

FAUSTO MOREIRA DA SILVA CARMO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE CANDIDATO, FATOR MIOGÊNICO-5  
(*myf-5*), EM SUÍNOS

Tese apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa,  
como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Zootecnia, para obtenção do título  
de *Doctor Scientiae*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS - BRASIL  
2003

FAUSTO MOREIRA DA SILVA CARMO

ESTUDO DE POLIMORFISMOS DO GENE CANDIDATO, FATOR MIOGÊNICO-5  
(*myf-5*), EM SUÍNOS

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada em: 30 de janeiro de 2003

---

Prof. Paulo Sávio Lopes  
(Conselheiro)

---

Prof. Robledo de Almeida Torres  
(Conselheiro)

---

Prof<sup>a</sup>. Marta Fonseca Martins

---

Prof. Jorge Abdala Dergan dos Santos

---

Prof<sup>a</sup>. Simone Eliza Facioni Guimarães  
(Orientadora)

## **AGRADECIMENTO**

A DEUS PAI, meu criador, que me AMA com amor infinito e incondicional e me incentiva a desvendar seus mistérios por intermédio do estudo e da experimentação dos fenômenos da natureza, os quais possibilitam nossa comunicação.

A DEUS FILHO, JESUS CRISTO, meu SALVADOR e SENHOR, que mudou minha vida por meio de uma experiência com ELE RESSUCITADO, demonstrando seu AMOR por mim e me dando esperança na mudança, para melhor, dos seres humanos.

A DEUS ESPÍRITO SANTO, meu SANTIFICADOR, que me mostra a verdade e me ensina o caminho que devo seguir, orientando-me em todas as decisões importantes na minha vida, convidando-me a trilhar o maravilhoso caminho da santidade.

À minha esposa Renata, mulher especial que amo, que sempre me incentivou e, em muitos momentos, foi fundamental para que eu continuasse a minha caminhada profissional e pessoal.

Aos meus filhos Daniel, Sarah e Ester, que, por muitas vezes, foram privados da minha companhia.

Aos meus pais Agostinho e Cibeline, por terem acreditado em mim e me incentivado, sem interferirem na minhas escolhas profissionais, mesmo que isso não estivesse de acordo com o que eles pesassem ser o melhor para mim.

À minha irmã Flávia e meu cunhado Og e sobrinhos Pedro e João, por me acolherem em sua casa durante os meses finais de conclusão desse trabalho e me incentivarem durante todo o tempo em que estive desfrutando de suas companhias.

À minha orientadora Simone, pela paciência, confiança e dedicação dispensadas durante todo o trabalho.

Aos meus conselheiros Paulo Sávio e Robledo, pelas sugestões e dicas e pela amizade.

Aos membros da banca examinadora Marta, Jorge Dergan, Paulo Sávio e Robledo, por terem participado de um momento muito importante na minha vida.

Ao “Bajá”, pelos préstimos cordiais dispensados ao longo do meu trabalho.

Aos meus amigos Aldrin, Samuel, Augusto (30 “dia” por mês), Maria Amélia, Amauri, Eliane, Adriana, Alex, Frederico, Jane, Carlos, Kleibe e Daniele, pelos momentos de trabalho e pela descontração com que vivemos na granja, no laboratório e nos amigos ocultos.

Aos funcionários da granja de melhoramento de suínos, José Geraldo, Edinaldo, Edinaldinho, Evandro, Geraldo e Aloizio, pela ajuda, pelo apoio e por todos os “galhos quebrados” durante o experimento de campo.

À Universidade Federal de Viçosa (UFV), que como uma mãe me acolheu, mais uma vez.

À CAPES, pelo apoio financeiro.

À direção e coordenação da FACASTELO, Faculdade de Castelo, pela compreensão da minha ausência e por acreditar no meu potencial.

A todos que direta ou indiretamente me ajudaram para que eu pudesse concluir esse trabalho. Não poderia citar todos eles, mas quem participou comigo sabe que foi fundamental e terá a recompensa pela ajuda que me foi concedida.

## CONTEÚDO

	Página
RESUMO .....	vi
ABSTRACT .....	viii
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	5
2.1. Métodos de estudo de genes candidatos .....	7
2.2. Genes relacionados com proliferação e diferenciação das células miogênicas .....	9
2.3. Genes da família <i>MyoD</i> .....	10
2.4. Importância econômica do genes da família <i>MyoD</i> .....	13
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
<b>SEQÜENCIAMENTO DO GENE DO FATOR MIOGÊNICO-5 (<i>myf-5</i>) EM SUÍNOS</b> .....	20
RESUMO .....	20
SUMMARY .....	21
1. INTRODUÇÃO .....	22
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1. Coleta de material para análise .....	26
2.2. Extração de DNA .....	27
2.3. Construção dos <i>primers</i> .....	27

2.4. Amplificação .....	29
2.5. Purificação .....	30
2.6. Reações de seqüenciamento dos fragmentos amplificados .....	31
2.7. Precipitação dos fragmentos .....	31
3. RESULTADOS .....	32
4. DISCUSSÃO .....	38
5. CONCLUSÃO .....	40
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	41
<b>ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS DO GENE <i>myf-5</i> COM CARACTERÍSTICAS ECONÔMICAS EM SUÍNOS .....</b>	<b>44</b>
RESUMO .....	44
SUMMARY .....	45
1. INTRODUÇÃO .....	46
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	49
2.1. Coleta de dados fenotípicos .....	49
2.2. Amplificação do sexto fragmento .....	51
2.3. Análises estatísticas .....	53
3. RESULTADOS .....	53
4. DISCUSSÃO .....	60
5. CONCLUSÃO .....	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	65
7. RESUMO E CONCLUSÕES .....	68

## RESUMO

CARMO, Fausto Moreira da Silva Carmo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, Janeiro de 2003. **Estudo de polimorfismos do gene candidato, fator miogênico-5 (*myf-5*), em suínos.** Orientadora: Simone Eliza Facioni Guimarães. Conselheiros: Paulo Sávio Lopes e Robledo de Almeida Torres

Com o desenvolvimento de técnicas de biologia molecular e o uso dos marcadores de DNA, tem sido possível associar regiões genômicas com características de importância econômica. Algumas regiões genômicas possuem genes que exercem efeitos sobre determinada característica. Nessa mesma região, podem existir seqüências polimórficas, não codificadas, que servem como marcadores e, se estiverem em desequilíbrio de ligação, podem ser seguidas através de gerações de famílias formadas por linhagens divergentes. A formação dessas famílias facilita as análises de associações entre as regiões genômicas e as características fenotípicas analisadas, geralmente, na geração F2. Genes seqüenciados, com ação biológica conhecida, poderão ter formas alélicas identificadas, as quais poderão ser usadas em Seleção Assistida por Marcador, *Marker Assisted Selection*-MAS, aumentando a rapidez na resposta à seleção. Com o intuito de identificar novas formas alélicas, o gene candidato para o desenvolvimento muscular hiperplásico, fator miogênico-5 (*myf-5*), de animais parentais, de uma geração F2 formada por machos da raça nativa Piau e fêmeas comerciais, foi amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase -

*Polymerase Chain Reaction* (PCR) e seqüenciado, utilizando-se seqüenciamento automático pelo método de *Sanger*. As seqüências geradas foram comparadas com uma seqüência homologa depositada no *GenBank*. Foram constatadas deleções e inserções de 1 até 3 pares de bases nas seqüências obtidas da geração parental. Essas mutações geraram diferenças alélicas observadas na F2. Os genótipos na geração F2 apresentaram duas classes mais comuns: Normal/Normal (NN) e Normal/Inserção (NI). Estes genótipos foram correlacionados, por meio de modelos estatísticos, às características de desempenho, características de carcaça e qualidade da carne. Os resultados foram significativos ( $P < 0,05$ ), sendo o alelo "I" responsável por maior peso de paleta, maior perda d'água por gotejamento, cozimento e perda total. O novo alelo pode ser usado em programas de seleção, nos quais deve ser monitorado e mesmo associado com outras características de qualidade da carne.

## ABSTRACT

CARMO, Fausto Moreira da Silva Carmo, D.S., Universidade Federal de Viçosa, January of 2003. **Study of the polymorphism in candidate gene myogenic factor-5 (*myf-5*) in swine.** Adviser: Simone Eliza Facioni Guimarães. Committee members: Paulo Sávio Lopes and Robledo de Almeida Torres

With the development of molecular biology techniques by means of DNA markers, it has been possible to associate chromosomic regions with economic traits. Some chromosomic regions have genes that produce effects on a given trait, those areas have not coded polymorphic sequences either, that serve as markers and if they are in linkage disequilibrium, they can be followed through generations of families formed by divergent lines that facilitate the analyses, because of the largest difference presented in F2 generation. It still exists the possibility of genes with great effect in economic traits that are responsible for phenotypic evaluated effects. Sequenced genes, with known biological action, may have allelic variants identified and, if they present phenotypic differences in the analyzed traits, those allelic variants can be used in Marker Assisted Selection-MAS. In the present work, a candidate gene, related to muscular hiperphasic development, was PCR amplified and sequenced by the Sanger method in parental animals of a F2 population, formed by two Brazilian Native bois (Piau breed) and 18 commercial females. The generated sequences were compared to the GenBank sequence number Y17154. Deletions and insertions of one up to three bases in the

sequences obtained from some parental animals were observed. The genotypes in the F2 generation were lifted up and tended as more common, two classes Normal/Normal (NN) and Normal/Insertion (NI). The genotype were associated, by means of statistical models, to performance, carcass and meat quality traits. The results were significant for picnic shoulder weight, brightness, drip, cooking and total loss. The new allele may be used in breeding programs, where it must be monitored and even associated to the other meat quality traits.

## 1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético suíno visa a obtenção de animais que possuam crescimento rápido e desenvolvimento muscular com baixos índices de deposição de gordura e alto rendimento de carne na carcaça, além de resistência às doenças, alta prolificidade, habilidade materna e boa conversão alimentar. Na criação desses produtos, os melhoristas estão sempre buscando novos meios para a seleção dos animais, com o objetivo de diminuir o tempo entre as descobertas genéticas e a sua aplicabilidade nos rebanhos comerciais, que irão se traduzir em resultados na mesa do consumidor.

O esforço é necessário, devido à representatividade do rebanho suíno no cenário mundial, aparecendo como uma das espécies animais mais criadas. A suinocultura no Brasil também possui grande expressão. O rebanho brasileiro ultrapassou 37 milhões de cabeças e o volume de exportação em 2002, 265 mil toneladas da carne (PORKWORLD, 2003).

Segundo o senso agropecuário 1996, a atividade estava presente em 6 milhões de propriedades no país. A região Sul concentra as maiores indústrias do setor, sendo responsável por, aproximadamente, 90% dos abates inspecionados do país, segundo o senso agropecuário (TALAMINI et al., 1997).

A suinocultura tem se tornado cada vez mais empresarial, diminuindo o número de pequenos criatórios pouco tecnificados e aumentando o número de grandes empresas produtoras da carne suína.

Na década de 80, existiam 670.000 unidades produtoras, no Brasil, que foram reduzidas para 208.000 em 1996. Entre as 462 empresas que deixaram de existir, 85% eram de até 100 cabeças e 15%, de até 500 cabeças. Esta tendência foi verificada, também, em outros países. Na Dinamarca, as indústrias fundiram-se, reduzindo de 54 para apenas quatro, enquanto o número de animais abatidos subiu de 11 para 20 milhões no mesmo período (SANCEVERO e ANTUNES, 1998).

Nos últimos anos, a carne suína vem sendo aprimorada por meio do desenvolvimento de linhagens de animais que apresentam crescimento com maior relação carne/gordura. A conscientização dos consumidores em relação ao consumo da carne com menor teor de gordura saturada, que compromete o sistema vascular, como também a preocupação do produtor com o custo de produção, estimula as pesquisas nessa área (BEUGUE et al., 1997).

O rendimento da carne da carcaça dos suínos vem aumentando por meio dos ganhos genéticos obtidos pela seleção de animais, com base na análise de características fenotípicas medidas antes e após o abate dos animais (SANCEVERO e ANTUNES, 1998). O rendimento de carcaça de suíno, no Brasil, era de 48%, em média, na década de 80; hoje em dia, já ultrapassa 52%. Segundo IRGANG (1997), esse aumento resultou da melhoria genética de reprodutores utilizados na produção de suínos, selecionados intensamente para a redução da espessura de toucinho. Apesar disso, a média brasileira está abaixo das médias de outros países. Na Inglaterra, por exemplo, 85% das carcaças de suínos apresentam rendimento mínimo de 55% da carne.

A carne é o resultado da transformação das células musculares em produto comestível, o que ocorre após o abate dos animais. As células musculares são constituídas por grande número de fibras compostas por fibrilas. A massa muscular representa a soma de todos os processos celulares individuais e de crescimento molecular que ocorrem dentro do músculo. O crescimento muscular na fase fetal ocorre por proliferação das células musculares (hiperplasia), enquanto após o nascimento, e até o abate dos animais, o crescimento das células musculares não depende mais da divisão do núcleo destas células, mas sim do

aumento do citoplasma no tamanho e diâmetro, em um processo denominado hipertrofia (Swatland, 1984; Renier, 1993, citados por IRGANG, 1997).

Para aumentar ainda mais a porcentagem da carne na carcaça, os pesquisadores contam com o avanço da biologia molecular, que vem fornecendo as bases necessárias para trabalhar características de crescimento muscular não somente na fase hipertrófica, como também na fase hiperplásica, o que não era considerado possível no passado. Como relatado por CLAUS e WEILER (1994), o crescimento dos tecidos musculares, em contraste com outros tecidos, é resultado principalmente da hipertrofia. Aumento na massa muscular por hiperplasia poderia ser induzido somente em situações peculiares envolvendo multiplicação de células satélites, o que foi obtido em humanos e gatos.

O trabalho de melhoramento genético, há alguns anos, limitava-se em aumentar a frequência dos genes responsáveis pelo desenvolvimento muscular dos suínos após o nascimento, ou seja, na fase hipertrófica. Com o desenvolvimento de técnicas usando os marcadores moleculares, mapas de ligação, sequenciamento do genoma suíno e pesquisas nas áreas de fisiologia e bioquímica, os genes envolvidos na fase hiperplásica e seus mecanismos têm sido descobertos e vêm sendo considerados nos processos de seleção. À medida que são comprovadas as ações aditivas dos alelos de genes nas características de rendimento, os mais favoráveis têm sido incorporados nas linhagens de suínos melhorados, por meio de seleção assistida por marcadores, Marked Assisted Selection-MAS (MONTALDO e MEZA-HERRERA, 1998). Alguns genes já foram identificados como responsáveis pela diferenciação e pelo número das fibras musculares, a saber: *myo-DI*, *myf-5* e miogenina, e outros, no processo de hipertrofia, como GH, IGF, *myf-6*, Calpaína e Calpastatina (LODISH et al., 1995; te PAS et al., 1999a).

O objetivo deste trabalho foi estudar o primeiro gene expresso para o controle transcricional da fase de proliferação de fibras musculares, chamado fator miogênico número - 5 (*myf-5*). Os *exons* deste gene foram seqüenciados em animais parentais de um cruzamento F2 entre fêmeas comerciais e machos da raça Piau. Os animais da geração F2 foram genotipados para as diferenças

nucleotídicas encontradas e seus genótipos estatisticamente associados com características de desempenho, carcaça e qualidade da carne.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Estudos de simulação têm mostrado que o modelo de melhoramento clássico é eficiente para avaliar as variações fenotípicas, quando os valores genéticos se baseiam em certo número de *loci*. Entretanto, quando um ou poucos genes exercem maior influência na característica, o modelo clássico não acomoda a explicação dos efeitos (KINGHORN et al., 1994).

A informação sobre a influência de um gene, em uma característica de interesse econômico, pode ser muito valiosa em programas de melhoramento, aumentando a velocidade de sua implementação. O conhecimento do papel biológico dos genes permite um avanço no melhoramento genético das características avaliadas e melhor aproveitamento desses genes nos diferentes ambientes em que os animais são criados (KINGHORN et al., 1994).

ANDERSSON et al. (1994) enfatizam que, na herança quantitativa (ou poligênica), a variação da característica é determinada pela ação de vários alelos e de diversos *loci* somados aos fatores ambientais. Tem-se, segundo esses autores, somente uma idéia sobre o número, a localização e a ação dos *loci* controlando uma característica quantitativa. Todavia, a habilidade de dissecar geneticamente uma característica tem aumentado com o desenvolvimento dos mapas de ligação, com base em marcadores genômicos.

O uso de marcadores genômicos para o aumento do ganho genético, em programas de melhoramento animal, baseia-se na possibilidade de acompanhar a herança de segmentos cromossômicos entre e dentro de diferentes gerações. Se um segmento cromossômico marcado se encontra ligado aos genes, sabidamente responsáveis por uma característica, pode-se então procurar alguma associação entre este segmento e o desempenho do animal portador. Isto permite selecionar as progênes de acordo com o fragmento cromossômico recebido dos pais, assim como por seu desempenho (PLASTOW, 2000). Os marcadores genômicos não possuem, por si só, efeitos fenotípicos, seus valores estão na posição cromossômica em relação aos segmentos que contêm genes que afetam o desempenho.

Estes genes podem ser: “genes principais” - major genes, genes simples que causam variação qualitativa ou de grande efeito ou, também, vários genes localizados em uma região cromossômica caracterizando loci de características quantitativas ou Quantitative Trait Loci - QTLs (GUIMARÃES e EUCLYDES, 1998).

Como QTL, alguns autores consideram uma região genômica com influência na característica fenotípica. A região do genoma onde estes *loci* estão localizados pode ser delimitada, ou seja, marcada; por meio dessa marcação, pode-se estimar a variação do fenótipo que lhe cabe (FALCONER e MACKAY, 1996). Dessa forma, QTL pode ser definido como o segmento cromossômico onde podem estar localizados um ou mais genes relacionados à expressão de uma característica.

Enquanto os QTLs são definidos como regiões genômicas onde podem se localizar genes relacionados à expressão de uma característica, um gene principal pode ser definido como um gene que exerce grande efeito fenotípico. Esse gene deve imprimir diferença igual ou superior a um desvio-padrão fenotípico ( $\sigma_p$ ) entre os valores médios da característica em indivíduos homozigotos para o gene, em relação à média dos que não são portadores (de VRIES et al., 1999).

Outros autores, no entanto, questionam tal separação apontando para certa equivalência entre os conceitos, pois, se QTL é uma região do genoma que pode conter um ou mais genes com influência sobre as características, certamente o gene principal estará inserido nela (FALCONER e MACKAY, 1996). Um terceiro conceito seria o de gene candidato, que difere dos dois conceitos citados

anteriormente. De acordo com ROTHSCILD e SOLLER (1997), gene candidato pode ser definido como gene clonado, seqüenciado, de ação biológica conhecida, que está envolvido com o desenvolvimento da característica. Sua participação pode ser como gene estrutural ou na atividade regulatória, agindo sobre determinado segmento na rota metabólica de uma característica e influenciando sua expressão.

## **2.1. Métodos de estudo de gente candidatos**

O primeiro passo na metodologia de estudo de genes candidatos é a escolha do gene. Acredita-se, *a priori*, que o gene está envolvido com a fisiologia da característica. Ele pode ser escolhido pelo efeito de grandes mutações, onde a nova forma do gene estudado foi reconhecida como responsável pela alteração, ou por sintenia em outras espécies que possuam um mapa genômico rico, como o de seres humanos e ratos. Como sintenia assume-se que o gene clonado e seqüenciado de função biológica conhecida, responsável por uma característica dentro de uma espécie, possua seqüência com grande similaridade em outra espécie (CIB, 2003).

Há três metodologias principais para o estudo de genes candidatos: comparativa, fisiológica e posicional. Na comparativa, *loci* polimórficos associados a efeitos fenotípicos conhecidos em uma espécie são explorados como candidatos para variação semelhante em outra espécie. Um exemplo é o *locus* que controla a cor e o padrão da pelagem em animais domésticos (vacas, cabras e ovelhas), originalmente identificado em camundongos (HALEY, 1999).

A estratégia fisiológica baseia-se em polimorfismos de genes estreitamente relacionados ao desenvolvimento da característica de interesse. Uma associação entre estes genes e o fenótipo é tida como evidência de que o gene está envolvido no controle genético da característica (HALEY, 1999).

Por meio da varredura de uma região genômica, previamente determinada, estabelece-se a posição do gene e associa-se a região ao efeito fenotípico estudado. Essa estratégia é considerada pesquisa de gene candidato posicional (CLUTTER, 1998).

Após a escolha do gene, um passo imprescindível é a obtenção de *primers* para a amplificação do gene. Os *primers* podem ser confeccionados a partir de cDNA e de informações do genoma de outras espécies como humano e camundongo (CLUTTER, 1998). A etapa seguinte é identificar polimorfismos que possam ser associados ao gene candidato. Existem vários métodos para detectar o polimorfismo de genes candidatos. O método mais usado é a Reação da Polimerase em Cadeia – Polimorfismo de Tamanhos de Fragmentos de Restrição (*Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou PCR-RFLP, que pode cobrir fragmentos de até aproximadamente 2500 pb. Esse método tem a vantagem de ser facilmente usado em larga escala. Outro método é o SSCP (*Single Strand Conformational Polymorphism*) – polimorfismo conformacional de fita simples, que pode detectar polimorfismos em fragmentos de até 300 pares de bases. Outra técnica bastante eficiente é o sequenciamento do DNA, entretanto, a técnica é cara, não se adaptando a estudos populacionais (ROTHSCHILD e SOLLER, 1997).

O estudo de genes candidatos precisa, ainda, estabelecer qual população deve ser usada para estudos de associação e quais informações fenotípicas de interesse na população serão avaliadas. As metodologias de gene candidato podem ser aplicadas para populações comerciais, dispensando o conhecimento do pedigree dos animais avaliados. Podem também ser usadas em cruzamentos de linhagens divergentes. Nesse caso, *locus* de cromossomos estão envolvidos com centenas de genes. Assim, o gene candidato serve como um marcador genético na F2 no desenho de análises de ligação (ROTHSCHILD e SOLLER, 1997).

Os efeitos de genes candidatos podem ser identificados por meio de testes de associação, examinando o efeito dos diferentes alelos como os determinados por um único sítio polimórfico ou como haplótipos, que possuem vários sítios polimórficos. Isso é feito usando modelos lineares mistos, em que os efeitos fixos são os alelos ou os genótipos. Quando múltiplos genes candidatos são usados para uma característica, regressões múltiplas podem ser usadas. Associações também podem ser investigadas comparando a freqüência entre as raças que diferem na característica (ROTHSCHILD e SOLLER, 1999).

## 2.2. Genes relacionados com proliferação e diferenciação das células miogênicas

Em razão de o desenvolvimento muscular dos mamíferos ser um processo muito complexo, pode-se dividi-lo em duas fases: pré-natal, onde ocorrem os processos mitóticos responsáveis pelo crescimento em número de fibras por meio da proliferação e diferenciação das células, a chamada hiperplasia, e pós-natal, que está relacionada com o crescimento no diâmetro e no tamanho das fibras, aumentando a massa muscular, chamada de hipertrofia.

A proliferação e a diferenciação de células miogênicas no embrião e por meio de células satélites no animal, após o nascimento, desempenham papel determinante na taxa e na eficiência do crescimento muscular. Embora a regulação desse processo seja pouco conhecida, a ocorrência do crescimento corporal suporta a hipótese de que ele é controlado por meio de ação integrada entre fatores de crescimento de ações positivas e negativas em tipos específicos de células. Conseqüentemente, é importante identificar os fatores de crescimento de ação positiva e os de ação negativa na proliferação e na diferenciação das células miogênicas (DAYTON e HATAWAY, 1990).

DAYTON e HATHAWAY (1990) descreveram que a regulação da proliferação e diferenciação das células satélites e das células miogênicas do embrião é crucial para o desenvolvimento muscular dos animais. Na época, as evidências sugeriam três fatores de crescimento (fator de crescimento de fibroblasto - *Fibroblast Growth Factor-FGF*, fator de crescimento semelhante à insulina - *Insuline-Like Growth Factor- IGF* e fator de crescimento transformante  $\beta$  - *Transforming Growth Factor- TGF- $\beta$* ), exercendo os principais papéis no processo de regulação do crescimento muscular. Os autores não relataram o mecanismo pelo qual o *FGF* afetava a diferenciação, entretanto descreveram-no como supressor da expressão de miogenina e de *MyoD1*, que são fatores de regulação da miogênese. O *TGF- $\beta$*  possui um papel inibitório na diferenciação em culturas de células miogênicas agindo na supressão dos fatores regulatórios miogênicos (família *MyoD*), mas estimula a proliferação de mioblastos. Esse fator

age ainda na diferenciação e fusão de células satélites em embriões e nos músculos após o nascimento.

O *IGF* afeta a proliferação, diferenciação e o *turnover* protéico em culturas de células musculares. Esse fator possui duas formas bem distintas, o *IGF-I* que estimula a proliferação e a diferenciação de células musculares de mamíferos, *in vitro*, por meio da estimulação do aumento de *mRNA* para *miogenina* e o *IGF-II*, que também atua nesses processos e ainda no *turnover* protéico de células musculares. Alguns trabalhos mais recentes mostram, de forma mais clara, a ação do *IGF-I* na diferenciação dos mioblastos, onde este aumenta o nível de *mRNA* da *miogenina*, membro da família *MyoD*, que está relacionada com a fase final da miogênese (FLORINI et al., 1996).

FLIGGER et al. (1998) associaram o aumento de secreção da proteína de ligação do fator de crescimento semelhante à insulina - 2 (*Insuline-like Growth Factor Binding Protein - 2, IGFBP-2*) com a diminuição da proliferação e formação de miotubos, em múltiplas passagens de células musculares clonadas. Segundo os autores, a possível explicação seria que o aumento da IGFBP-2 seqüestraria o *IGF-I*, diminuindo sua bioatividade.

### **2.3. Genes da família *MyoD***

Os genes da família *MyoD* (*myo-D1*, *myf-5*, *myogenina* e *myf-6* ou *mfr-4*) estão relacionados com o desenvolvimento dos músculos nos mamíferos. Os três primeiros genes desta família estão relacionados com o processo hiperplásico pré-natal e o último (*myf-6*), com o crescimento muscular pós-natal (LODISH et al., 1995; PAS et al., 1999a).

Uma breve descrição sobre a embriogênese é necessária para iniciar a revisão sobre esses genes. As células precursoras dos músculos são formadas, durante a embriogênese dos mamíferos, a partir das células mesodérmicas, que delimitam os somitos. Os somitos são estruturas embrionárias, formadas a partir de células da mesoderme, e se posicionam na direção rostro-caudal do embrião.

As células da parte ventral dos somitos formam o esclerótomo, células precursoras das estruturas esqueléticas. Simultaneamente, a parte dorsal desenvolve-se em dermátomo, que dará origem à derme, que irá formar o miótomo. O miótomo, por sua vez, diferencia-se em músculos esqueléticos (LIMA, 1999).

A fase hiperplásica muscular pode ser dividida em duas etapas: a transição de células mesodérmicas em mioblastos e a diferenciação dos mioblastos em miotubos. Os dois passos são regulados pelos fatores de transcrição miogênicos, sendo expressos pela família *MyoD* (te PAS et al., 2000; KLONT et al., 2001). A regulação do desenvolvimento das miofibras é exercida pela síntese de quatro proteínas chamadas *bhelix-loop-helix (bHLH)*, uma para cada gene envolvido no processo de determinação e diferenciação celular, agindo na regulação da expressão gênica em estádios específicos. Tais proteínas fazem parte do grupo de proteínas, chamado de fatores de transcrição ligantes ao DNA. As proteínas desse grupo formam homo e heterodímeros, que se ligam a sítios comuns, de seqüência “CANNTG” no DNA (E-box), para exercer o controle sobre a transcrição dos genes (ORDAHL e WILLIANS, 1998).

Segundo BERGSTROM e TAPSCOTT (2001), a *miogenina* é requerida para a diferenciação dos mioblastos estabelecida pela expressão inicial de *myf-5* ou *MyoDI*. Com isso, *MyoDI* e *myf-5* são genes considerados responsáveis pela determinação e especificação dos mioblastos, enquanto a *miogenina* pode ser considerada um fator de diferenciação. De acordo com te PAS et al. (1999b), o gene da *miogenina* tem papel central na família de genes *MyoD*, sendo o abolidor oficial da proliferação dos mioblastos, regulando a diferenciação de células mioblásticas uninucleadas em miofibras polinucleadas, na fase terminal de diferenciação. O *myf-6* expressa-se na fase pós-natal, durante a hipertrofia muscular; seu estudo tem sido difícil, devido à proximidade genética com o *myf-5*, mas, na regeneração de músculo esquelético adulto, mutações nesse gene resultam no aumento da expressão de *miogenina* e relativa diferenciação das células satélites musculares.

A diferença entre a especificação nas linhagens musculares mediadas pelos fatores *MyoDI* e *myf-5* e a diferenciação terminal mediada pela *miogenina*

pode ser atribuída a diferenças protéicas ou ao padrão de expressão de cada proteína, ou a ambos. Tanto na embriogênese como na regeneração muscular, ou seja, na ativação de células satélites os fatores, *MyoDI* e *myf-5* são os primeiros a serem expressos e, em seguida, *miogenina* e *myf-6*. É possível que o requerimento para *MyoDI* e *myf-5* na especificação das linhagens musculares se reflita em seqüências regulatórias, que, apropriadamente, iniciam a expressão desses fatores, visto que as proteínas codificadas pelos genes *bHLH* miogênicos podem ter funções redundantes. Vários estudos mostram que os fatores regulatórios da miogênese originados dos genes *MyoDI*, *myf-5*, *miogenina* e *myf-6*, quando expressos artificialmente e colocados separadamente, podem levar células não diferenciadas a se tornarem fibroblastos, mostrando a redundância desses fatores em determinar suas funções (BRAUN et al., 1989).

Outro estudo mostrando a redundância desses fatores foi feito por WANG e JAENISCH (1997), que, trabalhando com ratos deficientes (mutantes) para o gene *MyoDI* e portadores de alelo *myf-5<sup>myg-ki</sup>*, verificaram que estes possuíam musculatura normal, apesar de terem aproximadamente 10% menos proteínas músculo específicas que os ratos selvagens para o caráter. No entanto, essa redundância não é eficiente, pois todos os ratos morreram precocemente após o parto. Os mesmos autores mostraram ainda que o alelo *myf-5* selvagem foi mais eficiente no papel de formação muscular do que o alelo *myf-5<sup>myg-ki</sup>*. Ainda, estudos feitos por LODISH et al. (1995), utilizando ratos intactos e ratos *knockout*, revelaram a importância dos três genes, *MyoDI*, *myf-5* e *miogenina*, no desenvolvimento muscular hiperplásico

KITZMANN et al. (1998) mostraram que a expressão dos genes *MyoDI* e *myf-5* é sincronizada durante a proliferação dos mioblastos. A análise da expressão desses dois genes durante as fases do ciclo celular mitótico (G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S, G<sub>2</sub>, M) revela aspectos distintos e contrastantes na expressão desses fatores de transcrição. O *MyoDI* está ausente em G<sub>0</sub>, possui picos na metade de G<sub>1</sub>, cai ao mínimo em G<sub>1</sub>/S e aumenta de S para M. Em contraste, *myf-5* possui grande expressão em G<sub>0</sub>, decresce em G<sub>1</sub>, torna a aumentar no final de G<sub>2</sub> e permanece estável até a mitose (M).

BERGSTROM e TAPSCOTT (2001) mostraram que, apesar de terem semelhanças estruturais, os fatores de transcrição, todos do tipo *bHLH*, produtos dos genes da família *MyoD*, apresentam motivos diferentes em suas estruturas que lhes conferem funções bastante específicas dentro do desenvolvimento muscular. O fator *bHLH* do *MyoD* facilita a iniciação da expressão de genes endógenos, enquanto o fator *bHLH* da *miogenina* age como ativador de domínios transcripcionais. Assim, o uso alternado de motivos similares para ativação e iniciação de genes fornece uma base molecular para a distinção entre especificação e diferenciação dentro dos fatores *bHLH* da família *MyoD*. Apesar de possuírem estruturas semelhantes, os fatores de transcrição *bHLH* gerados pelos genes da família *MyoD* possuem funções específicas dentro do desenvolvimento muscular, devendo ser estudados separadamente.

#### **2.4. Importância econômica dos genes da família *MyoD***

HANDEL e STICKLAND (1988) relataram que o número de fibras musculares parece determinar o crescimento rápido e a baixa deposição de gordura nos músculos de suínos. Te PAS e VISSCHER (1994) relataram que a taxa, a duração da proliferação e o tempo de diferenciação dos mioblastos influenciam, potencialmente, o número de fibras formadas e, assim, a capacidade máxima de desenvolvimento muscular - crescimento magro.

Segundo SOUMILLION et al. (1997), a *miogenina* desempenha papel crucial na diferenciação muscular, controlando a fusão dos mioblastos e o estabelecimento das miofibras. Os mesmos autores relacionaram variação no gene da *miogenina* com características de crescimento, em suínos e bovinos, associadas ao número de miofibras. Eles reportaram, ainda, que a variação da *miogenina* está associada ao peso ao nascimento, à característica de crescimento e ao rendimento da carne na carcaça. Associaram, também, variação na fase de diferenciação da miofibras às características de deposição de músculo.

NEZER et al. (1999), estudando características de gordura corporal e características musculares em animais F2 oriundos de cruzamentos entre as raças

Large White x Pietrain, descreveram QTL para massa muscular e deposição de gordura localizado na parte final no braço curto do cromossomo 2. Dois genes candidatos (*MyoDI* e IGF-2) foram mapeados previamente, correspondentes à região no genoma humano. O *MyoDI* suíno foi encontrado e mapeado na região contendo o QTL descrito.

Te PAS et al. (1999a) investigaram o gene *myf-5* envolvido na proliferação dos mioblastos, em suínos. Os autores não foram capazes de relacionar nenhuma variação do gene ao desenvolvimento muscular relativo a características de produção da carne em duas linhagens comerciais de macho da raça *Yorkshire*. Seus achados são reforçados por estudos feitos por Rudinicki et al. (1993) e Braun et al. (1994), citados por te PAS et al. (1999a), que haviam comprovado a influência dos genes *myf-5* e *MyoDI* afetando o desenvolvimento muscular em ratos e mostraram que o gene *myf-5* não funcional, *knockout*, era compensado pela ativação extra do gene *MyoDI*, sem diferença no número de fibras no músculo do animal com *myf-5* não funcional, um argumento para futuras investigações sobre o papel das variações do gene *MyoDI* no desenvolvimento muscular. Te PAS et al. (1999a) ressaltam que o *myf-5* não deve ser desconsiderado como importante no desenvolvimento muscular, apesar de não terem conseguido correlacionar variantes alélicas desse gene com variações significativas na produção da carne.

Te PAS et al. (1999a) identificaram um polimorfismo de sítio de restrição no segundo *intron* do gene *myf-5*. Os autores estudaram animais *Yorkshire* de duas linhagens de seleção e relataram um sítio de restrição para a enzima *Hinfl* no gene *myf-5*. Os alelos gerados “A” e “B” representam presença do sítio de restrição e ausência do sítio *Hinfl*, respectivamente. Estes mesmos autores relataram, ainda, a presença de três microssatélites no *locus* do *myf-5*; um foi encontrado no segundo *intron* desse gene e os outros dois, na seqüência promotora. O produto de PCR de um animal de cada raça estudada foi seqüenciado, mostrando considerável variabilidade desses microssatélites. Os microssatélites localizados na região promotora foram investigados quanto a suas posições e foi detectado que eles estavam em desequilíbrio de ligação com o gene.

SOMUMILLION et al. (1997) descreveram o polimorfismo de restrição no gene miogenina usando a enzima *MspI*, produzindo dois alelos – um que não apresentava o sítio de restrição “A” e outro que apresentava o sítio “B”. te PAS et al. (1999b), também usando a enzima *MspI* para a digestão de fragmento do mesmo gene, associaram seu polimorfismo com peso ao nascimento, taxa de crescimento, crescimento magro até 200 dias e espessura de toucinho. Peso ao nascimento, peso da carcaça, taxa de crescimento e produção da carne tiveram efeito significativo para “AA” e “BB” (efeito aditivo), sendo genótipo “BB” o mais vantajoso.

KNOLL et al. (1997), estudando suínos das raças *Landrace*, *Large White*, *Duroc* e *Pietran*, descreveram polimorfismos de restrição para a enzima *DdeI* no gene *MyoDI*. Esses autores amplificaram um fragmento de 996 pb, que compreendia o *intron 1* desse gene, e submeteram o fragmento à digestão, produzindo dois alelos, que mostraram um padrão de herança Mendeliana nas quatro raças, por duas gerações. A marca encontrada nesse gene poderia ser testada em outras populações e usada em estudo de correlação entre suas formas polimórficas e características de produção da carne, podendo confirmar o que foi escrito por te PAS et al. (1999a) sobre o potencial do *MyoDI* no desenvolvimento muscular.

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSSON L., HALEY, C., ELLEGREN, H. et al. Genetic mapping of quantitative trait loci for growth and fatness in pigs. **Science**, v.263, p.1771-1773, 1994.
- BRAUN, T., RUDNICK, M.A. et al. Targeted inactivation to the muscle regulatory gene *Myf-5* results in abnormal rib development and perinatal death. **Cell**, v.71, p.1-20, 1989.
- BERGSTROM, D.A.; TAPSCOTT, S.T. Molecular distinction between specification and differentiation in myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family. **Molecular Cell Biology**, v.21, n.7, p.2404-2412, 2001.
- BUEGE, D.R., HENDERSON, D. W., WATTERS, S.H. et al. A nationwide audit of the composition of pork and poultry cuts and retails. **Journal of Animal Science**, v.75 (supplement 1), 1997.
- CLAUS, R., WEILER, U. Endocrine regulation of growth and metabolism in the pig: a review. **Livestock Production Science**, v.37, p.245-260, 1994.
- CLUTTER, A.C. Molecular markers and pig breeding programs, Anais do II Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 22 a 25 de junho de 1998, Uberaba – MG, **SBMA**, 1998.
- CONSELHO DE INFORMAÇÕES EM BIOTECNOLOGIA – CIB  
<http://www.cib.org.br>. acessado em 2003.
- DAYTON, R.W., HATHAWAY, M.R. Myogenic cell proliferation and differentiation. **Poultry Science**, v.70, p.1815-1822, 1991.

- de VRIES, A.G., SOSNICKI, A., PLASTOW, G.S. The Role of Major Genes and DNA Technology in Selection for Meat Quality in Pigs, **Meat Science**, v.49, Suppl. 1, p.s245-s255, 1999.
- FALCONER, D.S., MACKAY, T.F.C. Introduction to quantitative genetics. **Essex**, UK: Longman Group Limited, 6.ed., 1996. 464p.
- FLIGGER, J.M., MALVEN, P.V., DOUMITM, M.E. et al. Increases insulin-like growth factor binding protein-2 accompany decreases in proliferation and differentiation when porcine muscle satellite cells undergo multiple passages. **Journal of Animal Science**, v.76, p.2086-2093, 1998.
- FLORINI, J.R., EWTON, D.Z., COOLICAN, S.A., Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. **Endocrinology Review**, v.17, p.481-517, 1996.
- GUIMARÃES, S.E.F., EUCLYDES, R.F. Detecção e uso de marcadores genômicos e genes candidatos em programas de melhoramento animal. In: Anais do V encontro mineiro de Geneticistas, **SBG-RMG**, UFV, Viçosa-MG, 8, 1998.
- HALLEY C. Advances in quantitative trait locus mapping, <http://agbop.cabweb.org>, 1999.
- HANDEL S.E., STICKLAND, N.C. Check-up growth in pigs: relationship with muscle cellularity. **Animal Production Science**, v.47, p.291-295, 1988.
- PORWORLD 2003, <http://www.porkworld.com.br>
- IRGANG, R. A força da genética. **VIII Cong. Bras. de Médi. Vete. Espe. em Suín.**, 8, p.20-23, 1997.
- KINGHORN, B., ARENONK, J., HETZEL, J. Detection and use of principal gene in animal breeding. **Ag Biol. News Info.**, v.6, n.12, p.297-302, 1994.
- KITZMANN, M., CARNAC, G., VANDROMME, M. et al. The muscle regulatory factors *MyoD* and *Myf-5* undergo cell cycle-specific expression in muscle cells. **Journal of Cell Biology**, v.142, n.6, p.1447-1459, 1998.
- KLONT, R.E., SOSNICKL A.A., NASCIMENTO, J.D., PEREIRA, F. Produção Personalizada da carne Suína Através da Otimização da Genética e do Controle de Processo, in II Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade da carne Suína. 05 de novembro à 06 de dezembro de 2001 – via internet. <http://www.embrapa.br>.
- KNOLL A., NEBOLA, M., DVORAK, J. et al. Detection of a Dde1 PCR-RFLP within intron 1 of the porcine *MYOD1*(*MYF3*) locus. **Animal Genetics**, v 28, n. 4, pgs. 321-325, 1997.

- LIMA, P.R.M. Diferenciação, expressão gênica e o ciclo celular, Seminários de Biologia Celular, **Instituto de Biociências**, Rio Claro, v.1. p.345, 1999.
- LODISH, H., BALTIMORE, D., BERK, A. et al. **Molecular Cell Biology**, 3.ed., cap.13, p.556-561, 1995.
- MONTALDO, H.H., MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the in the genetic improvement of livestock. **Nature**, v.1, p.15-22, 1998.
- NEZER C., MOREAU L., BROWERS B. et al. An imprinted QTL with major effect on muscle mass and fat deposition maps to the IGF2 locus in pig. **Nature-Genetics**, v.21, n.2, p.155-156, 1999.
- ORDAHL C.P., WILLIAMS B.A. Knowing chops from chuck: roasting *MyoD* redundancy **Biol. Essa.**, v.20, p.357-362,1998.
- PLASTOW, G.S. Molecular genetics in the swine industry. In: Anais do II Simpósio Nacional da **SBMA**, p.21, 2000.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits of economic importance in domestic livestock. **Probe**, v. 8, p.13-20, 1997.
- ROTHSCHILD, M.F., SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect traits controlling traits economic importance in domestic livestock. Simpósio Internacional de Genética e Melhoramento Animal, 21 a 24 de setembro, Depto. Zootecnia – UFV, Viçosa, MG, 1999.
- SANCEVERO, A.B., ANTUNES, R.C. Qualidade de carcaça e qualidade da carne em suínos. In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, **SBMA**, v.2, p.167-172, 1998.
- SOUMILLION A., ERKENS J.H.F., LENSTRA J.A. et al. Genetic Variation in the porcine myogenin gene locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.564-568, 1997.
- TALAMINI D.J.D., SANTOS FILHO, J., CANEVER, M.D. A cadeia produtiva de suínos. In: **ABRAVES**, v.7, p.63-69,1997.
- te PAS M.F.W., VISSCHER, A.H. Genetic regulation of meat production by embryonic muscle formation a review. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.111, p.404-412, 1994.
- te PAS M, F.W., VERBURG, F.J., GERRITSEN, C.L.M. et al. Messenger ribonucleic acid expression of the Myo-D gene family in muscle tissue at slaughter in relation to section for porcine growth rate. **Journal of Animal Science**, v.78, n.1, p.69-77, 2000.

- te PAS, M.F.W., HARDESRS F.L., SOMILLION, A. et al. Genetic variation at the porcine *MYF-5* gene locus. Lack of association with meat production traits. **Mammalian Genome**, v.10, p.123-127, 1999a.
- te PAS, M.F.W., SOMILLION, A., HARDES, F.L. Influences for myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2352-2356, 1999b.
- WANG, Y., JAENISCH, R. Myogenin can substitute for *Myf-5* in promoting myogenesis but less efficiency. **Development**, v.124, p.2507-2513, 1997.

## SEQUENCIAMENTO DO GENE DO FATOR MIOGÊNICO-5 (*myf-5*) EM SUÍNOS

**RESUMO** - Nesse trabalho, foi estudado o gene *myf-5* membro da família *MyoD*. Os genes dessa família são fatores de transcrição que controlam o processo de desenvolvimento muscular embriogênico, chamado hiperplasia. Durante a hiperplasia, as células oriundas da mesoderme multiplicam-se e diferenciam-se em fibras musculares. O *myf-5* é o primeiro gene da família *MyoD* a ser ativado durante o desenvolvimento muscular embrionário. Esse gene foi seqüenciado em animais parentais de um cruzamento F2 entre varrões da raça Piau e fêmeas comerciais. Os animais tiveram seu DNA extraído de células brancas do sangue e amplificado por meio da reação de polimerização em cadeia. Os *primers* usados na reação foram desenhados para amplificar os três *exons* do gene. Os fragmentos amplificados foram seqüenciados em um seqüenciador automático, utilizando a técnica de *Sanger*. Os fragmentos gerados foram comparados com a seqüência do gene já depositada no *GenBank* (número de acesso Y17154). Foram notadas divergências, entre as seqüências geradas e as do *GenBank*, quanto a inserções e deleções, tanto em alguns animais Piau quanto em algumas fêmeas comerciais. Segundo a seqüência depositada no *GenBank*, essas alterações se encontram dentro do terceiro *exon*, o que poderá servir como marcas para associações das novas formas desse gene, com características de interesse econômico.

Palavras-chave: *myf-5*, suíno, seqüenciamento

## MYOGENIC FACTOR – 5 (*myf-5*) GENE SEQUENCING IN PIGS

**SUMMARY** - In this chapter it was studied the swine *myf-5* gene, a MyoD family member. This family is composed by four genes, *MyoD1*, *myf-5*, *myogenin* and *myf-6*. These genes are transcription factors that control the embryogenic muscular development process, called hyperplasia. During hyperplasia the cells originating from mesoderm multiply and differentiate in muscular fibers. *myf-5* gene is the first MyoD family member to be activated during the embryonic muscular development. This gene was sequenced in parental animals from a F2 cross. DNA samples were extracted from white blood cells and amplified by polymerization chain reaction. The primers used in the reaction were drawn to amplify the three exons of the gene. The amplified fragments were sequenced in an automatic DNA sequencer using the Sanger technique. The generated fragments were compared with the GenBank consensus sequence number Y17154. Divergences, like insertions and deletions, were noticed between the generated sequences from a Piau boar and some commercial females, and the one accessed in GenBank. According to the consensus sequence, those alterations are inside of third exon, so they may be used as markers for associations of the new variants of that gene and economic traits.

Key Words: *myf-5*, swine, sequencing

## 1. INTRODUÇÃO

O primeiro marcador genômico importante para o melhoramento genético de suínos, que envolve rendimento de carcaça e qualidade da carne, somente se tornou disponível em 1991, quando pesquisadores canadenses desenvolveram a técnica para identificação do chamado gene Halotano (FUJII et al., 1991), cujo efeito tem várias denominações, dentre elas a Síndrome do Estresse Suíno, *Porcine Stress Syndrome* - PSS.

Outros genes candidatos, como o da Proteína Ligadora de Ácido Graxo do Coração, *Heart Fatty Acid Binding Protein* - H-FABP, e o da Proteína Ligadora de Ácido Graxo de Adipócitos, *Adipocyte Fatty Acid Binding Protein* - A-FABP, têm sido estudados para aumentar a gordura intramuscular, já que esses genes possuem o papel específico de ligação e transporte intracelular de ácidos graxos e outros componentes hidrofóbicos, podendo ser usados na seleção assistida por marcadores. Esses genes vêm sendo incluídos em programas de melhoramento na tentativa de resolver problemas oriundos do aumento nos níveis de proteína, em detrimento dos níveis de gordura da carne suína, que levou à perda de sabor (GERBENS et al., 1998).

Os genes da *Calpaína* e da *Calpastatina*, relacionados à taxa de anabolismo e catabolismo (*turnover*) de proteínas, também são genes candidatos relacionados com a qualidade da carne. Esses genes se encontram em fase final de estudos, para inclusão em MAS (GEESINK e KOOMAHRAIE, 2000; SMITH e ROHRER, 2001).

Genes responsáveis pelo desenvolvimento embrionário muscular estão incluídos nesses estudos, como é o caso do *myf-5*. O gene *myf-5* é o primeiro gene ativado durante a formação muscular, sendo considerado um gene importante para a formação das fibras musculares. O desenvolvimento embrionário nos mamíferos é extremamente dependente do meio onde o embrião está sendo formado. O contato entre as células iniciais do embrião (células pluripotentes) influencia o desenvolvimento embrionário. Estas células produzem sinais químicos que são secretados e entram em contato com as células vizinhas,

estimulando ou reprimindo a expressão dos genes envolvidos nos processos de divisão celular e de migração de células para os locais em que serão formados os órgãos (TAJBASHSH et al., 1998).

As células embrionárias, antes de se diferenciarem em células de algum órgão, migram para os locais apropriados, induzidas por fatores posicionais. Essa interação entre os fatores posicionais e as células precursoras é fundamental para a manutenção dos padrões espaciais de distribuição dos órgãos no corpo. A origem dos músculos se dá no folheto embrionário mesenquimal, que se organiza em um folheto embrionário chamado mesoderma; as células do mesoderma se dispõem em uma estrutura com uma cavidade no centro (celoma), dando origem aos somitos. As células dos somitos se difundem ao longo do embrião; parte irá originar a derme, outra parte, os músculos (COSSU et al., 1996; TAYLOR, 2002).

Os somitos destinados à formação muscular se diferenciam em mioblastos, que se fundem formando os miotubos multinucleados, mas com núcleos na posição central das células. Os miotubos se diferenciam em miofibras, que possuem capacidade contrátil, são multinucleados e apresentam posição periférica de seus núcleos, logo abaixo do plasmalema. Esse processo de origem muscular é controlado por meio da expressão de vários genes. No caso da diferenciação das células musculares, parte essencial deste processo de sinalização é efetuada pela família *MyoD* e por proteínas miogênicas intimamente relacionadas. Essas proteínas possuem sítios de ligação ao DNA e, por meio da ligação desses sítios ao DNA, atuam na determinação das células musculares, desencadeando a produção de proteínas músculo-específicas, como  $\alpha$ -actina, cadeia pesada de miosina, tropomiosina, miosina de cadeia leve, troponina-C e troponina-I (LIMA, 1999).

YUN e WOLD (1996) descrevem que, sob influência de múltiplos sinais extracelulares, indutivos e inibitórios, células multipotentes da mesoderme paraxial começam a formar as células musculares primitivas (mioblastos). Por sua vez, os mioblastos secretam os fatores de regulação ou Fatores Reguladores Musculares - *Muscle Regulator Factors* - MRFs. Os produtos dos genes *myo-D1* e *myf-5*, que fazem parte desse grupo de fatores, são secretados durante as fases  $G_0/G_1$ . Após

essas fases, a secreção desses fatores é interrompida. Os mioblastos entram na fase de diferenciação, que é precedida pela secreção de dois outros MFRs, a miogenina, responsável pela diferenciação terminal dos mioblastos e do Fator Promotor Muscular - 2, *Muscle Enhancer Factor - 2*, e MEF2, que aumenta a expressão dos genes responsáveis pela diferenciação dos mioblastos.

A família *MyoD* é uma família de genes que expressam proteínas, do grupo das MRPs, chamadas de Proteínas Regulatórias Miogênicas. As MRPs são proteínas bastante relacionadas e partilham uma região de homologia que abrange dois domínios funcionais: um domínio Hélice-Alça-Hélice, importante na dimerização dessas proteínas, e uma região básica que contém aminoácidos positivamente carregados responsáveis pela interação com o DNA. Essas duas características definem a família de proteínas que funcionam, primariamente, como ativadoras da transcrição à família de elementos básicos hélice-alça-hélice (*basic Helix-Loop-Helix - bHLH*). Para se ligarem ao DNA e exercerem a função de regulação da transcrição, essas proteínas formam dímeros com outras proteínas do tipo hélice-alça-hélice. Dependendo da homologia entre as moléculas, são caracterizadas como homodímeros (ex.: *MyoD-E12*) ou heterodímeros (ex.: família *MyoD-Id*), YUN e WOLD (1996).

A ligação MRP-DNA ocorre nos sítios de ligação conhecidos como *E-box* e se localizam na região promotora de genes músculos-específicos. Esses *E-boxs* são relativamente pequenos, em torno de 60 a 120 pb, e apresentam regiões com similares de seqüência consenso CANNTG (C - citosina, A – adenina, T – timina, G – guanina e N desoxirribonucleotídeo qualquer). Dois fatos que dizem respeito aos E-box são relevantes: 1) esses sítios para fatores de transcrição só estão ocupados durante a ativação dos mioblastos, sendo a ativação de genes de proteínas contráteis regulada diretamente pela associação das MRPs a esses sítios. 2) a semelhança entre as seqüências regulatórias de diferentes genes músculo-específicos sugere que fatores de transcrição similares e processos de ativação coordenados são ativados durante a diferenciação dos mioblastos (BERGSTROM e TAPSCOTT, 2001).

Os genes da família *MyoD* são considerados como candidatos, devido a suas funções no desenvolvimento muscular. Nesse trabalho, o gene do fator miogênico-5 (*myf-5*) foi seqüenciado, com intuito de se obterem suas variações alélicas em fêmeas comerciais e machos da raça nativa Piau, constituintes da geração parental de um cruzamento F2.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta de material para análise

Foram analisadas amostras de DNA de 20 animais, sendo 18 fêmeas de linhagem comercial e dois machos da raça “nativa” Piau. As fêmeas foram identificadas com os números usados na granja de melhoramento de suínos da UFV. Os machos receberam os nomes C e J. O macho C foi cruzado com oito fêmeas e o macho J, com 10 fêmeas.

Foram feitos três *mix* de DNA das fêmeas para tornar o seqüenciamento do gene *myf-5* mais econômico. Acreditava-se também que esses animais tivessem a seqüência do gene *myf-5* conservada, tornando o seqüenciamento individual, das fêmeas, desnecessário. Os dois machos (C e J) foram seqüenciados individualmente. Consta na Tabela 1 a composição dos *mix* do DNA das fêmeas.

Tabela 1 - Composição dos *mix* de DNA das fêmeas e seus respectivos números

Amostras de DNA agrupadas	Número dos animais
<i>Mix1</i>	90, 91,92 147, 151, 154
<i>Mix2</i>	122, 127 130, 133 159, 160
<i>Mix3</i>	22, 25, 69, 80, 175, 211

## 2.2. Extração de DNA

O sangue foi coletado por punção venosa do *sinus orbitalis*, em tubos estéreis contendo ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), 0,5 M, pH 8,0. Após a coleta, as amostras foram centrifugadas a 2500 g, durante 20 minutos. A camada de células brancas, que se encontrava entre a camada inferior de células vermelhas e o plasma sangüíneo (camada superior), foi retirada e colocada em tubos limpos.

A extração do DNA genômico foi feita a partir dessas células, por purificação com fenol:clorofórmio, após tratamento com proteinase K, como descrito por SAMBROOK et al. (1989).

O DNA contido nas amostras foi quantificado usando espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 260 e 280 nanômetros. Com base na leitura, alíquotas de 200 a 300  $\mu$ L foram preparadas para uso de rotina no laboratório. As alíquotas foram diluídas em solução de TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 e 1 mM de EDTA, pH 8,0), à concentração de 25 ng de DNA/ $\mu$ L. As alíquotas foram mantidas a 4°C. A solução estoque de DNA, de cada animal, também foi diluída em TE e armazenada a -20°C.

## 2.3. Construção dos *primers*

Os *primers* foram construídos usando o programa “WebPrimers”, encontrado no site <http://alces.med.umn.edu/websub.html>. Utilizou-se a seqüência do gene *myf-5* publicada com o código de acesso no *GenBank* Y17154, cobrindo-se o *exon* 1, que apresenta 665 pb, o *exon* 2, o menor deles com 75pb, e o *exon* 3, com 791pb, já no final do gene.

Os *primers* foram construídos para gerarem fragmentos menores que 600 pb (pares de bases). Os critérios de seleção dos *primers* gerados foram: posição no gene, temperaturas de anelamento e variação da energia livre ( $\Delta G$ ), segundo RYCHLIK (1993). Os números que representam a posição dos *primers* foram baseados na seqüência descrita acima. Na Tabela 2, apresentam-se a relação dos *primers* usados e suas respectivas posições no gene. O *primer* direto (*Foward*)

está representado por F e o reverso (*Reverse*), por R. Na Figura 1, estão a representação esquemática do gene e as posições dos *primers* usados.

Tabela 2 - Relação de conjunto de *primers* usados no projeto, sua localização de anelamento no gene *myf-5* e o tamanho do fragmento esperado

Sentido e número <i>primer</i>	Seqüência dos pares de <i>primers</i> 5' -- 3'	Posição no gene	Tamanho esperado do fragmento (pb)
F1	AGAAGTCGGA GCTTCGGAGC	179-198	
R1	CCCCGCTTACTTGCGCTGTTA	606-627	449
F2	AACGTTGGATTTCTTCGTTCC	544-565	
R2	CCACTCGTGGCTCAAACCTCG	1090-1109	566
F3	GGACGAGTTTGAGCCACGAGTGG	1087-1109	
R3	GGTTFCTACACCTGCTTAAACG	1562-1581	495
F4	CAGAGCACCTTTTCGCCAAGA	2249-2268	
R4	TCCTCTAAAGGCGTTCGTTCT	2387-2407	159
F5	AGGGCAACGTAAGCAAGTCTACC	2729-2751	
R5	CCCTTGGATGAATTGCCCTATAAG	3240-3264	536
F6	TTCTTTTCCTTTGTCTTGGCATTAA	3190-3214	
R6	ACGTATCAATCACTGCCAATGCTA	3646-3669	479

A posição dos *primers* foi estabelecida obedecendo a seqüência do gene depositada no *GenBank* Y17154 (1999).

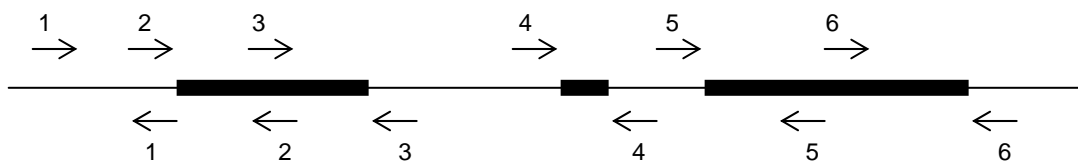


Figura 1 - Esquema do gene Myf-5 suíno com base na seqüência GenBank Y17154. Os blocos escuros representam os *exons*. As setas → representam os *primers forward* e as setas ←, os *primers reverse*.

## 2.4. Amplificação

As amplificações foram feitas no Laboratório Biotecnologia Animal (LABTEC) do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa (DZO-UFV), após extração do DNA dos animais parentais, a partir do sangue, como já descrito.

As amostras foram amplificadas em termocicladores MJ *research* PTC 100-96<sup>®</sup>, sendo as reações constituídas de Taq polymerase 1U; dNTPs 0,2 mM; *primers forward* e *reverse* 0,2 μM cada; Tris-HCl 20 mM pH 8,3; KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 2 a 4 mM; e DNA genômico 25 ng por reação, em volume total de 20 μL, quando eram usados para verificar o funcionamento da reação, e de 100 μL, quando os produtos eram destinados ao seqüenciamento.

Os programas de amplificação variaram para cada par de *primer*, constituindo-se, basicamente, dos seguintes passos: desnaturação 94°C/1 min; temperatura média de anelamento de 64°C/1 min; temperatura de extensão 72°C/1 min; e 35 ciclos de repetição. Ao final das amplificações, os produtos foram guardados a 4°C até o momento da eletroforese, feita em géis de poliacrilamida a 5%. A coloração dos géis foi feita utilizando-se a técnica de nitrato de prata (Ohsawa et al., 1983, citados por HAMES e RICKWOOD, 1990).

## 2.5. Purificação

A purificação dos produtos das amplificações foi feita utilizando-se colunas do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), uma para cada amostra amplificada; nessa coluna, foram adicionados 500 µL de “capture buffer” (Amersham Pharmacia Biotech®). Em seguida, a amostra de 100 µL, amplificada, foi transferida para a coluna e homogeneizada. Os conjuntos (coluna e tubo coletor) foram submetidos a 30 segundos de centrifugação a 15.800 x g. Os eluentes dos tubos coletores foram descartados. Em seguida, foram colocados 500 µL de uma solução “wash buffer” (Amersham Pharmacia Biotech®) nas colunas e os conjuntos novamente foram centrifugados por 30 segundos a 15.800 x g. Os tubos coletores foram descartados. Tubos novos foram colocados sob as colunas. Foram adicionados 15 µL de água MiliQ® nas colunas e os conjuntos, submetidos a 3 minutos de centrifugação a 15.800 x g. Do filtrado contendo DNA e água foram retiradas alíquotas para quantificação. O DNA das amostras foi quantificado utilizando-se o espectrofotômetro DNA/RNA GENEQUANT II (Amersham Pharmacia Biotech®), onde foi lida a absorbância das amostras a 260 e 280 nm, usando um comprimento de onda de 320 nm para a compensação do *background*. O restante do DNA purificado foi guardado a -20°C até a reação de sequenciamento.

## 2.6. Reações de seqüenciamento dos fragmentos amplificados

As reações de seqüenciamento foram feitas por intermédio da técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), com base no método de *Sanger* (SANGER e COULSON, 1975). O DNA foi seqüenciado utilizando-se o *ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequence Ready Reaction Kit (Applied Biosystems)*. Para isso, entre 200 e 500 ng das amostras de DNA a ser seqüenciado foram empregados em uma reação contendo 2  $\mu\text{L}$  de *mix*, fornecido no *Kit Big Dye*<sup>®</sup>, 5,0 pmol do *primer* direto e 2  $\mu\text{L}$  de tampão (200 mM Tris-HCl, pH 9,0; 5 mM Mg Cl<sub>2</sub>), em um volume total de reação de 10  $\mu\text{L}$ . Preparou-se um *mix* semelhante para o *primer* reverso.

## 2.7. Precipitação dos fragmentos

Após a reação de seqüenciamento, o DNA foi precipitado para ser levado ao seqüenciador automático, onde as seqüências foram lidas.

Uma solução contendo 20  $\mu\text{L}$  de água MiliQ<sup>®</sup>, 2  $\mu\text{l}$  de glicogênio (1 g/litro) e 4  $\mu\text{L}$  de acetato de sódio 1,5 M e EDTA 0,25 M foi preparada e 25  $\mu\text{L}$  dessa solução, dispensadas em cada tubo contendo o DNA a ser seqüenciado. A solução foi agitada durante 10 segundos. Em seguida, 100  $\mu\text{L}$  de etanol absoluto foram adicionados em cada tubo e, novamente, os tubos foram agitados por 10 segundos. Após essa etapa, os tubos foram deixados em repouso por 20 min, protegidos da luz, em temperatura ambiente. Em seguida, foram centrifugados a 15.800 x g por 30 minutos. O sobrenadante, de cada tubo, foi removido cuidadosamente, e 150  $\mu\text{L}$  de etanol 70% foram adicionados aos tubos. Novamente, eles foram centrifugados a 15.800 x g por 15 minutos. O sobrenadante foi retirado e os tubos, deixados destampados para evaporar todo o resíduo de álcool. O pellet foi ressuspenso em 15  $\mu\text{L}$  de *Template Reaction Reagent*, desnaturado a 95°C, por cinco minutos, e mantido em gelo até a aplicação. A próxima etapa foi a leitura feita em um seqüenciador automático ABI PRISM 377.

As seqüências geradas foram editadas e montadas em contíguos pelo programa SEQ MAN II (DNASTAR, Inc.) e, posteriormente, comparadas entre si e com a seqüência Y17154 depositada no GenBank, utilizando-se o programa BLAST (ALTSCHUL et al., 1997).

### 3. RESULTADOS

Os fragmentos gerados pela amplificação dos conjuntos de *primers* F1-R1, F2-R2, F3-R3 e F5-R5 não geraram polimorfismos após a análise das seqüências dos machos e dos três *mix* de fêmeas, por esta razão, o uso destes pares foi interrompido.

O primeiro fragmento seqüenciado que apresentou variações na seqüência foi resultado do uso do conjunto F4-R4, que possuía 159 pb, e abrange o *exon 2*. Quando os fragmentos seqüenciados foram comparados com a seqüência depositada no *GenBank*, o fragmento de 75 pb dessa seqüência, correspondente ao *exon 2*, apresentou homologia em todos os animais e *mix* usados, com exceção do *mix 2*, no qual houve bases não definidas nas posições 2381 pb e 2382 pb, destacadas em negrito na Figura 2. A mesma figura mostra as seqüências alinhadas e as comparações. Dentro desse fragmento, houve ainda alterações intrônicas que ocorreram também entre as seqüências do *mix 2* de fêmeas, onde, por comparação com a seqüência do GenBank nas posições 2387 pb, 2391 pb e 2397 pb, houve bases não definidas, como mostra em itálico a Figura 2.

```

                2245                                2304]
exon_II_GenBank.seq TTCCAGAGCACCTTTCCGCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA
exon_II_C.seq      --C-AGAGCACCTTTC-GCCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA
exon_II_J.seq      TTC-AGAGCACCTTTC-GCCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA
exon_II_mix1.seq   TTCCAGAGCACCTTTC-GCCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA
exon_II_mix2.seq   ---CAGAGCACCTTTC-GCCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA
exon_II_mix3.seq   TTCCAGAGCACCTTTC-GCCAAGACCTGAAAACAAATGCCTTCTTTTGTGTCTTTTATTA

[                2305
2364]
exon_II_GenBank.seq TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCCGAAAGAACAGCAGTTTTGACAGTATCTAC
exon_II_C.seq      TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCAGAAAGAGCAGCAGTTTTGACAGTATCTAC
exon_II_J.seq      TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCAGAAAGAGCAGCAGTTTTGACAGTATCTAC
exon_II_mix1.seq   TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCAGAAAGAGCAGCAGTTTTGACAGTATCTAC
exon_II_mix2.seq   TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCAGAAAGAGCAGCAGTTTTGACAGTATCTAC
exon_II_mix3.seq   TAGCCTGAATGCAACAGCCCTGTCTGGTCCAGAAAGAGCAGCAGTTTTGACAGTATCTAC

[                2365                                2397]
exon_II_GenBank.seq TGTCCGGATGTACCAAATGGTAAG-AACGAACGC
exon_II_C.seq      TGTCCGGATGTACCAAATGGTAAG-AACGAACGC
exon_II_J.seq      TGTCCGGATGTACCAAATGGTAAG-AACGAACGC
exon_II_mix1.seq   TGTCCGGATGTACCAAATGGTAAG-AACGAACGC
exon_II_mix2.seq   TGTCCGGATGTACCAANWGGTANTTAMCTGATRC
exon_II_mix3.seq   TGTCCGGATGTACCAAATGGTAAG-AACGAACGC

```

Figura 2 - Seqüência do fragmento que cobre o *exon 2*, do gene *myf-5*. A região sombreada corresponde ao *exon 2*; em negrito estão as bases exônicas não definidas e em itálico, as bases intrônicas não definidas.

Ao amplificar o sexto fragmento com o par de *primers* F6-R6, que corresponde ao final do terceiro *exon*, foi detectada em alguns animais a formação de bandas eletroforéticas com padrão em heteroduplex. O heteroduplex é definido como moléculas híbridas de DNA formadas pela união da fita de um alelo com a fita complementar de outro alelo, formado na sua maioria após o vigésimo ciclo da reação de PCR. O retardo na migração das bandas de heteroduplex está relacionado com o número de nucleotídeos divergentes das fitas e o tipo de pareamento entre elas, gerando alças que interferem na velocidade da migração. Portanto, a diferença de mobilidade dos heteroduplexes, que geraram as bandas observadas no gel, deve-se, provavelmente, ao posicionamento superior ou inferior da alça, formada na molécula, devido ao pareamento de duas fitas que não são totalmente complementares (Sorrentino et al., 1991; Nagamine et al., 1991,

citados por RODRIGUES, 1998). A Figura 3 mostra a amplificação dos animais, utilizando o sexto conjunto de *primers*.

As colunas 1 e 2 da Figura 4 são amostras amplificadas utilizando o DNA dos *mix* 1 e 2, o padrão de bandas é o esperado. Na coluna 3, foi usada amostra amplificada com DNA do *mix* 3. Nessa coluna, foi verificada banda extra caracterizando a presença de heteroduplex. A coluna 4 mostra a amplificação de um macho da raça Piau (C), que possui o padrão de banda semelhante ao padrão do *mix* 3. Os animais que compunham o terceiro *mix* foram seqüenciados separadamente, sendo que a fêmea 211 apresentou padrão de bandas heteroduplex.

Foi detectado no macho C e na fêmea comercial 211 uma deleção de três pares de bases "TTT"(t-timina) em heterozigose. Essa deleção se encontra na posição 3420 pb - 3422 pb do gene *myf-5*. Além desta variante, foram encontradas, em homozigose, inserção de três pares de bases "ATG" (a-adenina, t-timina, g-guanina), na posição 3326 pb em duas fêmeas irmãs completas (151 e 154), e uma deleção pontual de uma "adenina" na posição 3357 pb também em homozigose nessas fêmeas. A Figura 4 traz as deleções e as inserções em destaque e os respectivos animais seqüenciados que tiveram variação.

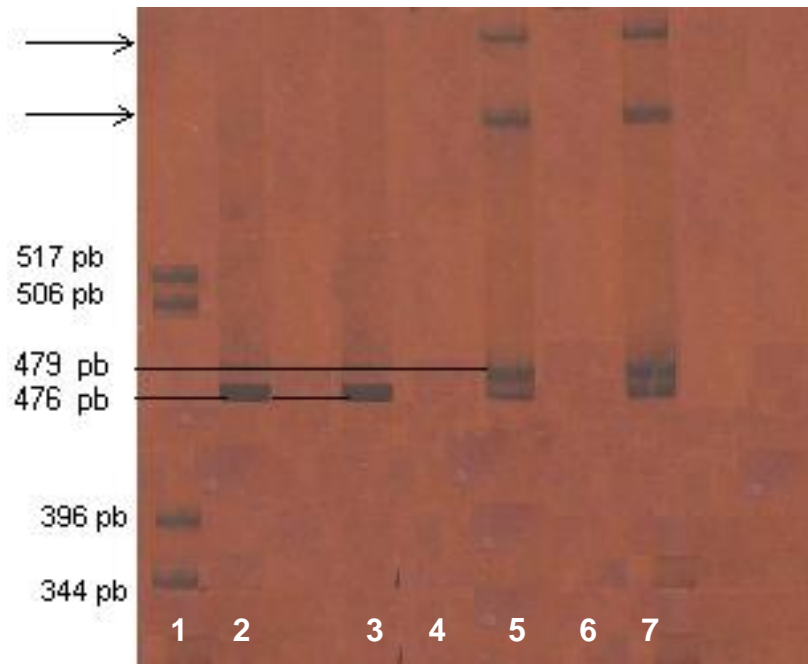


Figura 3 - Resolução dos produtos amplificados usando o sexto conjunto de *primers* região 3' do gene *myf-5*, em gel de poliacrilamida não desnaturante (8%), corado com nitrato de prata. A primeira canaleta (L) refere-se ao marcador de peso molecular (1 Kb DNA *Leader*, *Life Technologies*). A numeração na margem esquerda indica o tamanho dos fragmentos do marcador e dos fragmentos amplificados em pb. A canaleta 1 mostra produto da PCR, genótipo do *mix* 1 apresentando tamanho esperado de um única banda (479 pb). As setas mostram a presença de heteroduplex. Amostra 2 genótipo do *mix* 2 e na coluna três amplificação do *mix* 3 apresentando genótipo distinto do esperado (heteroduplex). Na coluna 4 o fenótipo do macho (C) com o padrão de bandas também de heteroduplex.

```

[
exon_III_frag6_GenBank      3319
C_exonIIIifrag6             ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p69_exonIIIifrag6           ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p90_exonIIIifrag6           ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p91_exonIIIifrag6           ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p92_exonIIIifrag6           ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p147_exonIIIifrag6          ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
p151_exonIIIifrag6          ACCTCTGATGTTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAA-TATTAGAACAAATACTAGA
p154_exonIIIifrag6          ACCTCTGATGTTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAA-TATTASAACAAATACTAGA
p211_exonIIIifrag6          ACCTCTG---TTTAGAGCTTTATTTTTTTCCCTTTAAAAATATTAGAACAAATACTAGA
[
exon_III_frag6_GenBank      3379
C_exonIIIifrag6             ACTGGAATCAAGTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p69_exonIIIifrag6           ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTT---GCTTCTCTTTAATC
p90_exonIIIifrag6           ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p91_exonIIIifrag6           ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p92_exonIIIifrag6           ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p147_exonIIIifrag6          ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p151_exonIIIifrag6          ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p154_exonIIIifrag6          ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTTTTTGTCTCTCTTTAATC
p211_exonIIIifrag6          ACTGGAATCA-GTTATAGGGAGTTTTAAATATATTTAACTTT---GCTTCTCTTTAATC
[
exon_III_frag6_GenBank      3439
C_exonIIIifrag6             CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p69_exonIIIifrag6           CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p90_exonIIIifrag6           CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p91_exonIIIifrag6           CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p92_exonIIIifrag6           CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p147_exonIIIifrag6          CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p151_exonIIIifrag6          CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p154_exonIIIifrag6          CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
p211_exonIIIifrag6          CTTTGGTTATATTGTGTTAAGTAAAAATATAACATACTGCCTAATGGTATATATTTTGAT
[
exon_III_frag6_GenBank      3498
C_exonIIIifrag6             CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p69_exonIIIifrag6           CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p90_exonIIIifrag6           CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p91_exonIIIifrag6           CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p92_exonIIIifrag6           CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p147_exonIIIifrag6          CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p151_exonIIIifrag6          CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p154_exonIIIifrag6          CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA
p211_exonIIIifrag6          CTTATAAGAAATGCATCTTTTTAATGTAAGCACAAAATAGTACTTTGTGGATGATTTCAA

```

Figura 4 - Sequência, parcial, gerada a partir dos fragmentos produzidos utilizando o sexto conjunto de *primers*, mostrando o sequenciamento parcial do exon 3, mostrando as alterações nucleotídicas encontradas. Nos animais de números 151 e 154, observa-se, sob a região sombreada, inserção ATG, na posição 3326 pb e inserção A, na posição 3357 pb. Os animais C e 211 apresentam deleção TTT, nas posições 3420 pb – 3422 pb, área também em destaque.

```

2701 gtttcaaagg agctgacctg cagttcaaag ggcaacgtaa gcaagtctac ctattggggtt
2761 tttttttttt taacgttttt ttttcccctt gtatcttttag tatatgccac ggataaaagc
2821 tccttatcca gcttggattg cttatccagc atagtggatc ggatcagcaa ctccgagcaa
2881 cctggactgc ctctccagga cccagcctct ctctctccag ttgccagcac cgattctcag
2941 cctgcaactc caggggcctc tagttccaga cttatctatc acgtgctatg aactaaaaat
3001 ctagtctaga ccatttctgc caggagtgcc tattacacag gaggaaggag gcccaaaagg
3061 cccaaaagca agacaacctg tatataaaca ttttttttca gttgtaaatt tgtaataact
3121 atcttgccac tttataagaa agtgtattta actaaaaagt cactattgca attaattctt
3181 tatttcttct tcttttcctt tgtcttgcca ttaaataat agttccaatg atattatttc
3241 ttataggggc aattcatcca agggtagctc gttgcaatgc ttaacttata cttttataa
3301 tattgcttat caaaatatta cctctgttta gagctttatt tttttcccct ttaaaaatat
3361 tagaacaat actagaactg gaaatcaagt tatagggagt ttaaatata ttaactttt
3421 ttgcttctct ttaatccttt ggttatattg tgtaagtaa aaatataaca tactgcctaa
3481 tggtatatat tttgatctta taagaaatgc atctttttaa tgtaagcaca aaatagtact
3541 ttgtggatga tttcaagatg taagagattt tggaaattcc accataaata aaattgttta
3601 aatgaagaat catttgattt atgattttgt taaaagaacc tctaatagca ttggcagtga
3661 ttgatacgta tctttgagct

```

Figura 5 - Comparação das três seqüências do exon 3, envolvidas no trabalho. Em negrito, está representada a seqüência do terceiro exon publicada no *GenBank* (Y17154). A seqüência correspondente a este exon, citada por te PAS et al. (1999a), está sublinhada e a região amplificada no trabalho está em itálico, usando os conjuntos de *primers* F5 e R5 e F6 e R6 (amplificação do nucleotídeo no. 2729 ao no. 3669). O primeiro destaque, em cinza, corresponde ao local da inserção das três bases (ATG), na posição 3326, nas fêmeas 151 e 154. O segundo é a deleção de uma adenina (A) na posição 3357 das mesmas fêmeas e o terceiro destaque corresponde à deleção em heterozigose, das três timinas (TTT), nas posições 3420-3422 do macho C e da fêmea 211.

#### 4. DISCUSSÃO

Alterações ocorridas nos *exons* podem influenciar a estrutura e função das proteínas por eles codificadas, alterando a capacidade de formar homo e heterodímeros. Apesar da seqüência da proteína que o *myf-5* codifica ainda não estar descrita em suínos, pode-se especular que possíveis alterações dentro de seus *exons* afetem a característica dessa proteína, tornando-a menos eficiente ou, até mesmo, impossibilitá-la de se ligar para formar os dímeros, se a alteração for, por exemplo, na região que codifica o domínio de ligação com a proteína ubíqua E.

Apesar de a proteína do tipo *bHLH*, codificada pelo *myf-5*, não ter sido seqüenciada ainda, pode-se especular que uma mudança no gene, na região que codifique aminoácidos carregados positivamente, possa gerar uma proteína alterada, impedindo que os dímeros se liguem ao DNA, interferindo na regulação dos genes músculo-específicos, podendo inviabilizar a diferenciação e proliferação das células musculares ou pelo menos retardar esse processo, já que o *MyoD1* pode substituir a função do *myf-5* na fase inicial de diferenciação dos mioblastos.

Neste trabalho, as alterações encontradas no *exon 2* não foram consideradas, pois aconteceram em apenas um *mix* de fêmeas (*mix 2*), não sendo esta alteração investigada mais profundamente, pois se deu prioridade às alterações encontradas no *exon 3*. A amplificação do *exon 3* pelo sexto conjunto de *primers* gerou seqüências compatíveis com o padrão eletroforético, onde fragmentos heteroduplexes foram encontrados no macho C e na fêmea 211, sendo então consideradas para análise. As alterações encontradas nas fêmeas 151 e 154, por serem homozigotas, não revelaram bandas heteroduplexes, e sim fragmentos com peso molecular menor que o inicialmente esperado (479 pb). Foi notada discrepância entre a seqüência depositada no *Genbank* (Y17154), usada para sintetizar os *primers* que geraram os fragmentos estudados e a seqüência publicada no artigo de te PAS et al. (1999a). Seguindo a seqüência depositada no *GenBank*, as alterações que geraram os novos alelos estão localizadas dentro do terceiro *exon*; e de acordo com o artigo, estas mutações encontram-se na porção 3' não transcrita do gene. Na Figura 5, estão apresentadas parcialmente as três seqüências. Em negrito está representada a seqüência do terceiro *exon* publicada no *GenBank* (Y17154); a seqüência correspondente a este *exon*, citada por te PAS et al. (1999), está sublinhada e a região amplificada no trabalho, em itálico.

No artigo publicado por te PAS et al. (1999), o *exon 3* é bem menor que o indicado na seqüência Y17154 do *GenBank*, conseqüentemente, as alterações se encontram em uma região não traduzida, existindo a possibilidade das alterações descritas nesse trabalho estarem situadas em uma região que não codifique proteína. Mesmo estando as alterações fora de região transcrita, estas poderão servir para marcar o próprio *myf-5* e outro(s) gene(s) em desequilíbrio de ligação, funcionando, *a priori*, para a população estudada como um marcador genético, pois, de acordo com BUYS (2000), o marcador genético pode ser parte do gene responsável pela característica ou pode estar localizado perto desse gene e ser co-herdado. Por meio das técnicas de genética molecular, a correlação entre o segmento cromossômico marcado e as características ou a sua variabilidade é estabelecida.

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados permitiram concluir que:

O gene *myf-5* apresenta variação alélica, que pode ser usada para trabalhos de associação com características de interesse econômico em programas de seleção assistida por marcadores.

Seqüências depositadas no *GenBank* devem ser bem estudadas e comparadas com outras fontes, antes de se estabelecerem os conjuntos de *primers* para amplificação e sequenciamento.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S.F., MADDEN, T.L., SCHÄFFER, A.A. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v.25, p.3389-3402, 1997.
- BERGSTROM, D.A., TAPSCOTT, S.T. Molecular distinction between specification and differentiation in myogenic basic helix-loop-helix transcription factor family, **Molecular Cell Biology**, v.21, n.7, p.2404-2412, 2001.
- BUYS, N. Recent technological advances in pig genetic improvement. In: SEMINÁRIO INTERNACIONAL DE SUINOCULTURA, 5., 2000, São Paulo. **Proceedings...** São Paulo, 2000.
- COSSU, G., TAJBAKSH, S., BUCKINGHAM, M. How is myogenesis initiated in the embryo? **TIG**, v.12, n.6, p.217-222, 1996.
- COUTINHO, L.L., EYRE, J.G., ALVARES, L.E. **Controle molecular do desenvolvimento da musculatura esquelética**. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, 1999, Viçosa, MG. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p.21-24.
- FUJII, J., OTSU, K., ZORZATO, F. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. **Science**, v.253, p.448-451, 1991.
- GEESINK, G.H., KOOHMARAIE, M. Ionic strength-induced inactivation of  $\mu$ -calpain in postmortem muscle 1,2. **Journal of Animal Science**, v.78, p.2336-2343, 2000.
- GEBERNS. F., VAN EARP, A.J.M., MEUWISSEN, T.H.E. et al. Heart fatty-acid binding protein gene variants are associated with intramuscular fat content and backfat thickness in pigs, In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998. **Proceedings...** 1998. v.26, p.187-190.
- HAMES, D.B., RICKWOOD, D. **Gel eletrophoresis of protein**. 1990. cap.1, p.383.
- LIMA, P.R.M. **Diferenciação, expressão gênica e o ciclo celular**. **Seminários de biologia celular**. Instituto de Biociências: 1999. v.1, 345p.

- RODRIGUES, C.V. **Detecção e análise de polimorfismos do gene do hormônio de crescimento bovino em animais de raças zebuínas e taurinas.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1998. 109p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, 1998.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. p.564.
- SANGER, F., COULSON, A.R. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. **Journal of Molecular Biology**, v.94, p.444-448, 1975.
- SMITH, T.P.L., ROHRER, G.A. Linkage mapping of the porcine micromolar calcium-activated neutral protease( $\mu$ -calpain) gene on SSC2. **Journal of Animal Science**, v.79, p.554-555, 2001.
- SOUMILLION, A., ERKENS, J.H.F., LENSTRA, J.A., RETTENBERGER, G., TE PAS, M.F.W. Genetic variation In the porcine myogenin gene locus. **Mammalian Genome**, v.8, p.564-568, 1997.
- SOUTHWOOD, O.I., SHORT, T.H., PLATOW, G.S. Genetic markers for litter size. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 6., 1998. **Proceedings...** 1998. v.26, p.453-456.
- TAILOR, M.V. Muscle differentiation: how two cells become one. Review. **Current Biology**, v.12, p.224-228, 2002.
- TAJBASHSH, S., BORELLO, U., VIVARELLI, E. et al. Differentiation activation of *myf-5* and *MyoD* by different Wnts in explants of mouse paraxial mesoderm and the later activation of myogenesis in the absence of *myf-5*. **Development**, v.125, p.4155-4162, 1998.
- te PAS, M.F.W., VERBURG F.J., GERRITSEN C.L.M et al. Messenger ribonucleic acid expression of the Myo-D gene family in muscle tissue at slaughter in relation to section for porcine growth rate. **Journal of Animal Science**, v.78, n.1, p.69-77, 2000.
- te PAS, M.F.W., HARDESRS, F.L., SOMILLION, A. et al. Genetic variation at the porcine *MYF-5* gene locus. Lack of association with meat production traits. **Mammalian Genome**, v.10, p.123-127, 1999.

YUN, K., WOLD, B. Skeletal muscle determination and differentiation: story of a core regulatory network and its context. **Current Opinion in Biology**, v.8, p.877-889, 1996.

VIRTUAL GENOME CENTER. 2000. <http://alces.med.umn.edu/bin/webprimers>, 2000.

## ASSOCIAÇÃO DE VARIANTES ALÉLICAS DO GENE *myf-5* COM CARACTERÍSTICAS ECONÔMICAS EM SUÍNOS

**RESUMO** - Neste trabalho, estudou-se o efeito fenotípico de dois polimorfismos encontrados no gene *myf-5*, em uma população de suínos F2 oriundos do cruzamento de linhagens divergentes, entre dois machos da raça Piau e 18 fêmeas comerciais. O primeiro polimorfismo estudado diz respeito a uma inserção “ATG” e deleção “A”, respectivamente, nas posições 3326 e 3357 pb deste gene, encontrado em duas fêmeas comerciais parentais; esta variante alélica foi chamada de Inserção. O segundo polimorfismo, chamado de Deleção, foi identificado em um macho nativo brasileiro e em uma fêmea comercial também da geração parental e trata de deleção “TTT” nas posições 3420-3422pb. Trezentos e cinquenta e nove animais F2 foram genotipados, obtendo-se as seguintes frequências genotípicas: 264 animais tiveram genótipo Normal/Normal (NN) (73,5%); 86 animais, Normal/Inserção (NI) (24%); cinco animais, com genótipo Normal/Deleção (ND) (1,4%); e quatro animais, genótipo Inserção/Deleção ID (1,1%). Os genótipos ND e ID foram desconsiderados nas análises estatísticas, por não serem representativos. Por meio de modelos estatísticos, usando o programa SAS, foram feitas associações entre os fenótipos das características de desempenho, carcaça e qualidade da carne. As características peso total da paleta, perda por gotejamento, perda por cozimento e perda total apresentaram diferença significativa entre os genótipos ( $P < 0,05$ ). Os valores para os genótipos NN e NI foram, respectivamente,  $4,86 \pm 0,66$  e  $5,04 \pm 0,59$  kg para peso de paleta,  $3,14 \pm 1,56$  e  $3,69 \pm 2,78\%$  para perda por gotejamento,  $32,26 \pm 2,41$  e  $33,21 \pm 2,31\%$  para perda por cozimento e  $34,16 \pm 2,63$  e  $34,97 \pm 2,08\%$  para perda total. Esses resultados indicam que o novo alelo “I” tem efeito deletério sobre as características de qualidade da carne e deve ser monitorado em programas de seleção assistida por marcadores.

Palavras-chave: *myf-5*, qualidade da carne, gene candidato, suíno

## ASSOCIATIONS OF *myf-5* GENE ALLELIC VARIANTS WITH ECONOMIC TRAITS IN PIGS

**SUMMARY** - In this chapter it was studied the phenotypic effect of two polymorphisms found in the *myf-5* gene in a F2 swine population, originated from a cross between 2 Brazilian native boars and 18 commercial females. The first polymorphism is an “ATG” insertion and an “A” deletion, respectively, at positions 3326 and 3357bp, detected in two parental commercial females. This variation was called Insertion. The second polymorphism, called Deletion, was identified in a native male and in a commercial female, and is characterized by a “TTT” deletion at positions 3420-3422bp. The genotypes of 359 F2 animals were obtained at the following frequencies: 264 Normal/Normal (NN) animals (73,5%), 86 Normal/Inserção (NI) animals (24%), 5 Normal/Delection (ND) animals (1,4%) and 4 Normal/Insertion (ID) animals (1,1%). The genotypes ND and ID were not considerate, as they were not representative. Using the SAS program the genotypes NN and NI were associated to phenotypic data for performance, carcass and meat quality traits obtained in the studied F2 population. It was found significance at 5%, respectively for NN and NI animals for picnic shoulder weight ( $4.86 \pm 0.66$  and  $5.04 \pm 0.59$ ), drip loss ( $3.14 \pm 1.56$  and  $3.69 \pm 2.78\%$ ), cooking loss ( $32.26 \pm 2.41$  and  $33.21 \pm 2.31\%$ ) and total loss ( $34.16 \pm 2.63$  and  $34.97 \pm 2.08\%$ ). The results indicated that the allelic variant “Insertion” has a deleterious effect on meat quality traits and should be monitored in marker assisted selection programs.

Key Words: *myf-5*, meat quality, candidate gene, swine

## 1. INTRODUÇÃO

O melhoramento genético animal é fundamentado nos princípios de seleção, no qual alguns animais são mantidos para reprodução, enquanto outros são descartados. Os critérios para se realizarem essas escolhas mudam à medida que o papel dos genes e suas interações com agentes ambientais na expressão das características de interesse são mais bem entendidos. A princípio, a escolha dos animais para reprodução era feita utilizando características pré-determinadas por associações de criadores que visavam manter um padrão fenotípico das raças, não levando em consideração os índices zootécnicos desses animais.

Posteriormente, os pesquisadores começaram a dar mais importância a características de desempenho na escolha dos reprodutores. Uma restrição nessa técnica foi logo notada pelos pesquisadores. O meio exercia grande influência nas características, prejudicando alguns animais com grande potencial genético. Era necessário desenvolver artifícios para separar os efeitos do meio dos efeitos genotípicos.

Com a evolução das pesquisas, foram descobertos os primeiros marcadores moleculares, as isoenzimas. Essas isoenzimas apresentavam formas polimórficas que poderiam ser associadas às características de produção, e a influência do meio onde o animal foi criado não exerceria efeito na análise do potencial genético desse animal. Entretanto, os marcadores isoenzimáticos logo ficaram insuficientes para tantas associações a serem feitas. Quando MULLIS (1990) concebeu o processo da PCR, novos campos se abriram para a associação entre os polimorfismos de DNA e as características fenotípicas.

As técnicas que vêm sendo empregadas são cada vez mais precisas e objetivam separar totalmente as contribuições do meio das contribuições do efeito genotípico. Dentre essas técnicas, os marcadores de DNA podem estar associados a QTL, genes principais e genes candidatos, mostrando-se melhores e mais potentes. As marcas ou marcadores no genoma dos animais não influem na característica estudada, mas podem estar ligados a uma região cromossômica que contenha os genes responsáveis pela característica. Como esses marcadores são polimórficos, suas formas podem ser associadas, por meio de métodos estatísticos, a variações fenotípicas.

Os dados para o estabelecimento dessas associações são obtidos pelo cruzamento entre animais de linhagens divergentes, por uma ou duas gerações, para se obter o máximo desequilíbrio de ligação entre a região que se acredita influenciar a característica e seus marcadores. Esta estratégia pode ser usada para o mapeamento de regiões ligadas a características quantitativas, ou, de forma alternativa, pode-se escolher um gene com ação biológica conhecida, envolvido no desenvolvimento ou na fisiologia da característica (ROTHSCHILD, 1997).

Estudos buscando encontrar associações entre marcas no genoma e características quantitativas vêm sendo feitos em vários centros de pesquisas mundiais. Em suínos, esses estudos normalmente usam famílias obtidas a partir de linhagens divergentes. Podem ser relatados como exemplos os cruzamentos entre *Wild Boar* x *Large White* (Anderson et al., 1994), *Meishan* x *Large White* (Archibald et al., 1996), *Wild Boar* x *Pietrain* x *Meishan* (Moser et al., 1998) e *Iberian pig* x *Landrace* (the IBMAP Consortium, 1998), citados por de VRIES et al. (1998).

Tentativas de associação dos polimorfismos moleculares com características fenotípicas vêm sendo feitas há várias décadas. No início, a tecnologia das isoenzimas permitiu que alguns resultados fossem alcançados. VÖGELI et al. (1984) fizeram a comparação dos polimorfismos de grupos sanguíneos em duas linhagens selecionadas de suínos, uma para crescimento magro, outra para conversão alimentar; além desse objetivo, o grupo estudou a predisposição à síndrome do halotano a partir de fenótipos de grupos sanguíneos. O gene responsável pela síndrome do halotano também interfere na qualidade da carne suína (FUJII et al., 1991). Marcadores moleculares associados a características de qualidade da carne vêm sendo estudados há pouco tempo.

De VRIES et al. (2000) relataram que têm usado o polimorfismo em genes candidatos para procurar associações em populações cruzadas de suínos. Quando essas associações são encontradas, o marcador pode potencialmente ser usado diretamente em programas de melhoramento. O autor cita também os genes da *calpaína*, *calpastatina* e *catepsina* como exemplo de genes candidatos que têm tido suas formas polimórficas associadas às características de qualidade da carne, em bovinos e ovinos. Nessas espécies, eles são responsáveis pela síntese e degradação de proteína muscular, ou seja, *tunover* protéico *in vivo*, e também após a morte são importantes no processo de transformação do músculo em carne. Na espécie suína, o gene da catepsina tem sido estudado para se estabelecerem associações entre suas variantes alélicas (B, B+L e H), com proteólise em produtos curados.

GERBENS et al. (1997) estudaram a possível relação entre a heterogeneidade genética, no gene da H-FABP, considerado gene candidato para qualidade da carne, e a variação na deposição de gordura intramuscular, ressaltando o uso do polimorfismo descrito em estudos de associação ou análise de ligação com características de produção e de qualidade da carne.

Por meio do seqüenciamento do gene *H-FABP*, GERBENS et al. (1998a) relataram a presença de um microssatélite de  $[CA]_{21}$  localizado a 69 pb do início do segundo *exon* na região 5' do gene (*upstream*). A associação do polimorfismo estudado gerou três alelos A1, A2 e A3, com seis classes genotípicas. Os genótipos foram associados à gordura intramuscular, espessura de toucinho e perda d'água por gotejamento. Os genótipos A2A3 e A3A3 ocorreram em baixa freqüência, não podendo ser associados às características estudadas. O genótipo A1A1 foi comparado com os outros analisados, apresentando menor espessura de toucinho, melhores índices de gordura intramuscular e pior índice de perda por gotejamento.

GERBENS et al. (1999), ao estudarem o efeito das variantes genéticas do gene *H-FABP*, usando enzimas de restrição, concluíram que o crescimento e o aumento da gordura intramuscular e da espessura de toucinho estão associados a um polimorfismo de fragmento de restrição comum e o polimorfismo do gene *H-FABP* pode ser usado como marcador, em programas de melhoramento, para ganho de peso diário e gordura intramuscular.

ROTHSCHILD e PLASTOW (1999) relataram, como genes candidatos associados a características de qualidade da carne, o gene da *miogenina*, membro da família *MyoD*, relacionado a maior número de fibras musculares; o gene da *calpastatina*, relacionado ao *tunover* protéico muscular; e o gene *KIT*, associado à cor “branco dominante” dos animais, que possui maior aceitação por parte dos consumidores de alguns cortes de carne *in natura*. O gene *KIT* já foi patenteado e tem sido usado em programas de seleção assistida por marcadores, *Marker Assisted Selection* – MAS e o gene *MSHR*, no controle de animais de cores vermelha e preta.

De VRIES et al. (1998) relataram alguns resultados de genes considerados principais, ou seja, quando em homozigose, imprimem ao indivíduo portador um desvio-padrão, ou mais, na característica estudada em relação aos indivíduos que não possuem esse alelo. Na categoria de gene principal estão o gene da sensibilidade ao halotano (*PSS*), relacionado à queda de pH após o abate, e o gene do rendimento de Napole (*RN*), relacionado à qualidade de produtos curados. Na categoria de gene candidato, têm-se os genes relacionados à gordura intramuscular, onde o que mais tem chamado a atenção é o *H-FABP*. O gene da Androstenona está relacionado com o odor característico da carne de machos não castrados.

Esse capítulo tem como objetivo estabelecer associações entre variantes alélicas do gene *myf-5* e características de desempenho, rendimento de carcaça e de qualidade da carne, em animais F2, produtos do cruzamento entre animais da raça Piau e uma linhagem comercial de suínos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1. Coleta dos dados fenotípicos

Foram genotipados 359 animais F2, resultantes de cruzamento de 11 fêmeas *Landrace x Large White* e 7 fêmeas *Landrace x Large White x Pietrain* e machos da raça nativa Piau. O experimento foi conduzido na Granja de Melhoramento de Suínos da Universidade Federal de Viçosa. Os animais foram abatidos com peso vivo médio de 65 kg, na própria granja.

As características de carcaça avaliadas foram: idade ao abate, em dias (IDABATE), peso vivo imediatamente anterior ao abate (PVIVO), peso da banda direita com cabeça e pés (PBDIR), peso da banda esquerda com cabeça e pés (PBESQ), peso da carcaça com cabeça e pés (PCARC), rendimento de carcaça com pés e cabeça (RCARC), comprimento de carcaça pelo Método Brasileiro de Classificação de Carcaça (MBCC), comprimento de carcaça pelo Método Americano (MLC), maior espessura de toucinho na região da copa, na linha do dorso lombar (SH), espessura de toucinho imediatamente após a última costela, na linha dorso-lombar (UC), espessura de toucinho entre a última e a penúltima vértebra lombar, na linha dorso-lombar (UL), menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar, na linha dorso-lombar (L), espessura de toucinho medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar (P2), espessura de toucinho (mm) a 6,5 cm da linha dorso-lombar equivalente à P2 (ETO), peso do bacon (PBACON), espessura do bacon (ESPBACON), comprimento (mm) do lombo sobre uma reta traçada da coluna vertebral serrada até a posição onde foi medida a espessura de toucinho em P2 (PROLOMB) e área de olho de lombo em cm<sup>2</sup> (AOL).

Foram avaliadas as características de cortes de carcaça: peso da banda direita resfriada (PBDIRRES), peso total de pernil (PTPERNIL), peso do pernil sem pele e gordura (PPERNIL), peso total da copa (PTCOPA), peso da copa sem pele e gordura (PCOPA), peso total da paleta (PTPALETA), peso da paleta sem pele e gordura (PPALETA), peso total do carré (PTCARRE), peso do lombo (PLOMBO), peso da costela (COSTELA), peso da papada (PAPADA), peso da cabeça (CABEÇA), peso do filezinho (FILEZIN), peso da banha rama (BARAMA), peso do rim (RIM), peso do pulmão (PULMÃO), peso do coração (CORAÇÃO), peso do fígado (FÍGADO), peso do baço (BAÇO) e comprimento do intestino delgado em metros (INTEST).

As características de desempenho avaliadas foram peso em quilos ao nascimento (PNAS), aos 21 (P21), 42 (P42), 63 (P63), 77 (P77) e 105 dias (P105), consumo de ração (CONSRAC), ganho de peso diário (GPD) e conversão alimentar (CA) dos 77 aos 105 dias.

As características de qualidade da carne foram avaliadas no Laboratório de Tecnologia da Carne do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFV. As características avaliadas no músculo *longissimus dorsi* foram: pH 45 minutos após o abate (pH45), pH 24 horas após o abate (pH24), percentagem de gordura intramuscular (GORINT), perda por gotejamento (PG), perda por cozimento (PC), perda total (PT),

maciez objetiva (força de cisalhamento - FC) e coloração. A coloração foi determinada pelo sistema *HUNTER LAB*, sendo medidos luminosidade (L), índice de vermelho (A), índice de amarelo (B), tonalidade de cor (h) e índice de saturação (c), em espectrofotômetro. Maiores informações sobre a metodologia empregada na análise das características de qualidade da carne são apresentadas por BENEVENUTO JÚNIOR (2001).

## 2.2. Amplificação do gene do fator miogênico 5

Entre as alterações encontradas por sequenciamento no gene *myf-5*, descritas no capítulo I, escolheu-se trabalhar com aquelas presentes no terceiro *exon*, geradas pela amplificação do sexto conjunto de *primers*. A genotipagem de 359 animais F2 foi feita no Laboratório de Biotecnologia Animal do DZO/UFV e a amplificação do fragmento 6, conforme descrito no Capítulo I.

Os fenótipos eletroforéticos foram classificados segundo a presença ou a ausência das bandas extras, ou seja, alguns animais apresentaram, além do fragmento de 479 pares de bases (pb), outros com peso de 476 ou 481 pb, classificando assim os genótipos dos animais. A presença ou ausência de bandas distintas do fragmento amplificado foram classificadas como: Normal/Normal (NN), onde uma única banda era visualizada e apresentava um peso molecular de 479 pb; Normal + Inserção (NI), que se apresentava com duas bandas, uma de 479 e outra com 481 pb; Normal + Deleção (ND), também aqui eram visualizadas duas bandas distintas, uma com 479 e outra com 476 pb; Inserção + Deleção (ID), visualizaram-se também duas bandas, uma com 476 e outra com 481 pb. As outras prováveis combinações, Inserção + Inserção (II) e Deleção + Deleção (DD), não ocorreram animais estudados. Apresentam-se na Figura 1 os padrões de bandas apresentados no gel e suas classificações.

Como descrito no Capítulo I, os genótipos encontrados foram classificados como 1, Normal/Normal (NN); 2, Normal/ Inserção (NI); 3, Normal/Deleção(ND); 4, Inserção/Deleção(ID), detectados, respectivamente, nas frequências de 73,5% (264 animais); 24% (86 animais); 1,4% (5 animais); e 1,1% (4 animais). Como os genótipos 1 e 2 foram os que apareçam em maior número, os demais foram desconsiderados nas associações estatísticas com características quantitativas. Relembrando, o alelo Deleção

(D) foi herdado do macho parental C e da fêmea comercial 211, heterozigotos para este alelo. O alelo Inserção (I) deveu-se às seqüências herdadas das fêmeas comerciais 151 e 154, homozigotas para este alelo. Após as genotipagens, os fenótipos dos animais F2 quanto às características de desempenho, carcaça e qualidade da carne foram associados com seus genótipos.

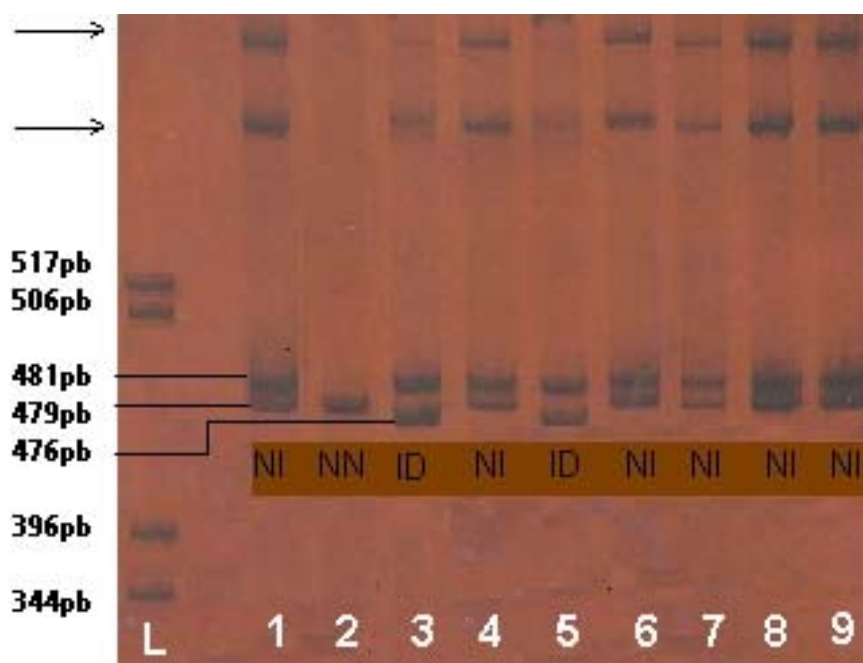


Figura 1 - Resolução dos produtos amplificados, da geração F2, usando o sexto conjunto de *primers* na região 3' do gene *myf-5*, em gel de poliacrilamida não desnaturante (8%), corado com nitrato de prata. A primeira canaleta (L) refere-se ao marcador de peso molecular (1kb DNA *Leader*, *Life Technologies*). Nas canaletas numeradas, são mostradas as amplificações apresentando alelos e as combinações desses alelos gerando bandas em heteroduplex indicadas pelas setas. As siglas NI, NN e ID significam genótipos Normal/Inseção com 479 e 481 pb, Norma/Normal com 479 e 479 pb e Inserção/Deleção com 476 e 479 pb, respectivamente. A numeração na margem esquerda indica o tamanho dos fragmentos do marcador e dos fragmentos amplificados, em pb.

### 2.3. Análises estatísticas

As análises estatísticas para a associação dos genótipos com as características avaliadas foram feitas utilizando-se o PROC GLM do SAS, seguindo-se o modelo:

$$y_{ijk} = S_i + L_j + (C_{ijk} - \bar{C})b + e_{ijk}$$

em que:

$y_{ijk}$  = o fenótipo;

$S_i$  = o efeito fixo do sexo  $i$ ,  $i = 1$  (macho),  $2$  (fêmea);

$L_j$  = o efeito fixo do lote ou época de parição  $j$ ,  $j = 1, 2, 3, 4, 5$ ;

$(C_{ijk} - \bar{C})b$  = ajustamento para as covariáveis (exceto NTETAS, TETE e TETD = sem covariável):

- tamanho de leitegada ao nascimento para PN;
- tamanho de leitegada ao desmame para P21, P42, P63, P77, P105 e PA;
- peso aos 77 dias para CR, GPD e CA;
- peso de carcaça para as características de carcaça;
- peso da banda direita resfriada para as características de corte; e
- idade ao abate para as características de qualidade de carne.

Foi aplicado o teste de F (ANOVA) para se verificar a diferença entre os genótipos. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

### 3. RESULTADOS

Apesar de a seqüência Deleção ser herdada a partir um macho parental, que tenderia a deixar mais descendentes, encontraram-se, em maior freqüência na geração F2, animais portadores do genótipo Inserção, que é derivado de duas fêmeas comerciais da primeira geração. Este fato pode ser explicado pelo acasalamento aleatório entre os machos e as fêmeas na geração parental, onde o macho C, heterozigoto para a deleção (ND), foi acasalado com fêmeas normais (NN), gerando animais F1 com genótipo Normal/Normal e Normal/Deleção, na freqüência de 50%. A Fêmea 211 portadora deste mesmo genótipo (ND) foi acasalada com o macho J (NN). Como a geração F1 não foi

genotipada, pode-se aventar a possibilidade dos animais portadores da Deleção terem sido excluídos aleatoriamente dos sistemas de acasalamentos que originaram a geração F2.

O macho J (NN) que acasalou com as fêmeas 151 e 154, ambas homozigotas para o genótipo Inserção (II), gerou progênie F1 100% (NI), que, ao ser acasalada com animais (NN), produziu descendentes F2 NI e NN nas freqüências observadas no trabalho. As fêmeas parentais acasaladas com os dois machos e os produtos da geração F1 estão representados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Número das fêmeas cruzadas com o macho C e número de descendentes da F1

Parentais		Geração F1					
	22	64	66	67	69	70	71
	69	948	949	950	951	952	953
	80	118	122	123	125		
	90	112	114	115			
Macho C	122	14	17				
	130	41	43	44			
	159	166	167	168			
	147	98	102	103	104	105	106

Tabela 2 - Número das fêmeas cruzadas com o macho J e número de descendentes da F1

Parentais		Geração F1							
Macho J	25	194	200	203	204	205			
	91	394	395	396					
	92	1131	1133						
	127	212	214						
	133	175	177						
	151	178	181	182	183	184	185	186	187
	154	228	229						
	160	190	192	193					
	175	216	217	218	220				
	211	159	160	162	163				

Constam nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 os resultados das análises estatísticas de associação dos genótipos às características de desempenho, carcaça e qualidade da carne. Constatou-se que houve diferença estatística apenas para perda por gotejamento, perda por cozimento e perda total, indicando que o gene estudado, *myf-5*, pode servir de marcador para tais características, em sistemas de melhoramento para qualidade da carne suína que utilizam técnicas de biologia molecular no processo de seleção.

Tabela 3 - Número de observações (n), média e desvio-padrão (dp) das características de desempenho, de acordo com os genótipos NN (Normal/Normal) e NI (Normal/Inserção)

Características de desempenho	Genótipos*			
	NN		NI	
	n	Média ± dp	N	Média ± dp
PNAS (kg)	250	1,20 ± 0,27	84	1,17 ± 0,26
P21 (kg)	186	4,93 ± 1,05	72	4,92 ± 0,99
P42 (kg)	185	8,46 ± 1,86	78	8,10 ± 1,83
P63 (kg)	188	16,46 ± 3,34	77	15,60 ± 3,35
P77 (kg)	197	21,43 ± 3,99	79	20,30 ± 4,20
P105 (kg)	193	35,95 ± 6,06	78	34,95 ± 5,98
CONSRA (kg)	240	40,07 ± 7,93	83	39,10 ± 8,25
GPD (kg)	236	0,52 ± 0,14	81	0,54 ± 0,11
CA (kg/kg)	236	2,91 ± 0,76	81	2,70 ± 0,58

\* Não-significativos a 5%.

Características: PNAS - Peso ao nascimento, P21 - Peso aos 21 dias, P42 - Peso aos 42 dias, P63 - Peso aos 63 dias, P77 - Peso aos 77 dias; P105 - Peso aos 105 dias, CONSRA - Consumo de ração dos 77 aos 105 dias, GPD - Ganho de peso diário dos 77 aos 105 dias, CA - conversão alimentar dos 77 aos 105 dias.

Tabela 4 - Número de observações (n), média e desvio-padrão (dp) das características de carcaça, de acordo com os genótipos NN (Normal/Normal) e NI (Normal/Inserção)

Características de carcaça	Genótipos*			
	NN		NI	
	n	Média ± dp	n	Média ± dp
IDABATE (dias)	175	147,58 ± 10,00	65	150,34
PVIVO (kg)	168	64,76 ± 5,53	64	66,25 ± 4,97
PBDIR (kg)	217	27,03 ± 2,80	70	27,47 ± 2,59
PBESQ (kg)	218	26,91 ± 2,70	70	27,28 ± 2,49
MBCC (cm)	218	86,14 ± 4,28	70	85,93 ± 4,14
MLC (cm)	216	71,79 ± 3,29	68	71,68 ± 3,05
UC (mm)	218	19,96 ± 4,89	70	20,80 ± 4,47
RCARC %	213	82,03 ± 2,28	67	82,04 ± 2,08
SH (mm)	216	41,32 ± 5,83	70	40,91 ± 5,44
UL (mm)	216	28,94 ± 6,09	70	30,02 ± 6,16
L (mm)	196	44,95 ± 1,92	61	45,40 ± 1,89
P2 (mm)	217	16,98 ± 3,64	70	17,70 ± 3,95
ETO (mm)	201	21,92 ± 5,23	64	23,05 ± 5,67
PROLOMB (mm)	194	43,30 ± 4,33	63	44,08 ± 4,41
PBACON	220	2,73 ± 0,46	70	2,76 ± 0,44
ESPBACON (mm)	219	25,42 ± 6,25	70	27,26 ± 7,22
AOL (cm <sup>2</sup> )	201	26,52 ± 3,70	66	26,00 ± 3,56

\* Não-significativos a 5% de probabilidade.

Características: IDABATE - idade ao abate, PVIVO - peso vivo antes do abate, PBDIR - peso de ½ carcaça direita, PBESQ - peso de ½ carcaça esquerda, MBCC - comprimento de carcaça pelo método Brasileiro, MLC - comprimento de carcaça pelo método americano, UC - espessura de toucinho imediatamente após a última costela na linha dorso-lombar, RCARC - rendimento de carcaça com pés e cabeça, SH - maior espessura de toucinho na região da copa, na linha dorso-lombar, UL - espessura de toucinho imediatamente após a penúltima vértebra lombar na linha dorso-lombar, L - menor espessura de toucinho na região acima da última vértebra lombar na linha dorso-lombar, P2 - espessura de toucinho (mm) medida imediatamente após a última costela, a 6,5 cm da linha dorso-lombar, ETO - espessura de toucinho (mm) a 6,5 cm da linha dorso-lombar equivalente à P2, PROLOMB - comprimento do lombo sobre uma reta traçada da coluna vertebral serrada até a posição onde foi medida a espessura de toucinho em P2, PBACON - peso do bacon, ESPBACON - espessura do bacon, AOL - área de olho de lombo.

Tabela 5 - Número de observações (n), média e desvio-padrão (dp) dos cortes de carcaça, de acordo com os genótipos NN (Normal/Normal) e NI (Normal/Inserção)

Características de carcaça	Genótipos*			
	NN		NI	
	n	Média ± dp	n	Média ± dp
PBDIRRES (kg)	218	26,70 ± 3,05	70	27,08 ± 2,55
PTPERNIL (kg)	221	7,31 ± 0,86	70	7,36 ± 0,83
PPERNIL (kg)	219	5,04 ± 0,61	69	5,06 ± 0,60
PTCOPA (kg)	223	2,36 ± 2,35	70	2,41 ± 0,35
PCOPA (kg)	222	1,71 ± 0,28	70	1,71 ± 0,26
PTPALETA (kg)	220	4,86 <sup>a</sup> ± 0,66	70	5,04 <sup>b</sup> ± 0,59
PPALETA (kg)	223	2,72 ± 0,41	70	2,76 ± 0,39
PTCARRE (kg)	218	3,53 ± 0,47	70	3,52 ± 0,50
PLOMBO (kg)	219	1,05 ± 0,18	69	1,05 ± 0,18
PBACON (kg)	220	2,73 ± 0,46	70	2,76 ± 0,44
ESPBACON (kg)	219	25,42 ± 6,25	70	27,26 ± 7,22
COSTELA (kg)	222	1,55 ± 0,25	70	1,57 ± 0,25
PAPADA (kg)	222	0,73 ± ,021	70	0,69 ± 0,17
CABEÇA (kg)	222	1,51 ± 0,22	70	1,55 ± 0,21
FILEZIN (kg)	221	0,23 ± 0,04	69	0,23 ± 0,04
BARAMA (kg)	220	0,48 ± 0,16	70	0,49 ± 0,15
PULMÃO (kg)	212	0,45 ± 0,07	70	0,46 ± 0,09
CORAÇÃO (kg)	216	0,23 ± 0,03	70	0,24 ± 0,03
FÍGADO (kg)	215	1,27 ± 0,15	70	1,30 ± 0,18
INTEST (m)	218	18,21 ± 1,86	70	18,49 ± 1,80
BAÇO (kg)	218	0,09 ± 0,02	70	0,09 ± 0,02
RIM (kg)	221	0,12 ± 0,02	70	0,13 ± 0,02

Médias seguidas por letras na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste F (P>0,05). As características analisadas foram: PBDIRRES - peso da banda direita resfriada, PTPERNIL - peso total de pernil, PPPERNIL - peso do pernil sem pele e gordura, PTCOPA - peso total da copa, PCOPA - peso da copa sem pele e gordura, PTPALETA - peso total da paleta, PPALETA - peso da paleta sem pele e gordura, PTCARRE - peso total do carré, PLOMBO - peso do lombo, PBACON - peso do bacon, ESPBACON - espessura do bacon, COSTELA - peso da costela, PAPADA - peso da papada, CABEÇA - peso da cabeça, FILEZIN - peso do filezinho, BARAMA - peso da banha rama, RIM - peso do rim, PULMÃO - peso do pulmão, CORAÇÃO - peso do coração, FIGADO - peso do fígado, BAÇO - peso do baço e INTEST - comprimento do intestino.

Tabela 6 - Número de observações “n”, média e desvio-padrão (dp) das características de qualidade da carne, de acordo com os genótipos NN (Normal/Normal) e NI (Normal/Inserção)

Características de qualidade da carne	Genótipo			
	NN		NI	
	n	Média ± dp	n	Média ± dp
pH45 (min)	212	6,52 ± 0,26	69	6,50 ± 0,28
pH24 (h)	214	5,72 ± 0,17	69	5,74 ± 0,16
L D <sub>65</sub>	197	44,98 ± 1,78	60	45,41 ± 2,18
A (índice de vermelho)	195	0,69 ± 0,57	59	0,71 ± 0,67
B (índice de amarelo)	197	6,61 ± 0,58	60	6,59 ± 0,55
GORINT (%)	201	1,55 ± 0,53	61	1,64 ± 0,69
PG (%)	216	3,14 <sup>a</sup> ± 1,56	69	3,69 <sup>b</sup> ± 2,08
PC (%)	217	32,26 <sup>a</sup> ± 2,41	69	3,21 <sup>b</sup> ± 2,31
PT (%)	192	34,16 <sup>a</sup> ± 2,63	56	34,97 <sup>b</sup> ± 2,78
FC (g/1,2 cm)	187	5551,4 ± 823,67	56	5759,1 ± 916,65
h (arctang b/a)	189	83,71 ± 5,19	54	83,63 ± 6,31
c (a <sup>2</sup> + b <sup>2</sup> ) ½	192	6,68 ± 0,55	56	6,67 ± 0,48

Médias seguidas por letras na mesma linha diferem estatisticamente pelo teste F (P>0,05).

As características analisadas foram: pH 45 - pH da carne após 45 min do abate, pH24 - pH da carne 24 horas após o abate, L - luminosidade, densidade 65 da luz medida, A - índice de vermelho, B - índice de amarelo, GORINT - gordura intramuscular, PG - perda por gotejamento, PC - perda por cozimento, PT - perda total, FC - força de cisalhamento, h - tonalidade, c - saturação.

## 4. DISCUSSÃO

Os marcadores de DNA podem ser, de maneira geral, classificados como tipo I e tipo II. No tipo I, estariam os genes e no tipo II, os microssatélites (CLUTTER, 1998). Neste trabalho, estuda-se um marcador do tipo I, caracterizado por um gene de função conhecida, onde a alteração encontrada pode estar dentro de um *exon*, se considerada a seqüência depositada no *GenBank* sob o número Y17154, o que levaria à alteração na estrutura da proteína gerada, podendo explicar os efeitos gênicos observados nas características de qualidade da carne. Todavia, de acordo com te PAS et al. (1999a), as alterações estariam na porção 3' não transcrita do gene, o que não implicaria em alteração de proteína, e colocariam as alterações descritas como marcadores genômicos em forte desequilíbrio de ligação, não apenas com o *myf-5*, mas possivelmente com outros genes próximos. Observando o mapa de ligação do cromossomo 5 (Figura 2), nota-se que outros genes relacionados com o desenvolvimento muscular se encontram próximos ao *myf-5* e a ação supostamente devida a ele pode ser, na realidade, relacionada aos outros genes em questão.

Como exemplo de genes relacionados ao desenvolvimento muscular, que se encontram próximos do *myf-5*, na região cromossômica 5q25, têm-se o fator de crescimento semelhante à insulina – I (*IGF – I*) e a proteína ligadora de miosina C1 (MYBPC1). O fator miogênico 6 não foi identificado nos mapas cromossômicos analisados da espécie suína (<http://www.toulouse.inra.fr> e <http://iowa.threarkdb.org>), apesar de PATAPOUTIAN et al. (1993) e FLOB et al. (1996) relatarem sua posição no mesmo cromossomo em humanos e camundongos.

A diferença no rendimento da carne magra entre as carcaças dos animais está relacionada com a diferença no número de fibras dos músculos desses animais, determinada no período embrionários (hiperplásia). Em bovinos, a capacidade de produção da carne foi determinada pelo número de miócitos do animal, uma vez que animais com musculatura dupla possuíam maior número de fibras que os animais normais (HANSET et al., 1982).

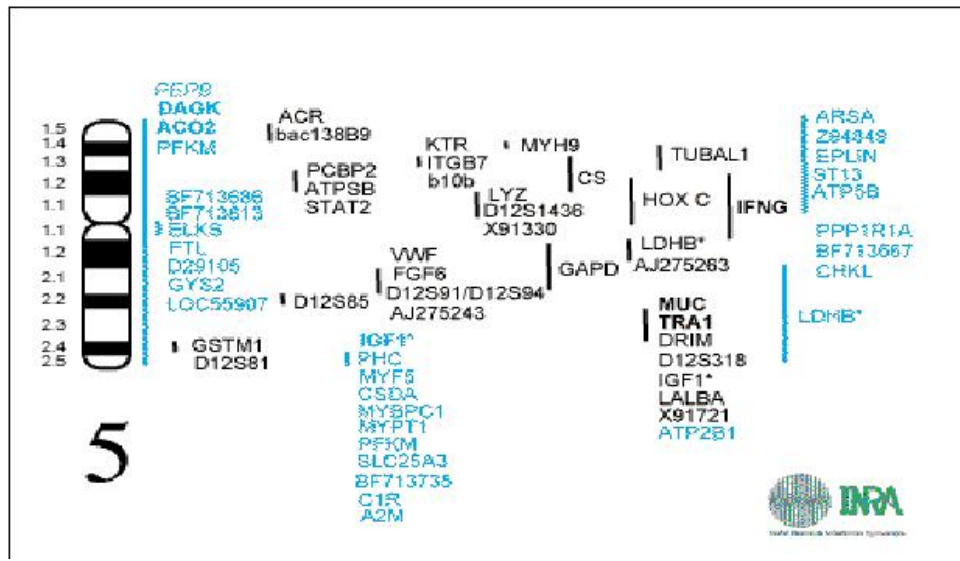


Figura 2 - Mapa citogenético do cromossomo suíno 5 mostrando os genes e marcadores já mapeados. A seta em vermelho indica o *myf-5*. Extraído de <http://www.toulouse.inra.fr>, 04.01.2003.

Como já descrito anteriormente, o processo de formação das fibras musculares nos mamíferos é um processo embrionário comandado pela família de genes *MyoD*. O músculo é a maior parte da carne consumida e, por meio do crescimento ósseo e muscular, tem-se o desenvolvimento corpóreo. Portanto, pode-se supor que as diferentes formas dos genes que controlam o processo hiperplásico muscular regulem as diferenças na taxa de crescimento, nas características da carcaça e na qualidade da carne dos animais. Conseqüentemente, sendo o número de fibras musculares determinado na vida embrionária e regulado, em parte, pelos quatro genes que compõem a família *MyoD*, os polimorfismos desses genes podem exercer efeito nas características relacionadas à produção e qualidade da carne dos suínos.

Te PAS et al. (2000) associaram aumento na expressão de mRNA dos genes da *miogenina*, *myf-5* e *MyoD1* em músculos de suínos selecionados para rápido crescimento, quando comparados com suínos selecionados para crescimento magro. te PAS et al. (1999b), ao analisarem um polimorfismo no gene da *miogenina* por PCR-RFLP com a enzima *MspI*, encontraram dois alelos, A e B, e observaram que o genótipo BB aumentava o peso ao nascimento, o índice de crescimento e o conteúdo da carne magra, sem afetar a espessura da gordura subcutânea. Especificamente com relação ao gene *myf-5*, a associação feita entre suas formas alélicas e características de produção de carne não apresentou diferenças significativas (te PAS et al., 1999a).

Nesta pesquisa, as características peso total da paleta, perda por gotejamento, perda por cozimento e perda total apresentaram valores que expressaram grau de significância ( $P < 0,05$ ) entre os dois genótipos. Essas características podem estar relacionadas com a quantidade ou a qualidade da proteína muscular após o abate.

O alelo Inserção, identificado no presente estudo, pareceu apresentar expressividade variável com relação à deposição de gordura nos cortes de carcaça. Ele influenciou significativamente o peso total da paleta (onde se considerou a gordura subcutânea e a pele), com nível de significância de 1,34%, com animais NI apresentando maior peso (5,04 kg) que animais NN (4,86 kg). Não houve influência deste alelo sobre outros cortes e medidas de carcaça.

Como os animais portadores do alelo Inserção obtiveram as maiores médias para os parâmetros perda por gotejamento (3,69 vs. 3,14%, com nível de significância de 2,78%), perda por cozimento (33,21 vs. 32,26, significância de 0,34%) e perda total (34,97 vs.

34,16, significância de 2,44%), esse alelo pode estar relacionado à pior qualidade ou menor quantidade de proteína muscular, visto que o alelo normal se mostrou mais capaz de reter água na carne.

Os músculos dos animais que apresentam grau de acidez mais elevado têm maior desnaturação protéica. Sendo as proteínas as moléculas responsáveis pela retenção de água na carne, quanto mais preservadas essas proteínas, menor será a perda por gotejamento, cozimento e perda total. Como não se observou diferença na acidez da carne entre os dois grupos de genótipos, outro ponto a ser considerado é a quantidade de proteína desse músculo. Em termos físicos, um corte de carne, se possui mais moléculas preservadas de proteína, poderá reter mais água, entretanto, menor quantidade de proteína íntegra levará à menor capacidade de reter as moléculas de água, com maiores perdas durante os processos de manuseio (cortes, estocagem, cozimento etc).

Entre os índices que avaliam o rendimento da carne nos suínos, a área de olho de lombo (AOL) é a que apresenta maior correlação com a capacidade de retenção de água. BENEVENUTO JÚNIOR (2001), analisando a qualidade da carne dos animais F2 genotipados neste trabalho, encontrou correlação significativa ( $P < 0,01$ ) entre AOL e perda por gotejamento e cozimento. Como no experimento aqui descrito não houve diferença significativa entre os genótipos do gene *Myf-5* (NN e NI) para AOL ( $P > 0,05$ ), pode-se inferir que estes não estariam influenciando a deposição de proteína no músculo e, conseqüentemente, o rendimento da carne, visto ser a AOL um preditor desta característica. Estes genótipos estariam atuando na variação da qualidade das proteínas musculares, as quais apresentam maior desnaturação, com menor capacidade de retenção de água, mesmo em condições nas quais o pH da carne não exerça influência, como no trabalho em questão.

Como exposto na revisão de literatura, a ação do *myf-5* é redundante à de outros genes como o *MyoD 1*, o que leva à redução de efeitos deletérios ocorridos por mutações em qualquer um destes genes. Portanto, para se ter uma real dimensão dos efeitos destes genes sobre o desenvolvimento muscular hiperplásico, devem ser estudadas as interações entre as variantes alélicas dos diferentes genes que atuam no desenvolvimento muscular, principalmente os genes da família *MyoD*.

## 5. CONCLUSÃO

Animais portadores do genótipo NI apresentam maior peso total de paleta, o que parece representar expressividade variável com relação à deposição de gordura nos cortes de carcaça.

Animais portadores do genótipo NI apresentam menor capacidade de retenção de água, o que influencia negativamente as características de processamento da carne.

A mutação identificada no gene do fator miogênico 5 pode ser utilizada como marcador genômico para características de qualidade da carne, na população experimental analisada.

O uso deste marcador para características de qualidade da carne deverá ser testado em populações comerciais de suínos.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BENEVENUTO JÚNIOR, A.A. **Avaliação de rendimento de carcaça e de qualidade da carne de suínos comerciais, de raça nativa e cruzados**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2001. 93p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2001.
- CLUTTER, A.C. Molecular markers and pig breeding programs. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 2., 1998, Uberaba. **Anais...** Uberaba: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 1998.
- de VRIES, A.G., FAUCITANO, L., SOSNICKI, A. et al. The use of gene technology for optimal development of pork meat quality. **Food Chemistry**, v.69, p.397-405, 2000.
- de VRIES, A.G., SOSNICKI, A., GARNIER, J.P. et al. The role of major genes and dna technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, v.49, n.1, p.s245-s255, 1998.
- FLOB, T., HANS, H.A., BRAUN, T. *Myf-5<sup>m1</sup>/Myf-6<sup>m1</sup>* compound heterozygous mouse mutants down-regulate *Myf-5* expression and exert rib defects: evidence for long-range cis effects on *Myf-5* transcription. **Development Biology**, v.174, p.140-147, 1996.
- FUJI, I.J., OTSU, K., ZORZATO, F. et al. Identification of a mutation in porcine ryanodine receptor associated with malignant hypertermia. **Science**, v.253, p.448-451, 1991.

- GEBERNS, F., VAN EARP, A.J.M., MEUWISSEN, T.H.E. et al. Heart fatty-acid binding protein gene variants are associated with intramuscular fat content and backfat thickness in pigs. In: WORLD CONGRESS ON GENETIC APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 1988. **Proceedings...** 1998a. v.26, p.187-190.
- GERBENS, F., JANSEN, A., ANTON, J.M. et al. The adipocyte fatty acid-binding protein locus: characterization and association with intramuscular fat content in pigs, **Mammalian Genome**, v.9, p.1022-1026, 1998b.
- GERBENS, F., JANSEN, A., ANTON, J.M. et al. Effect of genetic variants of the *Heart Fatty Acid-Binding protein* gene on intramuscular fat and performance traits in pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, p.846-852, 1999.
- GERBENS, F., RETTENBERG, G., LENSTRA, J.A. et al. Characterization, chromosomal localization, and genetic variation of the porcine heart fatty acid-binding protein gene. **Mammalian Genome**, v.8, p.328-332, 1997.
- GUIMARÃES, S.E.F. Análises de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal, em: melhoramento genético aplicado à produção animal. **FEP-MVZ**, cap. 24, p.383-419, 1999.
- HANDEL, S.E., STICKLAND, N.C. Check-up growth in pigs: relationship with muscle cellularity. **Animal Production**, v.47, p.291-295, 1988.
- HUNTER ASSOCIATES LABORATORY, Virginia-EUA, p.19, 1991.
- HANSET, R., MECHEAUX, C., DESSY-DOIZE, C. et al. Studies on the 7<sup>th</sup> rib cut in double-muscled and conventional cattle. Anatomical, historical and biochemical aspects. In muscle hypertrophy of genetic origin and its use to improve beef production. **JWB King**, p.341-349, 1982.
- LINDAHL, G., LUNDSTROM, K., TORNERG, E. Contribution of pigment content, Myoglobin forms and internal reflectance to the color of pork loin and ham from purebred pigs. **Meat Science**, v.42, p.145-15, 2001.
- MOURA, O.M. **Efeito de métodos de insensibilização e sangria sobre características de qualidade da carne de rã-touro e perfil das indústrias de abate**. Viçosa, MG: Universidade Federal de Viçosa, 2000. 208p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal de Viçosa, 2000.

- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Science American**, p.36-43, 1990.
- PATAPOUTIAN, A., MINER, J.H., LYONS, G.E. et al. Isolated sequences from the linked *Myf-5* and *MRFf-4* genes drive distinct patterns of muscle-specific expression in transgenic mice. **Development**, v.118, p.61-69, 1993.
- ROTHSCHILD, M.F., PLASTOW, G. Advances in pig genomics and industry applications. **Agri. Biot. Net**, v., p.1-8, 1999.
- ROTHSCHILD, M.F. Identification of major genes and quantitative trait loci in swine. **NSIF Proceedings**, 1997. 7p.
- te PAS, M.F.W., VERBURG, F.J., GERRITSEN, C.L.M. et al. Messenger ribonucleic acid expression of the Myo-D gene family in muscle tissue at slaughter in relation to section for porcine growth rate. **Journal of Animal Science**, v.78 n.1, p.69-77, 2000.
- te PAS, M.F.W., SOMILLION, A., BORN, L. et al. Genetic variation at the porcine *MYF-5* gene. Lack of association with meat production traits. **Mammalian Genome**, v.10, p.123-127, 1999a.
- te PAS, M.F.W., SOMILLION, A., HARDES, F.L. Influences for myogenin genotypes on birth weight, growth rate, carcass weight, backfat thickness, and lean weight of pigs. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2352-2356, 1999b.
- VÖGELI, P., STRANZINGER, G., SHNEEBELI, H. et al. Relationships between the H and A-O blood types, phosphohexose isomerase and 6-phosphogluconate dehydrogenase red cell enzyme systems and halotane sensitivity, and economics traits in a superior and an inferior selection line of Swiss Landrace Pigs. **Journal of Animal Science**, v.59, n.6, p.1440-1450, 1984.

## 7. RESUMO E CONCLUSÕES

O gene do fator miogênico-5 (*myf-5*) foi estudado nesse trabalho. Os três *exons* deste gene foram divididos em seis fragmentos e seqüenciados em seqüenciador automático, por meio da técnica da terminação em cadeia por dideoxinucleotídeos, em suínos da raça Piau (dois machos) e de linhagens comerciais (dezoito fêmeas), formadores da geração parental de um cruzamento F2.

Foram encontradas diferenças (deleções e inserções), tanto na seqüência de um macho Piau, quanto em algumas fêmeas comerciais, quando a seqüência gerada a partir da amplificação do sexto conjunto de *primers*, que amplifica parte do terceiro *exon*, foi comparada com a seqüência do *myf-5* suíno depositada no GenBank (Y17154). Quando comparada com a seqüência publicada por te PAS et al. (1999a), as mutações estão na região 3' não transcrita. Com base na seqüência Y17154, a amplificação do alelo não mutado (N) gerou fragmento eletroforético de 479 pb. O macho Piau C e a fêmea comercial 211 apresentaram deleção "TTT" em heterozigose nas posições 3420-3422 pb, gerando como padrão eletroforético a banda de 479 pb, e uma segunda com 476 pb (chamado alelo Deleção – D), além da formação de bandas heteroduplexes. Foram encontradas, em homozigose, inserção de três pares de base "ATG" na posição 3327 pb, em duas fêmeas irmãs completas (151 e 154), e deleção pontual "A" na posição 3357 pb, também em homozigose nessas fêmeas, o que gerou nestes animais banda eletroforética de 481 pb, chamado de alelo Inserção - I.

O fragmento número 6 foi amplificado em 359 animais da geração F2 e os genótipos, classificados de acordo com os padrões eletroforéticos gerados: 264 animais com genótipo NN (73,5%), 86 animais NI (24%), cinco animais ND (1,4%) e quatro animais ID (1,1%). Os genótipos ND e ID não foram considerados para as análises estatísticas, por serem pouco representativos, e os genótipos NN e NI foram associados com características de desempenho, de carcaça e de qualidade da carne. As características peso total da paleta, perda por gotejamento, perda por cozimento e perda total apresentaram diferença significativa entre os genótipos ( $P < 0,05$ ). Os valores para os genótipos NN e NI foram, respectivamente,  $4,86 \pm 0,66$  e  $5,04 \pm 0,59$  kg para peso de paleta,  $3,14 \pm 1,56$  e  $3,69 \pm 2,78\%$  para perda por gotejamento,  $32,26 \pm 2,41$  e  $33,21 \pm 2,31\%$  para perda por cozimento e  $34,16 \pm 2,63$  e  $34,97 \pm 2,08\%$  para perda total.

Concluiu-se que:

O gene *myf-5* apresenta variação alélica, que pode ser usada para trabalhos de associação com características de interesse econômico, em programas de seleção assistida por marcadores.

Seqüências depositadas no *GenBank* devem ser bem estudadas e comparadas com outras fontes antes de se estabelecerem os conjuntos de *primers* para amplificação e seqüenciamento.

Animais portadores do genótipo NI apresentam maior peso total de paleta, o que parece representar expressividade variável com relação à deposição de gordura nos cortes de carcaça.

Animais portadores do genótipo NI apresentam maior luminosidade da carne e menor capacidade de retenção de água, o que influencia negativamente as características de processamento da carne.

A mutação identificada no gene do fator miogênico 5 pode ser utilizada como marcador genômico para características de qualidade da carne, na população experimental analisada.

O uso deste marcador para características de qualidade da carne deverá ser testado em populações comerciais de suínos.