

Freqüência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana

[*Frequency of myostatin gene (GDF-8) in Marchigiana herds in Brazil*]

C.S. Teixeira, D.A.A. Oliveira

Escola de Veterinária - UFMG
Caixa Postal 567
30123-970 - Belo Horizonte, MG

RESUMO

Identificou-se e determinou-se a freqüência do gene miostatina (GDF-8) normal e mutante em rebanhos Marchigiana, em 377 bovinos da raça Marchigiana, criados nos estados de São Paulo e Paraná. Identificaram-se 37,9% de animais normais, 55,2% de portadores e 6,9% homozigotos afetados para musculatura dupla. Estes resultados indicam que os criadores têm interesse na característica musculatura dupla, promovendo, ainda que aleatoriamente, seleção a favor da mutação.

Palavras-chave: bovino, Marchigiana, DNA, miostatina, musculatura dupla, PCR

ABSTRACT

The frequency of the normal myostatin gene (GDF-8) and the mutant allele in Marchigiana herds was detected. Three hundred and seventy-seven animals of Marchigiana breed raised in São Paulo and Paraná States, Brazil, were tested. The results showed that 37.9% were homozygous normal animals, 55.2% heterozygous and 6.9% homozygous double muscling. The results suggest the interest of the breeders in having interest in the character double muscling, randomly promoting, the selection in favor of the mutation.

Keywords: beef cattle, Marchigrana, DNA, double muscled, myostatin, PCR

INTRODUÇÃO

Na produção de bovinos de corte, o aumento da musculatura sempre foi um dos maiores desafios para os pesquisadores e criadores, sendo uma das principais metas em alguns programas de melhoramento. Atualmente, como resultado de intensa seleção por muitas gerações, têm-se animais que apresentam musculatura extremamente desenvolvida, dentre os quais se destacam os bovinos, ovinos e suínos.

A síndrome da musculatura dupla foi descrita pela primeira vez no início do século XIX, sendo hoje observada em diversas raças bovinas (Bass et al., 1999). É caracterizada pela hipertrofia dos músculos, especialmente na região do quarto traseiro, onde os músculos são protuberantes,

com seus limites e contornos bem visíveis sob a pele (Ménissier, 1982). Comparados com os animais normais, os bovinos com musculatura dupla têm proporcionalmente menos osso, menos gordura, mais músculos e alta proporção de cortes de carne com alto valor de mercado, proporcionando, em média, 20% mais carne em cada animal (Johnson, 1981; Ménissier, 1982; Shahin e Berg, 1985; Arthur, 1995).

A musculatura dupla está associada a problemas tais como redução de fertilidade, distocia, baixa viabilidade dos bezerros e aumento da susceptibilidade ao estresse, principalmente nas raças Belgian Blue e Piemontesa, que apresentam extrema musculabilidade (Ménissier, 1982; Arthur et al., 1988). Entretanto, os ganhos em conversão alimentar e qualidade da carne,

Recebido em 6 de agosto de 2006

Aceito em 31 de maio de 2007

E-mail: clasalt@gmail.com

mais magra e macia (Arthur, 1995; Wheeler et al., 2001), têm compensado os custos de tais problemas, levando à seleção sistemática para animais com musculatura dupla ou o seu uso em programas de cruzamentos (Karim et al., 2000).

Em bovinos, têm sido observadas diferentes mutações que levam à perda da função do gene da miostatina, afetando a massa muscular e determinando o fenótipo musculatura dupla (MD) ou hipertrofia muscular (double-muscling) em algumas raças. Charlier et al. (1995) mapearam o gene da miostatina no cromossomo 2 bovino. Quanto ao estudo molecular da característica, McPherron e Lee (1997) compararam as seqüências gênicas da miostatina em 10 espécies diferentes. Esses pesquisadores encontraram pelo menos duas mutações diferentes em bovinos. Na raça Belgian Blue ocorre uma deleção de 11 nucleotídeos no exon 3, enquanto na raça Piemontesa, também no exon 3, ocorre uma simples substituição de tirosina por cisteína. Outros pesquisadores detectaram essas mutações em outras raças, tais como Blond d'Aquitaine, Limousin, Parthenaise, Asturiana de los Valles e Rubea Galega, que apresentam deleção dos 11 pb, resultando em inativação da proteína (Grobet et al., 1997; McPherron e Lee, 1997; Dunner et al., 1997; Karin et al., 2000; Smith et al., 2000). Fahrenkrug et al. (1999) descreveram, na raça Gasconne, a mesma mutação encontrada na raça Piemontesa, citada por Grobet et al. (1997).

Foram descritos outros quatro tipos de mutação afetando da mesma forma diversas raças em bovinos. Antoniu e Grosz (1999) descreveram uma transição de C→T, na posição 610 da seqüência do gene, ocasionando terminação prematura da síntese protéica, nas raças Limousin e Charolesa. Na raça Maine-Anjou, foi descoberta uma transversão G→T, na posição 676, levando a *stop codon* prematuro e inativação da miostatina (Karin et al., 2000). Na raça Marchigiana a mutação que determina a musculatura dupla é ocasionada pela transversão G→T, na posição 874, resultando em *stop codon* no domínio C-terminal bioativo, chamada de mutação E291X (Cappucio et al., 1998; Marchitelli et al., 2003). Com a identificação das diferentes mutações no gene da miostatina bovina, têm sido desenvolvidos testes moleculares baseados em reação em cadeia da polimerase (PCR), para os quais foram

desenhados *primers* específicos para detectar os animais homozigotos e heterozigotos para tais mutações. Esse procedimento vem sendo de grande utilidade em programas que visam melhorar a qualidade da carne bovina, para atender ao crescente mercado consumidor de carne magra e produtos cada vez mais saudáveis (Karim et al., 2000).

Marchitelli et al. (2003) estudaram 0,6% da população de Marchigiana na Itália e descreveram um teste rápido e simples para identificar animais homozigotos e portadores de mutação nesta raça, utilizando a PCR, dando início a esta linha de pesquisa nessa raça. Diferentemente das raças Belgian Blue, Piemontesa e Asturiana de los Valles, que têm muitas pesquisas a respeito desse assunto, a raça Marchigiana, até então, não apresentava dados informativos sobre a característica musculatura dupla. Assim, a avaliação desses animais no Brasil pode fornecer dados importantes para a Associação Brasileira de Criadores da Raça Marchigiana, subsidiando programas de seleção assistida por marcadores moleculares que visem aumentar a produção de carnes nobres com maior valor de mercado.

O objetivo desta pesquisa foi estimar a frequência do alelo mutante causador do fenótipo musculatura dupla, em bovinos Marchigiana criados no Brasil.

MATERIAL E MÉTODOS

A amostra foi composta de 377 animais da raça Marchigiana, registrados de acordo com as exigências da Associação Brasileira de Criadores da Raça Marchigiana (ABCM, Associação..., 2003). Foram utilizadas amostras de pêlo e sangue, em sua maioria coletados por técnicos da ABCM, nas regiões Sudeste de São Paulo e Norte do Paraná, onde se concentra a maioria dos criadores da raça.

O DNA genômico foi isolado de amostras de sangue fresco total utilizando a metodologia de Lewin e Stewart-Haynes (1992). Para extração do DNA a partir de amostras de pêlos com bulbos, utilizou-se a técnica do Laboratório de Genética Veterinária da Universidade da Califórnia-Davis, modificada por Yves Amigues do INRA, Jouy-en-Josas, França (não publicado

– uso sob licença). As amostras de DNA foram armazenadas em geladeira ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) até o momento do teste.

Foram utilizados dois *primers* específicos, desenhados e patenteados por Valentini et al. (2001), a partir da seqüência da miostatina bovina descrita no banco de dados GenBank sob o número de acesso AF320998. Os autores permitiram o uso dos *primers*, segundo protocolo específico, exclusivamente para a execução desta pesquisa. Os *primers* amplificam especificamente parte do terceiro exon, incluindo a variação E291X do gene da miostatina bovina na raça Marchigiana para os alelos normal e mutante, gerando um produto com 346pb.

O sistema de amplificação da PCR foi realizado conforme protocolo adaptado de Marchitelli et al. (2003), o volume final de reação foi de 10 μl , sendo 8 μl de tampão de PCR (10mM Tris-HCl pH 9; 50mM KCl; 1,5mM MgCl₂; 100 μM dNTPs; 0,6pmol de cada *primer*; 0,5U de Taq DNA polimerase) e 2 μl de DNA genômico (0,5ng). Os parâmetros utilizados na PCR foram: 30 segundos para denaturação a 95 $^{\circ}\text{C}$, 60 segundos para ligação dos *primers* a 60 $^{\circ}\text{C}$ e cinco segundos para extensão a 72 $^{\circ}\text{C}$ por 30 ciclos. O produto da PCR foi digerido com a enzima de restrição Tru9I, em 10 μl de reação, com 7 μl de tampão de digestão (10mM de Tris-HCl, 10mM MgCl₂, 100mM NaCl, 1mM DTT; 0,5U de enzima TRU9I) e 3 μl de produto amplificado, incubado em termociclador por 60 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Após a digestão com a enzima de restrição Tru9I, obtiveram-se os seguintes produtos: normais (N/N) = 279 e 67 pb; heterozigotos MD (D/N) = 279, 174, 105 e 67 pb e os homozigotos MD (D/D) = 174, 105 e 67 pb. As amostras digeridas foram diluídas em solução de carregamento 2X e submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida 8%, a 100V por quatro horas. Para revelação das bandas, empregou-se o método de coloração com nitrato de prata. Após a coloração, os géis foram digitalizados e os respectivos arquivos foram armazenados para posterior interpretação dos resultados.

Foram estimadas as frequências gênicas e genotípicas para o loco estudado. Aplicou-se teste de dispersão de frequência para indicar se houve, ou não, algum tipo de seleção que

pudesse favorecer o gene mutante para musculatura dupla na população avaliada. O nível de significância estabelecido foi de 5%.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amplificadas e digeridas amostras de DNA de 377 animais, confirmando a presença da variação E291X, no gene da miostatina (GDF-8), descrita por Marchitelli et al. (2003). As amostras analisadas equivaleram a 1,25% da população da raça Marchigiana no país. Foram encontrados homozigotos para a mutação, heterozigotos e homozigotos normais. As frequências alélicas e genotípicas esperadas e o qui-quadrado foram calculados, conforme mostrado na tab. 1.

Tabela 1. Frequências genotípicas para o gene da musculatura dupla em bovinos da raça Marchigiana no Brasil

Genótipo	Frequência observada	Frequência esperada	χ^2
DD	26	45,24	8,18
DN	208	169,65	8,67
NN	143	162,11	2,25
Total	377	377,00	19,1

Frequências alélicas: N = 0,655; D = 0,345. Qui-quadrado (χ^2) = significativo (P<0,01). DD=homozigoto para mutação, DN=heterozigoto e NN=homozigoto normal.

A diferença entre a frequência observada e esperada para os genótipos DD e DN evidencia que a população não está sob equilíbrio de Hardy-Weinberg, indicando que a mutação tem sido favorecida pelos criadores. As frequências genotípicas deste experimento foram comparadas com as frequências encontradas por Marchitelli et al. (2003) (Tab. 2). Observa-se que os criadores brasileiros têm dado preferência aos animais com o alelo mutante, já que a presença de indivíduos heterozigotos, na população estudada no Brasil, é duas vezes maior que dos animais analisados na Itália. No entanto, esse fato pode estar acontecendo devido ao uso intenso de alguns touros que apresentam musculatura avantajada na região do quarto traseiro, que embora não tenham sido genotipados, certamente são portadores do alelo mutante, uma vez que possuem filhos, testados, que apresentam os três genótipos.

Tabela 2. Frequências genótípicas para o gene da musculatura dupla em animais Marchigiana no Brasil e na Itália

Genótipo	Brasil	Itália
DD	6,9%	6%
DN	55,2%	25%
NN	37,9%	69%

DD=homozigoto para mutação, DN=heterozigoto e NN=homozigoto normal.

A preferência por animais com maior massa muscular tem crescido. Os problemas de distocia em algumas raças têm sido tolerados, pois o gado com musculatura dupla proporciona vantagens econômicas (Ott, 1990; Arthur, 1995). A carne mais tenra e saudável e o melhor aproveitamento da carcaça são características que vêm sendo procuradas por criadores, e estão presentes nesses indivíduos. Em alguns países, a carne desses animais é cotada a preço, algumas vezes, mais de 50% superior, que a de bovinos normais. No Brasil, o rebanho bovino é criado em regime extensivo, em sua maioria. A assistência ao homem do campo é, muitas vezes, deficiente, não permitindo sustentar uma situação extrema, como a do gado Belgian Blue, onde quase 100%

dos partos são por cesariana (Ott, 1990). Ocorre também que, com a atual economia do país, somente alguns núcleos poderiam pagar pela carne desses animais, valorizados com uma cotação diferenciada, como acontece em outros países.

Alguns países da Europa controlam melhor os rebanhos de animais com musculatura dupla com o objetivo de evitar o aumento excessivo no peso dos bezerras ao nascer, reduzindo, assim, a dificuldade de parto e as perdas nessa fase (Goyache et al., 1996). Arthur (1995) e Keele e Fahrenkrug (2001) citaram, como opção, a criação controlada de indivíduos homozigotos-musculatura dupla, com a finalidade de usá-los em acasalamentos em que todos os descendentes, machos e fêmeas, iriam para o abate. Foi observado, também, que o acasalamento de touros com musculatura dupla e vacas normais não resultaram em aumento relevante na frequência da distocia (Ott, 1990). Os animais heterozigotos apresentaram algumas características fenotípicas muito semelhantes às dos animais homozigotos para musculatura dupla (Fig. 1), justificando, assim, sua utilização nos acasalamentos. Tais evidências foram citadas antes por Arthur et al. (1989) (Tab. 3).

Tabela 3. Características de interesse conforme tipo de acasalamento para o fenótipo da musculatura dupla

Acasalamento	Aproveitamento da carcaça (%)	Cortes nobres (%)	Gordura (%)	Músculo (%)	Área do olho de lombo (cm ²)
DMxDM	63,2	61,3	22,8	61,6	90,5
DMxN	60,2	60,3	28,0	57,4	92,1
NxN	59,8	58,5	32,1	52,4	83,5

DMxDM = pai e mãe com fenótipo musculatura dupla DMxN= pai com fenótipo musculatura dupla e mãe com fenótipo normal e NxN= pai e mãe com fenótipo normal. Tabela adaptada de Arthur et al., (1989).



Figura 1. Animais da raça Marchigiana com o fenótipo musculatura dupla. Fonte: Associazione... (2003).

Além disso, animais Marchigiana com o fenótipo musculatura dupla têm sido usados em cruzamentos com raças zebuínas, buscando maior produção de carne (Associação..., 2003). Tendo em vista que não há relatos de problemas reprodutivos e de parto nesses mestiços, seria vantajosa a análise molecular dos touros Marchigiana, identificando os homozigotos para o gene mutante da miostatina, o que garantiria progênies portadoras do gene de interesse.

CONCLUSÕES

As frequências dos alelos normal e mutante do gene da miostatina bovina na amostra estudada mostram que tem ocorrido seleção de animais com essa característica nos rebanhos

Marchigiana no Brasil, embora essa não seja baseada em testes genéticos. Esse fato pode estar ocorrendo devido ao uso intenso de alguns reprodutores nos rebanhos nacionais, reprodutores esses certamente portadores do alelo em questão. A seleção assistida por teste genético pode aumentar os lucros dos criadores a partir do conseqüente aumento da produção de carnes nobres com maior valor de mercado.

AGRADECIMENTOS

À ABCM pela valiosa colaboração na realização deste trabalho. Aos Drs. Alesio Valentini e Cinzia Marchitelli da Università della Tuscia – Viterbo – Itália, pela autorização para uso dos primers.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANTONIOU, E.; GROSZ, M. PCR based detection of bovine myostatin Q204X mutation. *Anim. Gen.*, v.30, p.231-232, 1999.
- ARTHUR, P.F. Double muscling in cattle: a review. *Austr. J. Agric. Res.*, v.46, p.1493-1515, 1995.
- ARTHUR, P.F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M.A. et al. Heterosis, maternal and direct effects in double-muscled and normal cattle: II – carcass trait of young bulls. *J. Anim. Sci.*, v.67, p.911-919, 1989.
- ARTHUR, P.F.; MAKARECHIAN, M.; PRICE, M.A. Incidence of dystocia and perinatal calf mortality resulting from reciprocal crossing of double-muscled and normal cattle. *Can. Vet. J.*, v.29, p.163-167, 1988.
- ASSOCIAÇÃO Brasileira dos Criadores de Marchigiana - características da raça (provas técnicas). Disponível em: <<http://www.marchigiana.org.br>> acessado em 22 mar. 2003.
- ASSOCIAZIONE Nazionale Allevatori Bovini Italiani da Carne. Disponível em: <<http://www.anabic.it>> acessado em 22 mar.2003.
- BASS, J.; OLDHAM, M.; SHARMA, R. et al. Growth factors controlling muscle development. *Dom. Anim. Develop.*, v.17, p.191-197, 1999.
- CAPPUCIO, I.; MARCHITELLI, C.; SERRACCHIOLI, A. et al. A G-T transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophy Marchigiana beef subjects. *Anim. Gen.*, v.29, supl.1, p.51, 1998.
- CHARLIER, C.W.; COPPERTIERS, F.; FARNIR, L. et al. The mh gene causing double-muscling in cattle maps to bovine chromosome 2. *Mamm. Gen.*, v.6, p.788-792, 1995.
- DUNNER, S.; CHARLIER, C.; FANIR, F. et al Towards interbreed IBD fine mapping of the mh locus: double-muscling in the Asturiana de los Valles breed involves the same locus as in the Belgian Blue cattle breed. *Mamm. Gen.*, v.8, p.430-435, 1997.
- FAHRENKRUG, S.C.; CASAS, E.; KEELE, J.M. et al. Technical note: Direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR. *J. Anim. Sci.*, v.77, p.2028-30, 1999.
- GENEBANK, disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.tcg?val=13399079>> mstn gene. Acessado em 22 mar.2003.
- GROBET, L.; PONCELET, D.; ROYO, L.J. et al. Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Gen.*, v.9, p.210-213, 1997.
- JOHNSON, E.R. Carcass composition of double-muscled cattle. *Anim. Prod.*, v.33, p.31-38, 1981.
- KARIM, L.; COPPIETERS, W.; GROBET, L. et al. Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using multiplex oligonucleotide ligation assay. *Anim. Gen.*, v.31, p.396-399, 2000.
- KEELE, J.W.; FAHRENKRUG, S.C. Optimum mating systems for the myostatin locus in cattle. *J. Anim. Sci.*, v.79, p.2016-2022, 2001.
- LEWIN, H.A.; STEWART-HAYNES, J.A. A simple method for DNA extraction from leukocytes for use in PCR. *Biotechniques*, v.13, p.522-523, 1992.
- MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M.C.; CRISA, A. et al. Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mamm. Gen.*, v.14, p.392-395, 2003.
- MCPHERRON, A.C.; LEE, S. Double muscling in cattle due to mutation in the myostatin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.94, p.12457-12461, 1997.
- MÉNISSIER, F. General survey of the effect of double muscling on cattle performance. *Curr. Top. Vet. Anim. Sci.*, v.16, p.23-53, 1982.
- OTT, R.S. Muscular hypertrophy in beef cattle: déjà vu. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, v.196, p.413-415, 1990.
- SHAHIN, K.A.; BERG, R.T. Growth patterns of muscle, fat and bone, and carcass composition of double-muscled and normal cattle. *Can. J. Anim. Sci.*, v.65, p.279-293, 1985.
- SMITH, T.P.L.; LOPEZ-CORRALEZ, N.L.; KAPPES, S. M. et al. Myostatin maps to the interval containing the bovine mh locus. *Mamm. Gen.*, v.8, p.742-744, 1997.
- VALENTINI, A.; MARCHITELLI, C.; SAVARESE, M.C. et al. The promoter region of myostatin gene in cattle Disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.tcg?mstn_gene> acessado em 4 set. 2002.