

## DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE ZEBUÍNOS LEITEIROS DA RAÇA GIR LEITEIRO

Costa, T. G. da.<sup>1</sup>; Celestino, C. S.<sup>2</sup>; Sousa, N. F. M. de.<sup>3</sup>; Lacorte, G. A.<sup>4</sup>; Bastos, R. T.<sup>5</sup>; Steinberg, R. S.<sup>6</sup>;

1 Talita Gomes da Costa, Bolsista (IFMG), Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí - MG; [talitadacosta1@hotmail.com](mailto:talitadacosta1@hotmail.com)

2 Carina dos Santos Celestino, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí – MG

3 Nathan Felipe Morais de Sousa, Licenciatura em Ciências Biológicas, IFMG Campus Bambuí, Bambuí – MG

4 Gustavo Augusto Lacorte: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí;

5 Rafael Teixeira Bastos: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí;

6 Raphael Steinberg da Silva: Pesquisador do IFMG, Campus Bambuí; [raphael.silva@ifmg.edu.br](mailto:raphael.silva@ifmg.edu.br)

### RESUMO

A produção de leite por parte de raça Gir Leiteiro é destaque na formação de recursos genéticos para o melhoramento do rebanho leiteiro nacional, ganhando interesse comercial e, conseqüentemente, foco para pesquisas buscando o melhoramento genético. Características como a marmorização cárnea e presença de gordura no leite como produto, mediante a valorização econômica no estado de Minas Gerais, se tornaram alvo de trabalhos com o intuito de associá-las aos genótipos possivelmente candidatos. Em consequência da tal importância, este estudo objetivou a genotipagem do polimorfismo presente na região 5' UTR do gene da tireoglobulina bovina (TG) de animais pertencentes a raça Gir Leiteiro. Para tal, utilizou-se 92 indivíduos oriundos de uma Fazenda de animais Puros de Origem e pertencente ao PNMGL, que foram genotipados através da extração de DNA pelo método de Salting-Out e, em seguida, pela técnica da PCR-RFLP para a detecção do polimorfismo. Por fim, a eletroforese feita em um gel de Poliacrilamida 6,5 % corado com solução de Coloração com Nitrato de Prata 12% e precipitado no Hidróxido de Sódio 30% e Formol 37%. Como resultado, obteve-se uma frequência alélica alta para o alelo C de 82,74%, enquanto que o alelo T foi de 17,26%, traduzindo uma predominância na raça Gir do alelo C deste polimorfismo. Em relação à frequência genotípica, a predominância foi do homocigoto CC com 69,05% e, para os outros, 27,38% referente ao heterocigoto TC e 3,57% para o homocigoto TT. O alelo C presente pode expressar um possível teor inferior de marmorização cárnea e gordura no leite em indivíduos da raça Gir Leiteiro. Para base, com o intuito de aprofundamento nos estudos a perspectiva é a genotipagem de mais 207 amostras de DNA pertencentes ao Banco de DNA de Bovinos do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG – Campus Bambuí, seguida de estudos de associação com diferentes fenótipos avaliados nos referidos animais.

**Palavras-Chave:** frequência alélica, marcadores moleculares, polimorfismo, tireoglobulinas .

### INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta um grande potencial para a pecuária leiteira em nível internacional (CAMPOS, 2011). Como sexto maior produtor de leite, a atividade de pecuária leiteira gera renda para milhares de pequenos e grandes produtores, bem como leva à mesa de residências de todo mundo um produto de alto valor nutritivo (GOMES, 1999). Entre as regiões produtoras no Brasil, o Sudeste desponta como maior produtor de leite, com destaque para Minas Gerais, como o estado com maior produção de leite no país (IBGE, 2019).

A partir da chegada dos zebuínos no Brasil há mais de 100 anos, a raça Gir foi a que mais se adaptou ao território brasileiro e no início acabou se esquecendo do seu potencial leiteiro, focando-se apenas na seleção para corte, mas, pensando nisso criou-se programas de melhoramento genético e pesquisa nesse propósito (LEDIC, 2000). Anos mais tarde, iniciou-se o Programa de Teste de Progenie do Gir Leiteiro, para a avaliação da produção de leite de animais da raça, e o programa expandiu-se para o

Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (*PNMGL*), que se tornou mais amplo, analisando teor de proteína, lactose e sólidos totais na produção (VERNEQUE *et al.*, 2010).

O estudo da manifestação do potencial genético animal foi viabilizado por meio do processo de melhoramento das técnicas de genética molecular aliado aos métodos tradicionais. Seu uso relaciona favoravelmente a detecção e as características quantitativas da informação genética, contribuindo para compreensão da variação sobre o modo de ação gênica individual e suas correlações, com sua aplicação prática através da seleção assistida por marcadores (MAS) na produção animal (CAMPOS 2011).

A tireoglobulina (TG) é uma glicoproteína codificada pelo gene TG e expressa na glândula tireoidiana. Através da iodização, origina a monoiodotirosina (MIT) e a diiodotirosina (DIT), precursores dos hormônios Triiodotironina (T3) e Tiroxina (T4) (GUYTON *et al.*, 2006).

O gene responsável pela codificação da TG foi descrito por Barendse (1999) como um gene candidato na determinação da variação no acúmulo de gordura e marmoreio cárneo em bovinos. Esse efeito parece estar associado ao polimorfismo envolvendo a substituição de uma Citosina por uma Timina, na região 5'UTR do gene TG. O gene responsável é composto, no mínimo, por 37 éxons intercalados por grandes íntrons de até 64kb, além de cobrir pelo menos 300kb de DNA e codificar, também, um RNAm de 8,7kb (BAAS *et al.*, 1986).

Percebeu-se que os animais que contêm os genótipos TC e TT possuem uma maior marmoreio cárneo do que os que contêm o genótipo CC (BARENDSE, 1997). Tal como o gene da tireoglobulina com o intuito de caracterização de deposição de gordura em gado de corte, tem sido indicado como gene candidato, sendo este fator relacionado com o depósito da mesma no produto do leite bovino (VENERONI, 2007).

Diante disso, o presente trabalho é relevante por efeito do interesse comercial, como melhoramento genético, mediante fenótipos em animais de produção que atraem importância econômica, tendo como base a seleção baseada em polimorfismos em genes candidatos. Características como a marmorização cárnea e presença de gordura no leite como produto se tornaram alvo de trabalhos com o intuito de associá-las a genótipos possivelmente favoráveis (KHATIB, 2007).

Tem-se como objetivo deste trabalho padronizar uma genotipagem para o polimorfismo C/T da região 5' UTR do gene da TG bovina em amostras de DNA extraídas do sangue de bovinos da raça Gir Leiteiro e avaliar as frequências alélicas e genotípicas deste polimorfismo.

## **METODOLOGIA**

Foram utilizadas 92 vacas, da raça Gir Leiteiro, pertencentes a uma fazenda participante do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro (*PNMGL*). O DNA para as análises genômicas foi extraído usando amostras de sangue através do método de extração Salting-Out (MILLER *et al.*, 1988). Essa metodologia se baseia na lise de células por meio do acréscimo de altas concentrações salinas, precipitando as moléculas orgânicas para serem retiradas da amostra, seguida da precipitação de ácidos nucleicos com Etanol. Para a genotipagem das amostras de DNA extraídas foi utilizada a técnica de PCR-RFLP (Reação em Cadeia da

Polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Limitação) baseada nas condições descritas por New England BioLabs (*NEB*) com algumas adaptações.

A reação foi realizada em volume final de 25  $\mu\text{L}$ , usando 2  $\mu\text{L}$  de DNA a 100 ng/  $\mu\text{L}$ ; 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão IO (10x) fabricado por Phoneutria, Brasil; 0,8  $\mu\text{L}$   $\text{MgCl}_2$  (51 mM); 2,0  $\mu\text{L}$  de dNTPs (10 mM); 1,0  $\mu\text{L}$  de Primer TG F (5'GGGGATGACTACGAGTATGACTG3'); (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ); 1,0  $\mu\text{L}$  de Primer TG R (5'GTGAAAATCTTGTGGAGGCTGTA3') por (BARENDSE, 1997); (10 pmol/ $\mu\text{L}$ ); 0,2  $\mu\text{L}$  de Taq DNA polimerase (5U / $\mu\text{L}$ ) fabricado por Phoneutria, Brasil e 15,5  $\mu\text{L}$  de Água Ultrapura fabricado por Phoneutria, Brasil. A amplificação por PCR gerou um fragmento de 548 bp através das seguintes condições de termociclagem: desnaturação inicial à 94°C por 5 minutos; seguida de 30 ciclos contendo uma etapa de desnaturação de 94°C por um minuto, anelamento dos primers de 58°C por um minuto, e extensão de 72°C por um minuto, seguidos de uma etapa de extensão final de 72°C por 5 minutos utilizando-se o termociclador Kyratec. Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de Acrilamida corado no nitrato de prata para observação da amplificação das amostras. Foi utilizado eletroforese em gel de Acrilamida 6,5% com corrida de três horas em uma tensão 150V, corado com uma solução de Coloração de Nitrato de Prata 12% precipitada no Hidróxido de Sódio 30% e Formol 37%.

A reação de RFLP dos produtos de PCR envolveu a digestão enzimática em um volume de 15  $\mu\text{L}$  e foi realizada usando 5,0  $\mu\text{L}$  do produto de PCR; 0,1  $\mu\text{L}$  da enzima de restrição BstYI (10 U/ $\mu\text{L}$ ) fabricado por NEB; 1,5  $\mu\text{L}$  de tampão (2,1 NE – 10x) fabricado por NEB; e 8,4  $\mu\text{L}$  de Água Ultrapura. A digestão foi realizada através da incubação das reações em uma temperatura de 60°C no termociclador Kyratec. Os produtos de digestão foram resolvidos em eletroforese em gel de Acrilamida 6,5% corado com prata para identificação dos genótipos de cada animal. A eletroforese dos produtos digeridos foi realizada em gel de Acrilamida 6,5% em uma com corrida de 2,5 horas em uma tensão de 130V, corado com uma solução de Coloração de Nitrato de Prata 12% precipitada no Hidróxido de Sódio 30% e Formol 37%.

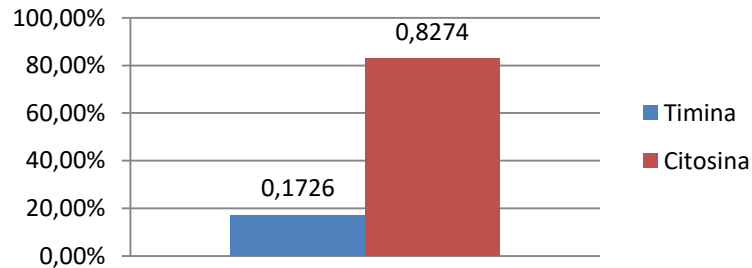
Em todos os géis houve a inclusão de um Marcador de Peso Molecular (*ladder*) de 50bp para identificação do tamanho das bandas geradas fabricado por CELLCO. De acordo com metodologia descrita por NEB eram esperados os seguintes perfis de restrição: para o genótipo TT bandas de 473bp + 75bp; para o genótipo TC bandas de 473bp + 295bp + 178bp + 75bp; e para o genótipo CC bandas de 295bp + 178b + 75bp.

## RESULTADOS E DISCUSSÕES

Entre as 92 vacas da raça Gir Leiteiro genotipadas neste trabalho foram encontrados os alelos C e T com frequência de 82,74% e 17,26%, respectivamente (Gráfico 1) e os genótipos TT, TC e CC com frequências de 3,57%, 27,38% e 69,05%, respectivamente (Gráfico 2). Na Figura 1 foi apresentado um gel de eletroforese em Poliácridamida 6,5% corado com Nitrato de Prata utilizado nas genotipagens do referido polimorfismo.

Gráfico 1: Frequências alélicas do polimorfismo do gene candidato da tireoglobulina em Gir Leiteiro, envolvendo a substituição de um nucleotídeo Citosina por um nucleotídeo Timina.

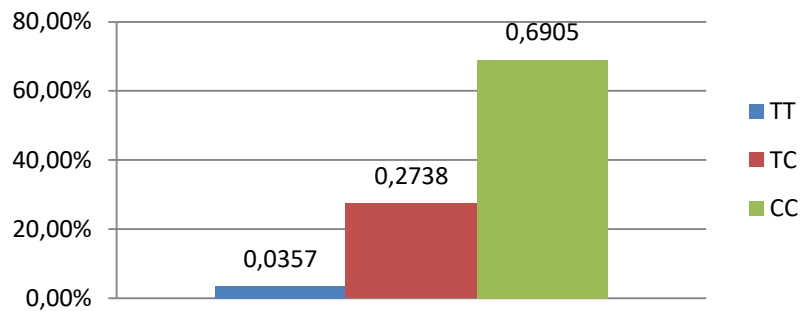
## Frequências Alélicas



Fonte: Autores (2019)

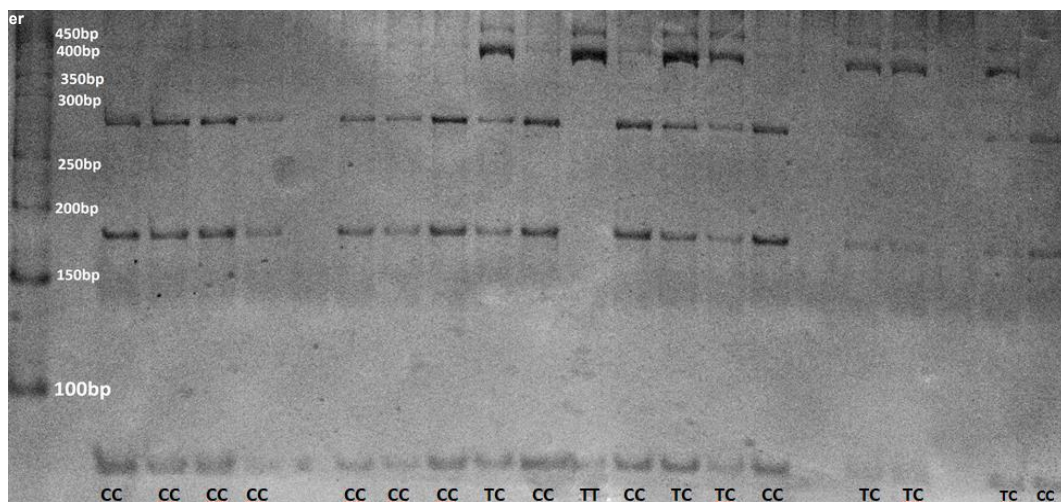
Gráfico 2: Frequências genotípicas do polimorfismo do gene da tireoglobulina para o homocigoto TT, heterocigoto TC e homocigoto CC em Gir Leiteiro.

## Frequências Genotípicas



Fonte: Autores (2019)

Figura 1: Gel de Poliacrilamida 6,5% para leitura de uma parcela dos genótipos de tireoglobulina, com a leitura dos genótipos na parte inferior, para o homocigoto TT, heterocigoto TC e homocigoto CC em Gir Leiteiro



Fonte: Autores (2019)

Calculou-se uma frequência alélica do alelo C de 82,74%, enquanto que o alelo T foi de 17,26%, traduzindo uma predominância na raça Gir de alelo C para este polimorfismo do gene TG. Para frequências genóticas teve-se 3,57% para o homozigoto TT, com um total de 3 animais; 27,38% para o heterozigoto TC, com um total de 23 animais e 69,05% para o homozigoto CC, com um total de 58 animais.

Nos animais portadores do genótipo TT há um acréscimo no teor de marmorização em comparação com os outros dois genótipos (BARRETO *et al.*, 2012). Na raça Holandês, igualmente, há uma frequência alélica do nucleotídeo Timina de 12% e do nucleotídeo Citosina de 78% em um total de 20 animais usadas em um estudo. (RIPOLI *et al.*, 2011). E, em concordância com Fortes (2007), que não notou o alelo T em animais da raça Nelore, observa-se uma prevalência significativa de alelo C na raça Gir Leiteiro, bem como uma predominância de genótipos homozigotos TT, o que provavelmente é um padrão das raças zebuínas.

Possivelmente essa semelhança entre os alelos se deve ao tipo de ambiente em que os animais encontram-se expostos, igualmente ainda pela seleção natural ao longo do processo evolutivo.

## CONCLUSÕES

Mediante ao exposto, a presença do alelo C, de acordo com estudos sobre a raça zebuína, se traduz em uma prevalência esperada, da mesma forma em que a seleção de animais com genótipo homozigoto TT objetiva o marmoreio, que se traduz em um possível teor inferior de marmorização cárnea e gordura no leite em indivíduos da raça Gir Leiteiro. Estudos de associação feitos na raça Gir Leiteiro são necessários para corroborar achados obtidos em outras raças por meio de estudos diretos com a porcentagem de gordura no leite de tais animais e sua correlação com o polimorfismo C/T no gene da TG, na expectativa de validá-lo como um marcador molecular a ser usado no melhoramento genético de bovinos leiteiros. A perspectiva é a genotipagem de mais 207 amostras de DNA pertencentes ao Banco de DNA de Bovinos do Laboratório de Biologia Molecular do IFMG – Campus Bambuí, seguida de estudos de associação com diferentes fenótipos avaliados nos referidos animais.

## REFERÊNCIAS

- BAAS, F.; VAN OMMEN, G.J.; BIKKER, H.; ARNBERG, A.C.; DE VIJLDER, J.J. **The human thyroglobulin gene is over 300 kb long and contains introns of up to 64 kb**. *Nucleic Acids Res.*, 14, 5171–5186. 1986.
- BARENDSE, W. J. **Assessing Lipid Metabolism**. Patent Publication wo99/23248. 1997.
- BARENDSE, W.J. **Assessing Lipid Metabolism**. Patent, International Publication number: wo99/23248. 1999.
- BARRETO, C.F.; WALKER, C.C.; JULIANO, R.S.; RAMOS, A. F; BARBOSA, E.A.; ALVES, F.V.; SANTOS S.; ALBUQUERQUE, M.S.M.; EGITO, A.A. **Polimorfismo de base única no gene da tireoglobulina relacionado ao marmoreio cárneo em bovinos da raça Pantaneira**. *AICA 2* (2012) 221 221-225.
- CAMPOS, M. A. da S. F. **Caracterização genética de vacas leiteiras por meio de marcadores moleculares e suas implicações na composição e qualidade do leite**. Dissertação de mestrado do programa de Pós-graduação em Produção Animal, UFRN - 2011. Disponível em:



<https://repositorio.ufrn.br/jspui/bitstream/123456789/17175/1/MiguelASFC DISSERT.pdf>. Acesso em: 4 de jul de 2019.

DINIZ, F. **Novas ferramentas genômicas mudam a cara do melhoramento genético. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária.** 2017. Disponível em: <https://www.embrapa.br/busca-de-noticias/-/noticia/21255873/novas-ferramentas-genomicas-mudam-a-cara-do-melhoramento-genetico>. Acesso em: 4 de jul de 2019.

FORTES, M.R.S. **Polimorfismos dos genes CAPN1, CAST, LEP, TG e DGAT1 como possíveis indicadores da qualidade da carne em bovinos zebuínos e cruzados abatidos em idade jovem.** Dissertação de Mestrado. Departamento de Reprodução Animal, USP, São Paulo, 85 p. 2007.

GOMES, S. T. **Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil.** Universidade Federal de Viçosa, 1999. Disponível em: [http://arquivo.ufv.br/der/docentes/stg/stg\\_artigos/Art\\_121%20-%20DIAGN%20C%20%93STICO%20E%20PERSPECTIVA%20DA%20PRODU%20C%20%87%20C%20%83O%20DE%20LEITE%20DO%20BRASIL%20\(11-3-99\).pdf](http://arquivo.ufv.br/der/docentes/stg/stg_artigos/Art_121%20-%20DIAGN%20C%20%93STICO%20E%20PERSPECTIVA%20DA%20PRODU%20C%20%87%20C%20%83O%20DE%20LEITE%20DO%20BRASIL%20(11-3-99).pdf). Acesso em: 4 de jul de 2019.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica.** Rio de Janeiro. Elsevier. 2006.

IBGE. **Indicadores IBGE estatísticas da produção pecuária.** Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, 2019. Disponível em: [https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp\\_2019\\_1tri.pdf](https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/2380/epp_2019_1tri.pdf). Acesso em: 4 de jul de 2019.

KHATIB, H.; ZAITOUN, I; CHANG, Y.M.; MALTECCA, C.; BOETTCHER, P. **Evaluation of association between polymorphism within the thyroglobulin gene and milk production traits in dairy cattle. J Anim Breed Genet.** (2007) J. Anim. Breed. Genet. ISSN 0931-2668.

LEDIC, I. L. **Gir: o grande trunfo da nossa pecuária leiteira.** São Paulo: Editora Fundação Peirópolis, 2000.

MILLER, S.A.; DYKES, D.D.; POLESKY, H.F. **A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. Nucleic Acids. Res.** 16(3):1215. 1988.

RIPOLI, M.V.; ROGBERG-MUÑOZ, A.; LIRÓN, J.P.; FRANCISCO, E.; VILLEGAS-CASTAGNASSO, E.E.; PERAL-GARCIA, P. & GIOVAMBATTISTA, G. **History and selection imprinting on genetic relationships among bovine breeds analyzed through five genes related with marbling.** Research in Veterinary Science 90, 245–252. 2011.

VENERONI, G. B.; **Associação da região centromérica do cromossomo 14 com espessura de gordura em bovinos da raça Canchim.** UFSCAR. SP. 2007.

VERNEQUE, R. da S.; PEIXOTO, M. G. C. D.; PEREIRA, M. C.; MACHADO, M. A.; GUIMARÃES, M. F. M.; SILVA, M. V. G. B. da. **Melhoramento Genético de Gado de Leite no Brasil.** VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2010. Disponível em: <http://sbmaonline.org.br/anais/viii/palestras/pdfs/7.pdf>. Acesso em: 4 de jul de 2019.