

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**GUILHERME HENRIQUE SANDER LUIZ**

**USO DE PCR – RFLP NO GENE TIREOGLOBULINA EM  
BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

**FLORIANÓPOLIS - SC**

**2024**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**GUILHERME HENRIQUE SANDER LUIZ**

**USO DE PCR – RFLP NO GENE TIREOGLOBULINA EM  
BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado  
como exigência para obtenção do Diploma de  
Graduação em Zootecnia da Universidade  
Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima

**FLORIANÓPOLIS - SC**

**2024**

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.  
Dados inseridos pelo próprio autor.

Luiz, Guilherme Henrique Sander  
Uso de PCR-RFLP no gene Tireoglobulina em bovinos da  
raça Braford / Guilherme Henrique Sander Luiz ; orientador,  
André Luís Ferreira Lima, 2024.  
33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. Marmoreio. 3. Melhoramento genético  
animal. 4. Seleção. 5. Genotipagem. I. Lima, André Luís  
Ferreira. II. Universidade Federal de Santa Catarina.  
Graduação em Zootecnia. III. Título.

GUILHERME HENRIQUE SANDER LUIZ

## **USO DE PCR – RFLP NO GENE TIREOGLOBULINA EM BOVINOS DA RAÇA BRAFORD**

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 10 de junho de 2024.

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima  
Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Márcio Cinachi Pereira  
Membro da Banca  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Dr. Sérgio Augusto Ferreira de Quadros  
Membro da Banca  
Universidade Federal de Santa Catarina

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu forças e saúde para concluir mais esta etapa da minha vida.

Agradeço a minha família, minha mãe Silvana Sander, minha irmã Verônica Sander e meu padrasto Wederson Marques, por serem a minha base em vários momentos da minha vida, proporcionando-me forças, auxílio e motivação tanto psicológica quanto financeira.

Ao meu avô Juarez Sander (*in memoriam*), que me ensinou sobre a vida e que mostrou como churrasco é bom demais.

À minha namorada Ingrid da Costa Gomes, que me ajudou imensamente, sendo minha parceira, me apoiando e estando ao meu lado nos momentos difíceis me fazendo ter a certeza de que tudo daria certo.

Ao meu orientador Prof. Dr. André Luís Ferreira Lima, onde agradeço por todos os ensinamentos, suporte, paciência e vontade de ensinar. Agradeço também por me auxiliar em um tema no qual eu tenho um grande carinho.

Aos Professores(as) Doutores(as) do Centro de Ciências Agrárias, que estudaram muito para se tornarem mestres, passando assim, conhecimento para formarem profissionais. Em especial, ao Prof. Dr. Fabiano Dahlke, Milene Puntel Osmari, Lucélia Hauptli, Sandra Regina Souza Teixeira de Carvalho, Márcio Cinachi Pereira e Sérgio Augusto Ferreira de Quadros.

À técnica do Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal – LEPGA, Aline Chiarelli Cristofolini que me instruiu em momentos de pesquisas e práticas, sempre com dedicação, paciência e atenção.

Agradeço aos meus amigos de longa data, Higor Theisges, Alexandre Proença, Victor Hillmann e Matheus Alves, pela amizade que só se fortaleceu com o passar dos anos.

Agradeço aos amigos que construí durante essa jornada, onde nem mesmo o trabalho em grupo desfez essas amizades. Em especial, deixo meus mais sinceros agradecimentos ao Felipe, Maurício, Raphael, Matheus e outros, por todos os momentos de conversas, risadas e divertimentos que dividimos durante esta jornada.

Desta maneira, agradeço também a mim, não como um ato narcisista, mas sim como um ato de reconhecer meu próprio esforço durante a graduação.

## RESUMO

Este trabalho foi conduzido com o intuito de identificar polimorfismos no gene da Tireoglobulina (TG), relacionada diretamente com a deposição de gordura na carcaça de bovinos. Para tanto, foram coletadas amostras de sangue de 29 animais da raça Braford. Para isolar e amplificar a região correspondente ao éxon V do gene TG foram utilizados os iniciadores TGFWD 5' TCCCAGAGTTAGCCTCCAAG 3' e TGREV 5' TGAATGAGAGGTGGTGAGGTC 3'. Os amplicons obtidos de aproximadamente 700pb foram submetidos à digestão utilizando-se a endonuclease *Hinf-I*. Os resultados obtidos após a RFLP mostraram a existência de polimorfismo na região estudada, caracterizado por três padrões diferentes de migração de bandas observáveis em 29 amostras e correspondentes aos genótipos MM, Mm e mm. Pela contagem direta destes padrões polimórficos, as frequências genotípicas foram iguais a 0.275, 0.586 e 0.139 para MM, Mm e mm, respectivamente e as frequências alélicas foram iguais a 0.568 (M) e 0.432 (m). A aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi avaliada com teste de  $\chi^2$  a 5% de significância, indicando que as frequências obtidas não estão em equilíbrio. Isto pode ser atribuído à existência de seleção natural / artificial nos animais avaliados. Os resultados obtidos neste estudo permitem inferir que foi possível identificar a existência de polimorfismos genéticos para o éxon V do gene TG em animais da raça Braford utilizando-se a técnica de PCR-RFLP com a enzima *Hinf-I* para realização das genotipagens.

**Palavras-chave:** Carne, melhoramento genético animal, marmoreio, seleção, genotipagem.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Escala de marmorização .....	15
<b>Figura 2</b> – Imagem representativa dos resultados obtidos da extração de DNA das amostras através do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Eletroforese em gel de agarose 0,5% .....	24
<b>Figura 3</b> – Imagem representativa dos resultados da aplicação das análises de PCR mostrando a amplificação do gene da Tireoglobulina. Gel de agarose 1,5%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder .....	25
<b>Figura 4</b> – Imagem representativa dos resultados das análises de RFLP. Gel de Agarose 2,5%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder. Eletroforograma representativo dos padrões de migração caracterizados dos genótipos MM, Mm e mm .....	25

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>14</b>
3.1 RAÇA BRAFORD E SEU DESENVOLVIMENTO NO BRASIL .....	14
3.2 MARMOREIO E A RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA CARNE.....	14
3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO E SUAS TECNOLOGIAS .....	16
3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR.....	16
3.5 TIREOGLOBULINA.....	17
<b>4. METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>6. CONCLUSÕES .....</b>	<b>28</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A bovinocultura de corte assume grande importância para o cenário econômico do país. Em 2022, o plantel nacional alcançou em torno de 234 milhões de cabeças de bovinos, onde, o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2022) mostra que houve um aumento de 3,1%, quando comparado ao ano de 2020. O aumento no rebanho nacional pode ser atribuído à necessidade de suprir a alta demanda populacional por proteína animal.

A raça bovina Braford (*Bos taurus*) obteve, segundo a Associação Brasileira de Hereford e Braford (ABHB), seu registro oficial em 2003, entretanto, animais desta raça vinham sendo selecionados no país há aproximadamente meio século, por criadores e pesquisadores. Esta raça se encontra com mais animais na região Sul do país, onde, segundo Silveira (2024), as características edafoclimáticas são diferentes quando comparadas com outras regiões brasileiras, encontrando – se temperaturas mais baixas e melhor qualidade das pastagens, permitindo assim, maior adaptação do gado taurino. Entretanto, o Braford está ganhando espaço em grande parte do Brasil, sendo muito utilizado em cruzamentos industriais, pois consegue reunir as qualidades dos bovinos taurinos e dos zebuínos, passando assim, de geração em geração, suas qualidades genéticas.

Além do potencial produtivo, os mercados consumidores interno e externo têm apresentado várias mudanças recentemente, onde o perfil dos consumidores de carnes com alto padrão de qualidade vem crescendo, possibilitando a diversificação de produtos e a consolidação de novos segmentos na cadeia produtiva.

Dentre as várias características que influenciam as propriedades organolépticas atribuídas à qualidade da carne (maciez/cor/sabor), a gordura intramuscular que é popularmente conhecida como Marmoreio (MAR) assume grande relevância. Sob este escopo, a carne de animais da raça Braford, apresenta bons índices de cobertura de gordura e marmoreio (ABHB, 2024), caracterizando assim, seu potencial de atratividade para o mercado consumidor. Um fator de extrema importância na deposição de gordura da carcaça é a ação de genes responsáveis por hormônios diretamente relacionados ao metabolismo lipídico, dentre eles, o da Tireoglobulina (TG). Uma ferramenta auxiliar na identificação de indivíduos portadores de alelos favoráveis é a genotipagem dos animais com uso de marcadores moleculares. Quando os genótipos marcados são associados às características de

interesse, o ganho genético mediante seleção é potencializado, seja pelo aumento da acurácia, da intensidade de seleção ou pela diminuição do intervalo de gerações.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

- Verificar e identificar possíveis polimorfismos em uma região do gene Tireoglobulina em bovinos da raça Braford localizados na Fazenda Experimental da Ressacada - Universidade Federal de Santa Catarina.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Extrair o DNA de amostras de sangue coletadas dos animais;
- Isolar e amplificar o fragmento que corresponda ao gene da TG, utilizando a técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR);
- Verificar a existência de polimorfismos nos produtos obtidos da PCR, utilizando a técnica de Polimorfismos de Tamanho de Fragmentos de Restrição (RFLP);
- Verificar as frequências do gene.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

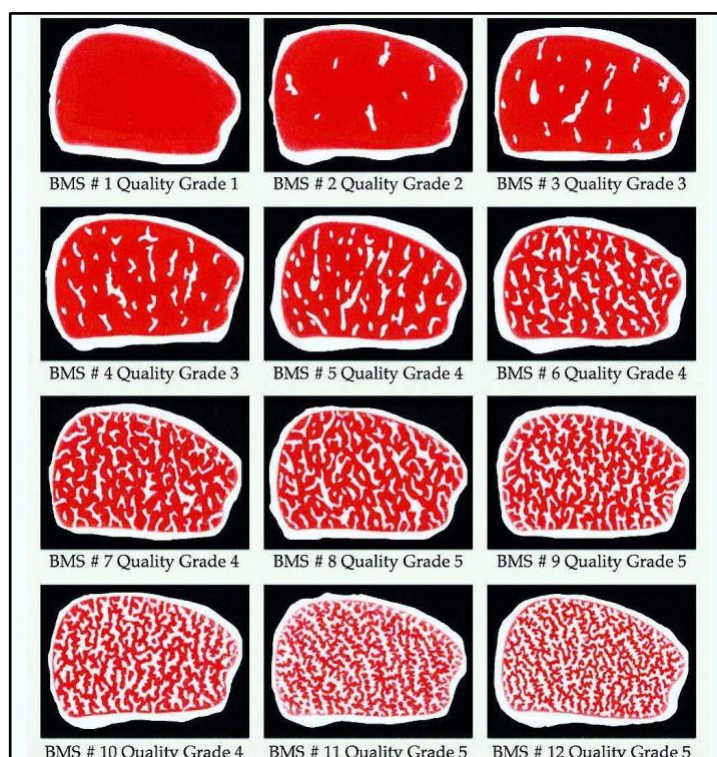
#### **3.1 RAÇA BRAFORD E SEU DESENVOLVIMENTO NO BRASIL**

A raça Braford surgiu oficialmente na Flórida (EUA) na década de 60, chegando ao Brasil em 1967, sendo Rubem Silveira Vasconcelos o criador pioneiro da cidade de Rosário do Sul (RS), fruto do cruzamento das raças Tabapuã (zebuíno) x Hereford (taurino), surgiu a raça sintética Braford. Em Uruguaiana (RS), outros criadores inseminaram vacas Hereford com Nelore, expandindo essa raça pelo estado (ABHB). Possuindo o propósito de ter a oportunidade em formar uma nova raça sintética, criadores e técnicos trabalharam nesses cruzamentos industriais para a formação de uma raça sintética com predominância taurina, porém com genótipo zebuíno, procurando assim, a rusticidade contra ectoparasitas e a capacidade de se adaptar em ambientes extremos. Com a ajuda da atual ABHB e da Embrapa Pecuária Sul, os técnicos visitaram e auxiliaram através de suporte técnico os criadores que estavam mais avançados na seleção destes animais para assim, surgir a formação da raça Braford (Embrapa Pecuária Sul, 2014). A raça se expandiu pelo país a partir de suas qualidades genéticas, principalmente a heterose de características a partir da combinação de taurinos e zebuínos, onde suas progênes tendem a ser superiores em valores zootécnicos, demonstrando características positivas para que ganhasse seu espaço dentro do rebanho nacional (Yokoo, 2014).

#### **3.2 MARMOREIO E A RELAÇÃO COM A QUALIDADE DA CARNE**

A gordura na carcaça dos animais pode ser classificada em função de seu local de deposição: a gordura subcutânea (externa), a gordura interna (envolve vísceras e órgãos), gordura intermuscular (entorno dos músculos) e gordura intramuscular ou marmoreio (entremeada às fibras musculares), sendo essa a única que não pode ser separada da carne (Silveira, 2024). O marmoreio torna-se cada vez mais importante dentro do comércio de carnes, estando intimamente associado ao sabor, suculência e maciez (Surita *et al.*, 2018), onde maiores níveis desta gordura entremeada ajudam a agregar valor em cortes comercializados ou em bovinos que possuam maiores níveis de marmorização em sua carcaça.

O marmoreio pode ser mensurado no músculo *Longissimus dorsi* da carcaça dos animais, em uma escala de pontuação que vai do escore 1 até o 12 (Figura 1), sendo o escore 1 o pior e aumentando progressivamente.



**Figura 1** – Escala de marmorização

Fonte: The Steak Guide

A característica de marmoreio, mostra-se de herdabilidade moderada a alta, tornando adequado para programas de seleção (Marques, 2011). Considerando-se métodos clássicos de melhoramento genético, a fenotipagem de características de carcaça era realizada *post mortem*, e a identificação de indivíduos geneticamente superiores era realizada por meio de testes de progênie, fato que tornava o processo mais demorado e influenciava de maneira negativa o progresso genético ao longo de gerações, principalmente em função do tempo. Tal problema foi diminuído nas últimas décadas com o aperfeiçoamento das tecnologias de captação de imagens por ultrassonografia, otimizando a obtenção das informações fenotípicas de carcaça de animais *in vivo* e possibilitando assim, o conhecimento do potencial genético dos indivíduos examinados (Sugisawa *et al.*, 2013).

### 3.3 MELHORAMENTO GENÉTICO E SUAS TECNOLOGIAS

Em 1953, James Watson e Francis Crick, fizeram a descoberta mais importante do século XX, no campo da genética molecular, a estrutura da molécula de DNA, possibilitando desenvolvimento de métodos e análises de estruturas e funções do material genético. Destacando assim, o surgimento de estudos aplicados ao melhoramento animal junto a inserções de características de interesse econômico em programas de avaliação genética animal (EMBRAPA, 2016).

Portanto, ainda no século XX, a produção animal deixou de ser uma atividade apenas de subsistência e começou a ser conduzida como uma atividade comercial, onde ocorreu uma demanda crescente por animais melhoradores e bem adaptados aos ambientes em que eram criados. Sendo assim, deu – se início aos programas de melhoramento animal, sendo empregados com base genética, alelos das raças já domesticadas, desta forma, esses programas foram projetados, mesmo que intuitivamente, com base em estéticas e características de animais que apresentavam fenótipos superiores (Coutinho *et al.*, 2010).

No que diz respeito ao melhoramento genético, Peripolli (2014) cita que pode ser descrito como o resultado de um processo de direção dos acasalamentos efetuados em raças ou linhas puras para a obtenção de ganho genético e fenotípico, em características de interesse econômico da produção animal. Portanto, há necessidade de identificar os melhores reprodutores, sejam eles machos ou fêmeas, para assim, se obter acasalamentos desejáveis através do valor genético da característica de interesse de seleção (Amorim, 2017).

Entretanto, a essência dos programas de melhoramento animal se dá pelas observações de populações, a correta identificação dos indivíduos avaliados para características de interesse, acasalamentos dos indivíduos melhoradores e, desta forma, ter a disseminação dos genótipos nos rebanhos (Oliveira, 2017).

### 3.4 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

Nas últimas décadas, diferentes técnicas foram criadas, permitindo que análises moleculares da variabilidade do DNA possam determinar pontos de referências nos cromossomos, tecnicamente chamados de marcadores moleculares. Desta maneira, é possível que a identificação dos animais, como também suas raças,

podem ser realizadas via avaliações moleculares, onde os marcadores genéticos identificam os genes que estão relacionados a características quantitativas de interesse, como por exemplo, o marmoreio (Silveira, 2019).

As técnicas de biologia molecular como a técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase), consiste em amplificar regiões de interesse nos genes a partir de iniciadores específicos (primers). Dentre as várias possibilidades de utilização dos produtos de regiões conhecidas a partir da PCR, destaca-se a marcação molecular do tipo RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism - Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição). Este é um dos marcadores moleculares de grande utilização, baseada em digerir todo o DNA das amostras com uma ou mais enzimas de restrição (Oliveira, 2021). Citado por Bento (2015), mostra - se que a técnica RFLP é muito utilizada, apresentando baixo custo e rapidez de execução quando aplicada em estudos populacionais, além de possuir alta reprodutibilidade e seu alcance de ampla cobertura do genoma.

Para os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism - Polimorfismo de Nucleotídeo Único), são utilizados para identificar mutações e polimorfismos baseados na variação da posição de um único nucleotídeo (Peripolli, 2014). Para Bento (2015), a principal vantagem dos SNPs é a possibilidade de detecção de grande quantidade de polimorfismos entre alelos de determinado gene, entretanto, as principais desvantagens aparentam estar na necessidade de conhecimento prévio de sequência do gene de interesse.

Atualmente, existem diversas tecnologias em sincronia com a genética molecular, onde podem ser utilizadas para estudos de marcadores moleculares, contudo, a escolha dependerá de alguns fatores de objetivo do estudo, recursos financeiros disponíveis, recursos humanos, infraestrutura disponível e nível de conhecimento da genética molecular da espécie a ser estudada (Faleiro, 2007).

### **3.5 TIREOGLOBULINA**

A tireoglobulina é uma glicoproteína que é codificada pelo gene TG, onde é sintetizada em células foliculares da tireoide, atuando como transportadora de dois hormônios, sendo eles, triiodotironina (T3) e tiroxina (T4), e é armazenada na glândula tireoide (Giusti, 2011). Estes hormônios tireoidianos executam papel de grande importância, no que se refere a regulação do metabolismo, podendo afetar a

diferenciação, crescimento e a de empenhar a homeostase nos depósitos de gordura (Giusti, 2011).

Este gene encontra – se localizado no cromossomo 14 em bovinos (BTA14), onde junto com os hormônios que é precursor, influenciam no metabolismo de lipídios, interferindo na diferenciação de adipócitos e na deposição de células de gordura dos músculos.

Para os programas de melhoramento genético, faz – se a necessidade de incorporar a seleção assistida por marcadores, deste modo, a associação entre marcadores moleculares e a característica de produção precisa ser avaliada na população sob seleção. Em várias populações de bovinos a região centromérica do cromossomo 14 (BTA14) foi associada com deposição de gordura. O gene da tireoglobulina está localizado à 4,46 Mb no BTA14 e relatos contraditórios descrevem a influência de um polimorfismo na sequência 5' líder desse gene sobre marmoreio (EMBRAPA, 2006).

Barreto *et al.* (2012), analisaram bovinos da raça Pantaneira, tendo o intuito de preservação da raça e mostrar aos produtores e técnicos as qualidades destes animais, que foram perdendo espaço para as raças zebuínas. Assim, os animais foram genotipados, tendo em vista o polimorfismo existente na região 5' do gene candidato TG, previamente relacionado com a qualidade cárnea. Após o resultado das análises, observaram na população avaliada, que o alelo favorável para a característica de marmoreio foi superior a 57%. Desta forma, acreditam que este processo poderá contribuir positivamente para a conservação e utilização da raça para carne, 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.

Fadel *et al.* (2024), encontraram valores superiores para a raça bovina Senepol, utilizaram 62 novilhos, Puros por Origem (PO). Por meio da técnica de PCR – RFLP, utilizaram a enzima de restrição *XmnI*, onde observaram que das 62 amostras analisadas, 49 (0,790) foram positivas para a expressão do gene da Tireoglobulina. Estudando a raça sintética Brangus, Ripoli *et al.* (2011) avaliaram polimorfismos de cinco SNPs de genes candidatos relacionados ao marmoreio, entre eles a Tireoglobulina, onde identificaram 12 animais que possuíam o alelo favorável para o gene em questão, sendo 30% (M) e 70% (m).

A utilização de marcadores moleculares para genes relacionados a qualidade da carne bovina viabiliza a promoção do melhoramento mediante a utilização de seleção assistida, ferramenta que provê melhorias no ganho genético pelo aumento da acurácia, da intensidade de seleção e redução do intervalo de gerações. Em virtude desses fatos, este trabalho será conduzido com o objetivo de utilizar marcadores moleculares para o gene da tireoglobulina e animais da raça Braford.

#### 4. METODOLOGIA

Foram utilizados 29 bovinos da raça Braford, mantidos pelo Laboratório de Bovino de Corte pertencentes a Fazenda Experimental da Ressacada, no bairro Tapera, localizado na cidade de Florianópolis – Santa Catarina. O protocolo de uso de animais para a realização desta pesquisa foi autorizado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFSC). As amostras de sangue foram coletadas por venopunção coccígea utilizando-se agulhas descartáveis e tubos do tipo *vacutainer* com EDTA potássico, em um volume de 4 mL/tubo/animal. Para o procedimento, os animais foram contidos em tronco de manejo, com a cauda erguida para melhor localização da veia e de maneira minimamente invasiva, buscando-se evitar qualquer tipo de estresse. Após a coleta, os tubos devidamente identificados foram acondicionados em freezer a - 20°C até o momento da extração do DNA genômico. As etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis/SC. Para o procedimento de extração do DNA da fase leucocitária, 1,5 mL de sangue/amostra foram transferidos para tubos de 2 mL e centrifugados por 15 minutos, logo em seguida, descartou-se o sobrenadante com cuidado para que as células brancas não fossem removidas da interface. Posteriormente, o volume dos tubos foi ajustado para 5 mL com uma solução A (250 µL Tris HCl pH 7.6 1 M; 250 µL MgCl<sub>2</sub> 0.5M; 50 µL NaCl 5 M). Em seguida foram adicionados 1 mL da solução tampão A e homogeneizado no agitador automático tipo vórtex até a obtenção de uma coloração escura e homogênea. Após esta etapa foi novamente centrifugado por 10 minutos e dispensou-se o sobrenadante por inversão e foi deixado o líquido escorrer lentamente. O sedimento foi ressuscitado em 2 mL do tampão de hemólise e misturado por inversão e em seguida foi centrifugado por mais 10 minutos e descartou-se novamente o sobrenadante. Essa lavagem foi realizada quatro vezes, e em seguida, as células brancas foram ressuscitadas em 500 µL do tampão de hemólise e colocadas em microtubos de 1,5 mL.

Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução de Proteinase K (5 µL de Tris HCl pH 8.0 1 M; 10 µL de NaCl 5 M; 10 µL de EDTA pH 8.0 0.5 M; 12.5 µL de SDS a 20% e completar o volume com 460,5 µL de água ultrapura e adicionar 2 µL de solução de proteinase K na concentração 20 mg/mL no momento do uso) ao sedimento de leucócitos armazenados na etapa anterior e misturados no vórtex até

que se desprenda do fundo do tubo. Em seguida foi incubado a 55°C em banho-maria até que se dissolva o precipitado (4 a 6 horas). Após a incubação adicionou-se 210 µL de TE pH 7.6 e 240 µL de NaCl 5 M e agitou-se por inversão e incubou no gelo por 15 minutos. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 25 minutos e 10.000 rpm, o sobrenadante foi transferido para dois tubos de 1,5 mL. Foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e os tubos foram agitados por inversão. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 15 minutos e o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, foi realizada a lavagem com 500 µL de etanol a 70% gelado e centrifugado por 5 minutos e realizou-se a secagem em temperatura ambiente. O pellet foi ressuspendido em 100 µL de solução TE e 0,25 mL de solução de RNase (10 mg/µL) e incubado por 12 horas a 4°C.

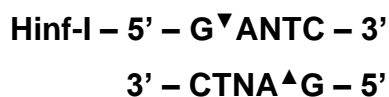
Para verificar a eficácia da metodologia da extração, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05%) de azul de bromofenol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização do DNA genômico foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (Loccus Biotecnologia), as imagens dos géis foram capturadas com software L-Pix Imagem Ex®.

O par de primers utilizado nas PCR's foi desenhado de acordo com as informações do gene da Tireoglobulina bovina disponíveis no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), possuindo as seguintes sequências de nucleotídeos, respectivamente:

<p><b>TG – Forward 5' – TCCCAGAGTTAGCCTCCAAG – 3'</b></p> <p><b>TG – Reverse 5' – TGAATGAGAGGTGGTGAGGTC – 3'</b></p>
--

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL por amostra, 100ng de DNA, 0.5mM de cada primer, 1 X PCR “buffer” [(10mM Tris-HCl) (pH 9.0)], 1.5mM MgCl<sub>2</sub> e 50mM KCl], 100mM de dNTPS, 0,5 U da enzima EasyTaq® DNA Polymerase (Trans Gen Biotech®). Os 35 ciclos de amplificação foram realizados em termociclador Biometra®, com as temperaturas de 95°C por 1' (desnaturação), 56,1°C por 1' (anelamento) e 72°C por 1' (extensão).

Para verificar o resultado da amplificação, uma alíquota de 5µL de cada amostra foi misturada a 4µL de tampão de corrida (azul de bromofenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 1,0% com corante Sybr, utilizando tampão TBE 1X a 65V por aproximadamente 50 minutos. O gel foi visualizado sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix Ex® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram capturadas por meio do software L-Pix Imagem Ex®. Após o isolamento e amplificação da região de interesse do gene da Tireoglobulina pela PCR, as amostras foram submetidas à técnica de marcação molecular (genotipagem) com PCR-RFLP. Desta forma, a enzima de restrição escolhida foi a *Hinf-I*, possuindo os seguintes sítios de corte:



A digestão foi realizada em um volume final de 20µL por amostra, contendo 10µL do produto da PCR, 5µL de tampão para a enzima de restrição, 0,5µL da enzima *Hinf-I* e 4,5µL de H<sub>2</sub>O para completar o volume final de cada amostra. O procedimento foi realizado em termociclador Bimetra®. A digestão da enzima *Hinf-I* foi feita a 37°C por 60 minutos, posteriormente a 80°C por 20 minutos para inativação da enzima e, por último a 4°C para conservação das amostras até a próxima etapa (Tabela 2).

Para confirmação dos resultados e visualização dos padrões de migração obtidos, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose (2,5%), em tampão TBE 1X (TrisHCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com corante Sybr a 80V, por aproximadamente 1 hora. A visualização do padrão eletroforético de migração das bandas ocorreu sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix Ex® (Loccus Biotecnologia) e as imagens foram registradas novamente com o auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

Após a detecção de polimorfismos nas amostras analisadas, foram realizados os cálculos das frequências genotípicas e alélicas e, posteriormente, realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg. As frequências genotípicas ( $X_{ij}$ ,  $X_{ij}$  e  $X_{jj}$ ) e alélicas ( $X_i$  e  $X_j$ ) foram determinadas a partir da contagem direta dos genótipos observados e estabelecidas com as seguintes equações:

$$x_{ii} = \frac{n_{ii}}{n} \quad x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n} \quad x_{jj} = \frac{n_{jj}}{n}$$

$$x_j = \frac{n_{jj} + (0,5n_{ij})}{n} \quad x_i = \frac{n_{ii} + (0,5n_{ij})}{n}$$

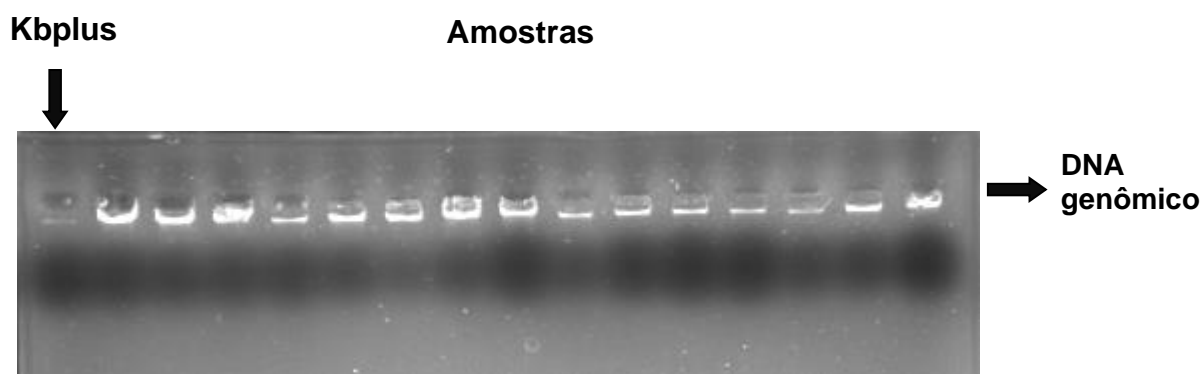
Onde:  $n_{ii}$ ,  $n_{ij}$  e  $n_{jj}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados nos alelos  $i$  e  $j$ , respectivamente;  $n$  corresponde ao número de indivíduos analisados. A aderência das frequências observadas ao equilíbrio de Hardy-Weinberg foi testada pelo  $\chi^2$ , ao nível de 5% de significância a partir da expansão do binômio descrito por Falconer e Mckay (1996):

$$(x_i + x_j)^2 = x_i^2 + 2x_i x_j + x_j^2$$

Em que:  $x_i^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $i$ ;  $2x_i x_j$  = frequência esperada para heterozigotos  $ij$ ;  $x_j^2$  = frequência esperada dos homozigotos para o alelo  $j$ .

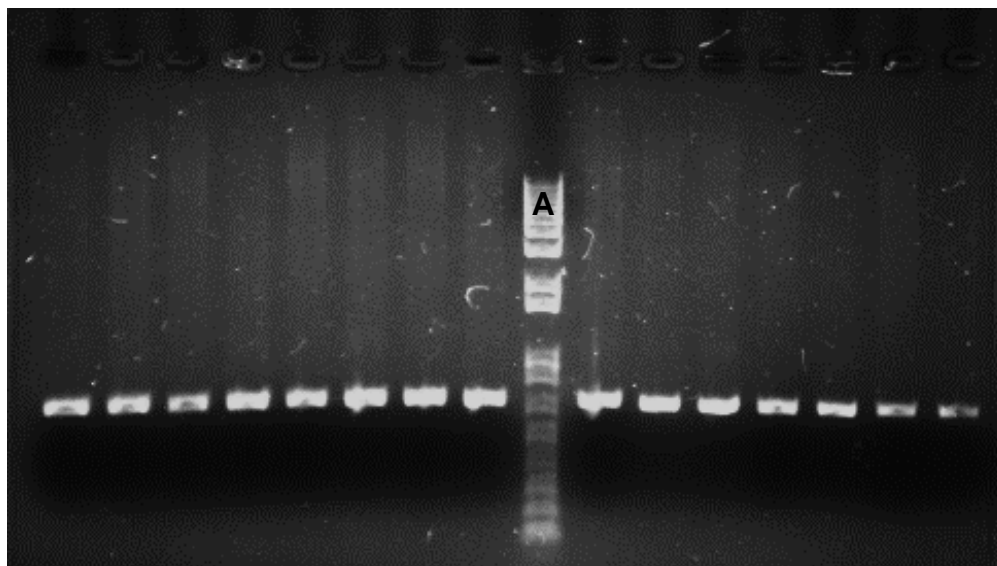
## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O protocolo de extração do DNA genômico referente ao sangue coletado dos bovinos demonstrou-se eficiente, como mostra a Figura 2. As amostras foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 0,5%, corados com tampão de corrida azul e expostos à luz UV. A partir da exposição foi possível visualizar a migração de DNA.



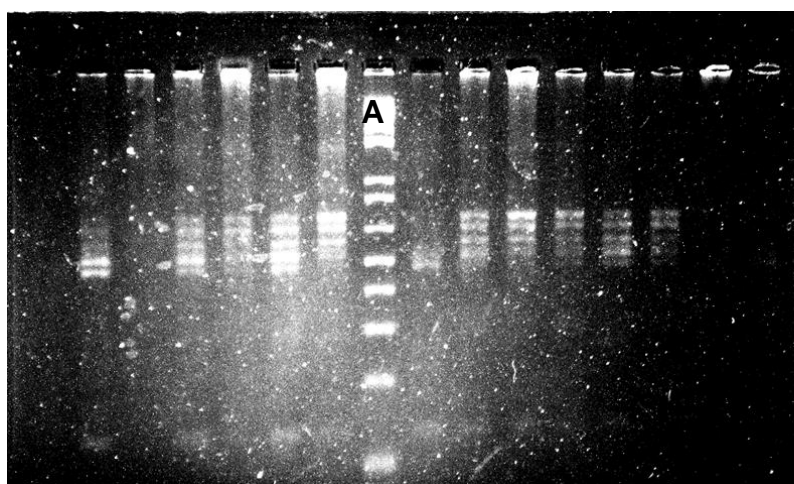
**Figura 2** – Imagem representativa dos resultados obtidos da extração de DNA das amostras através do método de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Eletroforese em gel de agarose 0,5%. Fonte: O autor (2024).

Os resultados obtidos para a etapa de PCR da região correspondente ao gene da Tireoglobulina, nas amostras dos 29 animais, estão apresentados na Figura 3. Nela, pode – se observar que os iniciadores utilizados neste trabalho foram eficientes no isolamento e amplificação da região estudada, onde todas as amostras apresentaram o fragmento de aproximadamente 700 pb.



**Figura 3** – Imagem representativa dos resultados da aplicação das análises de PCR mostrando a amplificação do gene da Tireoglobulina. Gel de agarose 1,5%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder. Fonte: O autor (2024).

Na Figura 4 estão descritos os resultados obtidos nas reações de RFLP utilizando-se a enzima *Hinf-I*. Foram observados 3 padrões de migração distintos, sendo dois padrões para os genótipos homozigotos com duas bandas (MM e mm, respectivamente) e um padrão para os heterozigotos (Mm) com quatro bandas caracterizadas.



**Figura 4** – Imagem representativa dos resultados das análises de RFLP. Gel de Agarose 2,5%. A= Marcador de peso molecular 1kb plus DNA Ladder. Eletroforograma representativo dos padrões de migração caracterizados dos genótipos MM, Mm e mm. Fonte: O autor (2024).

As frequências genóticas obtidas a partir da contagem dos padrões de migração observados foram iguais a 0.275 (8 animais), 0.586 (17 animais) e 0.139 (4 animais) para MM, Mm e mm, respectivamente e as frequências alélicas foram iguais a 0,568 (M) e 0,432 (m).

Os resultados obtidos com o teste de  $\chi^2$  ao nível de 5% de significância, mostram que as frequências observadas na região estudada nos animais avaliados não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Fato este, pode estar atribuído à existência de seleção natural / artificial nos animais avaliados. Siqueira *et al.* (2007) pesquisaram por meio de análises PCR- RFLP, utilizando a enzima de restrição *Mbo-I*, avaliaram as diferenças de frequências alélicas e genóticas do polimorfismo TG no gene da Tireoglobulina entre raças taurinas adaptadas (Bonsmara, Caracu, Senepol) e não adaptada (Angus), juntamente com a raça zebuína Nelore. Utilizaram 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. Foi observado que nenhum dos touros Nelore apresentou o alelo favorável ao marmoreio. Entretanto, para os touros taurinos testados, todas as raças apresentaram polimorfismos para a característica em questão. Dubovskova *et al.*, avaliaram o potencial genético de seleção em 18 touros da raça taurina Hereford utilizando marcadores para avaliar seu impacto no crescimento, desenvolvimento e produtividade cárnea de sua prole. Através da técnica de PCR-RFLP, utilizando a enzima de restrição *BstX2I*, observaram nesta população os genótipos para o gene da Tireoglobulina em 0.05, 0.17, e 0.78 para MM, Mm e mm, respectivamente e as frequências alélicas foram iguais a 0.14 (M) e 0.86 (m).

Contudo, Barreto *et al.* (2012), analisaram o SNP no gene da TG em 69 bovinos da raça Pantaneira, utilizando a enzima de restrição *Psu-I*. Possuíram como resultado, a presença do alelo em frequência superior a 57% nos animais analisados, evidenciando o potencial de uma raça naturalizada para a produção de uma carne com maior qualidade e um maior valor comercial agregado. Wu *et al.* (2005), analisando polimorfismos em bovinos derivados do acasalamento entre touros e vacas das raças Limousin e Wagyu, por meio de análise RFLP em diferentes genes, relataram que entre estes genes estava a TG e obtiveram como resultado, que todos os genes estudados contribuíram significativamente para a característica de marmoreio para os animais avaliados.

Silveira et al (2024), procuraram avaliar por meio de técnicas PCR-RFLP em 60 bovinos da raça Crioulo Lageano, utilizando a enzima *Hinf-I*, onde as análises constavam em auxiliar criadores da região Sul, para que estes animais poderiam possuir alelos favoráveis para a produção de marmoreio. Estes autores encontraram frequências genotípicas correspondentes 0.5614 (MM), 0.3334 (Mm) e 0.1052 (mm), e frequências alélicas, foi encontrado 0,7281 (M) e 0.2719 (m). As diferenças entre frequências gênicas obtidas em diferentes populações para polimorfismos obtidos no gene TG podem estar associadas a processos de seleção aos quais os animais foram submetidos, em diferentes programas de melhoramento genético.

## 6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que as técnicas de extração de DNA genômico e aplicação da técnica de PCR para isolar e amplificar a região de interesse do gene Tireoglobulina foram eficazes. Da mesma forma, os resultados mostram que a região estudada é polimórfica para os sítios de clivagem da enzima de restrição *Hinf-I* nos animais Braford avaliados.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMORIM, Sabrina Thaise. **APLICAÇÃO DE PCR-RFLP NA REGIÃO DO EXON 6 DO GENE DO IGF-I EM ANIMAIS DA RAÇA CRIOULA LAGEANA**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD (ABHB). **REGULAMENTO DO REGISTRO GENEALÓGICO DA RAÇA BRAFORD**. Bagé: ABHB, 2022.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE HEREFORD E BRAFORD. **Programa Carne Pampa**. Bagé: ABHB, 2014. 17 p.

BARBOSA, Pedro Franklin. **OBJETIVOS E CRITÉRIOS DE SELEÇÃO EM BOVINOS DE CORTE**. São Carlos, Sp: Embrapa Pecuária Sudeste, 2005.

BARRETO, C. F. *et al.* **Polimorfismo de base única no gene da tireoglobulina relacionado ao marmoreio cárneo em bovinos da raça pantaneira**. 2012.

BENTO, Lauana Luiza. **USO DE PCR-RFLP NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA EM SUÍNOS**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2015.

COSTA, Talita Gomes da; CELESTINO, Carina dos Santos; SOUSA, Nathan Felipe Moraes de; LACORTE, Gustavo Augusto; BASTOS, Rafael Teixeira; SILVA, Raphael Steinberg da. **DESENVOLVIMENTO DE MARCADOR MOLECULAR PARA O MELHORAMENTO GENÉTICO DE ZEBUÍÑOS LEITEIROS DA RAÇA GIR LEITEIRO**. Ribeirão das Neves: IFMG, 2019.

COUTINHO, Luiz Lehmann; ROSÁRIO, Millor Fernandes do; JORGE, Erika Cristina. **Biotechnologia animal**. estudos avançados, v. 24, p. 123-147, 2010.

DOS SANTOS, Maurílio Souza *et al.* **Qualidade da carne de bovinos terminados em pastejo**. Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR, v. 18, n. 2, 2015.

DUBOVSKOVA, M. *et al.* **Use of genetic markers of meat productivity in breeding of Hereford breed bulls.** 2019. Proc. IOP Conf. Series Earth Environ. Sci. 2019, 341, 012052.

EMBRAPA – **Artigo genômica e melhoramento genético em bovinos.**

Embrapa Pecuária Sul - **Critérios e Resultados Prova de Avaliação a Campo de Reprodutores da Raça Braford.** 2014.

FADEL, S. A. de O. *et al.* **Use of molecular marker to evaluate marbling in Senepol cattle.** 2024.

FALEIRO, F.G. **Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais.** Planaltina: Embrapa, 2007.

FORTES, Marina Rufino Salinas. **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.** 2007. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

FREZARIM, Gabriela Bonfá. **Validação de genes e proteínas diferencialmente expressos relacionados à qualidade de carne e carcaça em bovinos da raça Nelore.** 2019.

GIUSTI, Juliana. **Expressão de genes relacionados à qualidade da carne do músculo Longissimus dorsi em Nelore (Bos indicus) e Canchim (5/8 Bos taurus x 3/8 Bos indicus).** 2011.

IBGE – **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.** 2018. Disponível em: < <http://www.sidra.ibge.gov.br>>.

LEAL, J.J.B. **Avaliação da raça Braford no Brasil.** 2009.

LIMA, THALLES POLICARPO DE CARVALHO. **ESTRUTURA GENÉTICA E COMPOSIÇÃO RACIAL DE BOVINOS DA RAÇA PANTANEIRA POR MEIO DE MARCADORES DO TIPO MICROSSATÉLITES E SNPs**. 2020.

MARQUES, Ana Carolina Wider. **Ultrassonografia para predição das características de carcaça bovina**. Bebedouro: Scout Consultoria, 2011.

MARTINS, C. E. N. *et al.* **Forma e função em vacas braford: o exterior como indicativo de desempenho e temperamento**. Archivos de zootecnia, v. 58, n. 223, p. 425-433, 2009.

OLIVEIRA, Nicole Lourenço de. **ASPECTOS GERAIS DA QUALIDADE DA CARNE BOVINA**. Goiânia: Escola de Ciências Agrárias e Biológicas, 2020.

OLIVEIRA, Patrícia Pereira de. **Avaliação das características obtidas por ultrassom e a associação do uso de marcador molecular para o marmoreio em bovinos da raça de Nelore**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

PERIPOLLI, Elisa. **APLICAÇÃO DE PCR-RFLP PARA IDENTIFICAÇÃO DE POLIMORFISMOS NO GENE DO HORMÔNIO GRELINA DE REPRODUTORAS SUÍNAS**. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

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.

SALATTA, Bruna Maria. **Expressão de genes e proteínas relacionados à deposição de gordura intramuscular em bovinos nelore**. 2019.

SILVEIRA, J.P.M., THAINES L., LUIZ, G.H.S, *et al.* **GENOTIPAGEM VIA PCR-RFLP PARA O GENE DA TIREOGLOBULINA EM BOVINOS DA RAÇA CRIOLA LAGEANA.** in.: 33º CONGRESSO BRASILEIRO DE ZOOTECNIA, ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ZOOTECNISTAS (ABZ), 2024, Chapecó - SC – BRASIL.

SIQUEIRA, Fabiane; Torres Junior, Roberto A. de A.; Regitano, Luciana C. de A.; Alencar, Maurício; Silva, Luiz Otávio C.; Soares, Cleber; Euclides Filho, Kepler; Araújo, Flávio R; Rosinha, Grácia M. S.; Oliveira, Renato M. **Determinação das frequências alélicas e genóticas do gene Tireoglobulina em bovinos de corte.** Campo Grande: Embrapa, 2007.

SIQUEIRA, Fabiane; Torres Junior, Roberto A. de A.; Regitano, Luciana C. de A.; FEIJÓ, Gelson Luís Dias. **Genética Molecular Aplicada à Qualidade da Carne Bovina.** Campo Grande: Embrapa, 2007.

STEAK GUIDE. Steak Guide I: **Best types of steak, characteristics & cuts.** August 31, 2018. Disponível em: < <https://www.gentlemansgazette.com/steak-guide/>>.

SUGUISAWA, Liliane. **Ultra-sonografia para predição das características e composição da carcaça de bovinos.** Universidade de São Paulo, 2002.

TAVARES, Larissa Carvalho. **Análise de polimorfismo no gene da leptina em bovinos da raça Braford.** Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.

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.

UTEMBERGUE, Bruno Lapo. **Estudo da expressão de genes associados ao perfil de ácidos graxos em bovinos Nelore confinados.** 2014. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

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*, The Hague, v. 125, n. 1, p. 103-113, 2005.

YOKOO, Marcos Jun-Iti. **Métodos, Critérios e Resultados da 19ª Prova de Avaliação a Campo de Reprodutores da Raça Braford — 2013-2014**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, 2014.