



SEQUENCIAMENTO DO GENE DA MIOSTATINA NA RAÇA SUÍNA PIAU E RELAÇÃO FILOGENÉTICA COM OUTRAS ESPÉCIES DE ANIMAIS DOMÉSTICOS¹

DANIELLE ASSIS DE FARIA², SAMUEL REZENDE PAIVA³, SIMONE ELISA FACIONI GUIMARÃES^{4,5},
PAULO SÁVIO LOPES^{5,6}, BRUNA PENA SOLLERO⁷, JANE DE OLIVEIRA PEIXOTO², DÉBORA MARTINS
PAIXÃO⁷, PRISCILA VENDRAMINI SILVA⁷, DAIANNY SILVEIRA BARBOSA⁷

¹ Financiamento CAPES, CNPq, FAPEMIG

² Estudante de Mestrado, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG

³ Pesquisador Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia – Brasília – DF

⁴ Professor Orientador do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG

⁵ Professor Bolsista CNPq

⁶ Professor do Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG

⁷ Estudante de Graduação, Universidade Federal de Viçosa – Viçosa – MG

RESUMO - O objetivo deste estudo foi sequenciar o primeiro *exon* do gene da miostatina em suínos da raça Piau e de raças comerciais e comparar a seqüência com outras espécies de mamíferos e aves. Foi desenhado um par de primers que após amplificação e seqüenciamento gerou uma seqüência de 372 pb do referido *exon*. As análises filogenéticas foram congruentes com a sistemática já conhecida desses táxons e sugere que o gene da miostatina é um excelente exemplo da adaptação evolutiva dos vertebrados.

PALAVRAS-CHAVE: GDF8, filogenia dos animais domésticos, gene candidatos, *Sus scrofa*

SEQUENCING OF MYOSTATIN GENE IN PIAU SWINE BREED AND PHYLOGENETIC RELATIONSHIP WITH OTHER SPECIES OF DOMESTIC ANIMALS

ABSTRACT - The objective of this study was to sequence the first exon of myostatin gene in swine Piau and commercial breeds and later to compare the sequences with mammalian and birds species. The par of primers were designed and the PCR product was 372 bp, from the first exon. The phylogenetic analyses was appropriate with the systematic that is already known for these taxons, suggesting that myostatin gene is an excellent model for the evolutionary adaptation of vertebrates.

KEYWORDS: candidate genes, GDF8, phylogeny of livestock animals, *Sus scrofa*

INTRODUÇÃO

A miostatina é sintetizada principalmente na musculatura esquelética como um peptídeo de 376 aminoácidos que gera uma proteína madura de 15 kDa (McPherron *et al.*, 1997). Esta proteína é membro da família de fatores de crescimento transformantes β e é essencial para o crescimento e a diferenciação muscular. O gene da miostatina se localiza dentro do *locus mh* de bovinos, que é o *locus* responsável pela musculatura dupla em raças desta espécie animal (Smith *et al.*, 1997). Esta descoberta justifica o interesse no estudo deste gene em outras espécies, visto que o aumento de musculatura esquelética leva a maior quantidade de carne na carcaça. Em suínos já foram identificados polimorfismos na região promotora do gene nas raças Landrace, Large White e Meishan (Stratil e Kopecny, 1999). Os objetivos deste estudo foram seqüenciar o primeiro *exon* do gene da miostatina em suínos da raça Piau e relacionar sua seqüência com outras raças de suínos e espécies de mamíferos e aves.

MATERIAL E MÉTODOS

Neste estudo foram utilizadas as técnicas de PCR (reação em cadeia da polimerase) e seqüenciamento para estudar a organização genômica do primeiro *exon* do gene da miostatina (GDF8) em suínos da raça Piau e comerciais. Os *primers* para PCR foram desenhados a partir das seqüências de Stratil e Kopecny, (1999), sob os números de acesso AJ133580 e AJ237662 no *GenBank*. Como o primeiro *exon* é o mais conservado dentro deste gene, foi realizado um estudo filogenético entre várias espécies de animais domésticos, incluindo a espécie humana, com a finalidade de se confirmar essa conservação e a conseqüente importância desse gene na adaptação dos vertebrados. As seqüências obtidas nos suínos estudados foram editadas e alinhadas com as outras espécies a partir do uso dos programas Bioedit (Hall, 1999) e Chromas

(<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>). As espécies avaliadas foram *Bos taurus*, *Bubalus bubalis*, *Capra hircus*, *Ovis aries*, *Sus scrofa*, *Equus caballus*, *Homo sapiens*, *Mus musculus* e *Gallus gallus*, e os respectivos números de acesso no *GenBank* são: AB076403; AH013313; AY436347; AF019622; AF188638; AB033541; AF019627; AY204900 e AF346599. As seqüências foram analisadas para o número de substituições sinônimas e não sinônimas e alinhadas para as respectivas trocas de aminoácidos que ocorreram. As análises filogenéticas foram calculadas tanto para o método da Máxima Parcimônia como para as distâncias de dois parâmetros (Kmura,1980; Jukes e Cantor, 1969) a partir do programa MEGA. Foi também estimada a consistência interna de árvores por meio de uma análise de *bootstrap* (Efron, 1982).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foi obtida uma seqüência de aproximadamente 680 pares de bases do gene da miostatina para os suínos da raça Piau bem como para as raças comerciais. Dentro deste fragmento, foi possível obter o primeiro *exon* do gene (372 pb), a região promotora, bem como uma região do primeiro *intron*. A seqüência obtida dos varrões da raça Piau foi divergente em relação à seqüência utilizada como referência para desenho dos primers, todavia os animais não possuíam diferenças nucleotídicas entre si. O primeiro *exon* do gene da miostatina é conhecido por ser uma região extremamente conservada, de forma que a taxa encontrada de polimorfismos entre as espécies é, em sua maioria, referente aos resíduos de cisteína presentes nos *exons* 2 e 3. Entre as várias seqüências pesquisadas no banco de dados do *GenBank*, a maioria das espécies mostra um alto grau de conservação quanto ao tamanho do *exon* e a sua primeira posição, ou seja ao ATG inicial do gene (Figura 1). Essa conservação é possível, visto que, um gene contendo um efeito tão significativo não deve apresentar muitas modificações ao longo do tempo evolutivo (Liberles et al., 2001).

<i>Sus scrofa_Piau</i>	MQKLQIYVYI	YLFMLIVAGP	VDLNENSEQK	ENVEKEGLCN	ACMWRQNTKS	SRLEAIKIQI	LSKLR	[65]
<i>Sus scrofa</i>	[65]
<i>Homo sapiens</i>LC....T.....	..I.....	[65]
<i>Bos taurus</i>S....L..E..T.	[65]
<i>Mus musculus</i>M....A....G..REA....RY	..I.....	[65]
<i>Capra hircus</i>S....H.K....	..L...N..	[65]
<i>Ovis aries</i>F....L....K....	..L...N..	[65]
<i>Equus caballus</i>S....V..L..T.....	..I.....	[65]
<i>Bubalus bubalis</i>S....L..E..T.	[65]
<i>Gallus gallus</i>AV....Q.AVD.	..A.DGS.QPT	..A..D....	..T.....	..I.....	[65]
<i>Sus scrofa_Piau</i>	LETAP	NISKDAIRQL	LPKAPPLREL	IDQYDVQRDD	SSDGSLEDD	YHATTETIIT	MPTE	[124]
<i>Sus scrofa</i>	[124]
<i>Homo sapiens</i>V....	[124]
<i>Bos taurus</i>L..F....AR..V..	[124]
<i>Mus musculus</i>R....	[124]
<i>Capra hircus</i>V...V..	[124]
<i>Ovis aries</i>V...V..	[124]
<i>Equus caballus</i>	[124]
<i>Bubalus bubalis</i>L..F....A GR.DAV..	[124]
<i>Gallus gallus</i>	..Q..R.V.K..Q..	[124]

FIGURA 1. Alinhamento da seqüência de aminoácidos do primeiro *exon* do gene da miostatina para a raça suína Piau e suas diferenças com outras espécies de animais domésticos, bem como em humano e camundongos. Pontos indicam semelhança com a seqüência de *Sus scrofa_Piau*, enquanto que letras diferentes indicam substituições de aminoácidos

As distâncias genéticas para o algoritmo de Kimura variaram de zero (para o par *Sus scrofa_Piau* e comercial) até 0,2876 (para o par *Bubalus bubalis* e *Gallus gallus*) com uma diferença média de 0,1182 ou 11,82% entre as espécies. A proporção média de substituições não sinônimas foi de 0,0514 (D.P. 0,0089) enquanto as de substituições sinônimas foi de 0,4625 (D.P. 0,0722). Os resultados corroboram as relações evolutivas dos grandes grupos de vertebrados (<http://tolweb.org/tree?group=Eutheria&contgroup=Mammalia>) de forma que todos os Artiodactila, ou seja, os ruminantes e suiformes se agruparam juntos, sendo pelos de eqüinos (Perissodactila), humanos (primatas), roedores (rodentia) e, por último, pelas aves que, certamente, formam o grupo mais distante dentre os vertebrados analisados (Figura 2).

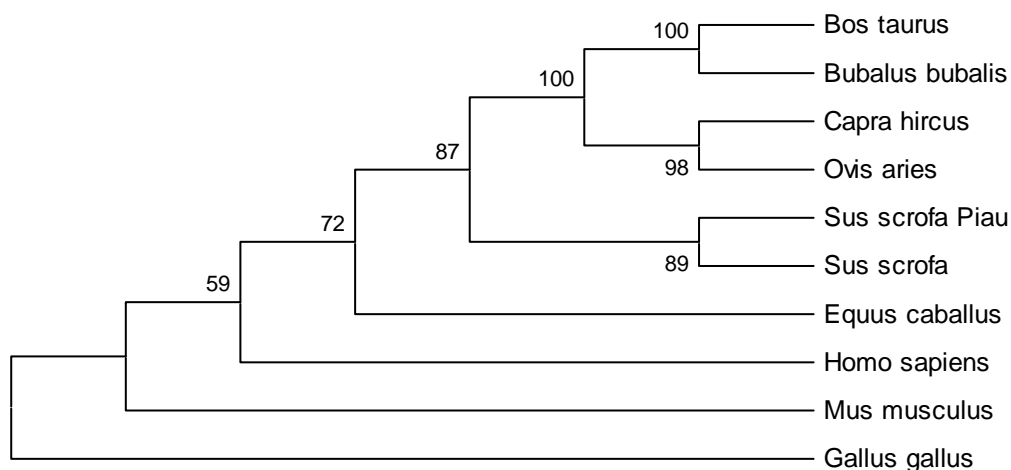


FIGURA 2. Árvore filogenética obtida por meio de Máxima Parcimônia do *exon 1* do gene da miostatina (GDF8) em várias espécies de animais domésticos, bem como em humanos e camundongos. Valores de *bootstrap* são mostrados antes de cada nó

A partir da comparação das seqüências de genes candidatos ao longo de várias espécies dos Artiodactyla num contexto filogenético, (Liberles et al., 2001) concluíram que a miostatina se encontra sobre uma seleção positiva antes do surgimento desse grande grupo, isto significa que, a proporção entre mutações não sinônimas sobre sinônimas é maior do que um ao longo das gerações. Esses resultados são importantes porque mostram como as proteínas foram sofrendo mutações e sendo selecionadas para adaptar melhor o organismo à sobrevivência a novas pressões ambientais.

CONCLUSÕES

Este trabalho permitiu evidenciar que o primeiro *exon* do gene da miostatina é razoavelmente conservado entre as espécies de mamíferos e aves, principalmente em relação aos primeiros aminoácidos da proteína. Entretanto suas diferenças refletem a sistemática dos grandes grupos de mamíferos e aves que hoje são utilizados na produção animal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- EFRON, B. **The Jackknife, the Bootstrap and Other Resampling Plans**. CBMS-NSF Regional Conference Series in Applied Mathematics, Monograph 38, SIAM, Philadelphia, 1982.
- HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.**; v. 41; p. 95-98, 1999.
- JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. In: MUNRO, H. N. (Ed.), **Mammalian Protein Metabolism**, New York: Academic Press, 1969. p. 21-132.
- KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, v.16; p. 111-120, 1980.
- LIBERLES, D.A.; SCHREIBER, D.R.; GOVINDARAJAN, S.; CHAMBERLIN, S.G.; BENNER, S. The Adaptive Evolution Database (TAED). **Genome Biology**, v. 2(8), p. 1-6, 2001.
- MATTHEW A. CRONIN, R. S. et al. **K-Casein Gene Phylogeny of Higher Ruminants (Pecora, Artiodactyla) Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 6 (2), p. 295-311, 1996.
- McPHERRON, A.C.; LAWLER, A.M. LEE, S. J. Regulations of skeletal muscle mass in mice by a new TGF β superfamily member. **Nature**, v.387, p.87-90, 1997.
- SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALES, N.L.; KAPPES, S.M. et al. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.742-744, 1997.



V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal

STRATIL, A.; KOPECNY, M. Genomic organization, sequence and polymorphism of the porcine myostatin (GDF8; MSTN) gene. **Animal Genetics**, v.30, p.462-478, 1999.