



UNIVERSIDADE FEDERAL DE RIO GRANDE DO SUL

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

“Estudo da variabilidade nos genes *PAX1* e *PAX9* em espécies de mamíferos e seu papel na rede de desenvolvimento dentário”

Luiza Zeni Saldanha

Orientadora: Prof^a Maria Cátira Bortolini

Co-orientadora: Vanessa R Paixão-Côrtes

**Trabalho de conclusão de curso
apresentado ao Instituto de Biociências -
UFRGS, como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharela em
Ciências Biológicas.**

Porto Alegre

2013/1

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, por me ensinarem a caminhar, estalar os dedos e assobiar. Por estarem sempre ao meu lado, durante todos esses anos, os altos e baixos, e me fazerem seguir em frente, mais segura a cada passo.

À minha avó amada, Daisy Zeni, por me abrigar quando precisei e acreditar em tudo o que já me aventurei a fazer. Prometo ainda assar teu bolo de cenoura.

À minha família pelo apoio e os idos almoços de sábado, que matavam a fome e a saudade quando muito tempo se passava.

Aos meus amigos de uma vida toda, que, mesmo espalhados pelo Brasil, sempre se mantiveram presentes: Mariana Fernandes, dona da risada mais contagiante; Lucas Gallinari e seu admirável bom humor; Rafael Praxedes, parceiro de todas as horas e pisa-pés e em especial à Isabela Ichihara, minha quase irmã (porque às vezes a genética não é tudo), por todos os momentos em que rimos juntas, sonhamos juntas e por todas as incríveis estadias na terrinha, Salvador.

Aos amigos queridos que ganhei de brinde com a vaga na universidade, vocês tornaram esses anos muito mais proveitosos e felizes; à Camile Ancines e ao Leandro Leal de Lima, que estiveram sempre presentes, eu diria que já temos muitas histórias para contar.

Aos meus colegas de laboratório, por toda a boa vontade que tiveram em me explicar as rotinas e tirar minhas dúvidas. Sem contar as conversas e risadas que esse período rendeu.

À minha orientadora, Profa. Maria Cátira Bortolini, e à minha co-orientadora, Dra. Vanessa Paixão-Côrtes, por tudo que aprendi e pela ajuda inestimável quando precisei.

Por fim, agradeço à Dra. Virginia Ramallo e à Dra. Gislene Lopes Gonçalves, por aceitarem fazer parte da banca examinadora desse trabalho.

RESUMO

Os genes *PAX* fazem parte da “caixa de ferramentas genéticas”, que regula os principais aspectos dos padrões corporais nos animais, e constituem uma família de genes que codificam fatores de transcrição com importante papel em processos do desenvolvimento. Por serem importantes no desenvolvimento das anatomias craniofaciais e dos dentes, eles são possivelmente bons candidatos para estudos que visam esclarecer a relação entre o fenótipo e o genótipo dos organismos, no que diz respeito a essas características. Nós estudamos dois genes desta família, *PAX1* e *PAX9*, em 28 espécies de mamíferos. Nossos resultados mostram que a seleção purificadora parece ter um papel central no padrão evolutivo destes genes, principalmente no exon 2. Também observamos uma maior variabilidade no exon 3 dos dois genes o que reforça a idéia de que ele age como uma “janela evolutiva”. O domínio de ligação ao DNA *paired* do *PAX1* é muito semelhante ao do *PAX9* e as mudanças foram categorizadas através de um teste de modelagem gráfica Bayesiana, que encontrou 15 sítios os quais poderiam estar co-evoluindo nos dois genes.

Palavras-chave: *PAX*, mamíferos, desenvolvimento dentário.

ABSTRACT

PAX genes are part of the “genetic toolbox”, which regulates the main aspects of the body's patterns in animals. They constitute a family of genes encoding transcription factors that play important roles in developmental processes. Because of their importance in the development of craniofacial and dental anatomy, they are potentially good candidates to clarify the relationship between phenotypes and genotypes in relation to these characteristics. We studied two of these genes, *PAX1* and *PAX9*, in 28 species of mammals. Our results show that purifying selection seems to have a central role in the evolutionary pattern of these genes, especially in exon 2. We also observed a greater variability in exon 3 of both genes that reinforces the idea that it acts as an "evolutionary window ". The paired domain of *PAX1* is very similar to its correspondent in *PAX9* and we identified 15 sites that could be co-evolving on both genes, based on a Bayesian graphic model test.

Keywords: *PAX*, mammals, tooth development.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	6
1. Os mamíferos e a alimentação.....	6
2. A caixa de ferramentas genéticas.....	7
3. Os genes <i>PAX</i>	7
3.1. <i>PAX1</i>	9
3.2. <i>PAX9</i>	9
4. A convergência e o paralelismo.....	10
OBJETIVOS.....	11
MATERIAL E MÉTODOS.....	12
1. Obtenção das sequências.....	12
2. Fórmulas dentárias e hábitos alimentares.....	12
3. Alinhamento das sequências.....	12
4. Árvores filogenéticas.....	13
5. Testes evolutivos.....	13
RESULTADOS.....	14
1. Conservação dos Genes <i>PAX1</i> e <i>PAX9</i>	14
2. Árvores filogenéticas.....	18
3. Testes evolutivos.....	18
DISCUSSÃO.....	23
CONCLUSÃO.....	23
REFERÊNCIAS.....	24

INTRODUÇÃO

1. Os mamíferos e a alimentação:

As adaptações para a obtenção e processamento de alimentos no mundo animal são amplamente diversificadas e facilmente observadas, mesmo entre os mamíferos: do tatu aos seres humanos, por exemplo, as variações no aparato bucal são muitas e sofisticadas (Figura 1). Foi durante a era Cenozóica que se deu a grande radiação evolutiva da Ordem Mammalia, frequentemente atribuída a desocupação de muitos nichos ecológicos ocupados anteriormente pelos dinossauros e outros grupos, que se extinguíram no final do período Cretáceo. Como consequência, surgiram ao longo do tempo diversas especializações morfológicas para atender as pressões seletivas relacionadas a distintos nichos alimentares (Pough e cols., 2003).

O desenvolvimento de uma dentição complexa, com incisivos, caninos, pré-molares e molares, capaz de processar alimentos diversos, foi extremamente importante para que esses animais passassem a obter quantidades maiores de energia, com maior facilidade (Line, 2003). A mudança na fórmula dentária frequentemente reflete uma adaptação funcional e por isso os dentes se tornaram um importante objeto de estudo da biologia evolutiva e do desenvolvimento, ajudando a elucidar os mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento dos órgãos e sua evolução morfológica (Neubüser e cols., 1997; Thesleff e Nieminen, 1996).

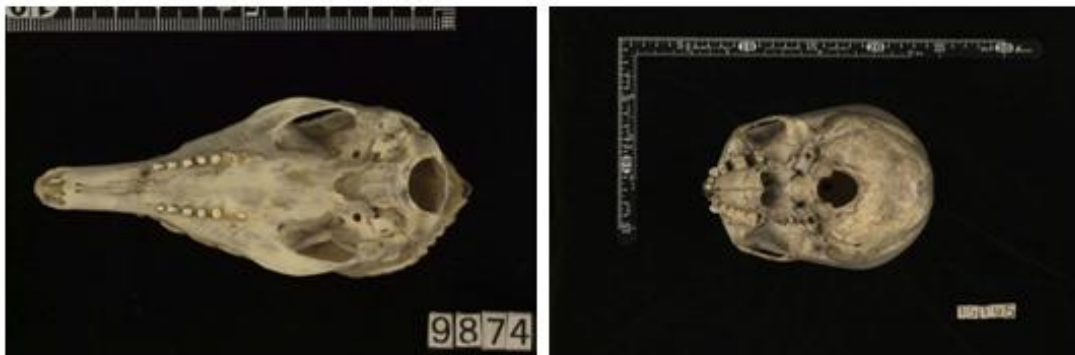


Figura 1. Vista inferior do crânio de um tatu (*Dasypus novemcinctus*) à esquerda e de um humano (*Homo sapiens*) à direita, exemplificando a diferença na morfologia craniofacial e dentária entre duas espécies de mamíferos. Disponível em: <http://1kai.dokkyomed.ac.jp/mammal/en/mammal.html>.

2. A caixa de ferramentas genéticas:

Nas últimas décadas, várias descobertas foram feitas na área da biologia evolutiva e do desenvolvimento. Através da análise de organismos modelos, constatou-se que, por maiores que sejam as diferenças morfológicas entre as espécies animais, os principais aspectos dos padrões corporais destes organismos são comandados pelas mesmas famílias de genes que regulam o desenvolvimento embrionário, a chamada “caixa de ferramentas genéticas” (Carroll, 2000).

Quando os genomas do chimpanzé e dos seres humanos foram comparados, notou-se que eles apresentavam 99% de similaridade. Dessa forma, como explicar as claras diferenças entre as morfologias das duas espécies? Alguns estudos sugerem que a evolução dos caracteres morfológicos se dá através de mutações em genes regulatórios, ao invés dos estruturais (King e Wilson, 1975; Carroll, 2000, 2003). Outros sugerem ainda que as pequenas mutações de grande efeito, em regiões regulatórias ou estruturais, são as responsáveis pela evolução morfológica (Nei, 2007).

3. Os genes *PAX*:

Os genes *PAX* fazem parte da caixa de ferramentas do desenvolvimento e constituem uma família de genes que codificam fatores de transcrição com importante papel em processos biológicos importantes, tais como proliferação, especificação, migração, organogênese e sobrevivência celular (Chi e Epstein, 2002; Robson e cols., 2006).

Foram primeiramente descobertos em *Drosophila* (*PAX neuro*) e se caracterizam por apresentarem sequências que codificam um domínio *paired* altamente conservado constituído de 128 aminoácidos, capaz de se ligar a região promotora do DNA alvo (Bopp e cols., 1986; Dahl e cols., 1997; Peters e cols., 1999; Chi e Epstein, 2002). Posteriormente, foram encontrados homólogos em diversos outros animais, tanto vertebrados, quanto invertebrados (Dahl e cols., 1997) e até mesmo em *Giardia lamblia*, um protozoário (Wang e cols., 2010).

Até então são conhecidos nove genes *PAX* em mamíferos, que provavelmente se diversificaram a partir de um ancestral comum por duplicação e divergência. Esses genes são usualmente separados em quatro grupos parálogos, — *PAX2/5/8*, *PAX3/7*, *PAX1/9* e *PAX4/6* — com base nas semelhanças em suas estruturas e sequências moleculares, e na presença ou ausência de outras sequências conservadas: um octapeptídeo e um homeodomínio (Balczarek e cols., 1997; Ogasawara e cols., 1999, 2000). Porém, mais recentemente, alguns estudos têm sugerido que os genes *PAX*, se inclusos aqueles presentes em outros filos como Cnidária e Porífera, se dividem em cinco grupos, ao invés de quatro. Essa divisão, por sua vez, é feita de acordo, mas não somente, com comparações das estruturas moleculares e de suas relações filogenéticas (Hill e cols., 2010; Suga e cols., 2010). Algumas evidências tem sugerido ainda que os genes *PAX* se diversificaram nos diferentes grupos antes da separação de Cnidária e Metazoa (Miller e cols., 2000; Suga e cols., 2010). Em todos os *taxa* nota-se uma redundância funcional entre os genes parálogos, o que atua em certos casos como um mecanismo compensatório se um dos genes não for devidamente expresso (Peters e cols, 1999).

PAX1 e *PAX9* constituem o grupo parálogo I e se caracterizam pela presença do octapeptídeo, além do domínio *paired* (Balczarek e cols., 1997; Breitling e cols., 2000). As sequências de aminoácidos de seus domínios *paired* são muito similares (98%; Peters e cols., 1999), assim como suas regiões codificadoras, onde foram encontradas apenas pequenas variações (Hetzer-Egger e cols., 2000). Alguns estudos mostram que o *PAX1* e o *PAX9* possuem funções similares e são co-expressos (Wilm e cols., 1998; Peters e cols., 1999). Além disso, o *PAX9* é herdado em um bloco de genes, formando um grupo sintênico parálogo ao do *PAX1* e isso evidencia ainda mais a forte conexão funcional entre os dois genes (Santagati e cols., 2003). Eles são essenciais ao desenvolvimento embrionário e atuam na formação dos arcos branquiais, timo, crânio, vértebras, membros entre outras estruturas (Neubüser e cols., 1995; Peters e cols., 1997; Hetzer-Egger e cols., 2000). Já os grupos II (*PAX2*, *PAX5* e *PAX8*), III (*PAX3* e *PAX7*) e IV (*PAX4* e *PAX6*) possuem não só o domínio *paired*, como também o homeodomínio.

Num recente estudo de nosso grupo de pesquisa, uma comparação detalhada das seqüências dos genes *PAX* de 188 espécies revelou níveis elevados de conservação, mas com algumas excessões notáveis: a ausência de *PAX4* e *PAX8*

entre algumas espécies de répteis e aves. A busca por assinaturas de seleção natural indicaram ainda que todos os genes *PAX* mantêm sua conservação devido a ação da seleção purificadora, com um possível relaxamento da mesma em *PAX4*, *PAX7* e *PAX8*. Este resultado indica a evolução assimétrica dos genes da família *PAX*, que pode ser associada com o aparecimento de novidades adaptativas na trajetória evolutiva dos cordados (Paixão-Côrtes e cols., 2013).

3.1. *PAX1*:

O *PAX1* localiza-se no cromossomo 20 em humanos, apresenta 5 exons e 4 introns, e seu domínio *paired*, como o do *PAX9*, também encontra-se no exon 2. As investigações nesta área têm mostrado o papel essencial do gene *PAX1*, especificamente na determinação da segmentação da coluna vertebral. Já foi descrita uma mutação nesse gene, em camundongos, que provoca escoliose severa (mutante *sco*) (Adham e cols., 2005; Giampietro e cols., 2005). Também em camundongos, foi descrita a substituição de um único nucleotídeo em uma região conservada do *PAX1*, que resulta no fenótipo *undulated*, caracterizado por defeitos no esqueleto axial, como malformações dos corpos vertebrais, disco intervertebrais e processos vertebrais (Balling e cols., 1988; Wallin e cols., 1994). Até então, não existem evidências que liguem diretamente o *PAX1* ao desenvolvimento dos dentes. Porém, como visto anteriormente, esse é um gene que atua na formação dos arcos branquiais, os quais dão origem à mandíbula em estágios mais avançados do desenvolvimento embrionário.

3.2. *PAX9*:

Localiza-se no cromossomo 14 em humanos (Stapleton e cols., 1993), apresentando quatro exons e três introns. Somente uma pequena parte do exon 1 é transcrita e codifica a primeira metionina. Já o exon 2 codifica o domínio *paired* e o octapeptídeo (Hetzer-Egger e cols., 2000).

O *PAX9* é herdado com um bloco de genes fisicamente ligados, um grupo sintênico conservado, presente não só em mamíferos, mas também em peixes

(Santagati e cols, 2003). Ele atua, juntamente com outros genes, na formação dos dentes e tem importante participação no desenvolvimento do palato e dos arcos branquiais (Peters e cols., 1999; Pereira e cols., 2006). Camundongos com o *PAX9* nocauteado sofrem uma parada no desenvolvimento dentário, ainda no estágio de broto (Peters e cols., 1998). Além disso, alguns estudos relacionam mutações nesse gene com a ocorrência de hipodontia e outras anomalias dentárias em humanos (Kist e cols., 2005; Nakatomi e cols., 2010; Paixão-Côrtes e cols., 2011a; Zhu e cols., 2012).

4. A convergência e o paralelismo:

Segundo Zhang e Kumar (1997), convergência é quando uma característica derivada comum se origina a partir de ancestrais diferentes. Em contraste, o paralelismo se dá quando mudanças a partir de um mesmo estado ancestral resultam no mesmo estado derivado. A ocorrência de convergência ou paralelismo pode nos dar uma idéia de como a seleção natural está agindo sobre os organismos, já que é muito improvável que determinados fenótipos surjam repetidamente por puro acaso, através de deriva genética.

Nosso grupo de pesquisa tem estudado com os genes *PAX* há vários anos e alguns trabalhos já foram publicados (Pereira e cols., 2006; Paixão-Côrtes e cols., 2008, 2011a, 2011b). Parte da amostra utilizada nesses estudos envolveu mamíferos com as mais diversas adaptações para a alimentação, as quais permitem que façamos inferências sobre a relação das sequências gênicas com as morfologias de cada uma das espécies. A partir daí, podemos inferir também se houve convergência ou paralelismo evolutivo.

Por serem importantes no desenvolvimento das anatomias craniofaciais e dos dentes, os genes *PAX* são, possivelmente, bons candidatos para estudos que visam esclarecer a relação entre o fenótipo e o genótipo dos organismos, no que diz respeito a essas características. Além disso, o estudo de genes parálogos, como é o caso do *PAX1* e do *PAX9*, pode nos ajudar a compreender as forças evolutivas que vêm atuando na evolução molecular desses genes, e conseqüentemente, na evolução das características morfológicas relacionadas.

OBJETIVOS

Considerando o que foi exposto anteriormente, este trabalho tem como objetivos:

- a) Avaliar a variabilidade das regiões codificadoras dos genes *PAX1* e *PAX9* em 28 espécies de mamíferos;
- b) Investigar se as forças evolutivas que moldaram a evolução dos genes *PAX1* e/ou *PAX9*, são divergentes ou semelhantes;
- c) Por fim, contribuir para aumentar o conhecimento que se tem a respeito da evolução molecular em famílias de genes responsáveis pelo desenvolvimento dental e craniofacial.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Obtenção das sequências:

Para ser possível fazermos uma comparação foi realizada uma busca pelas sequências dos genes *PAX1* e *PAX9* de outros mamíferos, a partir da sequência de referência humana, depositadas no Genbank/NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>), no Ensembl (<http://www.ensembl.org/>) e no UCSC (<http://genome.ucsc.edu>), através do sistema Nucleotide-nucleotide BLAST/BLAT. Em seguida foram escolhidos os resultados identificados como, ou possivelmente correspondentes aos genes em questão, além de sequências com identidade superior a 90%.

Através desta busca, foram obtidas as sequências de quase 40 espécies de mamíferos. Porém, somente aquelas em comum para os dois genes foram utilizadas, resultando num total de 28 espécies.

2. Fórmulas dentárias e hábitos alimentares:

Para cada uma dessas espécies foram obtidas as fórmulas dentárias e os hábitos alimentares, através dos bancos de dados do *Animal Diversity Web* (<http://animaldiversity.ummz.umich.edu/>), do *Animal Pictures* (<http://thewebsiteofeverything.com/>) e do Mammalian Crania Photographic Archive (<http://1kai.dokkyomed.ac.jp/mammal/en/mammal.html>). Essas informações nos permitem conhecer um pouco mais sobre a morfologia desses animais e possíveis adaptações para os diferentes tipos de alimentação.

3. Alinhamento das sequências:

O alinhamento múltiplo das sequências foi feito através do programa *Mega 5.1* (Tamura e cols., 2011), com o algoritmo *MUSCLE* (RFS) realizado com a sequência de aminoácidos presentes nos mamíferos. Para a visualização, as imagens do alinhamento foram geradas no programa *Jalview* (Waterhouse e cols., 2009).

4. Árvores filogenéticas:

Obtivemos a árvore filogenética dos mamíferos presentes no banco genômico Ensembl, através do *PhyloWidget* (<http://www.phylowidget.org/>), e editamos no programa *Mega 5.1*, para conter somente as espécies estudadas. Construímos árvores filogenéticas baseadas nas sequências codificadoras dos genes através do teste de máxima verossimilhança no *Mega 5.1*. O modelo evolutivo utilizado foi o *Hasegawa-Kishino-Yano* (HKY), escolhido a partir do *MODELTEST* no servidor *DataMonkey* (<http://www.datamonkey.org/>), com a opção de deleções parciais e um número de réplicas para o teste de confiança (*Bootstrap*) igual a 10.000. O objetivo desta metodologia era comparar às árvores gênicas entre si e com a árvore filogenética para podermos relacionar a padrões evolutivos dos genes *PAX1* e *PAX9*.

5. Testes Evolutivos:

No *Mega 5.1*, estimamos os valores de dN - dS (substituições não-sinônimas - substituições sinônimas) por códon para as sequências do *PAX1* e do *PAX9*. Os valores abaixo de zero indicam que uma seleção purificadora está atuando naqueles sítios. Já os valores próximos de zero refletem um relaxamento de pressão e aqueles maiores do que zero, uma seleção positiva.

Para estabelecer se alguns sítios presentes no domínio *paired*, localizado no exon 2, dos genes *PAX 1* e *PAX9* poderiam estar sob um regime de convergência evolutiva, utilizamos o teste de modelagem gráfica bayesiana *SPIDERMONKEY/BGM* (<http://www.datamonkey.org/>; Pon et al, 2009), que identifica a probabilidade posterior da mudança de um sítio específico ser dependente de qualquer outro sítio específico.

RESULTADOS

Podemos observar que, dentre as espécies selecionadas para este estudo, existe uma grande variedade de fórmulas dentárias e tipos de alimentação (Tabela 1). Dentre os primatas, algumas espécies pertencem às famílias de macacos do Novo Mundo (NWM), também classificados como Platyrrhini. Outras pertencem a família de macacos do Velho Mundo (OWM), que, junto com a família Hominidae (HOM), constituem a ordem Catarrhini. Nota-se que os catarrinos possuem um padrão de fórmula dentária, com 32 dentes no total, enquanto o sagui (*Callithrix jacchus*) e o lêmure (*Microcebus murinus*), representantes dos macacos do Novo Mundo e da família Lemnidae (LEM), respectivamente, possuem um total de 36 dentes. Já o tatu (*Dasyurus novemcinctus*), representante da ordem Xenarthra que inclui os animais ditos desdentados, apresentam um longo focinho adaptado ao seu tipo de alimentação insetívoro. Eles não possuem os dentes da frente, mas sim poucos e pequenos dentes nas laterais da mandíbula e maxila. Outro grupo de animais com adaptações interessantes são os da ordem Rodentia. Eles apresentam uma dentição altamente especializada para roer, não possuem caninos e seus incisivos não têm raiz, além de crescerem continuamente.

1. Conservação dos Genes *PAX1* e *PAX9*:

O exon 2, tanto no *PAX1* quanto no *PAX9*, é o mais conservado e de maneira geral são poucas as alterações nos aminoácidos. Porém, algumas se destacam por aparecerem em determinados grupos de espécies que se repetem nas árvores filogenéticas (Figura 2).

O exon 3 apresentou uma variabilidade maior em ambos os genes. O exon 4, porém, apesar de ser bastante variável no *PAX1*, apresenta-se muito mais conservado no *PAX9* (Figura 3).

Os exons 1 e 5 do *PAX1* mostraram uma porcentagem de identidade muito baixa devido ao fato de diversas sequências estarem incompletas.

Tabela 1. Espécies de mamíferos e suas respectivas fórmulas dentais e hábitos alimentares.

Nome popular	Espécie	Ordem	Fórmula dental: (I - C - PM - M)	Alimentação
Human	<i>Homo sapiens</i>	Primata (HOM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Onívoros
Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	Primata (HOM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Onívoros
Gorilla	<i>Gorilla gorilla gorilla</i>	Primata (HOM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Herbívoros
Orangutan	<i>Pongo abelii</i>	Primata (HOM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Herbívoros
Gibbon	<i>Nomascus leucogenys</i>	Primata (HOM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Herbívoros
Rhesus	<i>Macaca mulatta</i>	Primata (OWM)	2/2, 1/1, 2/2, 3/3 = 32	Onívoros
Marmoset	<i>Callithrix jacchus</i>	Primata (NWM)	2/2, 1/1, 3/3, 3/3 = 36	Herbívoros
Mouse lemur	<i>Microcebus murinus</i>	Primata (LEM)	2/2, 1/1, 3/3, 3/3 = 36	Carnívoros
Mouse	<i>Mus musculus</i>	Rodentia	1/1 - 0/0 - 1/1 - 3/3 = 20	Onívoros
Rat	<i>Rattus norvegicus</i>	Rodentia	1/1, 0/0, 0/0, 3/3 = 16	Onívoros
Guineapig	<i>Cavia porcellus</i>	Rodentia	1/1, 0/0, 3/3, 1/1 = 20	Herbívoros
Squirrel	<i>Ictidomys tridecemlineatus</i>	Rodentia	1/1, 0/0, 2/1, 3/3 = 22	Onívoros
Rabbit	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	Lagomorpha	2/1, 0/0, 3/2, 3/3 = 28	Herbívoros
Cow	<i>Bos taurus</i>	Artiodactila	0/3, 0/1, 2-3/3, 3/3 = 30-32	Herbívoros
Pig	<i>Sus scrofa</i>	Artiodactyla	3/3, 1/1, 4/4, 3/3 = 44	Onívoros
Horse	<i>Equus caballus</i>	Perissodactyla	3/3, 1-0/1-0, 3-4/3, 3/3 = 36-42	Herbívoros
Cat	<i>Felis catus</i>	Carnivora	3/3, 1/1, 2/2, 1/1 = 28	Carnívoros
Panda	<i>Ailuropoda melanoleuca</i>	Carnivora	3/3, 1/1, 3-4/4, 2/3 = 40-42	Herbívoros
Ferret	<i>Mustela putorius furo</i>	Carnivora	3/3, 1/1, 3/3, 1/2 = 34	Carnívoros
Dog	<i>Canis lupus familiaris</i>	Carnivora	3/3, 1/1, 4/4, 2/2 = 38	Onívoros
Microbat	<i>Myotis lucifugus</i>	Chiroptera	1-2/2-3, 1/1, 1-3/2-3, 3/3 = 28 -38	Insetívoros
Elephant	<i>Loxodonta africana</i>	Proboscidea	1/0, 0/0, 3/3, 3/3 = 26	Herbívoros
Tenrec	<i>Echinops telfairi</i>	Afrosoricida	2-3/2-3, 1/1, 2-3/2-3, 2-4/2-3 = 32-40	Onívoros
Armadillo	<i>Dasypus novemcinctus</i>	Xenarthra	7-8/7-8 até 18/19	Insetívoros
Opossum	<i>Monodelphis domestica</i>	Didelphimorphia	5/4, 1/1, 3/3, 4/4 = 50	Onívoros
Wallaby	<i>Macropus eugenii</i>	Diprotodontia	3/1, 1-0/0, 2/2, 4/4 = 32-34	Herbívoros
Tasmanian devil	<i>Sarcophilus harrisii</i>	Dasyuromorphia	4/3, 1/1, 2/2, 4/4 = 42	Carnívoros
Platypus	<i>Ornithorhynchus anatinus</i>	Monotremata	0	Carnívoros

Nota: I= incisivos; C= caninos; PM= pré-molares; M= molares

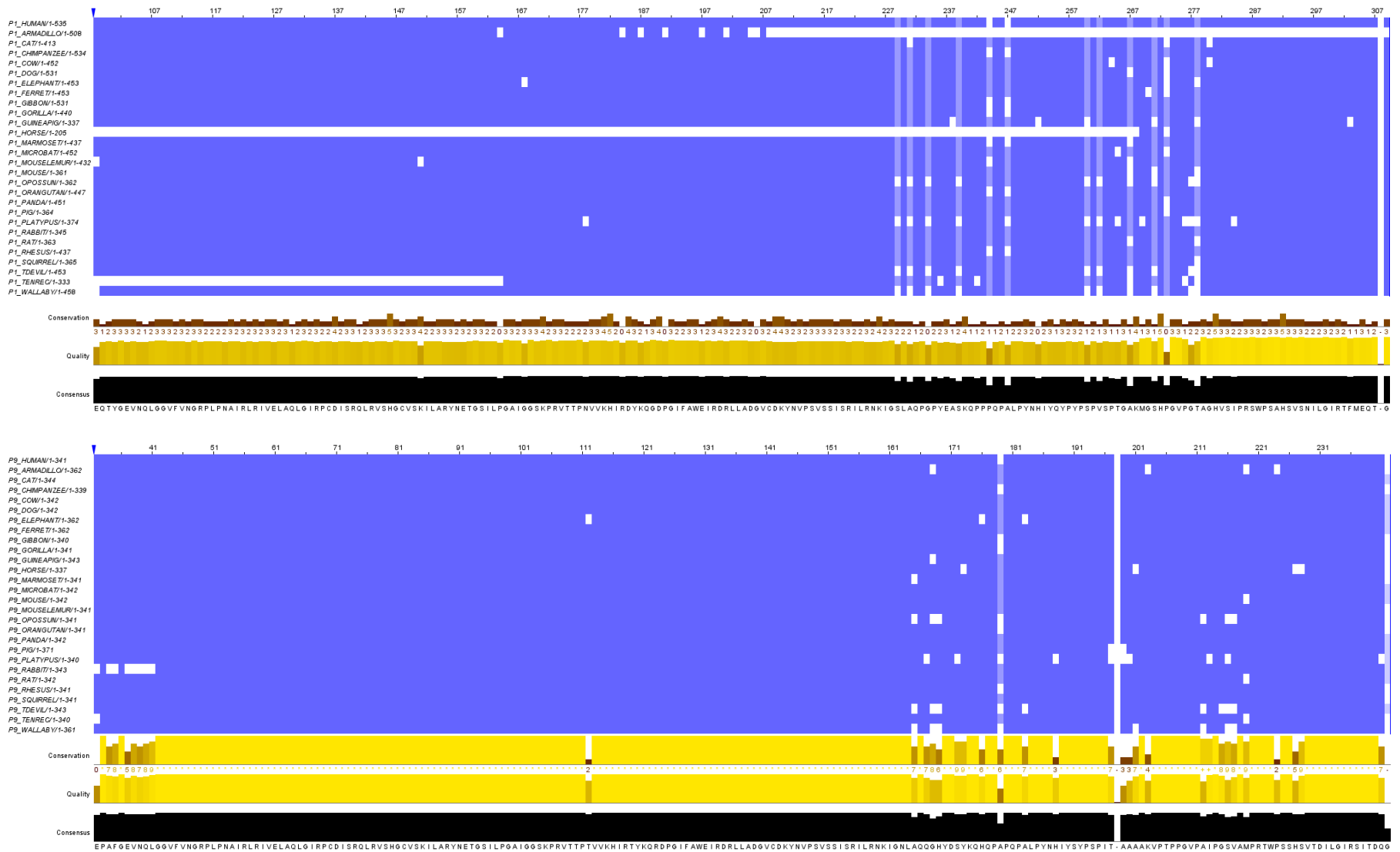


Figura 2. Exon 2 dos genes *PAX1* (a) e *PAX9* (b) nas 28 espécies. Os tons de azul marcam a porcentagem de identidade.

2. Árvores filogenéticas:

A Figura 4 mostra o cladograma das espécies estudadas, além daqueles construídos com base nas sequências do *PAX1* e do *PAX9*. Os números na base de cada ramificação representam os valores de confiança para cada um dos ramos. As espécies se agruparam de maneira semelhante nos três casos, ou seja, as árvores gênicas mostram uma história evolutiva próxima à filogenia dos mamíferos.

3. Testes Evolutivos:

Os cálculos das taxas de substituição mostram que a maioria dos códons nos dois genes está sujeita a pressões de seleção purificadora. Não foi encontrado nenhum sítio sob seleção positiva, porém, em alguns códons, parece haver um relaxamento de pressão da seleção natural (Tabelas 2 e 3).

Foram identificados 15 sítios que poderiam estar co-evoluindo nos genes *PAX1* e *PAX9* (Tabela 4; Figuras 4 e 5). Por exemplo, na posição 82 da cadeia de aminoácidos de *PAX1* aparece uma Asn e na posição 313 uma Pro. Já na proteína *PAX9*, nas mesmas posições, aparecem uma Thr e uma Glu, respectivamente. A probabilidade bayesiana de que esses resíduos apareçam juntos é maior do que 60%. Merece destaque o fato de que na proteína *PAX1* do ornitorrinco (*Ornithorhynchus anatinus*) temos uma Thr (82) e uma Glu (313), da mesma forma como acontece na proteína *PAX9*. Este resultado suporta a hipótese de que estamos diante de processos de co-evolução molecular. A real implicação disso na esfera fenotípica, entretanto, carece de estudos adicionais.

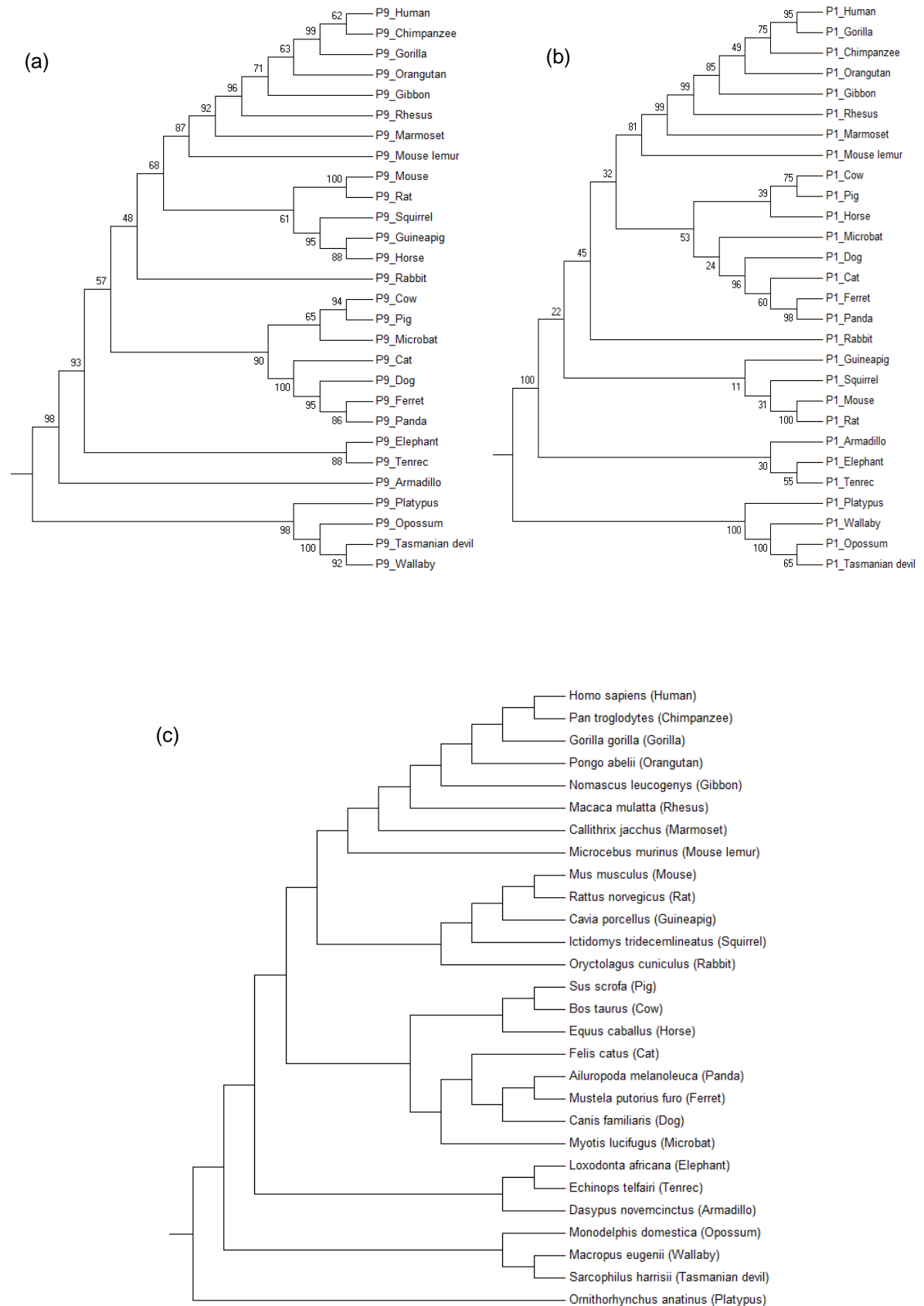


Figura 4. Cladogramas para o *PAX1* (a) e *PAX9* (b). Árvore filogenética das 28 espécies de mamíferos estudadas (c).

Tabela 2. Sítios do *PAX1* onde parece haver um relaxamento de pressão.

Codon	Trio	Sin (s)	Não-sin (n)	Sítios sin (S)	Sítios não-sin (N)	dS	dN	dN-dS	Valor-P	dN-dS normalizado
31	GGC	0	2	0,0266948	2,31624	0	0,8635	0,863	0,9773	0,348675
43	TCC	0	3	0,0900763	2,89887	0	1,0349	1,035	0,9123	0,417896
62	CTC	0	2	0,0547136	2,3325	0	0,8574	0,857	0,9547	0,346245
78	CCC	0	2	0,0657718	2,92317	0	0,6842	0,684	0,9565	0,276281
81	GGC	0,6667	2,3333	0,934188	2,03728	0,7136	1,1453	0,432	0,6178	0,174319
96	GCT	0	4	0,0953688	2,89357	0	1,3824	1,382	0,8784	0,558214
99	CAG	0	2	0,0547136	2,3325	0	0,8574	0,857	0,9547	0,346245
150	AGC	0	2	0,264933	2,73507	0	0,7312	0,731	0,8312	0,295282
180	GTC	0	3	0,0451092	2,95336	0	1,0158	1,016	0,9555	0,410184

Nota: Sin= média de substituições sinônimas; Não-sin= média de substituições não-sinônimas; dS= taxa de substituições sinônimas; dN= taxa de substituições não-sinônimas; Valor-P= valor de significância $P \leq 0,05$

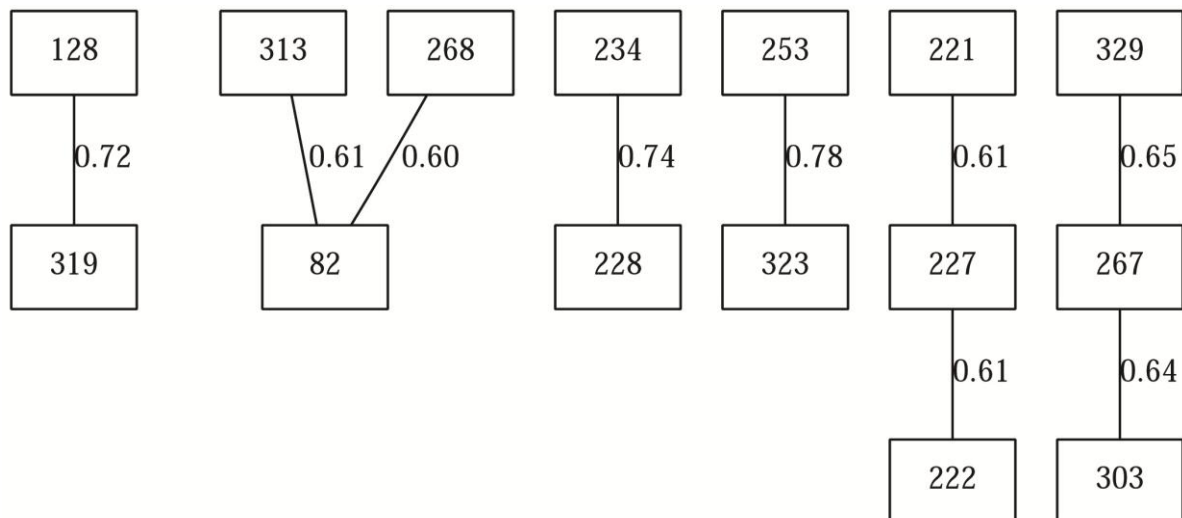
Tabela 3. Sítios do *PAX9* onde parece haver um relaxamento de pressão.

Codon	Trio	Sin (s)	Não-sin (n)	Sítios sin (S)	Sítios não-sin (N)	dS	dN	dN-dS	Valor-P	dN-dS normalizado
1	---	0,5	5,5	0,376645	2,31634	1,3275	2,3744	1,047	0,6025	0,845212
9	---	0	1	0,386292	2,35095	0	0,4254	0,425	0,8589	0,343405
184	CTG	0	1	0,870721	2,12928	0	0,4696	0,47	0,7098	0,379156
208	CCC	0	1	0,365769	2,37436	0	0,4212	0,421	0,8665	0,340019
209	GGG	1,8333	4,16667	0,955016	2,03925	1,9197	2,0432	0,124	0,6538	0,099741
227	CAC	1,8333	4,16667	0,969078	2,01544	1,8918	2,0674	0,176	0,6425	0,141722
229	GTC	0,5	6,5	0,317548	2,67975	1,5746	2,4256	0,851	0,646	0,687062
250	TAC	3	7	0,99665	2,00335	3,0101	3,4942	0,484	0,5623	0,390799
254	AAG	1	6	0,396437	2,34969	2,5225	2,5535	0,031	0,7323	0,025079
263	CGC	0	1	0,321945	2,67805	0	0,3734	0,373	0,8927	0,301461
270	GCC	0	1	0,275691	2,72431	0	0,3671	0,367	0,9081	0,296342
278	GAG	0	1	1	2	0	0,5	0,5	0,6667	0,403664
284	CAG	0	1	0,018877	2,98112	0	0,3354	0,335	0,9937	0,270814
289	GGT	0	1	1	2	0	0,5	0,5	0,6667	0,403664
304	GCA	0	6	0,744777	2,25522	0	2,6605	2,66	0,1805	2,14789
323	AGT	0	1	0,0188668	2,98113	0	0,3354	0,335	0,9937	0,270813
324	GCT	0	1	0,387206	2,35293	0	0,425	0,425	0,8587	0,343117

Tabela 4. Sítios que co-evoluem nos genes *PAX1* e *PAX9* com probabilidade posterior >0.60 .

Sítio 1	Sítio 2	$P\{S1 \rightarrow S2\}$	$P\{S1 \leftarrow S2\}$	$P\{S1 \leftrightarrow S2\}$
128	319	0,286374	0,436776	0,72315
221	227	0,195546	0,411032	0,606578
227	222	0,496925	0,113388	0,610313
234	228	0,183932	0,555846	0,739778
253	323	0,462133	0,316176	0,778309
267	303	0,48573	0,154362	0,640092
268	82	0,0503585	0,550966	0,601325
313	82	0,0638447	0,541268	0,605113
329	267	0,0278023	0,624159	0,651961

Nota: P= probabilidade posterior $P>0.60$

**Figura 4.** Interações entre os 15 sítios dos genes *PAX1* e *PAX9* que co-evoluem.

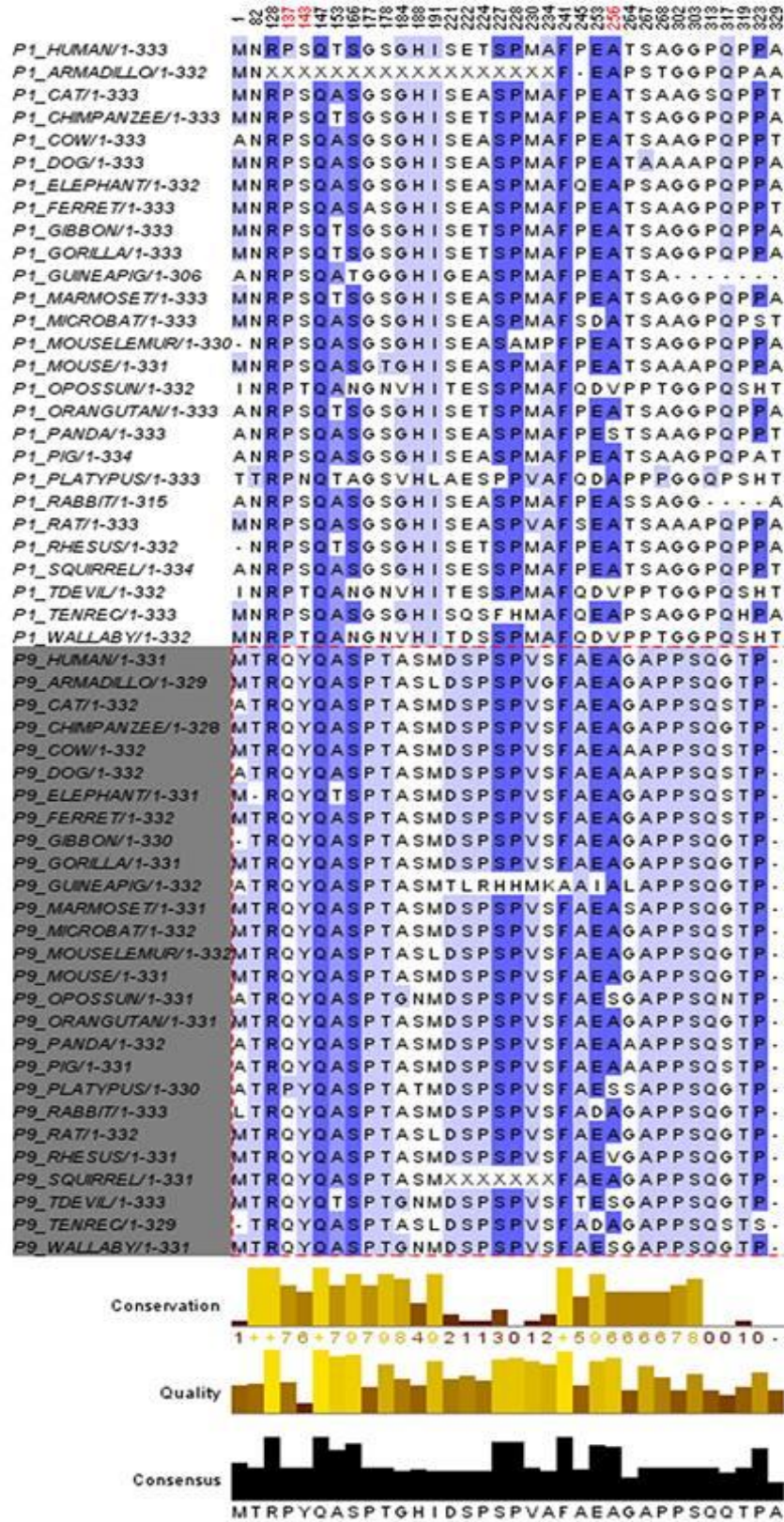


Figura 5. Sítios chaves, apontados pelo teste SPIDERMONKEY/BGM, onde parece ocorrer coevolução.

DISCUSSÃO

A seleção purificadora parece, de maneira geral, ter um papel central no padrão evolutivo dos genes *PAX1* e do *PAX9*. O exon 2, principalmente, engloba a região mais conservada em ambos os genes, uma vez que o domínio *paired* e o octapeptídeo são codificados nesta região. Esta conservação é confirmada pelo fato de que as filogenias dos genes recuperam, em grande parte, a filogenia das espécies.

A maior variabilidade encontrada no exon 3 do *PAX9* corrobora a idéia de que ele seria a “janela evolutiva” deste gene para adaptações funcionais na dentição (Pereira e cols, 2006; Paixão-Côrtes e cols., 2011b). Ou seja, esta seria uma região, em um gene muito conservado, onde alterações na sequência são mais toleradas por não impactarem as funções primordiais do gene. Essas alterações, porém, podem ser posteriormente selecionadas positivamente e levar a modificações na morfologia das espécies (Paixão-Côrtes e cols., 2011b). Já no *PAX1*, tanto o exon 3 quanto o exon 4 parecem ter maior tolerância para variações. Porém, é necessário que sejam feitas outras investigações para determinar o papel destas regiões variáveis no surgimento de novos caracteres morfológicos.

Não foram encontradas evidências de seleção positiva em uma busca inicial no *PAX1* ou no *PAX9*, o que indica que existem restrições funcionais as quais impedem maiores mudanças em ambos os genes.

CONCLUSÃO

Os genes *PAX1* e *PAX9* são de extrema importância para o desenvolvimento embrionário e a seleção purificadora parece ter, de fato, um papel essencial na evolução destes genes, especialmente no exon 2, onde é codificado o domínio *paired* (local de ligação da proteína ao DNA alvo). Nesta região do exon 2, quinze sítios parecem estar co-evoluindo tanto em um gene quanto no outro, porém, são necessários novos estudos para correlacionar as adaptações morfológicas às variações observadas no *PAX1* e *PAX9*.

REFERÊNCIAS

- ADHAM, I. M. e cols. The scoliosis (sco) mouse: a new allele of Pax1. *Cytogenetic and Genome Research*, v.111, n. 1, p.16-26, 2005.
- BALCZAREK, K. A.; LAI, Z. C.; KUMAR, S. Evolution and functional diversification of the paired box (Pax) DNA-binding domains. *Molecular Biology and Evolution.*, v. 14, n. 8, p.829-842, 1997.
- BALLING, R.; DEUTSCH, U.; GRUSS, P. Undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax1. *Cell*, v. 55, p.829-842, 1988.
- BOPP, D. e cols. Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of Drosophila. *Cell*, v. 47, p.1033-1040, 1986.
- BREITLING, R.; GERBER, J. K. Origin of the paired domain. *Development Genes and Evolution*, v. 210, n. 12, p.644-650, 2000.
- CARROLL, S. B. Endless forms: the evolution of gene regulation and morphological diversity. *Cell*, v. 101, n. 6, p.577-580, 2000.
- CARROLL, S. B. Evo-Devo and an expanding evolutionary synthesis: a genetic theory of morphological evolution. *Cell*, v. 134, p.25-36, 2008.
- CARROLL, S. B. Genetics and the making of Homo sapiens. *Nature Publishing Group*, v. 422, p.849-857, 2003.
- CHI, N.; EPSTEIN, J. Getting your Pax straight: Pax proteins in development and disease. *Trends in Genetics*, v. 18, n. 1, p.41-47, 2002.
- DAHL, E.; KOSEKI, H.; BALLING, R. Pax genes and organogenesis. *Bioessays*, v. 19, p.755-765, 1997.
- GIAMPIETRO, P. F. e cols. An analysis of PAX1 in the development of vertebral malformations. *Clinical Genetics*, v. 68, p.448-453, 2005.

- HETZER-EGGER, C.; SCHORPP, M.; BOEHM, T. Evolutionary conservation of gene structures of the Pax1/9 gene family. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1492, p.517-521, 2000.
- HILL, A. e cols. Origin of Pax and Six gene families in sponges: single PaxB and Six1/2 orthologs in *Chalinula loosanoffi*. *Developmental Biology*, v. 343, p.106-123, 2010.
- KING, MC.; WILSON, A. C. Evolution at Two Levels Humans and Chimpanzees. *Science*, v. 188, n. 4184, p.107-116, 1975.
- KIST, R. e cols. Reduction of Pax9 gene dosage in an allelic series of mouse mutants causes hypodontia and oligodontia. *Human Molecular Genetics*, v. 14, n. 23, p.3605-3617, 2005.
- LINE, S. R. P. Variation of tooth number in mammalian dentition: connecting genetics, development, and evolution. *Evolution & Development*, 5:3, p.295-304, 2003.
- MILLER, D. J. e cols. Pax gene diversity in the basal cnidarian *Acropora millepora* (Cnidaria, Anthozoa): implications for the evolution of the Pax gene family. *PNAS*, v. 97, n. 9, p.4475-4480, 2000.
- NAKATOMI, M. e cols. Genetic interactions between Pax9 and Msx1 regulate lip development and several stages of tooth morphogenesis. *Developmental Biology*, v. 340, p.438-449, 2010.
- NEI, M. The new mutation theory of phenotypic evolution. *PNAS*, v. 104, n. 30, p.12235-12242, 2007.
- NEUBÜSER, A. e cols. Antagonistic Interactions between FGF and BMP Signaling Pathways: A Mechanism for Positioning the Sites of Tooth Formation. *Cell*, v. 90, p.247-255, 1997.
- NEUBÜSER, A.; KOSEKI, H.; BALLING, R. Characterization and developmental expression of Pax9, a paired-box-containing gene related to Pax1. *Developmental Biology*, v. 170, p.701-716, 1995.

- OGASAWARA, M. e cols. Developmental expression of Pax1/9 genes in urochordate and hemichordate gills: insight into function and evolution of the pharyngeal epithelium. *Development*, v. 126, p.2539-2550, 1999.
- OGASAWARA, M. e cols. Pax1/Pax9-Related genes in an agnathan vertebrate, *Lampetra japonica*: expression pattern of LjPax9 implies sequential evolutionary events toward the gnathostome body plan. *Developmental Biology*, v. 223, p.399-410, 2000.
- PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R. PAX9: uma ferramenta evolutiva? 2008. 136 f. Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular-UFRGS, Porto Alegre, 2008.
- PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R. e cols. Genetic variation among major human geographic groups supports a peculiar evolutionary trend in PAX9. *PLoS One*, v. 6, e15656, 2011b.
- PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R. e cols. PAX9 and MSX1 transcription factor genes in non-syndromic dental agenesis. *Archives of Oral Biology*, v. 56, p.337-344, 2011a.
- PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R. e cols. Evolutionary history of Chordate PAX genes: dynamics of change in a complex gene family. *Submetido*. 2013.
- PEREIRA, T. V. e cols. Natural selection and molecular evolution in primate PAX9 gene, a major determinant of tooth development. *PNAS*, v. 103, n. 15, p.5676-5681, 2006.
- PETERS, H. e cols. Isolation of the Pax9 cDNA from adult human esophagus. *Mamm Genome*, v. 8, n. 1, p.62-64, 1997.
- PETERS, H. e cols. Pax1 and Pax9 synergistically regulate vertebral column development. *Development*, v. 126, p.5399-5408, 1999.
- PETERS, H. e cols. Pax9-deficient mice lack pharyngeal pouch derivatives and teeth and exhibit craniofacial and limb abnormalities. *Genes and Development*, v. 12, p.2735-2747, 1998.

- POON, A.; FROST, S.; POND, S. Detecting Signatures of Selection from DNA Sequences Using Datamonkey. In: *Bioinformatics for DNA Sequence Analysis*. Humana Press, p.163-183, 2009.
- POUGH, J. H.; JANIS, C. M.; HEISER, J. B. *A vida dos vertebrados*. 6ª Ed. São Paulo, Atheneu, 2003.
- ROBSON, E. J.; HE, S. J.; ECCLES, M. R. A PANorama of PAX genes in cancer and development. *Nature Publishing Group*, v. 6, n. 1, p.52-62, 2006.
- SANTAGATI, F. e cols. Identification of Cis-regulatory elements in the mouse Pax9/Nkx2-9 genomic region: implication for evolutionary conserved synteny. *Genetics*, v. 165, n. 1, p.235-242, 2003.
- STAPLETON, P. e cols. Chromosomal localization of seven PAX genes and cloning of a novel family member, PAX9. *Nature Genetics*, v. 3, p.292-298, 1993.
- SUGA, H. e cols. Flexibly deployed Pax genes in eye development at the early evolution of animals demonstrated by studies on a hydrozoan jellyfish. *PNAS*, v. 107, n. 32, p.14263-14268, 2010.
- TAMURA, K. e cols. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*; 28: 2731-2739, 2011.
- THESLEFF, I.; NIEMINEN, P. Tooth morphogenesis and cell differentiation. *Current Opinion In Cell Biology*, v. 8, p.844-850, 1996.
- WALLIN, J. e cols. The role of Pax-1 in axial skeleton development. *Development*, v. 120, p.1109-1121, 1994.
- WANG, Y. T. e cols. A novel Pax-like protein involved in transcriptional activation of cyst wall protein genes in *Giardia lamblia*. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 285, n. 42, p.32213-32226, 15 out. 2010.
- WATERHOUSE, A. e cols. Jalview Version 2: A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191, 2009.

- DELPORTE, W. e cols. Datamonkey 2010: a suite of phylogenetic analysis tools for evolutionary biology. *Bioinformatics*, 2010 July 29 [Epub ahead of print; PMID: 20671151].
- WILM, B. e cols. Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. *PNAS*, v. 95, p.8692-7869, 1998.
- ZHANG, J.; KUMAR, S. Detection of Convergent and Parallel Evolution at the Amino Acid Sequence Level. *Molecular Biology And Evolution*, v. 14, n. 5, p.527-536, 1997.
- ZHU, J. e cols. A novel nonsense mutation in PAX9 is associated with sporadic hypodontia. *Mutagenesis*, v. 27, n. 3, p.313-317, 2012.