOP, L.; YU, D.S.W.; TAJBAKHSI, S.; KELLY, R.G.; WERNIG, A.; BUCKINGHAM, M.E.; PARTRIDGE, T.A.; ZAMMIT, P.S. Expression of CD34 and Myf5 defines the majority of quiescent adult skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v.151, n.6, p.1221-1234, 2000.

BEHM-ANSMANT, I.; REHWINKEL, J.; DOERKS, T.; STARK, A.; BORK, P.; IZAURRALDE, E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. **Genes & Development**, New York, v.20, p.1885-1898, 2006.

BEREZIKOV, E.; CHUNG, W.J.; WILLIS, J.; CUPPEN, E.; LAI, E.C. Mammalian mirtron genes. **Molecular Cell**, Cambridge, v.28, p.328-336, 2007.

BERNSTEIN, E.; CAUDY, A.A.; HAMMOND, S.M.; HANNON, G.J. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. **Nature**, London, v.409, p.363-366, 2001.

BIRCHMEIER, C.; BROHMANN, H. Genes that control the development of migrating muscle precursor cells. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.12, n.6, p.725-730, 2000.

BLADT, F.; RIETHMACHER, D.; ISENMANN, S.; AGUZZI, A.; BIRCHMEIER, C. Essential role for the c-met receptor in the migration of myogenic precursor cells into the limb bud. **Nature**, London, v.376, p.768-771, 1995.

BOBER, E.; FRANZ, T.; ARNOLD, H.H.; GRUSS, P.; TREMBLAY, P. Pax-3 is required for the development of limb muscles: a possible role for the migration of dermomyotomal muscle progenitor cells. **Development**, Cambridge, v.120, p.603-612, 1994.

- BOHNSACK, M.T.; CZAPLINSKI, K.; GORLICH, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. **RNA**, New York, v.10, p.185-191, 2004.
- BRACHT, J.; HUNTER, S.; EACHUS, R.; WEEKS, P.; PASQUINELLI, A.E. Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. **RNA**, New York, v.10, p.1586-1594, 2004.
- BRAND, T. Heart development: molecular insights into cardiac specification and early morphogenesis. **Developmental Biology**, New York, v.258, p.1-19, 2003.
- BRAND-SABERI, B.; EBENSPERGER, C.; WILTING, J.; BALLING, R.; CHRIST, B. The ventralizing effect of the notochord on somite differentiation in chick embryos. **Anatomy and Embryology**, Heidelberg, v.188, p.239-245, 1993.
- BRAUN, T.; BOBER, E.; BUSCHHAUSEN-DENKER, G.; KOHTZ, S.; GRZESCHIK, K.H.; ARNOLD, H.H.; KOTZ, S. Differential expression of myogenic determination genes in muscle cells: possible auto activation by the Myf gene products. **Embo Journal**, Oxford, v.8, p.3617-3625, 1989a.
- BRAUN, T.; BUSCHHAUSEN-DENKER, G.; BOBER, E.; TANNICH, E.; ARNOLD, H.H. A novel human muscle factor related to but distinct from MyoD1 induces myogenic conversion in 10T1/2 fibroblasts. **Embo Journal**, Oxford, v.8, p.701-709, 1989b.
- BRENNECKE, J.; STARK, A.; RUSSELL, R.B.; COHEN, S.M. Principles of microRNA-target recognition. **PLoS Biology**, San Francisco, v.3, n.3, e.85, 2005. doi:10.1371/journal.pbio.0030085.
- BROHMANN, H.; JAGLA, K.; BIRCHMEIER, C. The role of Lbx1 in migration of muscle precursor cells. **Development**, Cambridge, v.127, p.437-445, 2000.
- BRUNETTI, A.; GOLDFINE, I.D. Role of myogenin in myoblast differentiation and its regulation by fibroblast growth factor. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.265, p.5960-5963, 1990.
- BRYSON-RICHARDSON, R.J.; CURRIE, P.D. The genetics of vertebrate myogenesis. **Nature Reviews**, London, v.9, p.632-646, 2008.
- BUCKINGHAM, M.; BAJARD, L.; CHANG, T.; DAUBAS, P.; HADCHOUEL, J.; MEILLAC, S.; MONTARRAS, D.; ROCANCOURT, D.; RELAIX, F. The formation of skeletal muscle: from somite to limb. **Journal of Anatomy**, London, v.202, p.59-58, 2003.
- BUSHATI, N.; COHEN, S. M. microRNA functions. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.23, p.175-205, 2007.
- CAI, X.; HAGEDORN, C.H.; CULLEN, B.R. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. **RNA**, New York, v.10, p.1957-1966, 2004.

CALLIS, T.E.; DENG, Z.; CHEN, J.-F.; WANG, D.-Z. Muscling through the microRNA world. **Experimental Biology and Medicine**, Maywood, v.233, p.131-138, 2008.

CARE, A.; CATALUCCI, D.; FELICETTI, F.; BONCI, D.; ADDARIO, A.; GALLO, P.; BANG, M.-L.; SEGNALINI, P.; YUSU, G.; DALTON, N.D.; ELIA, L.; LATRONICO, M.V.G.; HØYDAL, M.; AUTORE, C.; RUSSO, M.A.; DORN, G.W.; ELLINGSEN, O.; RUIZ-LOZANO, P.; PETERSON, K.L.; CROCE, C.M.; PESCHLE, C.; CONDORELLI, G. MicroRNA-133 controls cardiac hypertrophy. **Nature Medicine**, New York, v.13, p.613-618, 2007.

CHAI, J.; TARNAWSKI, A.S. Serum response factor: discovery, biochemistry, biological roles and implications for tissue injury healing. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Kraków, v.53, n.2, p.147-157, 2002.

CHALFIE, M.; HORVITZ, H.R.; SULSTON, J.E. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v.24, p.59-69, 1981.

CHAN, Q.K.Y.; NGAN, H.Y.S.; IP, P.P.C.; LIU, V.W.S.; XUE, W.C.; CHEUNG, A.N.Y. Tumor suppressor effect of follistatin-like 1 in ovarian and endometrial Carcinogenesis - a differential expression and functional analysis. **Carcinogenesis**, London, v.30, n.1, p.114-121, 2009.

CHANOINE, C.; GASPERA, B.D.; CHARBONNIER, F. Myogenic regulatory factors: Redundant or specific functions? Lessons from *Xenopus*. **Developmental Dynamics**, New York, v.231, n.4, p.662-670, 2004.

CHEN, C.; LI, L.; LODISH, H.F.; BARTEL, D.P. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. **Science**, Washington, v.303, n.5654, p.83-86, 2003.

CHEN, J.F.; MANDEL, E.M.; THOMSON, J.M.; WU, Q.; CALLIS, T.E.; HAMMOND, S.M.; CONLON, F.L.; WANG, D.Z. The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. **Nature Genetics**, New York, v.38, p.228-233, 2006.

CHENDRIMADA, T.P.; FINN, K.J.; JI, X.; BAILLAT, D.; GREGORY, R.I.; LIEBHABER, S.A.; PASQUINELLI, A.E.; SHIEKHATTAR, R. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. **Nature**, London, v.447, p.823-828, 2007.

CHO, P.F.; POULIN, F.; CHO-PARK, Y.A.; CHO-PARK, I.B.; CHICOINE, J.D.; LASKO, P.; SONENBERG, G.N. A new paradigm for translational control: inhibition via 5'-3' mRNA tethering by Bicoid and the eIF4E cognate 4EHP. **Cell**, Cambridge, v.121, p.411-423, 2005.

CHRIST, B.; ORDAHL, C.P. Early stages of chick somite development. **Anatomy and Embryology**, Heidelberg, v.191, n.5, p.381-396, 1995.

CHUANG, J.C.; JONES, P.A. Epigenetics and microRNAs. **Pediatric Research**, Basel, v.61, p.24R-29R, 2007.

CLOP, A.; MARCQ, F.; TAKEDA, H.; PIROTTIN, D.; TORDOIR, X.; BIBE, B.; BOUIX, J.; CAIMENT, F.; ELSEN, J.M.; EYCHENNE, F.; LARZUL, C.; LAVILLE, E.; MEISH, F.; MILENKOVIC, D.; TOBIN, J.; CHARLIER, C.; GEORGES, M. A mutation creating a

potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. **Nature Genetics**, New York, v.38, p.813-818, 2006.

COLEMAN, M.E.; DEMAYO, F.; YIN, K.C.; LEE, H.M.; GESKE, R.; MONTGOMERY, C.; SCHWARTZ, R.J. Myogenic vector expression of insulin-like growth factor 1 stimulates muscle cell differentiation and myofiber hypertrophy in transgenic mice. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.270, p.12109-12116, 1995.

COOPER, R.N.; TAJBAKHSI, S.; MOULY, V.; COSSU, G.; BUCKINGHAM, M.; BUTLER-BROWNE, G.S. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. **Journal of Cell Science**, Cambridge, v.112, n.17, p.2895-2901, 1999.

CORNELISON, D.D.; OLWIN, B.B.; RUDNICKI, M.A.; WOLD, B.J. MyoD(-/-) satellite cells in single-fiber culture are differentiation defective and MRF4 deficient. **Developmental Biology**, New York, v.224, n.2, p.122-137, 2000.

CULLEN, B.R. Transcription and processing of human microRNA precursors. **Molecular Cell**, Cambridge, v.16, p.861-865, 2004.

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

DERRY, M.C.; YANAGIYA, A.; MARTINEAU, Y.; SONENBERG, N. Regulation of poly(A)-binding protein through PABP-interacting proteins. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, New York, v.71, p.537-543, 2006.

DIETRICH, S.; SCHUBERT, F.; HEALY, C.; SHARPE, P.; LUMSDEN, A. Specification of the hypaxial musculature. **Development**, Cambridge, v.125, p.2235-2249, 1998.

DIETRICH, S.; SCHUBERT, F.R.; LUMSDEN, A. A Control of dorsoventral pattern in chick paraxial mesoderm. **Development**, Cambridge, v.124, n.19, p.2235-2249, 1997.

DODSON, M.V.; MCFARLAND, D.C.; GRANT, A.L.; DOUMIT, M.E.; VELLEMAN, S.G. Extrinsic regulation of domestic animal-derived satellite cells. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v.13, p.107-126, 1996.

DOENCH, J.G.; SHARP, P.A. Specificity of microRNA target selection in translational repression. **Genes & Development**, New York, v.18, p.504-511, 2004.

DOLLENMEIER, P.; TURNER, D.C.; EPPENBERGER, H.M. Proliferation and differentiation of chick skeletal muscle cells cultured in a chemically defined medium. **Experimental Cell Research**, New York, v.135, p.47-61, 1981.

DOSTIE, J.; MOURELATOS, Z.; YANG, M.; SHARMA, A.; DREYFUSS, G. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. **RNA**, New York, v.9, p.180-186, 2003.

DUCLOS, M.J.; WILKIE, R.S.; GODDARD, C. Stimulation of DNA synthesis in chicken muscle satellite cells by insulin and insulinlike growth factors: evidence for exclusive

mediation by a type-I insulin-like growth factor. **Journal of Endocrinology**, London, v.128, p.35-42, 1991.

EBENSPERGER, C.; WILTING, J.; BRAND-SABERI, B.; MIZUTANI, Y.; CHRIST, B.; BALLING, R.; KOSEKI, H. *Pax-1*, a regulator of sclerotome development is induced by notochord and floor plate signals in avian embryos. **Revista: Ciências de la Actividad Física**, Valparaíso, v.191, n.4, p.297-310, 1995.

EDMONDSON, D.G.; OLSON, E.N. A gene with homology to the myc similarity region of MYOD1 is expressed during myogenesis and is sufficient to activate the muscle-differentiation program. **Genes & Development**, New York, v.3, p.628-640, 1989.

EPSTEIN, J.A.; SHAPIRO, D.N.; CHENG, J.; LAM, P.Y.; MAAS, R.L. Pax-3 modulates expression of the c-Met receptor during limb muscle development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.93, p.4213-4218, 1996.

FAN, C.M.; TESSIER-LAVIGNE, M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. **Cell**, Cambridge, v.79, n.7, p.1175-1186, 1994.

FIGUEIREDO, E.A.P.; ROSA, P.S.; SCHEUERMANN, G.N.; JAENISCH, F.R.F.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.; BRENTANO, L.; COSTA, C.A.F. Genetic gain in body weight feed conversion and carcass traits in White Plymouth Rock broiler strain Embrapa 021. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., Reunião da Associação Latinoamericana de Produção Animal, 18., 2003, Porto Alegre. Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003a.

FIGUEIREDO, E.A.P.; SCHMIDT, G.S.; LEDUR, M.C.; AVILA, V.S.; BRUM, P.A.R.; FIORENTIN, L.; JAENISCH, F.R.F. Genetic gain in egg production and egg weight in White Leghorn Embrapa 011. In: WORLD CONFERENCE ON ANIMAL PRODUCTION, 9., Reunião da Associação Latinoamericana de Produção Animal, 18., 2003, Porto Alegre. Porto Alegre: WAAP; ALPA; SBZ; UFRGS, 2003b.

FILIPOWICZ, W.; BHATTACHARYYA, S.N.; SONENBERG, N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? **Nature Reviews**, London, v.9, p.102-114, 2008.

FILIPOWICZ, W.; JASKIEWICZ, L.; KOLB, F.A.; PILLAI, R.S. Post-transcriptional gene silencing by siRNAs and miRNAs. **Current Opinion in Structural Biology**, Philadelphia, v.15, p.331-341, 2005.

FLORINI, J.R.; EWTON, D.Z. Induction of gene expression in muscle by the IGFs. **Growth Regulation**, London, v.2, p.23-29, 1992.

FLORINI, J.R.; MAGRI, K.A.; EWTON, D.Z.; JAMES, P.L.; GRINDSTAFF, K.; ROTWEIN, P.S. "Spontaneous" differentiation of skeletal myoblasts is dependent upon autocrine secretion of insulin-like growth factor-II. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.266, p.15917-15923, 1991.

FLYNT, A.S.; LI, N.; THATCHER, E.J.; SOLNICA-KREZEL, L.; PATTON, J.G. Zebrafish miR-214 modulates Hedgehog signaling to specify muscle cell fate. **Nature Genetics**, New York, v.39, p.259–263, 2007.

FOSCHINI, R.M.S.; RAMALHO, F.S.; BICAS, H.E.A. Células satélites musculares. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, São Paulo, v.67, n.4, p.681-687, 2004.

GAUTHIER-ROUVIERE, C.; VANDROMME, M.; TUIL, D.; LAUTREDOU, N.; MORRIS, M.; SOULEZ, M.; KAHN, A.; FERNANDEZ, A.; LAMB, N. Expression and activity of serum response factor is required for expression of the muscledetermining factor MyoD in both dividing and differentiating mouse C2C12 myoblasts. **Molecular Biology of the Cell**, Bethesda, v.7, p.719–729, 1996.

GILBERT, SF. **Developmental biology**. 8.ed. Sunderland: Sinauer Associates, 2006. 817p.

GIRALDEZ, A.J.; MISHIMA, Y.; RIHEL, J.; GROCOCK, R.J.; VAN DONGEN, S.; INOUE, K.; ENRIGHT, A.J.; SCHIER, A.F. Zebrafish miR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. **Science**, Washington, v.312, p.75-79, 2006.

GIRALDEZ, A.J.; CINALLI, R.M.; GLASNER, M.E.; ENRIGHT, A.J.; THOMSON, J.M.; BASKERVILLE, S.; HAMMOND, S.M.; BARTEL, D.P.; SCHIER, A.F. MicroRNAs Regulate Brain Morphogenesis in Zebrafish. **Science**, Washington, v.308, n.5723, p.833-838, 2005.

GOULDING, M.; LUMSDEN, A.; PAQUETTE, A.J. Regulation of Pax-3 expression in the dermomyotome and its role in muscle development. **Development**, Cambridge, v.120, p.957-971, 1994.

GREFTE, S.; KUIJPERS-JAGTMAN, A.M.; TORENSMA, R.; VON DEN HOFF, J.W. Skeletal muscle development and regeneration. **Stem Cells and Development**. New Rochelle, v.16, p.857–868, 2007.

GRIMAUD, C.; BANTIGNIES, F.; PAL-BHADRA, M.; GHANA, P.; BHADRA, U.; CAVALLI, G. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. **Cell**, Cambridge, v.124, p.957-971, 2006.

GRIMSON, A.; FARH, K.K.; JOHNSTON, W.K.; GARRETT-ENGELE, P.; LIM, L.; BARTEL, D.P. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. **Molecular Cell**, Cambridge, v.27, p.91-105, 2007.

GRISHOK, A.; PASQUINELLI, A.E.; CONTE, D.; LI, N.; PARRISH, S.; HA, I.; BAILLIE, D.L.; FIRE, A.; HUVKUN, G.; MELLO, C.C. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. **Cell**, Cambridge, v.106, p.23-24, 2001.

GROUND, M.D.; GARRETT, K.L.; LAI, M.C.; WRIGHT, W.E.; BEILHARZ, M.W. Identification of skeletal muscle precursor cells in vivo by use of MyoD1 and myogenin probes. **Cell and Tissue Research**, Heidelberg, v.267, n.1, p.99-104, 1992.

HAMBROCK, H.O.; KAUFMANN, B.; MULLER, S.; HANISCH, F.G.; NOSE, K.; PAULSSON, M.; MAURER, P.; HARTMANN, U. Structural characterization of TSC-36/Flik: analysis of two charge isoforms. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.279, p.11727-11735. 2004.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. A series of normal stages in the development of chick embryo. **Journal of Morphology**, New York, v.88, p.49-92, 1951.

HAMMOND, S.M.; BOETTCHER, S.; CAUDY, A.A.; KOBAYASHI, R.; HANNON, G.J. Argonaute 2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. **Science**, Washington, v.293, p.1146-1150, 2001.

HATFIELD, S.D.; SHCHERBATA, H.R.; FISCHER, K.A.; NAKAHARA, K.; CARTHEW, R.W.; RUOHOLA-BAKER, H. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. **Nature**, London, v.435, n.7044, p.974-978, 2005.

HAWKE, T.J.; GARRY, D.J. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.91, p.534-551, 2001.

HILLIER, L.W.; MILLER, W.; BIRNEY, E.; WARREN, W.; HARDISON, R.C.; PONTING, C.P.; BORK, P.; BURT, D.W. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, London, v.432, n.7018, p.695-716, 2004.

HODGSON, G.; HAGER, J.H.; VOLIK, S.; HARIONO, S.; WERNICK, M.; MOORE, D.; NOWAK, N.; ALBERTSON, D.G.; PINKEL, D.; COLLINS, C.; HANAHAN, D.; GRAY, J.W. Genome scanning with array CGH delineates regional alterations in mouse islet carcinomas. **Nature Genetics**, New York, v.29, p.459-464, 2001.

HUMPHREYS, D.T.; WESTMAN, B.J.; MARTIN, D.I.; PREISS, T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.102, p.16961-16966, 2005.

HUTVAGNER, G.; MCLACHLAN, J.; PASQUINELLI, A.E.; BALINT, E.; TUSCHL, T.; ZAMORE, P.D. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the *let-7* small temporal RNA. **Science**, Washington, v.293, p.834-838, 2001.

HWANG, W.; MENDEL, J.T. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. **British Journal of Cancer**, London, v.94, p.776-780, 2006.

INGHAM, P. Micromanaging the response to Hedgehog. **Nature**, London, v.39, n.2, p.145-146, 2007.

IORIO, M.V.; FERRACIN, M.; LIU, C.G.; VERONESE, A.; SPIZZO, R.; SABBIONI, S.; MAGRI, E.; PEDRIALI, M.; FABBRI, M.; CAMPIGLIO, M.; MENARD, S.; PALAZZO, J.P.; ROSENBERG, A.; MUSIANI, P.; VOLINIA, S.; NENCI, I.; CALIN, G.A.; QUERZOLI, P.; NEGRINI, M.; CROCE, C.M. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v.65, p.7065-7070, 2005.

JACKSON, R.J.; STANDART, N. How do microRNAs regulate gene expression? **Sci STKE Review**, v.2, n. 367, re.1, 2007. DOI: 10.1126/stke.3672007re1. Disponível em: <http://stke.sciencemag.org/cgi/content/full/sigtrans;2007/367/re1>. Acesso em: 16/11/2008.

JING, Q.; HUANG, S.; GUTH, S.; ZARUBIN, T.; MOTOYAMA, A.; CHEN, J.; DI PADOVA, F.; LIN, S.; GRAM, H.; HAN, J. Involvement of microRNA in AU-rich element-mediated mRNA instability. **Cell**, Cambridge, v.120, p.623-634, 2005.

JONES-RHOADES, M.W.; BARTEL, D.P.; BARTEL, B. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. **Annual Review of Plant Biology**, Palo Alto, v.57, p.19-53, 2006.

JORGE, E.C. **Identificação e caracterização de transcritos associados ao desenvolvimento e crescimento da musculatura esquelética em frangos (*Gallus gallus*)**. 2006. 150f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2006.

JORGE, E.C.; MONTEIRO-VITORELO, C.B.; ALVES, H.J.; SILVA, C.S.; BALAN, R.G.; PATRÍCIO, M.; COUTINHO, L.L. EST analysis of mRNA expressed during embryogenesis in *Gallus gallus*. **The International Journal of Developmental Biology**, Vizcaya, v.48, p.333-337. 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 427p.

KALDIS, P. Another piece of the p27 Kip1 puzzle. **Cell**, Cambridge, v.128, p.241-244, 2007.

KETTING, R.F.; FISCHER, S.E.; BERNSTEIN, E.; SIJEN, T.; HANNON, G.J.; PLASTERK, R.H. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. **Genes & Development**, New York, v.15, p.2654-2659, 2001.

KIM, H.K.; LEE, Y.S.; SIVAPRASAD, U.; MALHOTRA, A.; DUTTA, A. Muscle-specific microRNA miR-206 promotes muscle differentiation. **Journal of Cell Biology**, New York, v.174, p.677-687, 2006.

KIM, Y.K.; KIM, V.N. Processing of intronic microRNAs. **Embo Journal**, Oxford, v.26, p.775-783, 2007.

KIRIAKIDOU, M.; TAN, G.S.; LAMPRINAKI, S.; DE PLANELL-SAGUER, M.; NELSON, P.T.; MOURELATOS, Z. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. **Cell**, Cambridge, v.129, p.1141-1151, 2007.

KOISHI, K.; ZHANG, M.; MCLENNAN, I.S.; HARRIS, A.J. MyoD protein accumulates in satellite cells and is neurally regulated in regenerating myotubes and skeletal muscle fibers. **Developmental Dynamics**, New York, v.202, n.3, p.244-254, 1995.

KRICHEVSKY, A.M.; SONNTAG, K.; ISACSON, O.; KOSIK, K.S. Specific MicroRNAs modulate embryonic stem cell-derived neurogenesis stem cells. **Revista: Ciências de la Actividad Física**, Valparaíso, v.24, n.4, p.857-864, 2006.

KUANG, S.; CHARGÉ, S.B.; SEALE, P.; HUH, M.; RUDNICKI, M.A. Distinct roles for Pax7 and Pax3 in adult regenerative myogenesis. **Journal of Cell Biology**, New York, v.172, n.1, p.103-113, 2006.

KUNINGER, D.; KUZMICKAS, R.; PENG, B.; PINTAR, J.E.; ROTWEIN, P. Gene discovery by microarray: identification of novel gene induced during growth factor mediated muscle cell survival and differentiation. **Genomics**, Orlando, v.48, n.5, p.876-889, 2004.

LAGOS-QUINTANA, M.; RAUHUT, R.; YALCIN, A.; MEYER, J.; LENDECKEL, W.; TUSCHL, T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. **Current Biology**, London, v.12, p.735-739, 2002.

LANDGRAF, P.; RUSU, M.; SHERIDAN, R. et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. **Cell**, Cambridge, v.129, p.1401-1414, 2007.

LE SAGE, C.; NAGEL, R.; EGAN, D.A.; SCHRIER, M.; MESMAN, E.; MANGIOLA, A.; ANILE, C.; MAIRA, G.; MERCATELLI, N.; CIAFRE, S.N.; FARACE, M.G.; AGAMI, R. Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. **Embo Journal**, Oxford, v.26, p.3699-3708, 2007.

LECELLIER, C.H.; DUNOYER, P.; ARAR, K.; LEHMANN-CHE, J.; EYQUEM, S.; HIMBER, C.; SAÏB, A.; VOINNET, O. A cellular MicroRNA mediates antiviral defense in human cells. **Science**, Washington, v.308, n.5721, p.557-560, 2005.

LEDUR, M.C.; ZANELLA, E.L.; SCHMIDT, G.S.; JAENISCH, F.R.F.; SILVA, V. S.; VENTURA, L.; COUTINHO, L.L. Divergence of strains and strain crosses used to develop new reference populations for QTL studies in poultry. In: **WORLD'S POULTRY CONGRESS, 21.**, 2000, Montreal. **Proceedings...** Montreal: Organizing Committee World Poultry Congress, 2000. 1 CD-ROM.

LEE, E.J.; BAEK, M.; NUOVO, G.J.; CHEN, C. SCHMITTGEN, T.D. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines and tumors. **RNA**, New York, v.14, p.1-8, 2008.

LEE, R.C.; FEINBAUM, R.L.; AMBROS, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. **Cell**, Cambridge, v.75, p.843-854, 1993.

LEE, Y.; AHN, C.; HAN, J.; CHOI, H.; KIM, J.; YIM, J.; LEE, J.; PROVOST, P.; RÅDMARK, O.; KIM, S.; KIM, V.N. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. **Nature**, London, v.425, p.415-419, 2003.

LEE, Y.; JEON, K.; LEE, J.T.; KIM, S.; KIM, V.N. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. **Embo Journal**, Oxford, v.21, p.4663-4670, 2002.

LEE, Y.S.; KIM, H.K.; CHUNG, S.; KIM, K.S.; DUTTA, A. Depletion of Human MicroRNA miR-125b Reveals That It Is Critical for the Proliferation of Differentiated Cells but Not for the Downregulation of Putative Targets during Differentiation. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.280, n.17, p.16635-16641, 2005.

LEHNERT, S.A.; REVERTER, A.; BYRNE, K.A.; WANG, Y.; NATTRASS, G.S.; HUDSON, N.J.; GREENWOOD, P.L. Gene expression studies of developing bovine *longissimus* muscle from two different beef cattle breeds. **BMC Developmental Biology**, v.7, n.95, 2007. doi:10.1186/1471-213X-7-95. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1471-213X/7/95>. Acesso em: 10/10/2008.

LEWIS, B.P.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. **Cell**, Cambridge, v.120, p.15-20, 2005.

LIM, L.P.; LAU, N.C.; WEINSTEIN, E.G.; ABDELHAKIM, A.; YEKTA, S.; RHOADES, M.W.; BURGE, C.B.; BARTEL, D.P. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. **Genes & Development**, New York, v.17, p.991-1008, 2003.

LIN, S.Y.; JOHNSON, S.M.; ABRAHAM, M.; VELLA, M.C.; PASQUINELLI, A.; GAMBERI, C.; GOTTLIEB, E.; SLACK, F.J. The *C. elegans* hunchback homolog, *hbl-1*, controls temporal patterning and is a probable microRNA target. **Developmental Cell**, Amsterdam, v.4, p.639–650, 2003.

LINGEL, A.; SIMON, B.; IZAURRALDE, E.; SATTLER, M. Structure and nucleic-acid binding of the *Drosophila* Argonaute 2 PAZ domain. **Nature**, London, v.426, p.465-469, 2003.

LIU, J.; RIVAS, F.V.; WOHLSCHEGEL, J.; YATES III, J.R.; PARKER, R.; HANNON, G.J. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. **Nature Cell Biology**, London, v.7, p.1261–1266, 2005.

LIU, J.; CARMELL, M.A.; RIVAS, F.V.; MARSDEN, C.G.; THOMSON, J.M.; SONG, J.J.; HAMMOND, S.M.; JOSHUA-TOR, L.; HANNON, G.J. Argonaute 2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. **Science**, Washington, v.305, p.1437-4114, 2004.

LIU, N.; WILLIAMS, A.H.; KIM, Y.; MCANALLY, J.; BEZPROZVANNAYA, S.; SUTHERLAND, L.B.; RICHARDSON, J.A.; BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. An intragenic MEF2-dependent enhancer directs muscle-specific expression of microRNAs 1 and 133. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.104, n.52, p.20844–20849, 2007.

LIU, S.; WANG, L.; WANG, W.; LIN, J.; HAN, J.; SUN, H.; GUO, H.; SUN, R.; WU, Q. TSC-36/FRP inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and migration. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v.80, p.132-140, 2006.

LU, J.; MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. Regulation of skeletal myogenesis by association of the MEF2 transcription factor with class II histone deacetylases. **Molecular Cell**, Cambridge, v.6, p.233-244, 2000.

LUKIW, W.J.; CUI, G.; LI, Y.Y.; CULICCHIA, F.J. Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). **Neurooncology**, Heidelberg, v.91, p.27–32, 2009.

LUND, E.; GUTTINGER, S.; CALADO, A.; DAHLBERG, J.E.; KUTAY, U. Nuclear export of microRNA precursors. **Science**, Washington, v.303, p.95–98, 2004.

LYTLE, J.R.; YARIO, T.A.; STEITZ, J.A. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.104, p.9667–9672, 2007.

MARCHESIN, M.L. **Análise da expressão gênica de MyoD, MRF4, miogenina e miostatina nos músculos *Biceps femoris* e *Gastrocnemius lateralis* em duas linhagens de *Gallus gallus* (corte e postura)**. 2008. 61f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2008.

MASHIMO, J.; MANIWA, R.; SUGINO, H.; NOSE, K. Decrease in the expression of a novel TGF beta1- inducible and ras-recision gene, TSC-36, in human cancer cells. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.113, p.213–219, 1997.

MASSAGUE, J.; CHEIFETZ, S.; ENDO, T.; NADAL-GINARD, B. Type beta transforming growth factor is an inhibitor of myogenic differentiation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.83, p.8206-8210, 1986.

MATHONNET, G.; FABIAN, M.R.; SVITKIN, Y.V.; PARSYAN, A.; HUCK, L.; MURATA, T.; BIFFO, S.; MERRICK, W.C.; DARZYNKIEWICZ, E.; PILLAI, R.S.; DUCHAINE, T.F.; SONENBERG, N. microRNA inhibition of translation initiation *in vitro* by targeting the cap-binding complex eIF4F. **Science**, Washington, v.317, p.1764-1767, 2007.

MAURO, A. Satellite cells of skeletal muscle fibers. **Journal of Biophysics and Biochemical Cytology**, New York, v.9, p.493–495, 1961.

MCCARTHY, J.J. MicroRNA-206: The skeletal muscle-specific myomiR. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.1779, n.11, p.682-691, 2008.

MCCARTHY, J.J.; ESSER, K.A. MicroRNA-1 and microRNA-133a expression are decreased during skeletal muscle hypertrophy. **Journal of Applied Physiology**, Bethesda, v.102, p.306-313, 2007.

MCPHERRON, A.C.; LEE, S.J. Double muscle in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.94, p.12457-12461, 1997.

MCPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M.; LEE, S.J. Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily. **Nature**, London, v.387, p.83-90, 1997.

MEDINA, R.; ZAIDI, S.K.; LIU, C.G.; STEIN, J.L.; VANWIJNEN, A.J.; CROCE, C.M.; STEIN, G.S. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. **Cancer Research**, Chicago, v.68, n.8, p.2773-2780, 2008.

MINER, J.H.; WOLD, B. Herculín, a fourth member of the MyoD family of myogenic regulatory genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.87, p.1089–1093, 1990.

MIURA, P.; JASMIN, B.J. Utrophin upregulation for treating Duchenne or Becker muscular dystrophy: how close are we? **Trends in Molecular Medicine**, Oxford, v.12, p.122-129, 2006.

MIZUNO, Y.; YAGI, K.; TOKUZAWA, Y.; KANESAKI-YATSUKA, Y.; SUDA, T.; KATAGIRI, T.; FUKUDA, T.; MARUYAMA, M.; OKUDA, A.; AMEMIYA, T.; KONDOH, Y.; TASHIRO, H.; OKAZAKI, Y. miR-125b inhibits osteoblastic differentiation by down-regulation of cell proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.368, p.267-272, 2008.

MOLNÁR, A.; SCHWACH, F.; STUDHOLME, D.J.; THUENEMANN, E.C.; BAULCOMBE, D.C. miRNAs control gene expression in the single-cell alga *Chlamydomonas reinhardtii*. **Nature**, London, v.447, p.1126-1129, 2007.

MOSS, F.P. The relationship between the dimensions of the fibres and the number of nuclei during normal growth of skeletal muscle in the domestic fowl. **The American Journal of Anatomy**, Lancaster, v.122, p.555-564, 1968.

MURCHISON, E.P.; KHERADPOUR, P.; SACHIDANANDAM, R.; SMITH, C.; HODGES, E.; XUAN, Z.; KELLIS, M.; GRÜTZNER, F.; STARK, A.; HANNON, G.J. Conservation of small RNA pathways in platypus. **Genome Research**, Woodbury, v.18, p.995-1004, 2008.

NAGUIBNEVA, I.; AMEYAR-ZAZOUA, M.; POLESSKAYA, A.; AIT-SI-ALI, S.; GROISMAN, R.; SOUIDI, M.; CUVELLIER, S.; HAREL-BELLAN, A. The microRNA *miR-181* targets the homeobox protein Hox-A11 during mammalian myoblast differentiation. **Nature Cell Biology**, London, v. 8, n.3, p. 278-284, 2006.

NAYA, F.J.; OLSON, E.N. MEF2: a transcriptional target for signalling pathways controlling skeletal muscle growth and differentiation. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v.11, p.638-683, 1999.

NIELSEN, C.B.; SHOMRON, N.; SANDBERG, R.; HORNSTEIN, E.; KITZMAN, J.; BURGE, C.B. Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. **RNA**, New York, v.13, p.1894-1910, 2007.

NOTTROTT, S.; SIMARD, M.J.; RICHTER, J.D. Human *let-7a* miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v.13, p.1108-1114, 2006.

OLGUIN, H.C.; OLWIN, B.B. Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal. **Developmental Biology**, New York, v.275, n.2, p.375-388, 2004.

OLSEN, P.H.; AMBROS, V. The *lin-4* regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. **Developmental Biology**, New York, v.216, p.671-680, 1999.

OLSON, E.N.; STERNBERG, E.; HU, J.S.; SPIZZ, G.; WILCOX, C. Regulation of myogenic differentiation by type beta transforming growth factor. **Journal of Cell Biology**, New York, v.103, p.1799-1805, 1986.

PARKER, R.; SONG, H. The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v.11, p.121–127, 2004.

PATEL, K.; CONNOLLY, D.J.; AMTHOR, H.; NOSE, K.; COOKE, J. Cloning and early dorsal axial expression of Flik, a chick follistatin-related gene: evidence for involvement in dorsalization/neural induction. **Developmental Biology**, New York, v.178, p.327–342, 1996.

PATRÍCIO, K. (da Universidade de São Paulo). Caracterização Morfológica e Análise da Expressão de Miosina em Diferentes Estádios de Desenvolvimento de *Gallus gallus*.

PAULEY, K.M.; EYSTATHIOY, T.; JAKYMIW, A.; HAMEL, J.C.; FRITZLER, M.F.; EDWARD, K.L. Formation of GW bodies is a consequence of microRNA genesis. **Embo Journal**, Oxford, v.7, n.8, p.904–910, 2006.

PETERSEN, C.P.; BORDELEAU, M.E.; PELLETIER, J.; SHARP, P.A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. **Molecular Cell**, Cambridge, v.21, p.533–542, 2006.

PFAFFL, M.W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, London, v.29, n.9, p.2002–2007, 2001.

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. **Nucleic Acids Research**, London, v.30, n.0, p.e36, 2002. Disponível em: <http://www.gene-quantification.de/pfaffl-et-al-nar-2002.pdf>. Acesso em: 12/01/2009.

PFEFFER, S.; ZAVOLAN, M.; GRASSER, F.A.; CHIEN, M.; RUSSO, J.J.; JU, J.; JOHN, B.; ENRIGHT, A.J.; MARKS, D.; SANDER, C.; TUSCHL, T. Identification of virus-encoded microRNAs. **Science**, Washington, v.304, p.734–736, 2004.

PILLAI, R.S. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? **RNA**, New York, v.11, p.1753–1761, 2005.

PILLAI, R.S.; BHATTACHARYYA, S.N.; ARTUS, C.G.; ZOLLER, T.; COUGOT, N.; BASYUK, E.; BERTRAND, E.; FILIPOWICZ, W. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. **Science**, Washington, v.309, p.1573–1576, 2005.

PILLAI, R.S.; BHATTACHARYYA, S.N.; FILIPOWICZ, W. Repression of protein synthesis by miRNAs: how many mechanisms? **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v.17, n.3, p.118–126. 2006.

POURQUIE, O. Vertebrate somitogenesis. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.17, p.311–350, 2001.

POWELL, M.E.; GUSTAFSSON, M.K.; EMERSON JUNIOR, C.P. Myogenic Regulatory Factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, Palo Alto, v.18, p.747–783, 2002.

POY, M.N.; ELIASSON, L.; KRUTZFELDT, J.; KUWAJIMA, S.; MA, X.; MACDONALD, P.E.; PFEFFER, S.; TUSCHL, T.; RAJEWSKY, N.; RORSMAN, P.; STOFFEL, M. A

pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. **Nature**, London, v.432, p.226-230, 2004.

PURI, P.L.; SARTORELLI, V. Regulation of muscle regulatory factors by DNA binding, interacting proteins, and post-transcriptional modifications. **Journal of Cellular Physiology**, Philadelphia, v.185, n.2, p.155-173, 2000.

RANA, T.M. Illuminating the silence: understanding the structure and function of small RNAs. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v.8, p.23-36, 2007.

RAO, P.K.; KUMAR, R.M.; FARKHONDEH, M.; BASKERVILLE, S.; LODISH, H.F. Myogenic factors that regulate expression of muscle-specific microRNAs. **Developmental Biology**, New York, v.103, n.23, p.8721-8726, 2006.

RASMUSSEN, R. Quantification on the LightCycler. In: MEUER, S.; WITTER, C.; NAKAGAWARA, K. (Ed.). **Rapid cycle real time PCR - Methods and applications**. Heidelberg: Springer, 2001. p.21-34.

REINHART, B.J.; SLACK, F.J.; BASSON, M.; PASQUINELLI, A.E.; BETTINGER, J.C.; ROUGVIE, A.E.; HORVITZ, H.R.; RUVKUN, G. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, London, v.403, n.6772, p.901-906, 2000.

RELAIX, F.; MONTARRAS, D.; ZAFFRAN, S.; GAYRAUD-MOREL, B.; ROCANCOURT, D.; TAJBAKHSI, S.; MANSOURI, A.; CUMANO, A.; BUCKINGHAM, M.E. Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. **Journal of Cell Biology**, New York, v.172, p.91-102, 2006.

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

RONG, P.M.; TEILLET, M.A.; ZILLER, C.; LE DOUARIN, N.M. The neural tube/notochord complex is necessary for vertebral but not limb and body wall striated muscle differentiation. **Development**, Cambridge, v.115, p.657-672, 1992.

ROSENBERG, M.I.; GEORGES, S.A.; ASAWACHAICHARN, A.; ANALAU, E.; TAPSCOTT, S.J. MyoD inhibits Fstl1 and Utrn expression by inducing transcription of miR-206. **Journal of Cell Biology**, New York, v. 175, p. 77:85, 2006.

ROUHI, A.; MAGER, D.L.; HUMPHRIES, R.K.; KUCHENBAUER, F. MiRNAs, epigenetics, and cancer. **Mammalian Genome**, New York, v.19, n.7-8, p.517-525, 2008.

RUBY, J.G.; JAN, C.; PLAYER, C.; AXTELL, M.J.; LEE, W.; NUSBAUM, C.; GE, H.; BARTEL, D.P. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v.127, p.1193-1207, 2006.

RUBY, J.G.; JAN, C.H.; BARTEL, D.P. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. **Nature**, London, v.448, p.83-86, 2007.

SCAAL, M.; GROS, J.; LESBROS, C.; MARCELLE, C. In ovo eletroporation of avian somites. **Developmental Dynamics**, New York, v.229, n.3, p.643-650, 2004.

SCHMIDT, C.; CHRIST, B.; MADEN, M.; BRAND-SABERI, B.; PATEL, K. Regulation of *Epha4* expression in paraxial and lateral plate mesoderm by ectoderm-derived signals. **Developmental Dynamics**, New York, v.220, n.4, p.377-386, 2001.

SCHRATT, G.; WEINHOLD, B.; LUNDBERG, A.S.; SCHUCK, S.; BERGER, J.; SCHWARZ, H.; WEINBERG, R.A.; RÜTHER, U.; NORDHEIM, A. Serum Response Factor Is Required for Immediate-Early Gene Activation yet Is Dispensable for Proliferation of Embryonic Stem Cells. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.21, n.8, p.2933-2943, 2001.

SCHWARZ, D.S.; ZAMORE, P.D. Why do miRNAs live in the miRNP? **Genes & Development**, New York, v.16, p.1025–1031, 2002.

SCOTT, G.K.; GOGA, A.; BHAUMIK, D.; BERGER, C.E.; SULLIVAN, C.S.; BENZ, C.C. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.1479-1486, 2007.

SEALE, P.; SABOURIN, L.A.; GIRGIS-GABARDO, A.; MANSOURI, A.; GRUSS, P.; RUDNICKI, M.A. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. **Cell**, Cambridge, v.102, n.3, p.777-786, 2000.

SEGGERSON, K.; TANG, L.; MOSS, E.G. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. **Developmental Biology**, New York, v.243, p.215-225, 2002.

SEMPERE, L.F.; SEMPERE, L.F.; FREEMANTLE, S.; PITHA-ROWE, I.; MOSS, E.; DMITROVSKY, E.; AMBROS, V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. **Genome Biology**, London, v.5, n.3, R13. 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15003116>. Acesso em: 26/12/2008.

SEN, G.L.; BLAU, H.M. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. **Nature Cell Biology**, London, v.7, p.633–636, 2005.

SHIBANUMA, M.; MASHIMO, J.; MITA, A.; KUROKI, T.; NOSE, K. Cloning from a mouse osteoblastic cell line of a set of transforming-growth-factor-beta 1-regulated genes, one of which seems to encode a follistatin related polypeptide. **European Journal of Biochemistry**, Oxford, v.217, p.13–19, 1993.

SOKOL, N.S.; AMBROS, V. Mesodermally expressed Drosophila microRNA-1 is regulated by Twist and is required in muscles during larval growth. **Genes & Development**, New York, v.19, p.2343–2354, 2005.

SOMI, S.; BUFFING, A.A.; MOORMAN, A.F.M.; VAN DEN HOFF, M.J.B. Dynamic patterns of expression of BMP isoforms 2,4,5,6, and 7 during chicken heart development. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, Hoboken, v.279, p.636–651, 2004.

SONG, J.J.; LIU, J.; TOLIA, N.H.; SCHNEIDERMAN, J.; SMITH, S.K.; MARTIENSSEN, R.A.; HANNON, G.J.; JOSHUA-TOR, L. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v.10, p.1026–1032, 2003.

SOULEZ, M.; GAUTHIER-ROUVIERE, C.; CHAFEY, P.; HENTZEN, D.; VANDROMME, M.; LAUTREDOU, N.; LAMB, N.; KAHN, A.; TUIL, D. Growth and differentiation of C2 myogenic cells are dependent on serum response factor. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v.16, n.11, p.6065–6074, 1996.

STANDART, N.; JACKSON, R.J. MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs *in vitro* by inhibiting initiation and promoting deadenylation. **Genes & Development**, New York, v.21, p.1975–1982, 2007.

STOCKDALE, F.S.; NIKOVITS JUNIOR, W.; CHRIST, B. Molecular and cellular biology of avian somite development. **Developmental Dynamics**, New York, v.219, p.304–321, 2000.

SUMITOMO, K.; KURISAKI, A.; YAMAKAWA, N.; TSUCHIDA, K.; SHIMIZU, E.; SONE, S.; SUGINO, H. Expression of a TGF-beta1 inducible gene, TSC-36, causes growth inhibition in human lung cancer cell lines. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.155, p.37–46, 2000.

SUN, Q.; ZHANG, Y.; YANG, G.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; CAO, G.; WANG, J.; SUN, Y.; ZHANG, P.; FAN, M.; SHAO, N.; YANG, X. Transforming growth factor-beta-regulated miR-24 promotes skeletal muscle differentiation. **Nucleic Acids Research**, London, v.36, n.8, p.2690–2699, 2008.

SWEETMAN, D.; RATHJEN, T.; JEFFERSON, M.; WHEELER, G.; SMITH, T.G.; WHEELER, G.N.; MUNSTERBERG, A.; DALMAY, T. FGF-4 Signaling is involved in mir-206 expression in developing somites of chicken embryos. **Developmental Dynamics**, New York, v.235, p.2185–2191, 2006.

TAJBAKHSH, S.; BUCKINGHAM, M.E. The birth of muscle progenitor cells in the mouse: spatiotemporal considerations. **Current Topics in Developmental Biology**, New York, v.48, p.225–268, 2000.

TANG, G. siRNA and miRNA: an insight into RISCs. **Trends in Biochemical Sciences**, Amsterdam, v.30, p.106–114, 2005.

TANZER, A.; STADLER, P.F. Molecular evolution of a microRNA cluster. **Journal of Molecular Biology**, London, v.339, p.327–335, 2004.

TAPSCOTT, S.J. The circuitry of a master switch: MyoD and the regulation of skeletal muscle gene transcription. **Development**, Cambridge, v.132, p.2685–2695, 2005.

TOWERS, P.; PATEL, K.; WITHINGTON, S.; ISAAC, A.; COOKE, J. Flik, a chick follistatin-related gene, functions in gastrular dorsalisation/neural induction and in subsequent maintenance of midline Sonic hedgehog signalling. **Developmental Biology**, New York, v.214, p.298–317, 1999.

TSUCHIYA, S.; OKUNO, Y.; TSUJIMOTO, G. MICRORNA: Biogenetic and Functional Mechanisms and Involvements in Cell Differentiation and Cancer. **Journal of Pharmacological Science**, Tokyo, v.101, p.267-270, 2006.

VAN DEN BERG, G.; SOMI, S.; BUFFING, A.A.M.; MOORMAN, A.F.M.; VAN DEN HOFF, M.J.B. Patterns of expression of the follistatin and follistatin-like1 genes during chicken heart development: a potential role in valvulogenesis and late heart muscle cell formation. **The Anatomical Record. Part A, Discoveries in Molecular, Cellular, and Evolutionary Biology**, Hoboken, v.290, p.783-787, 2007.

VANDROMME, M.; GAUTHIER-ROUVIERE, C.; CARNAC, C.; LAMB, N.; FERNANDEZ, A. Serum response factor p67 (SRF) is expressed and required during myogenic differentiation of both mouse C2 and rat L6 muscle cell lines. **Journal of Cell Biology**, New York, v.118, p.1489-1500, 1992.

VASUDEVAN, S.; TONG, S.Y.; STEITZ, J.A. Cell cycle control of microRNA-mediated translation regulation. **Cell Cycle**, Austin, v.7, n.11, p.1545-1549, 2008.

VENKATESWARAN, V.; BRACHETT, E.J.; VIERCK, J.; CLOUD, J.G.; DODSON, M.V. Substratum is an important determinant in growth factor regulation of trout-derived satellite cells. **Basic and Applied Myology**, Heidelberg, v.5, p.297-304, 1995.

VISONE, R.; PALLANTE, P.; VECCHIONE, A.; CIROMBELLA, R.; FERRACIN, M.; FERRARO, A.; VOLINIA, S.; COLUZZI, S.; LEONE, V.; BORBONE, E.; LIU, C.G.; PETROCCA, F.; TRONCONE, G.; CALIN, G.A.; SCARPA, A.; COLATO, C.; TALLINI, G.; SANTORO, M.; CROCE, C.M.; FUSCO, A. Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. **Oncogene**, Basingstoke, v.29, p.7590-7595, 2007.

WARREN, W.C.; HILLIER, LAD.W.; GRAVES, J.A. et al. Genome analysis of the platypus reveals unique signatures of evolution. **Nature**, London, v.453, p.175-183, 2008.

WIGHTMAN, B.; HA, I.; RUVKUN, G. Posttranscriptional Regulation of the Heterochronic Gene *lin-14* by *lin-4* Mediates Temporal Pattern Formation in *C. elegans*. **Cell**, Cambridge, v.75, p.855-862, 1993.

WILLIAMS, A. E. Functional aspects of animal microRNAs. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Heidelberg, v.65, p.545-562, 2008.

WILLIAMS, B.A.; ORDAHL, C.P. Pax-3 expression in segmental mesoderm marks early stages in myogenic cells specification. **Development**, Cambridge, v.120, n.4, p.785-796, 1994.

WILUSZ, C.J.; WORMINGTON, M.; PELTZ, S.W. The cap-to-tail guide to mRNA turnover. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v.2, p.237-246, 2001.

WRIGHT, W.; SASSON, S.; LIN, V. Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. **Cell**, Cambridge, v.56, p.607-617, 1989.

WU, L.; FAN, J.; BELASCO, J.G. microRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, Washington, v.103, p.4034–4039, 2006.

XIAO, J.; LUO, X.; LIN, H.; ZHANG, Y.; LU, Y.; WANG, N.; ZHANG, Y.; YANG, B.; WANG, Z. MicroRNA miR-133 represses HERG K_pchannel expression contributing to QT prolongation in diabetic hearts. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.282, p.12363–12367, 2007.

YI, R.; QIN, Y.; MACARA, I.G.; CULLEN, B.R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. **Genes & Development**, New York, v.17, p.3011–3016, 2003.

YING, S.Y.; LIN, S.L. Intron-derived microRNAs - fine tuning of gene functions. **Gene**, Amsterdam, v.342, n.1, p.25–28, 2004.

ZAMMIT, P.S.; RELAIX, F.; NAGATA, Y.; RUIZ, A.P.; COLLINS, C.A.; PARTRIDGE, T.A.; BEAUCHAMP, J.R. Pax7 and myogenic progression in skeletal muscle satellite cells. **Journal of Cell Science**, Colchester, v.119, p.1824–1832, 2006.

ZENG, Y.; CULLEN, B.R. Sequence requirements for microRNA processing and function in human cells. **RNA**, New York, v.9, p.112–123, 2003.

ZHAO, J.J.; LIN, J.; YANG, H.; KONG, W.; HE, L.; MA, X.; COPPOLA, D.; CHENG, J.K. MicroRNA-221/222 Negatively Regulates Estrogen Receptor α and Is Associated with Tamoxifen Resistance in Breast Cancer. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.283, n.45, p.31079–31086, 2008.

ZHAO, Y.; SAMAL, E.; SRIVASTAVA, D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. **Nature**, London, v.436, p.214–220, 2005.

ZHU, X.; HADHAZY, M.; WEHLING, M.; TIDBALL, J.G.; MCNALLY, E.M. Dominant negative myostatin produces hypertrophy without hyperplasia in muscle. **FEBS Letters**, Amsterdam, v.474, p.71–75, 2000.

ZUKER, M. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. **Nucleic Acids Research**, London, v.31, p.3406–3415, 2003.

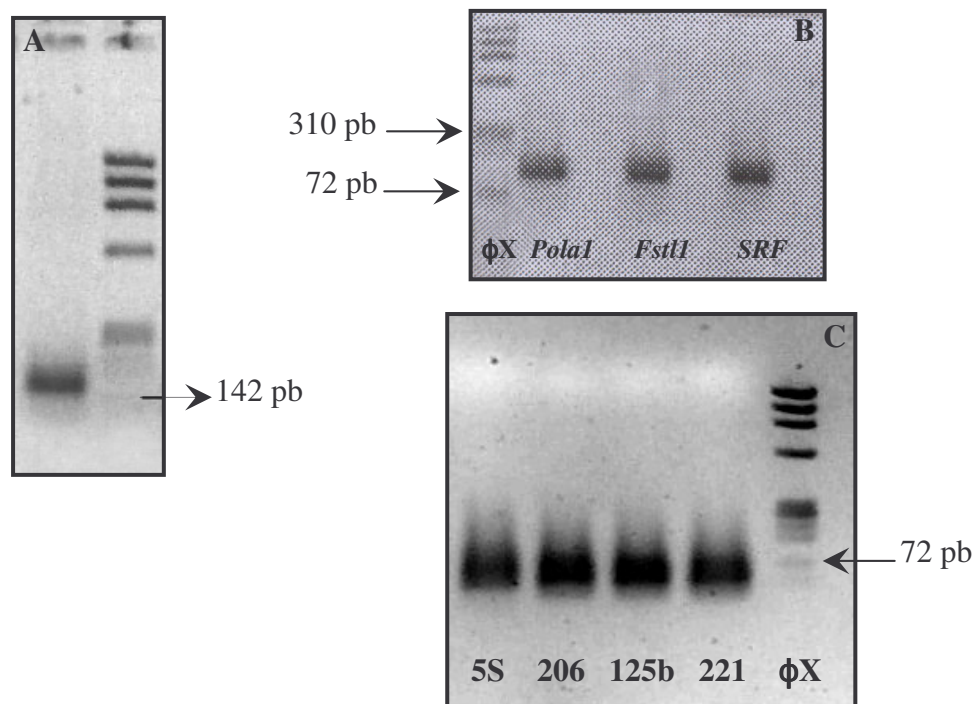
ANEXOS

ANEXO A. Outras classes de pequenos RNAs regulatórios e suas principais características.

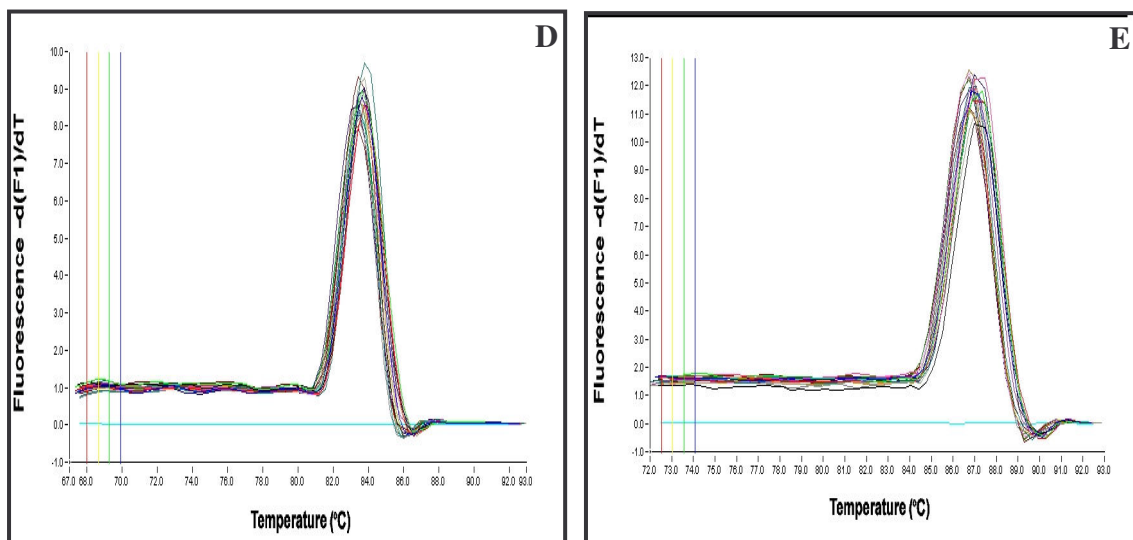
Classe	Tamanho (nt)	Estrutura precursora	Mecanismo de ação	Biogênese	Complexo protéico associado
miRNA	20-23	Grampos imperfeitos	Repressão traducional, clivagem do RNAm.	Dependente de Dicer	Ago
siRNA	20-23	Longos RNAs fita dupla	Clivagem do RNAm	Dependente de Dicer	Ago
piRNA	24-33	RNAs fita simples	Clivagem do RNAm em linhagens germinativas e controle de transposons. Regulação da estrutura da cromatina,	Independente de Dicer	Piwi
hcRNA	24	Longos RNAs fita dupla	controle de transposons, regulação da transcrição.	-	Ago
scnRNA	26-30	RNAs fita dupla	Regulação da estrutura da cromatina	Dependente de Dicer	Piwi

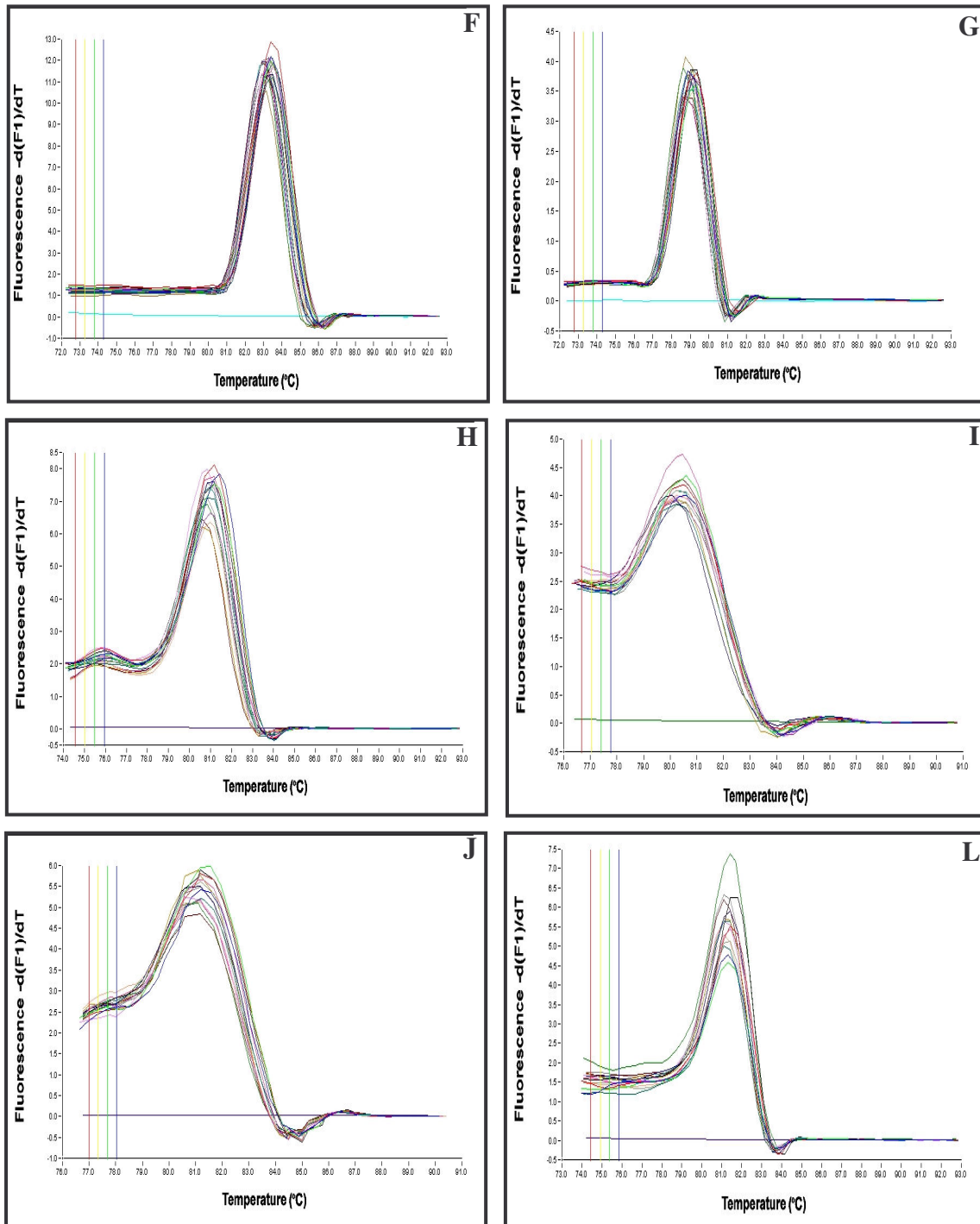
miRNA = microRNA, siRNA – *small interfering RNA*, piRNA = *Piwi-interacting small RNA*, hcRNA = *heterochromatic small RNA*, scnRNA = *scanRNA*.

ANEXO B. Confirmação da especificidade da PCR por eletroforese em gel e curvas de *Melting*.



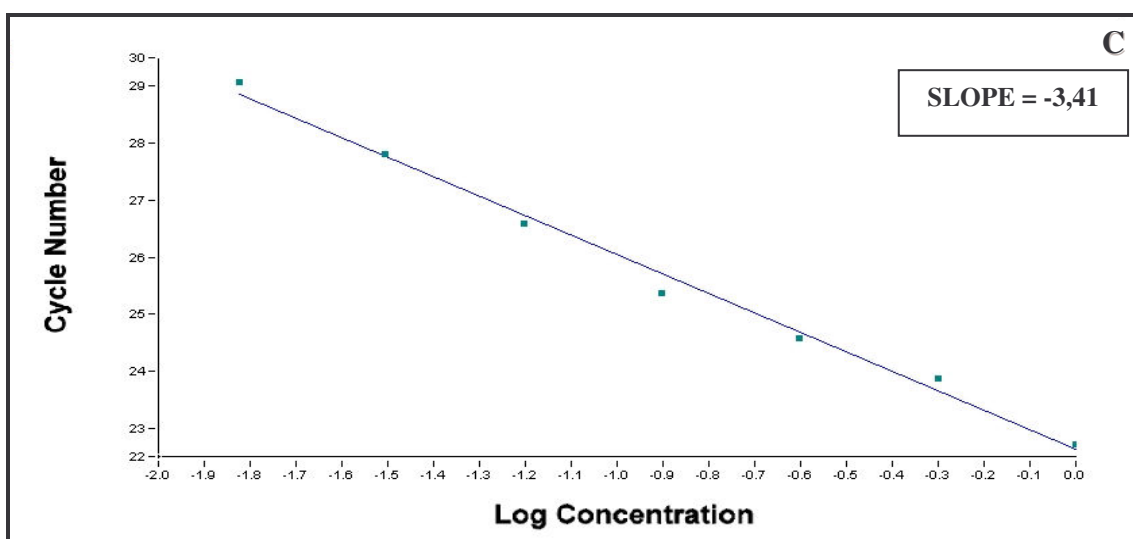
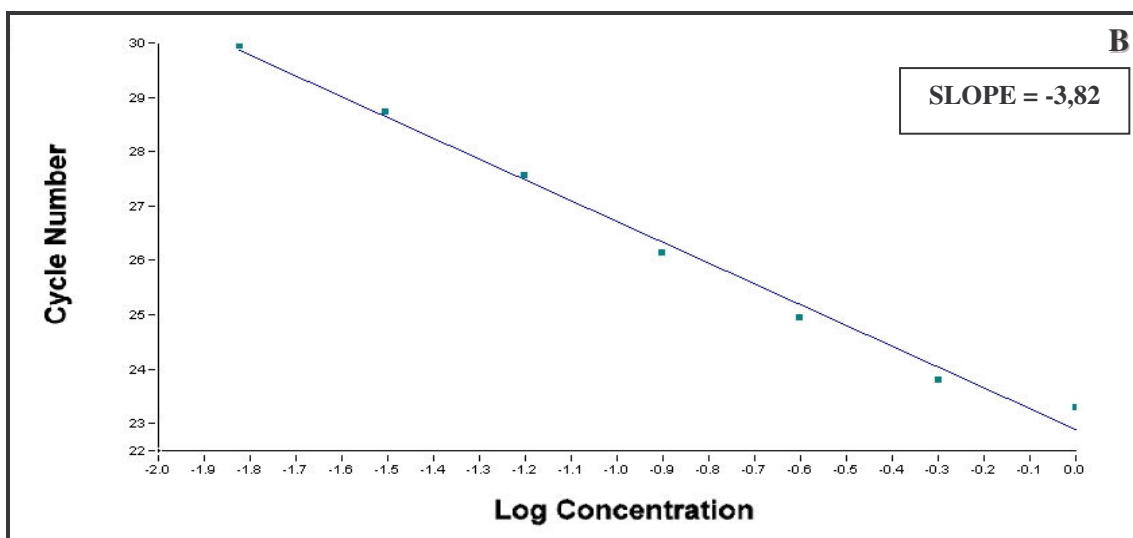
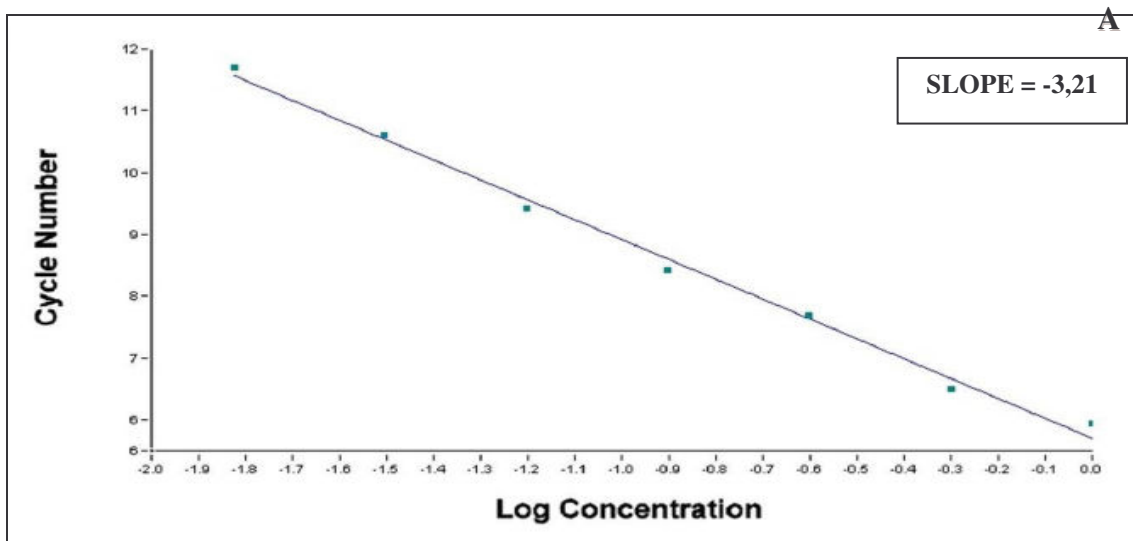
Figuras A, B e C. Visualização do produto da PCR em gel de agarose. A = Banda específica de 142 pb produto da amplificação do *GAPDH*; B = bandas específicas de cerca de 100 pb produtos da amplificação dos genes; C = bandas específicas de cerca de 60 pb produtos da amplificação dos miRNAs.

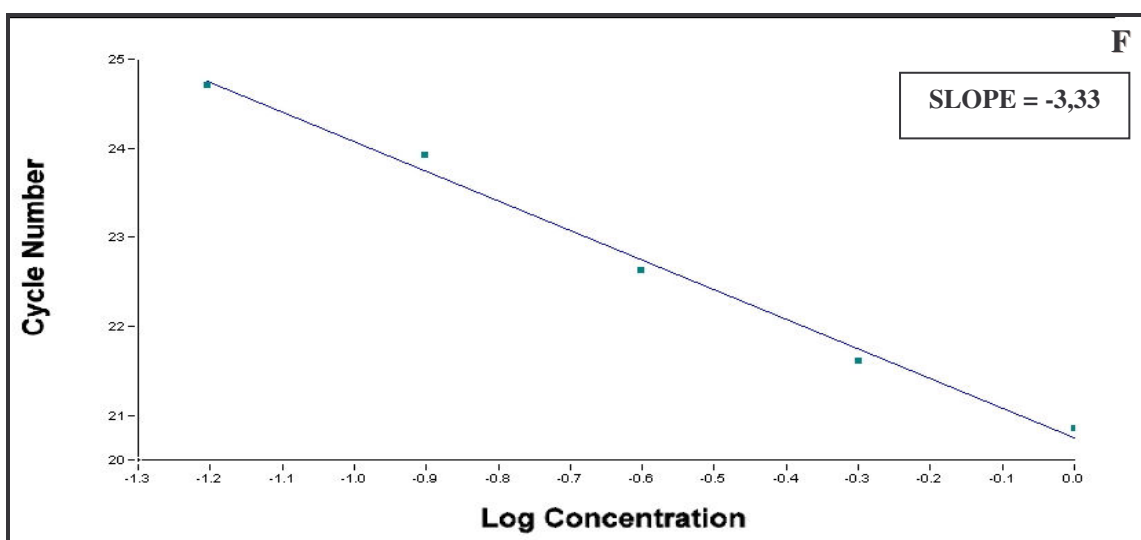
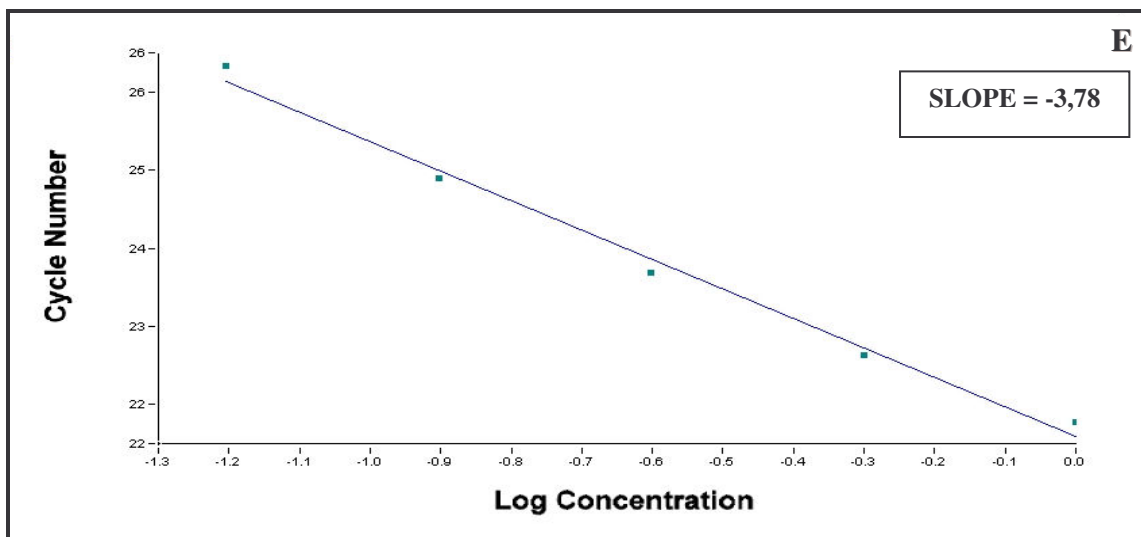
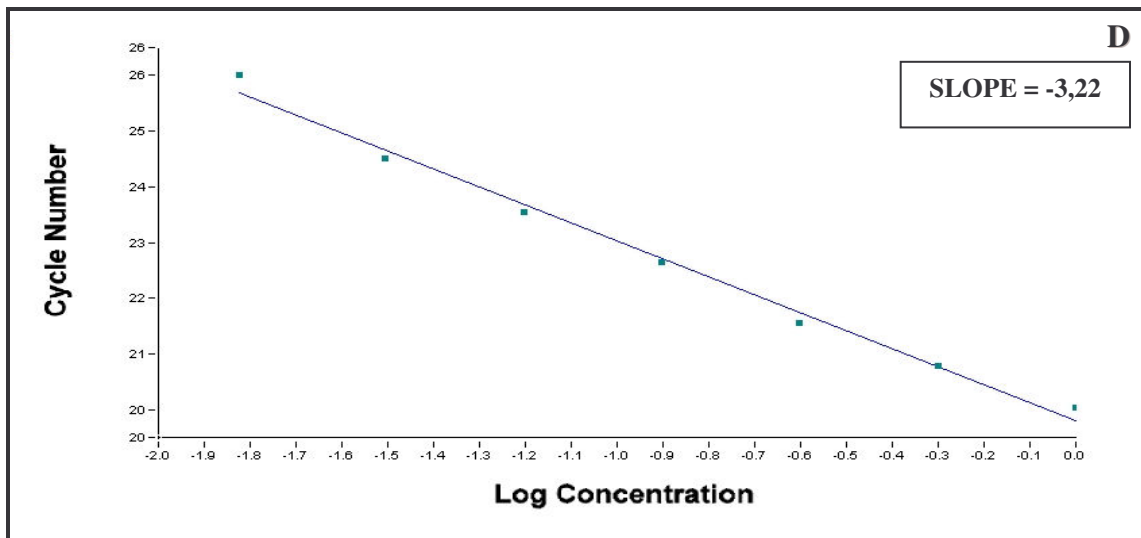


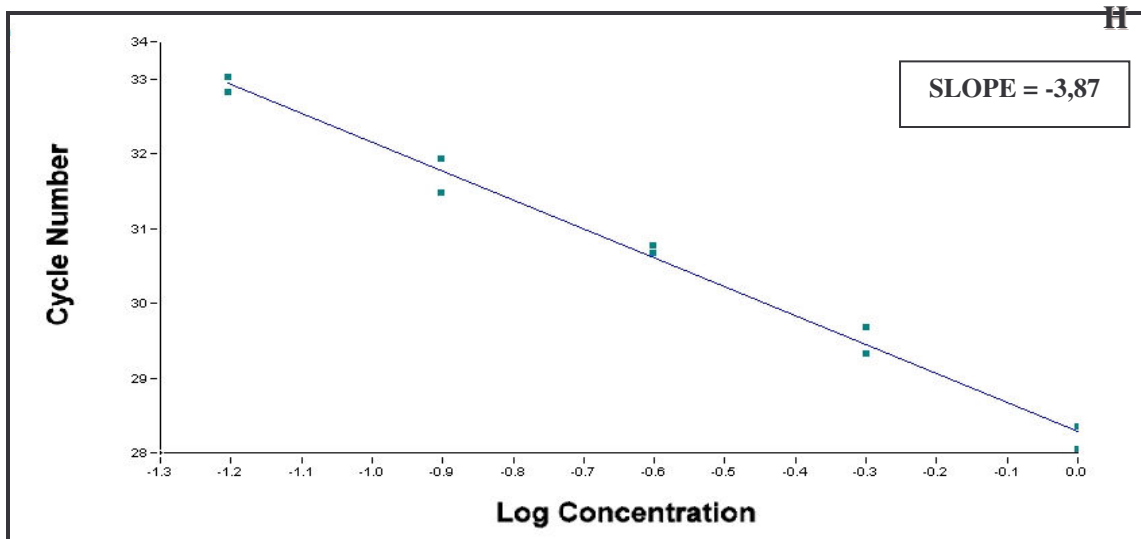
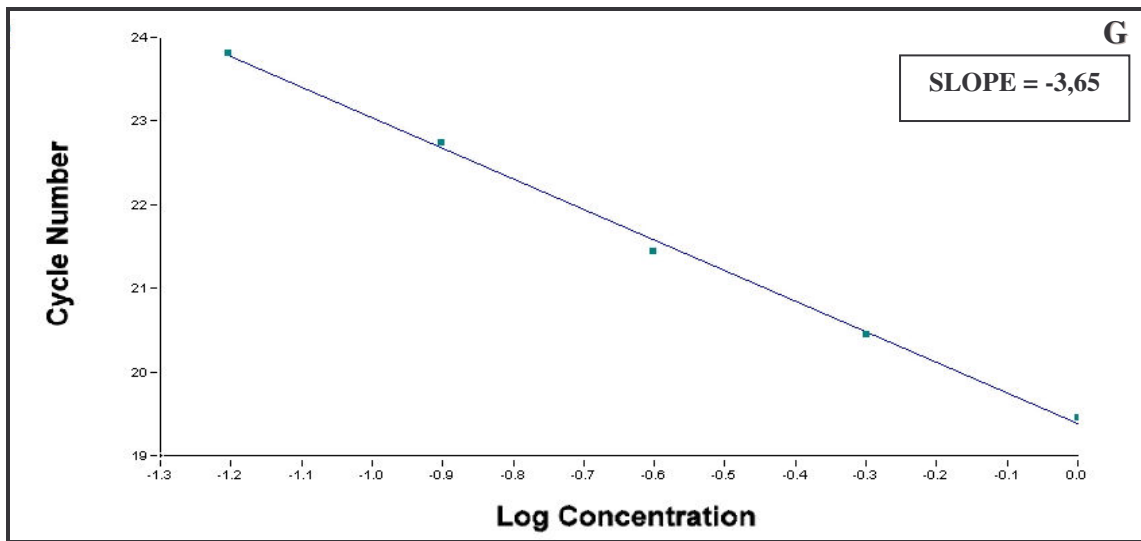


Figuras D - L. Curvas de Melting dos genes e miRNAs: D = *GAPDH*; E = *SRF*; F= *Fst11*; G = *Polal*; H = 5S ; I = miR-125b ; J = miR-221; L = miR-206.

ANEXO C: Curvas de diluição para a determinação da eficiência de amplificação.







Figuras A - H. Curvas de diluição dos genes e miRNAs: A = *GAPDH*; B = *SRF*; C = *Fstl1*; D = *Polal*; E = 5S ; F = miR-125b ; G = miR-221; H = miR-206.

ANEXO D: Outros tipos de pequenos RNAs identificados na biblioteca.

Seqüência	Identificação
CATCCCCATTCCACTCCTAGCACT	Similar à Ros-miR-2-53-3
AACTTCAACCGGCGTCCGGTGAGT	RNAr
CGTGGATCGCCCCAGCTGC	RNAr
CAACTCTTAGCGGTGGATC	RNAr
AATCAAGATCAAGCGAGTCTT	RNAr
GCGCCGCCGGGCGGGCTCGGGCCA	RNAr
GCCGAGTGATCCACCGCTAAGAGTT	RNAr
GGCGCCAGAAGCGAGAGCCCCTCGGGGCTCG	RNAr
AAGCGACGCTCAGGCAGGCG	RNAr
CCGCTCGGCCGGCGCCTAGCAAC	RNAr
AGGGCGCCCCGGGGTCCGCGGCGACGTCGG	RNAr
GGGAGTAACTATGACTCTCTTAAGGTAGCC	RNAr
CGCGACCGGCTCCGGGACGGCT	RNAr
TGGTGGAGGTCCGTAGCGGTCC	RNAr
CCGGGCCGGGCTCGGGCC	RNAr
AAGCCTACAGCACCCGAGTAT	RNAr
AAGGGTGGTGCCTGAGACTACAAA	RNAr
ACAGCGCCAGACTAGAGTC	RNAr
ACATCGAAGGATCAAAAAG	RNAr
AGGTGCACTTAGACTACAA	RNAr
CACCCGGTATTCCCA	RNAr
GCGCCGGCGGACGGTGGGATCCCTCGGGCCGG	RNAr
GCCGCCCGGGATCCCACCTCAGCCGGC	RNAr
CCGGCTGAGGTGGGATCCCGGGGCGGC	RNAr
CCGGCGGCTTTGGTGA CTCTANAAT	RNAr
TAAATCAGTTATGGTTCCTTTGGT	RNAr
GTTACTTGGATAACTGTGGTAAT	RNAr
AACTCTTAGCGGTGGATCACTCGGT	RNAr
AAGCCTACAGCACCCGGTATT	RNAr
TTACCGGGTAAACTGCACCGC	RNAr
CTTGCCCCCTCTAGCCCGACAAA	RNAr mit. ou Ros-miR-3-74-1
TACCGAGTGTCGTAGGCGT	RNAr ou Ros-miR-6-21-3
TGGTGCCACAGGTATAGTAG	RNAr, RNAr mit., ou RNAt
AAACACATAGACTCCCAGGCGAGCCAAA	<i>TNC</i>
GAGCTCCAGCGTAGGCGTC	<i>TNC</i>
ACAGCTGGATTGACGGGGACCAAA	<i>TNC</i>
ACTCACGACCTTCAGGATTATG	<i>TNC</i>
ATGTGACCCTGAAGACCATA	<i>TNC</i>
CAGCTGGTTGAACGCGGGACCAAA	<i>TNC</i>
CATGATACTTTTGAGCTACGC	<i>TNC</i>
CCTCCTTGTCCTCCGCCCC	<i>TNC</i>
GGGGTGCGAACGTGAAGATGAAGTCACTGTAC	<i>TNC</i>
GCGGNCCCCGGGTCGGGGGGGGTCTCC	<i>TNC</i>
GGCACGCCGGGATGCAGCGAGT	<i>TNC</i>
CCGTGTGCCCGTGGGGGGTTCACTTT	RNAt

TNC = Transcrito não caracterizado; mit. = mitocondrial.