



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



**ASSOCIAÇÃO ENTRE REGIÕES NÃO-CODIFICANTES  
CONSERVADAS INTRÔNICAS DOS GENES IGF1 DE  
MAMÍFEROS COM A MASSA CORPORAL.**

Autor: Rafael Rocha Pacheco

Piracicaba  
2010

Rafael Rocha Pacheco

**Associação entre regiões não-codificantes conservadas  
intrônicas dos genes IGF1 de mamíferos com a massa  
corporal.**

Monografia apresentada ao Curso de  
Odontologia da Faculdade de Odontologia  
de Piracicaba - Unicamp, para a obtenção  
do título de Cirurgião - Dentista.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line

Piracicaba  
2010

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**  
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8<sup>a</sup>. / 8099

P115a	<p>Pacheco, Rafael Rocha. Associação entre regiões não-codificantes conservadas intrônicas dos genes IGF1 de mamíferos com a massa corporal / Rafael Rocha Pacheco. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2010. 22f. : il.</p> <p>Orientador: Sérgio Roberto Peres Line. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.</p> <p>1. Gene. 2. Crescimento. 3. Ossos. I. Line, Sérgio Roberto Peres. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título. (eras/fop)</p>
-------	---

Dedico este trabalho aos meus pais,  
Osmar e Zuleide, que ao longo destes  
quatro anos, assim como ao longo de  
toda minha vida, me deram todo apoio e  
incentivo para conclusão de meus  
estudos.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, sem dúvidas, agradeço a Deus, que tem me acompanhado durante toda minha vida e, durante este período, me deu força, luz, paciência, saúde, e todas as condições necessárias para passar por mais essa fase da minha vida. Não tenho palavras para agradecer por tanto amor, misericórdia, e por mais essa vitória.

Agradeço aos meus pais, Osmar e Zuleide, por terem me dado suporte em todos os aspectos, pela preocupação, carinho, paciência, confiança e, principalmente, amor em todos os dias da minha vida. Também à minha irmã, Renata, que me abriu muitos caminhos e sempre lutou pelo meu bem.

Gostaria de agradecer ao Prof. Dr. Sérgio Roberto Peres Line que desde o início de minhas atividades na graduação tem estado ao meu lado demonstrando grande confiança no meu potencial e, sempre que necessário, contar com sua amizade, apoio, atenção e orientação.

Agradeço, também, a todas as amizades conquistadas durante esses quatro anos as quais espero que não se tornem apenas lembranças, mas sim, perdurem por muitos anos.

Finalmente, agradeço a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP pela oportunidade de estudar e me desenvolver dentro de uma das melhores faculdades de odontologia do mundo.

## **RESUMO**

O crescimento normal de um indivíduo depende de uma série de fatores como: hormônios, dieta adequada e ausência de estresse. Dentre estes hormônios, destaca-se a somatotropina (hormônio do crescimento, originado da adenohipófise), que apresenta ação trófica, estimulando a secreção de fatores de crescimento semelhantes à insulina, ou IGF (somatomedina). A ação conjunta da somatotropina e dos IGF's permite o estímulo do crescimento ósseo e de tecidos moles. O IGF é produzido no fígado e é o efetor do hormônio do crescimento promovendo um crescimento da cartilagem nos ossos longos.

## **PALAVRAS-CHAVE**

Gene, somatotropina, IGF, crescimento, tecido ósseo

## **ABSTRACT**

Normal growth of an individual depends on a number of factors such as hormones, diet and lack of stress. Among these hormones, there is a somatotropin (growth hormone, originated from the adenohipophysis), which has trophic effects by stimulating the secretion of growth factors similar to insulin, IGF (somatomedin). The combined action of somatotropin and IGF's allows the stimulation of bone growth and soft tissue. The IGF is produced in the liver and is the effector of growth hormone promotes growth of cartilage in long bones.

## **KEYWORDS**

Gen, somatotropin, IGF, growth, bone tissue

## LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

**Tabela 1** – Massa corpórea e tamanho do Íntron 1 do gene IGF-1 de cada espécie. (Pág. 8)

**Tabela 2** – Resultados das correlações de Pearson e Spearman entre a massa corpórea e o tamanho do íntron1 do gene IGF-1. (Pág. 9)

**Gráfico 1** – Correlação linear de Pearson entre massa corpórea e tamanho do íntron 1 do gene IGF-1. (Pág. 9)

**Tabela 3** – Distâncias filogenéticas das diferentes espécies de animais Gene LIG3. (Pág. 10)

**Gráfico 2** - Árvore filogenética das diferentes espécies de animais (gene LIG3). (Pág. 11)

**Tabela 4** - Distâncias filogenéticas das diferentes espécies de animais gene IGF1. (Pág. 11)

**Gráfico 3** - Árvore filogenética das diferentes espécies de animais (gene IGF1). (Pág. 12)

**Tabela 5** – Distâncias corrigidas (Razão IGF1 / LIG3) (Pág. 13)

**Tabela 6** - Correlações de Pearson e Spearman entre massa corpórea e sequências conservadas do gene IGF1. (Pág. 13)

## SUMÁRIO

1. Introdução e Revisão de Literatura	Pág. 1
2. Proposição	Pág. 2
3. Materiais e Métodos	Pág. 3
4. Resultados e Discussão	Pág. 7
5. Conclusão	Pág. 12
Referências Bibliográficas	Pág. 13

## 1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

O tecido ósseo é o principal constituinte do esqueleto humano, apresentando extrema resistência e rigidez. Essas propriedades são essenciais às funções que este exerce, como proteção de órgãos vitais, suporte para tecidos moles, reserva de íons minerais (como cálcio e fosfato), movimentação e, até mesmo, alojamento e proteção da medula óssea, produtora dos componentes sanguíneos.

Este tecido é, basicamente, composto por células e material intracelular mineralizado, a matriz óssea. O tecido ósseo pode ser formado por dois processos: ossificação intramembranosa (o osso é formado diretamente do mesênquima) e ossificação endocondral (tem início sobre um modelo cartilaginoso pré-existente). A ossificação intramembranosa é o processo formador dos ossos frontal, parietal e de partes do occipital, do temporal e dos maxilares superior e inferior, e apresenta grande importância para o crescimento dos ossos curtos e o espessamento de ossos longos. Já a ossificação endocondral consiste na formação de ossos curtos e longos e no crescimento longitudinal dos mesmos.

O crescimento corporal é um processo complexo que se inicia antes do nascimento. Estudos feitos entre espécies de mamíferos mostram que a taxa de crescimento, dada pelo peso corporal, é proporcional a taxa do metabolismo basal (White et al 2007). Deste modo, o crescimento normal depende de uma série de fatores como: hormônios, dieta adequada e ausência de estresse entre outros. Dentre estes hormônios, destaca-se a somatotropina (hormônio do crescimento, originado da adenohipófise), que apresenta ação trófica, estimulando a secreção de fatores de crescimento semelhantes à insulina, ou IGF (somatomedina). A ação conjunta da somatotropina e dos IGFs permite o estímulo do crescimento ósseo e de tecidos moles.

O IGF é produzido no fígado e é o efetor do hormônio do crescimento promovendo um crescimento da cartilagem nos ossos longos. A função do IGF no crescimento está bem evidenciada pelo efeito de mutações genéticas neste gene ou no seu receptor IGF1R causando nanismo em humanos, assim como pelo seu efeito em camundongos mutantes “knockouts” (Laron 2004). O IGF-1 estimula a proliferação dos osteoblastos (célula do tecido ósseo), a formação óssea e o

aumento do volume ósseo e também parece ter um efeito direto no anabolismo protéico (Laron 2001).

Trabalhos têm mostrado que regiões não codificadoras de genes são importantes para a regulação da expressão genética (Hardison, 2000, Beerman et al. 2006, Prabhakar et al 2006) podendo influenciar em características fenotípicas. A identificação de seqüências não codificadoras conservadas entre espécies tem sido considerada de grande importância, pois estas regiões são prováveis sítios de ligação de fatores de transcrição ou RNA's não codificantes. Estes últimos têm estado em evidência nos últimos anos, pois, acredita-se que modulem a transcrição gênica. Estas regiões possivelmente respondem pela diversidade que existe entre as espécies e também por características interindividuais, i.e. dentro de uma mesma espécie (Carninci e Hayashizaki 2007, Nakaia et al 2007).

Desta maneira, seqüências que determinam variações entre espécies são também candidatas para determinação de variações interindividuais. Como exemplo, pode-se supor que as mesmas regiões conservadas não codificantes que venham a ser importantes na variação de massa óssea (i.e. peso corporal) entre espécies de mamíferos são as mesmas seqüências que determinam diferenças individuais na espécie humana.

Variações em regiões não-codificantes conservadas podem ainda ajudar a explicar alterações no crescimento do tecido ósseo em locais específicos observadas em humanos, como no caso de prognatismo e micrognatia.

O gene IGF1 parece influenciar o crescimento ósseo e tamanho corporal em humanos e camundongos (Baker et al 1993, Woods et al 1996,1997). Trabalho recentemente publicado na conceituada revista Science mostrou que a variação do tamanho em cães é causada principalmente por polimorfismos genéticos (SNP's) no gene da IGF1 (Sutter et al 2007).

## **2. PROPOSIÇÃO**

No presente trabalho, pretendemos fazer análise de seqüências não codificadoras conservadas dos genes IGF1 presentes nas regiões intrônicas em diversas espécies de mamíferos no intuito de se correlacionar variações na conservação destas seqüências com diferenças de massa corporal em mamíferos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

As seqüências intrônicas e mRNA do gene IGF1 foram obtidas das bases de dados NCBI [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome), ENSEMBL (<http://www.ensembl.org/index.html>) e UCSC GENOME BROWSER (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start>) das seguintes espécies de tamanhos corpóreos variados listadas abaixo, porém a maioria destas estavam com as seqüências incompletas, impossibilitando sua análise.

Foram analisadas as seqüências das seguintes espécies: Vaca (*Bos taurus*), cavalo (*Equus caballus*), golfinho (*Tursiops truncatus*), gorila (*Gorilla gorilla*), alpaca (*Vicugna pacos*), humano (*Homo sapiens*), orangotango (*Pongo pygmaeus*), chimpanzé (*Anthropopithecus troglodites*), cão (*Canis familiaris*), rhesus (*Macaca mulatta*), gato (*Felis catus*) tatu (*Dasypus ovmcinctus*), hyrax (*Procavia capensis*), coelho (*Oryctolagus cuniculus*), lêmure (*Microcebus murius*), morcego de grande porte – “raposa voadora” (*Pteropus vampyrus*), porco-da-índia (*Cavia Parcellus*), esquilo (*Spermophilus triecemlieatus*), rato (*Rattus novergicus*), morcego de pequeno porte – “morcego-de-orelhas-de-rato” (*Myotis lucifugus*), camundongo (*Mus musculus*), sagüi (*Callithrix penicillata*), ouriço (*Echinops telfairi*), tupaia (*Tupaia belangeri*), társio (*Tarsius syrichta*), pika (*Ochotona princeps*), rato canguru (*Dipodomys ordii*) e musaranho (*Sorex araneus*). Após esta primeira seleção nossa análise ficou restrita a 15 espécies listadas na Tabela 1.

A hipótese a ser testada é se existem seqüências conservadas onde os valores de homologia se correlacionam com as massas corpóreas das espécies analisadas. As seqüências obtidas foram copiadas em formato FASTA em um arquivo de texto sem formatação (“.txt”), de forma a facilitar as análises, e os animais foram organizados em ordem decrescente de massa corpórea. As seqüências foram primeiramente alinhadas, utilizando-se o programa ClustawW contido no pacote BIOEDIT.

Foram utilizados vários parâmetros para determinar as seqüências conservadas variando o grau de homologia de entropia 0.4 a 0.1 (estringência) e o tamanho do fragmento variando de >10, >25, >50, >100 pares de bases. As possíveis associações entre a massa corpórea e as seqüências das regiões

conservadas serão determinadas usando-se matriz de similaridade com as distâncias relativas entre espécies usando-se o software “DNAdist (DNA distance matrix, dará valores numéricos)” e “DNAML (DNA maximum likelihood program, mostrará distância por árvore filogenética)” que constam do pacote Bioedit. As semelhanças estruturais entre as espécies serão obtidas utilizando-se o algoritmo Orchid, que se baseia no padrão de clivagem química do DNA (Greebaum et al 2007).

A clivagem química do DNA é um parâmetro estrutural indireto bastante relevante, sendo dependente da conformação da dupla hélice do DNA (Tullius et al 2005). Neste caso, as possíveis associações entre a massa corpórea e as seqüências das regiões conservadas serão determinadas usando-se matriz de similaridade com as distâncias relativas entre espécies usando-se análise multivariada (Distância Multivariada Euclideana) e correlação (Coeficiente de Correlação de Pearson). Estas duas análises devem produzir resultados semelhantes, no entanto a análise multivariada trata cada posição (bases alinhadas pelo programa Clustaw W) como uma entidade distinta.

Estas análises fornecerão a distância relativa de cada espécie com as outras permitindo então a construção de um gráfico para cada espécie analisada. Na ordenada de cada gráfico serão colocados os valores de massa corporal e na abscissa os valores das distâncias obtidas na análise filogenética entre o animal de interesse com as outras. Para cada comparação estaremos obtendo um coeficiente de correlação de Spearman.

Como controle para cada região conservada será coletada aleatoriamente uma região de baixa similaridade, i.e. entropia $>0,5$  contendo o mesmo número de bases. Estas regiões serão submetidas ao mesmo tipo de análise aos quais foram submetidas as regiões conservadas. Os coeficientes de correlação de Spearman das regiões conservadas e não conservadas serão comparados pelo teste “t” de student, onde a hipótese a ser testada é se os coeficientes são diferentes ao nível de 5%.

Após o alinhamento, as seqüências foram submetidas à ferramenta “Find Conserved Regions”, também no pacote BIOEDIT. Esta ferramenta gera diferentes

arquivos referentes a cada região conservada encontrada de acordo com o parâmetro utilizado. No caso utilizamos o seguinte parâmetro: somente 2 (duas) lacunas por segmento, sendo 1 (uma) lacuna contígua, comprimento mínimo da seqüência de 50 (cinquenta) pares de bases com entropia média de 0,4.

Os arquivos gerados foram agrupados e submetidos à ferramenta “DNA Dist> Neighbor phylogenetic tree”, também do pacote BIOEDIT, que por sua vez gera dois arquivos: um arquivo contendo a árvore filogenética referente à região conservada, e outro arquivo com as distâncias entre cada espécie. O mesmo foi realizado com o gene *LIG3\**, onde o mesmo foi alinhado e submetido à ferramenta “DNA Dist> Neighbor phylogenetic tree” gerando dois arquivos utilizados posteriormente.

**Tabela 1** – Massa corpórea e tamanho do Íntron 1 do gene IGF-1 de cada espécie.

<b>Animal</b>	<b>Massa (Kg)</b>	<b>Tamanho do Íntron 1</b>
Vaca	600,000	4475
Cavalo	500,000	4507
Humano	70,000	4519
Orangotango	70,000	4507
Chimpanzé	50,000	4515
Cão	15,000	4570
Rhesus	10,000	4497
Coelho	4,500	5194
Porco-da-Índia	1,000	5064
Rato	0,400	5034
Camundongo	0,300	5318
Sagüi	0,300	5436
Tupaia	0,200	4390
Társio	0,130	4523
Pika	0,100	5015

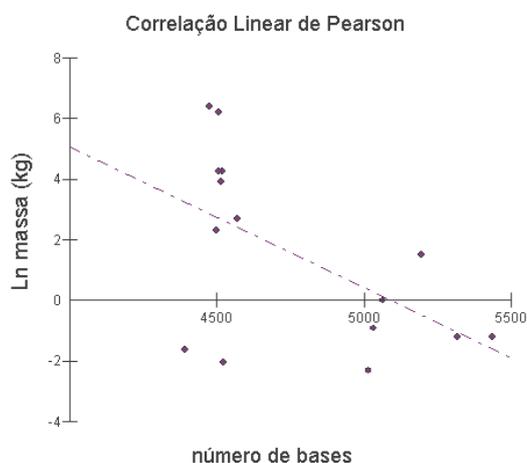
#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A primeira hipótese a ser testada foi a associação entre o tamanho do primeiro íntron e a massa corpórea pelos testes de correlação de Spearman e Pearson (correlação linear). Para esta segunda análise, os dados de massa corpórea foram transformados em escala logarítmica ( $\ln(x)$ ). Os resultados mostraram que existiu uma correlação negativa moderada, porém significativa entre a massa corpórea e o tamanho do primeiro intron (Tabela 2). A análise da curva de correlação de Pearson (Gráfico 1) mostrou que os animais *Tarsius* e *Tupaia* estavam bastante fora da curva. A remoção destes animais resultou em uma alta correlação linear negativa com resultados, no teste de correlação linear, de  $r = -0,845$  e  $p = 0,0003$ . Estes resultados sugerem que a perda de regiões gênicas localizadas no intron 1 do gene IGF1 pode ter contribuído para o aumento do tamanho que ocorreu durante a evolução dos mamíferos placentários (Roy 1998).

**Tabela 2** – Resultados das correlações de Pearson e Spearman entre a massa corpórea e o tamanho do íntron1 do gene IGF-1.

Pearson		Spearman	
(r)	(p)	(rs)	(p)
-0,5506	0,0333	-0,4539	0,0891

**Gráfico 1** – Correlação linear de Pearson entre massa corpórea e tamanho do íntron 1 do gene IGF-1.



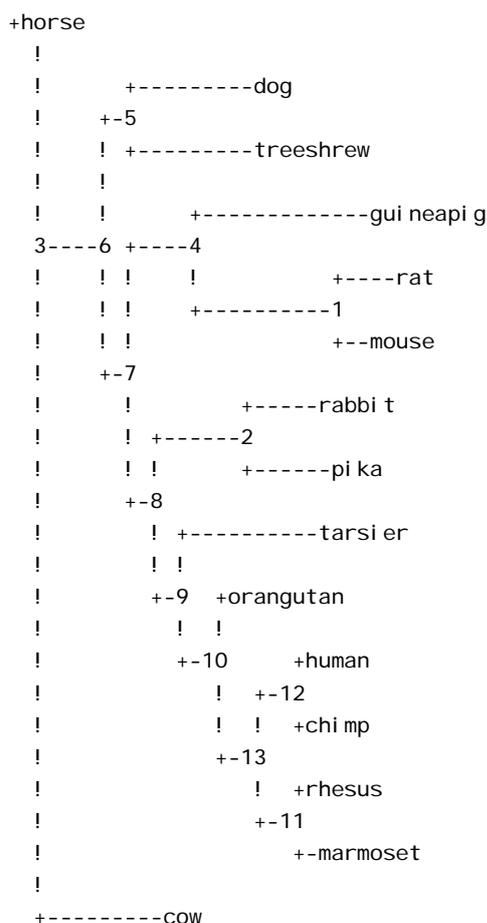
Na próxima análise procuramos determinar se variações em sequências conservadas no intron 1 do gene IGF1 estavam correlacionadas com a massa corpórea. É importante mencionar aqui que o gene controle utilizado foi o *LIG3\** (DNA ligase 3), pois o gene *PAX9* não foi ainda sequenciado em todas as espécies estudadas e, para a escolha do gene controle, foram testados mais de 30 genes, pois em algumas das espécies - em particular, coelho, tárσιο, pika e tupaia - existem poucos genes que foram completamente seqüenciados.

Esta foi a etapa mais demorada do nosso trabalho. As distâncias e árvore filogenéticas entre as espécies e, baseada no gene *LIG3*, estão mostradas abaixo na Tabela 3 e Gráfico 2 e, *IGF1*, Tabela 4 e Gráfico 3.

**Tabela 3 – Distâncias filogenéticas das diferentes espécies de animais Gene *LIG3*.**

Animal	Vaca	Cavalo	Humano	Orangotango	Chimpanzé	Cão	Rhesus	Coelho	Porco-da-Índia	Rato	Camundongo	Sagüi	Tupaia	Tárσιο	Pika
Vaca	0.0000	0.1689	0.3570	0.3381	0.3529	0.4418	0.3566	0.5248	0.6093	0.6631	0.5865	0.4180	0.4826	0.5063	0.5162
Cavalo	0.1689	0.0000	0.2126	0.2092	0.2088	0.2459	0.2137	0.3233	0.4256	0.4555	0.4260	0.2489	0.2990	0.2752	0.3445
Humano	0.3570	0.2126	0.0000	0.0229	0.0041	0.2788	0.0434	0.2892	0.3774	0.4238	0.4268	0.0600	0.2635	0.2400	0.2947
Orangotango	0.3381	0.2092	0.0229	0.0000	0.0216	0.2752	0.0511	0.2781	0.3823	0.4318	0.4354	0.0707	0.2635	0.2115	0.2819
Chimpanzé	0.3529	0.2088	0.0041	0.0216	0.0000	0.2751	0.0415	0.2862	0.3784	0.4218	0.4226	0.0593	0.2654	0.2365	0.2934
Cão	0.4418	0.2459	0.2788	0.2752	0.2751	0.0000	0.2913	0.4256	0.5350	0.5771	0.5393	0.3584	0.3160	0.5199	0.4580
Rhesus	0.3566	0.2137	0.0434	0.0511	0.0415	0.2913	0.0000	0.2857	0.3814	0.4171	0.4252	0.0676	0.2820	0.2395	0.3070
Coelho	0.5248	0.3233	0.2892	0.2781	0.2862	0.4256	0.2857	0.0000	0.5532	0.5563	0.5178	0.3490	0.4167	0.4075	0.2188
Porco-da-Índia	0.6093	0.4256	0.3774	0.3823	0.3784	0.5350	0.3814	0.5532	0.0000	0.5207	0.4511	0.4420	0.5469	0.5633	0.5556
Rato	0.6631	0.4555	0.4238	0.4318	0.4218	0.5771	0.4171	0.5563	0.5207	0.0000	0.1244	0.4613	0.5538	0.6405	0.5838
Camundongo	0.5865	0.4260	0.4268	0.4354	0.4226	0.5393	0.4252	0.5178	0.4511	0.1244	0.0000	0.4607	0.4968	0.4899	0.5312
Sagüi	0.4180	0.2489	0.0600	0.0707	0.0593	0.3584	0.0676	0.3490	0.4420	0.4613	0.4607	0.0000	0.3335	0.2950	0.3590
Tupaia	0.4826	0.2990	0.2635	0.2635	0.2654	0.3160	0.2820	0.4167	0.5469	0.5538	0.4968	0.3335	0.0000	0.4954	0.4301
Tárσιο	0.5063	0.2752	0.2400	0.2115	0.2365	0.5199	0.2395	0.4075	0.5633	0.6405	0.4899	0.2950	0.4954	0.0000	0.4237
Pika	0.5162	0.3445	0.2947	0.2819	0.2934	0.4580	0.3070	0.2188	0.5556	0.5838	0.5312	0.3590	0.4301	0.4237	0.0000

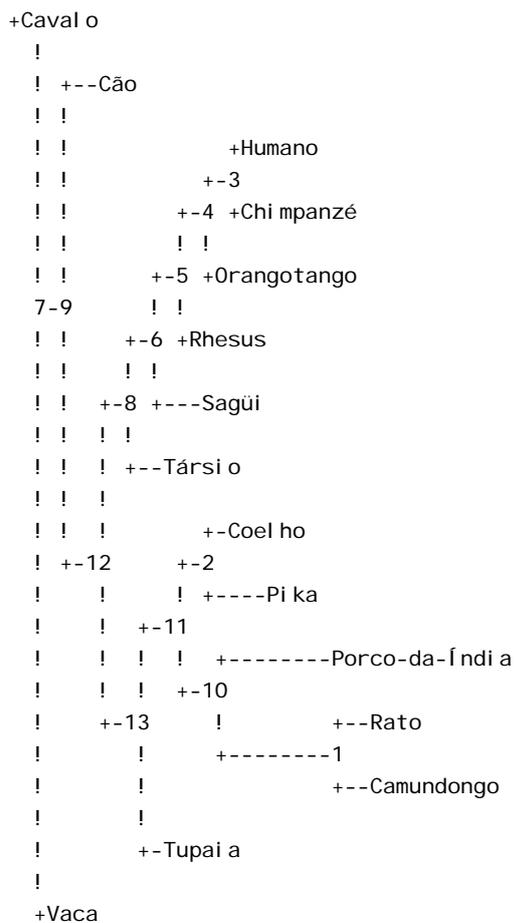
## Gráfico 2 - Árvore filogenética das diferentes espécies de animais (gene LIG3).



**Tabela 4 - Distâncias filogenéticas das diferentes espécies de animais gene IGF1.**

Animal	Vaca	Cavalo	Humano	Orangotango	Chimpanzé	Cão	Rhesus	Coelho	Porco-da-Índia	Rato	Camundongo	Sagüi	Tupaia	Társio	Pika
Vaca	0,0000	0,0487	0,0854	0,0855	0,0820	0,0709	0,0854	0,0978	0,1873	0,2552	0,2445	0,1129	0,0740	0,0867	0,1610
Cavalo	0,0487	0,0000	0,0855	0,0874	0,0857	0,0693	0,0891	0,0997	0,1898	0,2519	0,2391	0,1094	0,0742	0,0869	0,1551
Humano	0,0854	0,0855	0,0000	0,0190	0,0062	0,1032	0,0238	0,1149	0,2000	0,2637	0,2462	0,0713	0,0955	0,0811	0,1662
Orangotango	0,0855	0,0874	0,0190	0,0000	0,0142	0,0980	0,0271	0,1132	0,2002	0,2576	0,2401	0,0748	0,0903	0,0812	0,1684
Chimpanzé	0,0820	0,0857	0,0062	0,0142	0,0000	0,0980	0,0206	0,1151	0,1917	0,2599	0,2424	0,0714	0,0921	0,0812	0,1665
Cão	0,0709	0,0693	0,1032	0,0980	0,0980	0,0000	0,0961	0,1068	0,1870	0,2536	0,2495	0,1295	0,0860	0,0972	0,1689
Rhesus	0,0854	0,0891	0,0238	0,0271	0,0206	0,0961	0,0000	0,1150	0,1881	0,2623	0,2447	0,0765	0,0956	0,0828	0,1702
Coelho	0,0978	0,0997	0,1149	0,1132	0,1151	0,1068	0,1150	0,0000	0,2135	0,2521	0,2559	0,1375	0,0975	0,1144	0,1184
Porco-da-Índia	0,1873	0,1898	0,2000	0,2002	0,1917	0,1870	0,1881	0,2135	0,0000	0,3417	0,3302	0,2367	0,1909	0,2026	0,2500
Rato	0,2552	0,2519	0,2637	0,2576	0,2599	0,2536	0,2623	0,2521	0,3417	0,0000	0,1070	0,2979	0,2501	0,2481	0,3123
Camundongo	0,2445	0,2391	0,2462	0,2401	0,2424	0,2495	0,2447	0,2559	0,3302	0,1070	0,0000	0,2910	0,2337	0,2430	0,3203
Sagüi	0,1129	0,1094	0,0713	0,0748	0,0714	0,1295	0,0765	0,1375	0,2367	0,2979	0,2910	0,0000	0,1270	0,1079	0,1901
Tupaia	0,0740	0,0742	0,0955	0,0903	0,0921	0,0860	0,0956	0,0975	0,1909	0,2501	0,2337	0,1270	0,0000	0,0897	0,1488
Társio	0,0867	0,0869	0,0811	0,0812	0,0812	0,0972	0,0828	0,1144	0,2026	0,2481	0,2430	0,1079	0,0897	0,0000	0,1814
Pika	0,1610	0,1551	0,1662	0,1684	0,1665	0,1689	0,1702	0,1184	0,2500	0,3123	0,3203	0,1901	0,1488	0,1814	0,0000

**Gráfico 3** - Árvore filogenética das diferentes espécies de animais (gene IGF1).



Para a comparação das distâncias filogenéticas das espécies estudadas com a massa corpórea, os valores obtidos nas matrizes de distância foram inicialmente divididos pelos valores de matriz de distância obtidos pelo por sequências exônicas e intrônicas do gene LIG3. Este gene está relacionado ao reparo do DNA e não se correlaciona à formação óssea. As distâncias obtidas na matriz do gene LIG3 foram de acordo com o esperado para as distâncias filogenéticas entre as espécies. Sendo assim as distâncias obtidas como gene LIG3 foram consideradas como as distâncias corrigidas que refletiam os valores reais das sequências conservadas.

Desta maneira as distâncias corrigidas (razão IGF1/LIG3 – Tabela 5) mostram a aproximação entre as espécies, mostrando a real influência das sequências conservadas sobre a massa corpórea. Foram usados como parâmetro de comparação os valores referentes às distâncias de todas as espécies analisadas.

**Tabela 5 – Distâncias corrigidas (Razão IGF1 / LIG3)**

Animal	Vaca	Cavalo	Humano	Orangotango	Chimpanzé	Cão	Rhesus	Coelho	Porco-da-Índia	Rato	Camundongo	Sagüi	Tupaia	Társio	Pika
Vaca	0,0000	0,2883	0,2392	0,2529	0,2324	0,1605	0,2395	0,1864	0,3074	0,3849	0,4169	0,2701	0,1533	0,1712	0,3119
Cavalo	0,2883	0,0000	0,4022	0,4178	0,4104	0,2818	0,4169	0,3084	0,4460	0,5530	0,5613	0,4395	0,2482	0,3158	0,4502
Humano	0,2392	0,4022	0,0000	0,8297	1,5122	0,3702	0,5484	0,3973	0,5299	0,6222	0,5769	1,1883	0,3624	0,3379	0,5640
Orangotango	0,2529	0,4178	0,8297	0,0000	0,6574	0,3561	0,5303	0,4070	0,5237	0,5966	0,5514	1,0580	0,3427	0,3839	0,5974
Chimpanzé	0,2324	0,4104	1,5122	0,6574	0,0000	0,3562	0,4964	0,4022	0,5066	0,6162	0,5736	1,2040	0,3470	0,3433	0,5675
Cão	0,1605	0,2818	0,3702	0,3561	0,3562	0,0000	0,3299	0,2509	0,3495	0,4394	0,4626	0,3613	0,2722	0,1870	0,3688
Rhesus	0,2395	0,4169	0,5484	0,5303	0,4964	0,3299	0,0000	0,4025	0,4932	0,6289	0,5755	1,1317	0,3390	0,3457	0,5544
Coelho	0,1864	0,3084	0,3973	0,4070	0,4022	0,2509	0,4025	0,0000	0,3859	0,4532	0,4942	0,3940	0,2340	0,2807	0,5411
Porco-da-Índia	0,3074	0,4460	0,5299	0,5237	0,5066	0,3495	0,4932	0,3859	0,0000	0,6562	0,7320	0,5355	0,3491	0,3597	0,4500
Rato	0,3849	0,5530	0,6222	0,5966	0,6162	0,4394	0,6289	0,4532	0,6562	0,0000	0,8601	0,6458	0,4516	0,3874	0,5349
Camundongo	0,4169	0,5613	0,5769	0,5514	0,5736	0,4626	0,5755	0,4942	0,7320	0,8601	0,0000	0,6316	0,4704	0,4960	0,6030
Sagüi	0,2701	0,4395	1,1883	1,0580	1,2040	0,3613	1,1317	0,3940	0,5355	0,6458	0,6316	0,0000	0,3808	0,3658	0,5295
Tupaia	0,1533	0,2482	0,3624	0,3427	0,3470	0,2722	0,3390	0,2340	0,3491	0,4516	0,4704	0,3808	0,0000	0,1811	0,3460
Társio	0,1712	0,3158	0,3379	0,3839	0,3433	0,1870	0,3457	0,2807	0,3597	0,3874	0,4960	0,3658	0,1811	0,0000	0,4281
Pika	0,3119	0,4502	0,5640	0,5974	0,5675	0,3688	0,5544	0,5411	0,4500	0,5349	0,6030	0,5295	0,3460	0,4281	0,0000

**Tabela 6 - Correlações de Pearson e Spearman entre massa corpórea e sequências conservadas do gene IGF1.**

Animal	Pearson		Spearman		Massa (kg)
	r	(p)	rs	(p)	
Vaca	-0.1829	0.5314	-0.1013	0.7304	600.00
Cavalo	-0.2866	0.3205	-0.3040	0.2907	500.00
Humano	0.0111	0.9698	-0.0220	0.9405	70.00
Orangotango	-0.2074	0.4767	-0.1232	0.6747	70.00
Chimpanzé	-0.0059	0.9841	-0.0264	0.9285	50.00
Cão	-0.2914	0.3121	-0.2137	0.4633	15.00
Rhesus	-0.3494	0.2206	-0.2952	0.3056	10.00
Coelho	-0.3823	0.1773	-0.2687	0.3529	4.50
Porco-da-Índia	-0.2304	0.4282	-0.0969	0.7417	1.00
Rato	-0.1386	0.6365	-0.0815	0.7818	0.40
Camundongo	-0.3530	0.2156	-0.3278	0.2525	0.30
Sagüi	0.2697	0.3510	0.1254	0.6692	0.30
Tupaia	-0.4128	0.1423	-0.3634	0.2014	0.20
Társio	-0.3911	0.1666	-0.4802	0.0822	0.13
Pika	-0.0703	0.8111	0.0969	0.7414	0.10

## **5. CONCLUSÃO**

Os resultados apresentados na Tabela 6, mostram que não foram encontradas correlação significativa entre a massa corpórea e as sequências conservadas do gene IGF1.

A análise conjunta dos resultados do tamanho do intron e sequências conservadas sugere que as possíveis variações na massa corpórea influenciadas pelo intron 1 do gene IGF1, provavelmente ocorreram devido a deleções, e não em substituições de bases nucleotídicas que respondem pela maioria das mutações presentes no genoma humano.

## REFERÊNCIAS

BATES, P.; MERGNY, J-L.; YANG, D. Quartets in G-major: The first international meeting on Quadruplex DNA. EMBO reports, v. 08, n. 11, p. 1003 – 1010, 2007;

DUQUETTE, M.L. et al. Intracellular transcription of G-rich DNAs induces formation of G-loops, novel structures containing G4 DNA. Genes & Development, v. 18, p. 1618-1629, 2004;

ROY J. COPE'S rule and the dynamics of body mass evolution in North American fossil mammals. Science. 1998 May 1;280(5364):731-4.

NOWAK RM, WALKER EP. Walkers mammals of the world. By. JHU press 1999.

IVA KEJNOVSKA´ , JAROSLAV KYPR, AND MICHAELA VORLI´Cˇ KOVA. Circular dichroism spectroscopy of conformers of (guanine + adenine) repeat strands of dna. Chirality 15:584–592 (2003).

MAJEWSKI J, OTT J. Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. Genome Res. 2002 Dec;12(12):1827-36.

HAN YJ, DE LANEROLLE P. Naturally extended CT . AG repeats increase H-DNA structures and promoter activity in the smooth muscle myosin light chain kinase gene. Mol Cell Biol. 2008 Jan;28(2):863-72.

HTUN H, DAHLBERG JE. Topology and formation of triple-stranded H-DNA. Science. 1989 Mar 24;243(4898):1571-6. Review.

SIDDIQUI-JAIN, A. et al. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. PNAS, v. 99, n. 18, p. 11593 - 11598, 2002;

SIMONSSON, T.; PECINKA, P.; KUBISTA, M. DNA tetraplex formation in the control region of c-myc. Oxford University Press, v.26, n.5, p. 1167 – 1172, 1998.

SIRAND-PUGNET P., et al. An intronic (A/U)GGG repeat enhances the splicing of an alternative intron of the chicken beta-tropomyosin pre-mRNA. Nucleic Acids Res., v.23, p. 3501-3507, 1995.

Distribution and characterization of regulatory elements in the human genome. MAJEWSKI J, OTT J. GENOME Res. 2002 Dec;12(12):1827-36.