

POLIMORFISMO DE BASE ÚNICA NO GENE DA TIREOGLOBULINA RELACIONADO AO MARMOREIO CÁRNEO EM BOVINOS DA RAÇA PANTANEIRA

SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM IN THYROGLOBULIN GENE RELATED TO BEEF MARBLING IN PANTANEIRO BOVINE BREED

Barreto C.F.¹, Walker C.C.², Juliano R.S.³, Ramos A. F.⁴, Barbosa E.A.⁴, Alves F.V.⁵, Santos S.³, Albuquerque M.S.M.⁴, Egito A.A.^{5*}

¹Universidade Anhanguera/Uniderp, Campo Grande, MS, Brasil

²Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

³Embrapa Pantanal, Corumbá, MS, Brasil

⁴Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF, Brasil

⁵Embrapa Gado de Corte, Avenida Rádio Maia, 830 - Vila Popular, Caixa Postal 154, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brasil.

egito@cnpqc.embrapa.br

Abstract

Pantaneiro taurine cattle adapted to the Pantanal region, is resistant to ecto and endoparasites and to climatic variations and characteristics of this biome. For a long time, this population was the economic basis of the Pantanal. However over time, this local type was gradually replaced by zebu breeds, causing an intense process of genetic dilution that currently results in near extinction. Due to cultural and historical importance of the Pantaneira breed, this work aimed at genotyping animals for polymorphism in the 5' region of the candidate gene TG5, previously related to the quality of meat. Sixty nine animals from the Center for Conservation in Fazenda Embrapa Nhumirim in Corumbá-MS were genotyped by PCR-RFLP. The allele frequencies observed were 57.2% for the T allele and 42.8% for allele C. An 8.98% of animals presented the genotype considered favorable (TT). The observed heterozygosity was 0.565 and the genetic diversity for polymorphism analysis was 0.493. The frequency of the T allele greater than 57% suggests the potential that this naturalized breeds to give high quality and value added products.

Keywords:

PCR-RFLP

Allele frequencies

TG

Meat quality

Palavras-chave:

PCR-RFLP

Frequência alélica

TG

Qualidade de carne

Resumo

O gado Pantaneiro é um taurino adaptado à região do Pantanal, resistente a endo e ectoparasitas e às variações climáticas características deste bioma. Durante muito tempo, foi a base da economia pantaneira. Porém, com o tempo, esse tipo de bovino local foi substituído gradativamente por raças zebuínas, ocasionando um intenso processo de diluição genética que atualmente resulta em sua quase extinção. Devido à importância cultural e histórica da raça Pantaneira, este trabalho teve como objetivo a genotipagem de animais desta raça para o polimorfismo existente na região 5' do gene candidato TG5, previamente relacionado com a qualidade cárnea. Foram genotipados, por PCR-RFLP, 69 animais provenientes do Núcleo de Conservação da Embrapa, localizado na Fazenda Nhumirim em Corumbá-MS. As frequências alélicas observadas foram de 57,2% para o alelo T e 42,8% para o alelo C. Foram observados 28,98% de animais com o genótipo considerado favorável (TT). A heterozigidade observada foi de 0,565 e a diversidade gênica para o polimorfismo analisado foi de 0,493. A presença do alelo T em frequência superior a 57% evidencia o potencial que as raças naturalizadas quando se fala em produtos com maior qualidade e valor comercial agregado.

Introdução

O gado bovino foi trazido da Península Ibérica para o Brasil pelos portugueses e espanhóis ainda na época do descobrimento com a finalidade de fornecimento de alimento para a comunidade dos colonos. Assim, quase sem interferência humana, o gado prosperou adaptando-se aos diferentes ecossistemas deste país. A pressão da seleção natural por várias gerações ocasionou mudanças de tamanho, de biótipo e de temperamento e acabou

por estabelecer as diferentes raças naturalizadas brasileiras, incluindo o Pantaneiro, conhecido como gado cuiabano ou tucura, que são animais reconhecidamente resistentes às condições ambientais e pouco exigentes em relação ao manejo (Mazza *et al.*, 1994; Mariante & Egito, 2002). Adaptado à região pantaneira, o bovino Pantaneiro está na maior parte concentrado na região de Corumbá-MS onde a Embrapa Pantanal mantém um Núcleo de Conservação desta raça na Fazenda Nhumirim. Devido a sua quase extinção, atualmente, esta raça faz parte dos projetos de conservação de Recursos Genéticos Animais (RGA) desenvolvidos pela EMBRAPA e seus parceiros. Os estudos prospectivos da pecuária bovina de corte apontam como diretrizes a introdução de material genético que proporcione fêmeas com alta eficiência reprodutiva, com menor tamanho e resistência natural a carrapatos (Nehmi Filho, 2003). Os bovinos naturalizados além de possuírem a maioria destas características apresentam, segundo relatos, uma carne saborosa e mais macia o que pode estar relacionado ao fato destes animais terem origem taurina (Egito *et al.*, 2004). Bases científicas devem ser construídas para comprovar esta afirmativa, pois existem ainda poucos estudos realizados no Brasil relacionados à produção e qualidade de carne de bovinos naturalizados. Ainda que o Brasil tenha o primeiro rebanho comercial do mundo, e seja o segundo no ranking de produção de carne mundial, é preocupante que a base da pecuária de corte nacional seja formada pela utilização de animais de origem zebuína. Estudos realizados ao longo de 33 anos no Meat Animal Research Center (MARC-USA) verificaram que a força de cisalhamento (índice físico para medida da maciez da carne) aumentava à medida que aumentava a porcentagem de *Bos indicus* nos cruzamentos. Carnes com mais de 50% de sangue zebuino tendem a ser mais duras que aquelas provenientes de cruzamento com um grau de sangue menor (Shackelford *et al.*, 1991) sendo inclusive sugerida a utilização de animais que possuem apenas 25% de sangue zebuino em sua composição racial, e a utilização de animais 3/8 ou 5/8 zebuínos somente se estes apresentam alto potencial genético para marmoreio e maciez de carne (Dickeman, 1995). Tendo em vista a importância de características como a maciez e a marmorização da carne na determinação da qualidade do produto, diversos estudos foram conduzidos com o intuito de buscar marcadores genéticos e/ou genes candidatos que pudessem estar associados a estas características. Atualmente vários genes estão sendo estudados e vários polimorfismos estão comprovadamente associados a características de interesse comercial (Rexroad *et al.*, 2001; Harper 2004; Barendse *et al.*, 2004) e podem ser utilizados visando a seleção de reprodutores em programas de melhoramento genético (Armstrong *et al.*, 2011). Barendse (1999) identificou o gene codificador da tireoglobulina (TG) como candidato posicional baseado em sua ligação com o microssatélite CSSM66, relacionado com o marmoreio de carne. O polimorfismo detectado ocorre na sequência 5' do gene e mostra uma associação genotípica envolvendo a substituição de uma citosina por uma timina (posição 422 do acesso do GenBank X05380) com um maior marmoreio da carne em animais que possuem o alelo 3 ou T do que em animais que possuem o alelo 2 ou C. Animais portadores dos genótipos CT ou TT possuem escores mais altos de marmoreio do que aqueles com genótipo CC (Barendse *et al.*, 2004). Sabe-se que a conservação efetiva de raças naturalizadas, só será possível por meio de sua valorização e da busca de um nicho econômico favorável visando à sustentabilidade e fortalecimento da criação. A inserção de raças locais ou naturalizadas em nichos de mercado com alto valor agregado, como a produção de carne de alta qualidade, com maior palatabilidade e maciez poderá fornecer o suporte e incentivo necessários para a sua exploração de maneira comercial e maior interesse por parte dos criadores na formação de plantéis dessas raças. Assim sendo, com o propósito de analisar o potencial genético de da raça Pantaneira para a produção de carne com maior marmoreio realizou-se a genotipagem do polimorfismo de base única (SNP) no gene da tireoglobulina (TG) comprovadamente associado a esta característica.

Material e métodos

Foram analisados 69 animais da raça Pantaneira oriundos do Núcleo de Conservação de bovinos Pantaneiros da Embrapa Pantanal. O DNA genômico foi obtido a partir de amostras sanguíneas utilizando um procedimento inorgânico com altas concentrações salinas (Miller *et al.*, 1988). A genotipagem do polimorfismo do gene TG foi feita pela técnica de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism). Um fragmento de 548 pares de bases do gene TG foi amplificado com o *primer* descrito por Thaller *et al.* (2003). As reações de PCR foram feitas com um volume final de 20 μ l, utilizando-se 9 ng de DNA genômico; tampão 1x; 1,0 mM de $MgCl_2$, 200 μ M de cada dNTP, 0,25 μ M de *primer* e 1,0 UI de Taq DNA polimerase. O protocolo da PCR foi de 94°C/5', seguido por 35 ciclos de 94°C/1'; temperatura de anelamento de 69°C/1' e 72°C/1' tendo como extensão final a temperatura de 72°C/10'. O fragmento amplificado foi clivado com 1.5 UI

da enzima de restrição *PsuI*. A clivagem foi realizada seguindo os parâmetros descritos para esta enzima: 1h a 37°C, seguido de inativação a 80° C por 20 minutos. A separação dos produtos digeridos foi feita em gel de agarose 2% corado com SyberGold (1:10.000) exposto a luz ultravioleta. O tamanho dos fragmentos de restrição foi determinado pela comparação com um padrão de peso molecular de 1 kb. Os alelos foram denominados de “C”, quando a digestão dava origem a 3 fragmentos de 75, 178 e 295 pb e de alelo “T” quando apareciam apenas dois fragmentos, um de 75 bp e o outro de 473 pb. As frequências alélicas e genotípicas foram obtidas por contagem direta. Os índices de diversidade genética foram obtidos utilizando-se o programa FSTAT (Goudet, 2002).

Tabela I. Frequências alélicas do polimorfismo do gene TG em diversas raças (*Allele frequencies of the TG polymorphism in different breeds*)

Origem	Raça	N	Freq. Alélica		Autor
			T	C	
<i>Bos taurus</i>	Pantaneiro	69	57%	43%	Este trabalho
	Caracu	28	57%	43%	Egito et al. 2004
	Curraleira	24	48%	52%	Egito et al. 2004
	Pantaneira	24	44%	66%	Egito et al. 2004
	Mocho Nacional	21	43%	57%	Egito et al. 2004
	Criolo Lageano	22	43%	57%	Egito et al. 2004
	Jersey	21	52%	48%	Egito et al. 2004
	Criolo Uruguaio-Rocha	45	9%	91%	Armstrong et al. 2011
	Criolo Uruguaio-C. Lago	38	34%	76%	Armstrong et al. 2011
	Criolo Uruguaio-Rivera	36	14%	86%	Armstrong et al. 2011
	Wagyu	22	68%	32%	Ripoli et al. 2011
	Hereford	21	2%	98%	Ripoli et al. 2011
	Holandês	20	12%	78%	Ripoli et al. 2011
	Jersey	10	50%	50%	Ripoli et al. 2011
	Charoles	14	8%	92%	Ripoli et al. 2011
	Aberdeen Angus	59	14%	74%	Ripoli et al. 2011
	Retinta	26	29%	71%	Ripoli et al. 2011
	Galowaii	10	60%	40%	Ripoli et al. 2011
	Criolo da Patagonia	20	50%	50%	Ripoli et al. 2011
	Criolo Savedenho	20	16%	72%	Ripoli et al. 2011
	Chaquenho Boliviano	20	13%	77%	Ripoli et al. 2011
	Criolo Valle Grande	20	21%	79%	Ripoli et al. 2011
	Criolo Argentino	20	15%	75%	Ripoli et al. 2011
Chusco	7	50%	50%	Ripoli et al. 2011	
Criolo Yacomenho	35	9%	91%	Ripoli et al. 2011	
<i>Bos indicus</i>	Nelore	46	0%	100%	Fortes et al. 2007
	Nelore	33	10%	90%	Ripoli et al. 2011
	Guzerá	21	24%	76%	Egito et al. 2004
	Gir	23	35%	65%	Egito et al. 2004
Cruzados	Canchim	572	16%	84%	Veneroni et al.2007
	Brahman	467	40%	60%	Smith et al.2009
	Brahman	20	11%	89%	Ripoli et al. 2011
	Brangus	12	30%	70%	Ripoli et al. 2011

Resultados e discussões

Pela digestão enzimática do fragmento de 548 pb clivado com a enzima *PsuI* que caracteriza o polimorfismo TG5, foi possível verificar a presença dos dois alelos, C e T sendo o segundo o alelo favorável, responsável por um maior aumento no teor de marmoreio da carne. O alelo C apresentou uma frequência alélica de 42,8% e o alelo T de 57,2%. As frequências genotípicas observadas foram de: 14,49% para o homocigoto CC (10

indivíduos), 56,53% para o heterozigoto CT (39 indivíduos) e 28,98% para o homozigoto TT (20 indivíduos). A diversidade gênica observada para o polimorfismo estudado foi de 0,493. A heterozigosidade observada (H_o) foi de $0,565 \pm 0,059$, superior a heterozigosidade esperada ($H_e = 0,493$) indicando não haver endogamia na população para o polimorfismo estudado. O índice de endogamia (F_{IS}) obtido de -0,148 corrobora esta observação. Segundo Barendse et al. (2004) existe um aumento significativo no teor de marmorização de animais portadores do genótipo TT em relação aos de genótipo CT e CC. Fortes (2007) não observou o alelo T em animais da raça Nelore, porém há presença deste alelo em outras raças como o Curraleiro e o Mocho Nacional (raças naturalizadas de origem taurina; Egito et al., 2004). Na raça japonesa de origem taurina Wagyu, conhecida por seu alto teor de marmoreio e alto valor agregado a carne, o alelo favorável T foi observado em uma frequência de 68% (Ripoli et al., 2011; Tabela I). Raças de origem zebuína, que apresentam menor teor de marmoreio quando comparada com as raças taurinas (Marshall, 1999), possuem uma maior frequência do alelo C (Tabela I). Embora os indivíduos homozigotos TT sejam classificados como reprodutores ótimos em testes comerciais, touros e matrizes com os genótipos CT também são classificados de modo diferenciado daqueles que apresentam o genótipo CC (Barendse *et al.*, 2004). Na tabela II pode-se observar a frequência genotípica em diferentes raças bovinas. A presença do alelo T na raça Pantaneira poderá contribuir positivamente para sua conservação e utilização, pois o uso de reprodutores que possuem alelos favoráveis, relacionados a características de interesse econômico, em sistemas de melhoramento animal e cruzamentos industriais poderá contribuir para melhorar a qualidade da carne do mercado nacional.

Tabela II. Frequencia genotípica observada em diversas raças (*Genotypic frequency observed in several breeds*)

Origem	Raça	Freq. Genotípica			Autor
		CC	CT	TT	
<i>Bos taurus</i>	Pantaneiro	15%	57%	29%	Este trabalho
	Caracu	36%	79%	18%	Egito et al. 2004
	Curraleira	13%	79%	83%	Egito et al. 2004
	Pantaneira	17%	79%	42%	Egito et al. 2004
	Mocho Nacional	19%	76%	42%	Egito et al. 2004
	Criolo Lageano	23%	68%	9%	Egito et al. 2004
	Criolo Uruguaio-Rocha	82%	18%	0%	Armstrong et al. 2011
	Criolo Uruguaio-C. Lago	34%	63%	3%	Armstrong et al. 2011
	Criolo Uruguaio-Rivera	72%	28%	0%	Armstrong et al. 2011
<i>Bos indicus</i>	Nelore	100%	0%	0%	Fortes et al. 2007
	Guzerá	57%	38%	48%	Egito et al. 2004
	Gir	30%	70%	0%	Egito et al. 2004
Cruzados	Brahman	99%	1%	0%	Smith et al.2009

Conclusão

A presença do alelo T, relacionado ao maior teor de marmoreio, em frequência superior a 57% na raça Pantaneira condiz com o observado para raças taurinas e evidencia o potencial que esta raça possui em relação à indústria de carne quando se fala em produtos com maior qualidade e valor comercial agregado.

Agradecimentos

Às instituições Embrapa Gado de Corte, Embrapa Cenargen, Embrapa Pantanal, CNPq e Universidade Anhanguera Uniderp.

Bibliografia

Armstrong E., Peñagaricano F., Artigas R., Soto L., Corbi C., Llambí S., Rincón G. & Postiglioni A. 2011. A molecular marker related to marbling in uruguayan creole cattle. *Archivos Zootecnia* 60, 707-716.

- Barendse W., Bunch J. R., Thomas M., Armitage S., Baud S. & Donaldson N. 2004. The TG5 Thyroglobulin gene teste for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 44, 669-674.
- Barendse W.J. 1999. Assessing lipid metabolism. Patent, International Publication number: wo99/23248. World International Property Organization.
- Dickeman M.E. 1995. Carcass composition and quality of finished crossbred Brahman cattle. *Arkansas Agricultural Experimental Station*, 77-88.
- Egito, A. A., Almeida L.D., Paiva S.R., Albuquerque, M.S.M., McManus C., Mariante A.S., Serrano G.M.S. & Castro, S.R. 2004. Polimorfismos do gene TG (tireoglobulina) em diferentes raças bovinas criadas no Brasil. V Simpósio Iberoamericano de Conservación y Utilización de Recursos Genéticos, 2004, Puno. Memorias ... 1, 95 – 97.
- Fortes M.R.S. 2007. *Polimorfismos dos genes CAPNI, 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.
- Goudet J. 2002. *FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices* (Version 2.9.3.2).
- Harper G.S., Pethick D.W. 2004. Fatness in production animals: using genetic and environmental levers to meet consumer demand. *Asian Pacific Journal on Clinical Nutrition* 3 (Suppl), S37.
- Mariante A. S., Egito A. A. 2002. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. *Theriogenology* 57, 223-235.
- Marshall D. M. 1999. Genetics of meat quality. In: Fries R., Ruvinsky A. *The genetics of cattle*. 605-636.
- Mazza M.C.M., Mazza C.A.S., Sereno, J.R.B., Santos, S.A. & Pellegrin A.O. 1994. *Etnobiologia e conservação do Bovino Pantaneiro*. Embrapa Pantanal- Corumbá, 61p.
- Miller S. A., Dykes D.D. & Polesky H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research* 16, 1215.
- Nehmi Filho V.A. 2003. Uma visão do futuro: a pecuária brasileira daqui a dez anos. *Anuário da Pecuária Brasileira*. FNP Consultoria & Comércio 9, 14-30.
- Rexroad III C.E., Bennett G.L., Stone R.T., Keele J.W., Fahrenkrug S.C., Freking B.A., Kappes S.M. & Smith T.P.L. 2001. Comparative mapping of BTA15 and HSA11 including a region containing a QTL for meat tenderness. *Mammalian Genome*, v.12, p. 561-565, 2001.
- Ripoli M.V., Rogberg-Muñoz A., Lirón J.P., Francisco E., Villegas-Castagnasso E.E., Peral-Garcia P. & Giovambattista G. 2011. History and selection imprinting on genetic relationships among bovine breeds analyzed through five genes related with marbling. *Research in Veterinary Science* 90, 245–252.
- Shackelford S.D., Koohmaraie M., Miller M.F., Crouse J.D. & Reagan J.O. 1991. An Evaluation of tenderness of the longissimus muscle of Angus by Hereford versus Brahman crossbred heifers. *Journal Animal Science* 69, 171-7.
- Thaller G., Kühn C., Winter A., Ewald G., Bellmann O., Wegner J., Zühlke H. & Fries R. 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* 34, 354-357.