Determinação das freqüências alélicas e genotípicas do gene da tireoglobulina em bovinos de corte

Siqueira, Fabiane[1]; Torres Junior, Roberto A. de A.[1]; Regitano, Luciana C. de A.[2]; Alencar, Maurício M.[2]; Silva, Luiz Otávio C.[1]; Soares, Cleber O.[1]; Euclides Filho, Kepler[3]; Araújo, Flábio R.[1]; Rosinha, Grácia M. S.[1]; Oliveira, Renato M.[1].

[1] Embrapa Gado de Corte – Campo Grande/MS/Brasil – fabiane@cnpgc.embrapa.br
[2] Embrapa Pecuária Sudeste – São Carlos/SP/Brasil – luciana@cppse.embrapa.br
[3] Embrapa Sede – Brasília/DF/Brasil

Introdução

A integração entre os diversos segmentos da cadeia produtiva da carne bovina, associada ao aumento da exigência do consumidor quanto à qualidade do produto final, tem demandado por animais que sejam capazes de produzir carne de melhor qualidade de forma economicamente viável. Com relação às pesquisas envolvendo cruzamentos, vários grupos têm desenvolvido trabalhos visando o aumento da eficiência produtiva dos rebanhos bovinos e a melhoria da qualidade da carne, sendo a maciez sempre apontada como fator essencial para o julgamento da qualidade do produto (RAZOOK et al., 2002; HEINEMANN et al., 2003; MENEZES et al., 2005). Segundo Burrow (2006), em programas de cruzamento em ambientes tropicais é possível utilizar raças de bovinos *Bos indicus* e raças taurinas adaptadas (*Bos taurus*) para otimizar a heterose e maximizar a produtividade. As raças taurinas são usadas em programas que visam melhorar a taxa de fertilidade, o temperamento, o rendimento de carcaça e a qualidade da carne, porém, sem comprometer a adaptação do animal ao ambiente. Vários genes candidatos foram previamente identificados como possíveis responsáveis pela deposição de gordura subcutânea em bovinos de corte, como os genes: *DGAT1* (THALLER et al., 2003), *FABP3* (ROY et al., 2003), *GH1* (TAYLOR et al., 1998), *LEP* (BUCHANAN et al., 2002) e *TG* (BARENDSE, 1997). Contudo, a magnitude relativa aos efeitos e a importância de cada um destes genes no controle de variações fenotípicas permanecem desconhecidas. Barendse (1997) descreveu um polimorfismo na seqüência 5' líder do gene da tireoglobulina associado com marmoreio. O autor observou que animais que possuem o alelo '3', ou seja, ambos os genótipos '23' e '33' têm maior marmoreio em relação à média, do que os animais que possuem o genótipo '22'. Este polimorfismo Tg5 é a base do teste comercial *GeneStar Marbling*™ (Genetic Solution). Ele foi testado em confinamentos da Austrália e confirmado nos Estados Unidos em cruzamentos Simental X Angus pelo Consórcio de Avaliação Nacional de Gado de Corte (NBCEC). Porém, ainda são necessários estudos para verificar o efeito desses genes nas diferentes raças criadas em condições brasileiras. Neste contexto, a identificação de animais que apresentam potencial para produção de carne de melhor qualidade, por meio da utilização de testes de DNA, constitui uma ferramenta importante para viabilizar a seleção dos reprodutores que possuam estas características, aumentando, assim, a qualidade e uniformidade da carne do rebanho comercial. A seleção assistida por marcadores oferece benefícios potenciais quando se trata de características de baixa herdabilidade, difíceis e/ou de alto custo de medição ou que se medem numa idade avançada. Dessa forma, as diferenças genéticas existentes entre as raças, e mesmo entre indivíduos de uma mesma raça, no que se refere às variáveis envolvidas na qualidade da carne, podem ser usadas nos sistemas de produção do Brasil, no sentido de se adequar genótipo ao ambiente para produzir um produto que satisfaça as necessidades do mercado consumidor.

Objetivo

Avaliar as diferenças de freqüências alélicas e genotípicas do polimorfismo Tg5 no gene da tireoglobulina entre raças taurinas adaptadas (Bonsmara, Caracu e Senepol) e delas com a raça Nelore (zebuína) e Angus (taurina não adaptada).

Material e métodos

Para a determinação das freqüências alélicas e genotípicas no gene *TG* foram obtidas amostras de sêmen e de sangue de 106 touros das raças Nelore, Angus (Aberdeen e Red), Bonsmara, Caracu e Senepol de centrais de inseminação, de associações de raças e de criadores, sendo que essas amostras foram escolhidas de acordo com o menor grau de parentesco possível entre os animais.

Extração de DNA: para extração de DNA foram utilizadas amostras de sêmen e de sangue de 26 touros das raças Nelore, 16 de touros Angus (sendo 9 de Aberdeen Angus e 7 de Red Angus), 18 de Bonsmara, 25 de Caracu e 21 de Senepol. Os DNAs foram quantificados em espectrofotômetro *Ultrospec 2000* (Pharmacia Biotech) e diluídos em alíquotas contendo 40 ng de DNA/µL de solução de TE (10 mM Tris HCl pH 7,6; 1 mM EDTA). **Amplificação do DNA:** foi amplificada parte da região 5' líder do gene da tireoglobulina, a qual possui 545 pares de bases, utilizando os *primers* descritos por Barendse (1997). As reações de PCR foram realizadas em um aparelho termociclador *Mastercycler Personal* (Eppendorff) a partir de 100 ng de DNA genômico em um volume final de reação de 25 µL contendo Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, $MgCl_2$ 2,0 mM, 200 µM de cada dNTP, 0,164 µM de cada *primer* e 0,65 unidades de Taq DNA polimerase. A reação de amplificação constou de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação

a 94°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após os 35 ciclos, o produto amplificado foi submetido a um passo de extensão final por 10 minutos a 72°C. **Eletroforese**: para a verificação de amplificação foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídeo. Para isso, utilizou-se tampão TBE 1X (Tris base 90 mM; ácido bórico 90 mM; EDTA 2 mM pH 8,0) e foi aplicada uma voltagem de 100 V por 1h30 minutos. Um volume de 5 µL de cada produto de amplificação foi aplicado no gel, acrescido de 2 µL de *loading buffer* (glicerol; TBE 10X; azul de bromofenol 1%; água deionizada) e 3 µL de água ultrapura. Ao término da eletroforese os produtos de amplificação foram visualizados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital (Figura 1). **Digestão dos produtos amplificados:** os produtos de amplificação do gene *TG* foram digeridos com a enzima *MboI*. O volume final da reação de digestão foi de 14 µL, sendo 12 µL do produto de PCR e 2,0 µL do Emix de digestão (1U *MboI*; 10 mM Tris-HCl pH 8,5; 10 mM $MgCl_2$; 100 mM KCl; 0,1 mg/ml de BSA). A reação de digestão foi incubada a 37ºC por 3 horas no termociclador. **Análise dos genótipos:** para análise dos genótipos do gene *TG*, os produtos da digestão foram separados em gel de agarose 4%. Esse procedimento foi realizado com tampão de eletroforese TBE 1X, submetidos a voltagem de 100 V por 2h00 e corados com brometo de etídeo. Foram aplicados no gel 14 µL do produto de digestão acrescidos de 2,8 µL de *loading buffer* (5:1). No primeiro poço de cada fileira do gel foi aplicada uma amostra de padrão de tamanho de DNA de 100 pb acrescido de *loading buffer* na mesma proporção acima. Os fragmentos foram detectados sob iluminação ultravioleta e fotografados com câmera digital (Figura 2). Após a digestão com a enzima *MboI*, o alelo A é caracterizado pela presença de três fragmentos de restrição, com 74, 193 e 278 pares de bases e o alelo B produz fragmentos de 17, 74, 176 e 278 pares de bases. **Análise estatística:** as freqüências alélicas e genotípicas foram determinadas contando o número de cada alelo e de cada genótipo e dividindo pelo número de alelos e genótipos avaliados em cada raça. Estas freqüências foram comparadas utilizando o teste de Qui-quadrado. (Tabela 1).

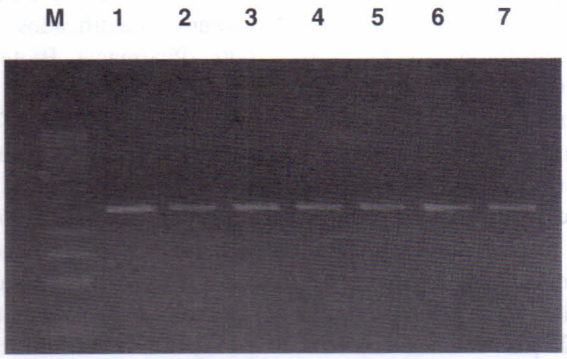

Figura 1. Gel de agarose 0,8% com produto de amplificação de um segmento de 545 pb do gene da tireoglobulina. M. Padrão molecular de tamanho de 100 pb.

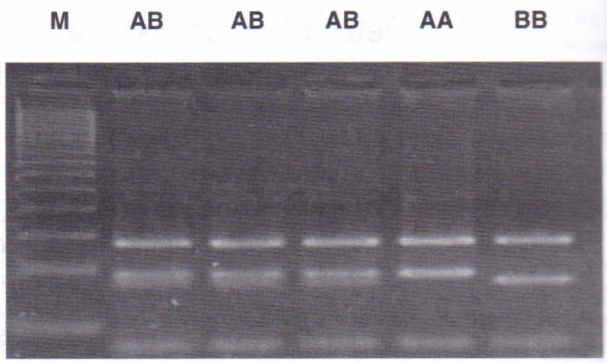

Figura 2. Gel de agarose 4% com fragmentos do gene da tireoglobulina após digestão com enzima de restrição *MboI*. M. Padrão molecular de tamanho de 100 pb.

Tabela 1. Freqüências genotípicas e alélicas para o gene da tireoglobulina em raças Nelore, Caracu, Senepol, Bonsmara e Angus.

	Genótipos *				Alelos **		
Raças	AA	AB	BB	Total	A	B	Total
	Freqüência Relativa						
Nelore	0,0	0,0	100,0	100,0	0,0	100,0	100,0
Senepol	0,0	19,0	81,0	100,0	9,5	90,5	100,0
Caracu	28,0	20,0	52,0	100,0	38,0	62,0	100,0
Bonsmara	11,1	27,8	61,1	100,0	25,0	75,0	100,0
Angus	12,5	50,0	37,5	100,0	37,5	62,5	100,0
Geral	10,4	20,8	68,9	100,0	20,8	79,2	100,0
	Freqüência Absoluta						
Nelore	0	0	26	26	0	52	52
Senepol	0	4	17	21	4	38	42
Caracu	7	5	13	25	19	31	50
Bonsmara	2	5	11	18	9	27	36
Angus	2	8	6	16	12	20	32
Geral	11	22	73	106	44	168	212

* Presença de diferenças significativas (P = 0,000077) entre raças para as freqüências genotípicas, pelo teste de Qui-quadrado.

** Presença de diferenças significativas (P = 0,000002) entre raças para as freqüências alélicas, pelo teste de Qui-quadrado.

Resultados e Discussão

O alelo favorável para marmoreio foi designado, neste trabalho, de A e o alelo desfavorável designado de B. Nenhum dos touros Nelore avaliados apresentou o alelo A (P<0,05). Apesar do pequeno número de animais analisados e da possibilidade deste alelo estar em freqüências muita baixas na raça Nelore, este resultado é um indicativo de que o alelo B possa estar fixado na população. Se esse resultado se confirmar em uma amostra maior de animais Nelore, testes de DNA para esse gene não terão valor na seleção de reprodutores. Casas et al. (2005) também encontraram uma baixa freqüência do alelo favorável para marmoreio em zebuínos avaliando uma população de bovinos da raça Brahman. Esses autores encontraram associação deste polimorfismo com espessura de gordura mas não com

marmoreio, além das freqüências alélicas deste polimorfismo terem sido diferentes das encontradas por Barendse et al. (2001) em bovinos das raças Angus e Shorthorn. Veneroni (2007), analisando 572 animais da raça Canchim, não encontrou associação do polimorfismo Tg5 com espessura de gordura e o alelo considerado favorável para alto grau de marmoreio apresentou freqüência de 16,11% nesses animais. Segundo a autora, por ter sido testado apenas o efeito de Tg5 sobre espessura de gordura subcutânea não se pode descartar um possível efeito desse polimorfismo sobre marmoreio, uma vez que a correlação entre essas duas características não é alta (CREWS; KEMP, 2001). No presente trabalho, verificou-se que o alelo favorável para marmoreio está presente nas raças taurinas adaptadas, assim como na raça Angus, mas, como pode ser observado na Tabela 1, há grande variação da freqüência deste alelo entre as raças taurinas adaptadas. Esses resultados estão em concordância com os publicados por Wu et al. (2005), que analisaram polimorfismos nos genes *DGAT1*, *FABP3*, *GH1*, *LEP* e *TG* em uma população F2 de animais Wagyu X Limousin e encontraram freqüências alélicas de 39,05% para o alelo favorável para alto grau de marmoreio e de 60,95% para o alelo desfavorável. Todos os cinco genes contribuíram significativamente para deposição de gordura intramuscular, porém com contribuições variadas.

Conclusões

O rebanho bovino brasileiro é formado por diversas raças de corte, entre elas as raças britânicas, com uma deposição de gordura intramuscular precoce, e as raças zebuínas, especialmente a Nelore, que são tardias na deposição de gordura intramuscular. Quanto à raça Nelore, de acordo com a população analisada, a não observação do alelo favorável para marmoreio indica que o uso desse marcador como ferramenta para selecionar reprodutores dessa raça pode ser ineficiente. No entanto, esse marcador pode mostrar-se viável na seleção de animais taurinos, adaptados ou não, já que a freqüência de média a baixa observada na população em estudo permite que esse teste seja aplicado, com ganhos expressivos, desde que confirmada a associação dos alelos desse gene com o grau de marmoreio.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Associação dos Criadores de Bonsmara, Associação Brasileira de Criadores de Caracu, Alta Genetics, Lagoa da Serra, ABS Pecplan, Sr. Lício Isfer, Sr. Diomário Faustino de Barros, Sr. Sebastião Fogaça, Sr. Aguiar de Almeida Pereira, Sr. José Neves Ferreira e Sr. Flávio Fioravanti Júnior que nos auxiliaram na obtenção das amostras de sêmen.

Referências bibliográficas

BARENDSE, W. **Assessing lipid metabolism**. Patent International Publication number: WO 99/23248. World International Property Organization, 1997.

BARENDSE, W.; BUNCH, R.; THOMAS, M.; ARMITAGE, S.; BAUD, S.; DONALDSON, N. The TG5 DNA marker test for marbling capacity in Australian feedlot cattle. In: PROCEEDINGS BEEFQUALITY CRC MARBLING SYMPOSION, 2001. p.30-35. Disponível em: <http://www.beef.crc.org.au/Publications/MarblingSym/Day1/Tg5DNA>. Acesso em: 15 dez. 2006.

BUCHANAN, F. C.; FITZSIMMONS, C. J.; VAN KESSEL, A. G.; THUE, T. D.; WINKELMAN-SIM, D. C.; SCHMUTZ, S. M. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. **Genetic Selection Evolution**, v. 34, p. 105-116, 2002.

BURROW, H. M. Utilization of diverse breed resources for tropical beef production. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8., 2006, Belo Horizonte/MG. **Anais...** Belo Horizonte: Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal, 2006, CD ROM.

CASAS, E.; WHITE, S. N.; RILEY, D. G.; SMITH, T. P. L.; BRENNEMAN, R. A.; OLSON, T. A.; JOHNSON, D. D.; COLEMAN, S. W.; BENNETT, G. L.; CHASE JR., C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13-19, 2005.

CREWS, Jr. D. H.; KEMP, R. A. Genetic parameters for ultrasound and carcass measures of yield and quality among replacement and slaughter beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 3008-3020, 2001.

HEINEMANN, R. J. B.; PINTO, M. F.; ROMANELLI, P. F. Fatores que influenciam a textura da carne de novilhos Nelore e cruzados Limousin-Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 38, n. 8, p. 963-971, 2003.

MENEZES, L. F. G.; RESTLE, J.; VAZ, F. N.; BRONDANI, I. L.; ALVES FILHO, D. C.; FREITAS, A. K.; METZ, P. A. M. Composição física da carcaça e qualidade da carne de novilhos de gerações avançadas do cruzamento alternado entre as raças Charolês e Nelore, terminados em confinamento. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 3, p. 946-956, 2005.

RAZOOK, A. G.; FIGUEIREDO, L. A.; RUGGIERI, A. C.; NARDON, R. F.; CYRILLO, J. N. S. G. Desempenho em pastagens e características de carcaça da 16ª progênie dos rebanhos Nelore, Guzerá e Caracu de Sertãozinho/SP. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 3, p. 1367-1377, 2002.

ROY, R.; CALVO, J. H.; HAYES, H.; RODELLAR, C.; EGGEN, A. Fine mapping of the bovine Herat fatty acid-binding protein gene (*FABP3*) to BTA2q45 by fluorescence *in situ* hybridization and radiation hybrid mapping. **Animal Genetics**, v. 34, p. 466-467, 2003.

TAYLOR, J. F.; COUTINHO, L. L.; HERRING, K. L.; GALLAGHER, D. S.; BRENNEMAN, R. A. Candidate gene analysis of *GH1* for effects on growth and carcass composition of cattle. **Animal Genetics**, v. 29, p. 194-201, 1998.

THALLER, G.; KÜHN, C.; WINTER, A.; EWALD, G.; BELLMANN, O.; WEGNER, J.; ZÜHLKE, H.; FRIES, R. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal Genetics**, v. 34, p. 354-357, 2003.

VENERONI, G. B. **Associação da região centromérica do cromossomo 14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim**. 2007, 68f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde , Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2007.

WU, X. L.; MACNEIL, M. D.; DE, S.; XIAO, Q. J.; MICHAL, J. J.; GASKINS, C. T.; REEVES, J. J.; BUSBOOM, J. R.; WRIGHT JR., R. W.; JIANG, Z. Evaluation of candidate gene effects for beef backfat via Bayesian model selection. **Genetica**, v. 125, p. 103-113, 2005.