



Expressão gênica de polimorfismo da Tireoglobulina em embriões produzidos in vitro de bovinos da raça Senepol

Michele Honório Trevisé, Alexandre Nobuhiro Tajiri, Bianca Fernandes Oliveira, Carlo Rossi Del Carratore, Isabella Pereira Azoia, Letícia Peternelli da Silva, Lucas Aparecido Gaion, Marcia Regina Coelho, Nancy de Freitas Fadel, Rodolfo Claudio Spers, Silter Aparecido de Oliveira Fadel, Isabela Bazzo da Costa.



<https://doi.org/10.36557/2009-3578.2025v11n1p193-205>

Artigo recebido em 29 de Maio e publicado em 17 de Junho de 2025

ARTIGO ORIGINAL

RESUMO

O agronegócio da pecuária de corte no Brasil alcançou recordes em 2023, exportando 2,29 milhões de toneladas de carne bovina para 157 países e gerando US\$10,55 bilhões. Apesar de ter o maior rebanho comercial do mundo 197,2 milhões de cabeças, a taxa de desfrute real (24,48%) está abaixo do ideal (45%), destacando a necessidade de melhorias na produção. A qualidade da carne é influenciada por características como maciez, suculência e marmoreio, as raças taurinas, como Angus e Senepol, apresentam melhores resultados. O Senepol se destaca por adaptação ao clima tropical e atributos superiores de carcaça. A seleção genética assistida por marcadores moleculares, como o gene TG (Tireoglobulina), tem potencial para identificar animais com maior qualidade de carne, otimizando a produção. Estudos associaram o polimorfismo TG5 ao marmoreio em raças taurinas, enquanto raças zebuínas, como Nelore, não apresentaram o alelo favorável. O uso de ferramentas genômicas e a seleção de características desejáveis podem promover avanços na eficiência, qualidade e competitividade da carne bovina brasileira, atendendo mercados internos e externos mais exigentes, portanto, o objetivo desse trabalho foi verificar a expressão de polimorfismo no gene da TG em 15 embriões de bovinos da raça Senepol, utilizando a técnica de PCR-RFLP. Para tanto, foram coletadas amostras de embriões para a extração do DNA genômico. O par de primers utilizado nas reações de PCR foram desenhados de acordo com o *GenBank* e a enzima de restrição escolhida foi a endonuclease XmnI. Para a visualização dos resultados, foi realizada a eletroforese em gel de agarose a 2%. Dos 15 embriões avaliados, 10 se mostraram positivos para a expressão da Tireoglobulina, sugerindo a veracidade da associação deste gene com animais da raça Senepol com maior aptidão para o marmoreio.

Palavras-chave: Bovinocultura de corte, Expressão gênica, Tireoglobulina, Melhoramento animal.



Gene expression of Thyroglobulin polymorphism in vitro produced embryos of Senepol cattle

ABSTRACT

In 2023, Brazil's beef cattle agribusiness reached record levels, exporting 2.29 million tons of beef to 157 countries and generating \$10.55 billion. Despite having the largest commercial herd in the world—197.2 million heads—the actual utilization rate (24.48%) falls short of the ideal (45%), highlighting the need for improvements in production. Meat quality is influenced by traits such as tenderness, juiciness, and marbling. Taurine breeds like Angus and Senepol demonstrate superior results. Among them, Senepol stands out for its adaptation to tropical climates and superior carcass attributes. Genetic selection assisted by molecular markers, such as the TG (Thyroglobulin) gene, has the potential to identify animals with higher meat quality, optimizing production. Studies have associated the TG5 polymorphism with marbling in taurine breeds, while zebu breeds like Nelore do not exhibit the favorable allele. The use of genomic tools and the selection of desirable traits can drive advancements in efficiency, quality, and competitiveness of Brazilian beef, meeting the demands of more discerning domestic and international markets. The objective of this study was to verify the expression of polymorphism in the TG gene in 15 Senepol cattle embryos using the PCR-RFLP technique. Genomic DNA was extracted from embryo samples. The primer pair used in the PCR reactions was designed according to the GenBank database, and the selected restriction enzyme was XmnI endonuclease. Results were visualized through 2% agarose gel electrophoresis. Out of the 15 embryos evaluated, 10 were positive for Thyroglobulin expression, suggesting the validity of the association between this gene and Senepol animals with greater aptitude for marbling.

Keywords: Beef cattle, Gene expression, Thyroglobulin, Animal breeding.

Instituição afiliada – UNIVERSIDADE DE MARÍLIA - UNIMAR

Autor correspondente: *Isabela Bazzo da Costa* isabelabazzo@unimar.br

This work is licensed under a [Creative Commons Attribution 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).





INTRODUÇÃO

Com um grande impacto na economia e um crescimento constante, segundo a Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carne, o agronegócio da pecuária de corte no Brasil movimentou em 2023 um marco histórico de 2,29 milhões de toneladas de carne bovina, estabelecendo um novo recorde em volume. Reforçando a posição como líder global, exportando para 157 países e gerando um faturamento de US\$10,55 bilhões. O Brasil tem o maior rebanho comercial do mundo com 197,2 milhões de cabeças de gado. Cerca de 12% do rebanho bovino do mundo está no Brasil (ABIEC, 2024).

Nas exportações, o Brasil ocupa a primeira colocação, sendo responsável pela exportação de 18,7% de toda a carne comercializada no mundo. A carne bovina *in natura* segue como o principal produto exportado pelo país, respondendo cerca de 90% do total. A China continuou como o principal comprador de carne bovina brasileira em 2023, respondendo por 54,4% do total, seguida por Estados Unidos e União Europeia (ABIEC, 2024).

Porém, mesmo tendo o maior rebanho mundial comercial de bovinos, a taxa de desfrute real brasileira foi estimada em 24,48%, quando uma taxa de desfrute adequada para ciclo completo é acima de 45% detalhe que ressalva a importância de providência de melhorias no processo de produção (SCOT CONSULTORIA, 2024).

Em produção de carne, o Brasil segue ocupando a segunda posição em 2023, com o total de 10,6 milhões de toneladas equivalente carcaça (TEC), responsável pela produção de 13,8% de toda carne bovina do mundo. A frente do Brasil, apenas os Estados Unidos, que, com um rebanho 55% menor, produziu 15,7% mais carne em 2023, em função do tipo de produção, raça do rebanho e uso de tecnologias não utilizadas e permitidas no Brasil (ABIEC, 2024).

Promover o aumento do peso da carcaça, a diminuição da idade de abate e a adoção de índices de seleção multicaudalísticas tanto para bovinos em terminação quanto para novilhas de reposição, representam práticas gerenciais com significativo impacto na viabilidade da produção de carne bovina (TERRY *et al.*, 2021).

Segundo Siqueira *et al.* (2007) a manutenção da competitividade da bovinocultura de corte nacional nos mercados interno e externo implica a produção de



carne com máxima eficiência e com um padrão de qualidade que atenda aos mercados mais exigentes. Dentre os fatores que determinam a qualidade da carne estão os atributos organolépticos e, dentre esses, a maciez é o principal quesito de avaliação ou apreciação por parte do consumidor.

O depósito de gordura em ruminantes ocorre em quatro locais distintos: a gordura visceral, localizada dentro da cavidade abdominal entre os órgãos; a gordura subcutânea, situada sob a pele dos animais e responsável pela maior proporção de gordura na carcaça; a gordura intermuscular, localizada entre os músculos; e a gordura intramuscular, localizada entre as fibras musculares. O conteúdo de gordura intramuscular, denominado marmoreio, refere-se à presença de depósitos de gordura visíveis entre as fibras musculares (HOCQUETE *et al.*, 2010).

A utilização de testes de DNA e o uso de marcadores moleculares têm se mostrado como alternativa promissora em programas de melhoramento de bovinos de corte, pois permite um melhor planejamento dos sistemas de acasalamento, objetivando o aumento ou a diminuição da frequência de determinados alelos na população (SIQUEIRA *et al.*, 2007).

Considerando que desde os primeiros esforços para o melhoramento guiado por marcadores genéticos, os embriões foram explorados, a seleção de embriões é possível graças a uma importante ferramenta acessória à sua produção, que consiste na biópsia embrionária (ALONSO *et al.*, 2003).

Dessa forma, as biotécnicas da reprodução são importantes ferramentas para serem associadas às análises genômicas, em especial no caso da produção *in vitro* no Brasil. A biópsia de blastocistos é segura e possibilita índices semelhantes aos de embriões não biopsiados na implantação e no nascimento de animais (OLIVEIRA *et al.*, 2017).

Vários genes foram previamente identificados por pesquisas como possíveis responsáveis pela qualidade de carcaça e carne em bovinos de corte, a Tireoglobulina (TG) (BARENDSE, 1999), que segundo este autor trata-se de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene da Tireoglobulina (TG5) ao qual está associado com marmoreio (MAR) em bovinos, testes de DNA com Marcadores Moleculares (MAS) deste polimorfismo, poderão ser aplicados na seleção embrionária para produção de carne de qualidade.



A contribuição para os avanços no melhoramento genético bovino, visam o desenvolvimento de rebanhos cada vez mais aprimorados, com animais que possuam características superiores e desejáveis, diante disso, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a possível expressão do gene da TG, como foco no polimorfismo TG5 em embriões oriundos de fertilização *in vitro* de bovinos da raça Senepol, relacionado ao marmoreiro da carne.

METODOLOGIA

Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) da Universidade de Marília - UNIMAR, conforme as normas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) sob o protocolo 20/2023.

Obtenção das amostras

Foram avaliados 15 embriões bovinos provenientes de Fertilização *in vitro* - FIV da raça Senepol, produzidos de acordo com os protocolos comerciais já instituídos pela Central Senepol Lab FIV, localizada na Fazenda Experimental da Universidade de Marília – UNIMAR, Rua Hygino Muzzy Filho 1001, Marília, SP.

Extração de DNA genômico

Para a extração do DNA genômico, foi utilizado o kit *QuickExtract™ DNA Extraction Solution – Lucigen*, o qual recomenda: (1) Rotular o número apropriado de tubos contendo 0,5 mL de solução *QuickExtract*. (2) Colocar 1 embrião em cada microtubo de 0,5 - 1cm. (3) Vórtex por 15 segundos. (4) Transferência do tubo para um bloco térmico a 65°C e incubar por 6 minutos (5) Vórtex por 15 segundos. (6) Transferência do tubo para um bloco térmico a 98°C e incubar por 2 minutos. (7) Armazenar o DNA a -20°C (por até 1 semana). (8) Usar 5 µL ou menos do DNA extraído para cada amplificação por Reação em Cadeia pela Polimerase – PCR.

No intuito de verificar a eficácia da metodologia da extração de DNA, as amostras foram misturadas com 3 µL de tampão de corrida (azul de bromo - fenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio, em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 75



V, por aproximadamente 45 minutos. A visualização foi feita sob luz ultravioleta em Sistema de Fotodocumentação L-Pix EX® (*Loccus Biotecnologia*) e as imagens dos géis foram capturadas com o software L-Pix Imagem Ex®.

Amplificação do material genético

O par de *primers* utilizado nas reações de PCR (Reações em Cadeia pela Polimerase) foram desenhados de acordo com as informações disponíveis no *GenBank*, possuindo as seguintes sequências de nucleotídeos: TG - Forward 5' – TCCCAGAGTTAGCCTCCAAG - 3'; TG – Reverse 5' – TGAATGAGAGGTGGTGAGGTC - 3'.

As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 25µL por amostra, contendo 2µL de DNA genômico, 0,5µM de cada primer, tampão PCR 1X, 0,5µM de MgCl₂, 100µM de dNTPS, 0,75U EasyTaq® DNA Polymerase (*Trans Gen Biotech*®). Os ciclos de amplificação foram realizados em Termociclador Biometra® nas condições descritas na Tabela 1.

Tabela 1. Condições de amplificação do gene da Tireoglobulina na Reação em Cadeia pela Polimerase em termociclador.

	<u>Etapa 1 (10 ciclos)</u>		<u>Etapa 2 (35 ciclos)</u>	
	T °C	Tempo	T °C	Tempo
Denaturação	96	5 minutos	95	5 minutos
Anelamento	65	1 minuto	55	1 minuto
Extensão	70	1 minuto	70	1 minuto

Fonte: elaborada pela autora, 2025.

Para verificar o resultado da amplificação uma alíquota de 3 µL de cada amostra foi misturada a 3µL de tampão de corrida (azul de bromo-fenol, xileno-cyanol e glicerol) e submetida à eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (0,05 µg/ml), utilizando tampão TBE 1X a 70V por aproximadamente 40 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 PCR-RFLP. A enzima de restrição escolhida foi



a endonuclease XmnI que possui os seguintes sítios de corte: XmnI - 5'-GAANN*NNTTC - 3' 3'CTTNN*NNAAG - 5'.

A digestão foi realizada em volume final de 20 µL/amostra, contendo 10 µL do produto da PCR, 1/10 de tampão para enzima de restrição e 10 unidades das enzimas BamHI e XmnI. O procedimento foi realizado em termociclador Biometra®. A digestão da enzima XmnI foi feita por 15 minutos a 37°C e posteriormente a 65°C por 20 minutos para inativação e por último a 4°C para conservação das amostras até a fotodocumentação.

Para a visualização do resultado, 7µL de cada amostra foram misturadas a 3µL de tampão de corrida (azul de bromo-fenol, xileno-cyanol e glicerol) para realização da eletroforese em gel de agarose a 2% com brometo de etídio (0,05 µg/ml), em tampão TBE 1X a 70V, por 1 hora e 40 minutos. 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 registradas com auxílio do software L-Pix Imagem Ex®.

Análise estatística

As análises estatísticas para os resultados dos possíveis polimorfismos identificados, foram realizadas através da utilização do teste Qui-quadrado pelo Software R.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Como apresentado na Figura 1, pode-se afirmar que a técnica de extração de DNA genômico escolhida, mostrou-se eficaz. Considerando que as amostras se apresentaram positivas no padrão de migração de bandas no gel de eletroforese confirmou que houve uma quantidade satisfatória de DNA extraído.

A extração de DNA genômico de alta qualidade é uma etapa primária e crítica na biologia molecular, pois segundo Wang TY *et al.* (2011) influencia o sucesso de experimentos subsequentes como reação em cadeia da polimerase (PCR). Os resultados da extração estão em conformidade com Martins *et al.* (2020), demonstrando que a biópsia de embrião possibilita a obtenção de material genômico embrionário.



Figura 1. Fotodocumentação representativa do gel de agarose demonstrando a presença de DNA genômico (seta) dos embriões identificados de acordo com a sequência numérica, onde todos apresentaram o material genético procurado.

Já nas análises de amplificação do material genético com o anelamento dos primers da TG, os fragmentos apresentaram bandas positivas em 709pb, indicando o funcionamento dos primers desenhados para a região estudada, conforme demonstrado na Figura 2.

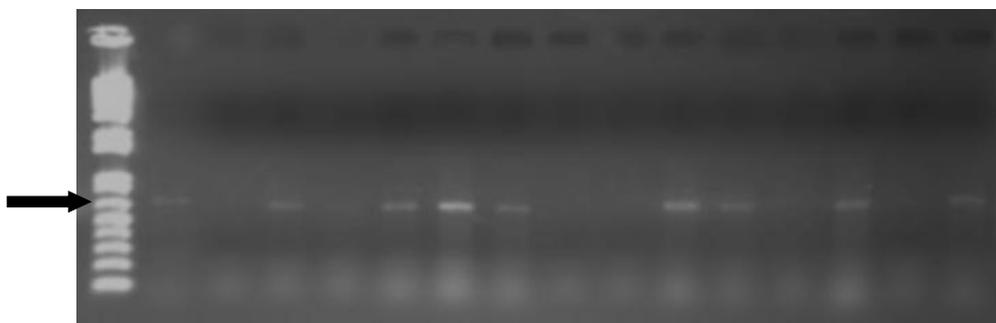


Figura 2. Fotodocumentação representativa do gel de agarose de parte dos resultados das análises de PCR com os primers escolhidos para a TG com 709 pares de bases (seta).

A partir dos resultados obtidos pela técnica de PCR foi possível a realização da PCR-RFLP, onde as amostras continham apenas a região de interesse do gene da Tireoglobulina e esta foi digerida com a enzima XmnI, conforme descrito anteriormente na metodologia de execução desse trabalho.



Os resultados obtidos nesse trabalho demonstraram que os produtos amplificados de PCR foram digeridos em 10 das 15 amostras analisadas, ou seja, somente 05 amostras se apresentaram negativas para a expressão éxon 5 do gene da TG.

Os dados se mostraram estatisticamente diferentes quando comparados entre eles, em relação a presença ou ausência desta expressão (Tabela 2), confirmando, portanto, a contribuição significativa do gene estudado para a análise da característica de marmoreio em embriões da raça Senepol.

Tabela 2. Demonstrativo da análise estatística realizada da comparação entre os embriões com expressão gênica da TG com os do polimorfismo TG5 nestes embriões analisados.

Testes χ^2

	Valor	gl	Valor de p
χ^2	0.536	1	0.464
N	15		

	Nº de amostras	Total de amostras	Proporção	Valor de p
Expressão gênica	SIM 10	15	66,67	< 0,464
	NÃO 05	15	33,33	< 0,464

Nota: A proporção H_a é $\neq 0,05$

Barendse (1999), cita que um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene da TG está associado com MAR em bovinos, da qual ocorre na região 5' do gene da TG. Os resultados de Siqueira e colaboradores (2007) avaliaram as frequências alélicas e genotípicas do polimorfismo TG em touros das raças taurinas Senepol, Bonsmara e Caracu.



Os pesquisadores identificaram a presença do polimorfismo em regiões distintas do gene destes animais, evidenciando a potencial associação do gene tireoglobulina com o marmoreio. Barreto *et al.* (2012) também obtiveram resultados semelhantes, utilizando da técnica de extração e análise para identificar o gene da tireoglobulina em bovinos da raça Pantaneira.

Considerando que a biópsia embrionária associada à uso de tecnologias genômicas e seleção assistida por marcadores moleculares permitem a obtenção de informações genômicas antes mesmo da transferência dos embriões, essa técnica tem se mostrado uma alternativa promissora que permite identificar embriões portadores do gene da TG. Dessa forma, podendo contribuir no processo de seleção genética objetivando o aumento ou a diminuição da frequência de determinados alelos em rebanhos, garantindo produção de carne de qualidade superior.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nos resultados obtidos neste estudo, que confirmam a presença do polimorfismo no gene da Tireoglobulina, no alelo TG5 em embriões de bovinos da raça Senepol, e sua correlação com o marmoreio, a utilização de MAS (Seleção Assistida por Marcadores) representa uma ferramenta genética promissora, capaz de identificar animais com maior predisposição a formação de marmoreio desde a fase embrionária, permitindo selecionar aqueles com maior potencial antes mesmo do nascimento e reduzir os custos associados ao manejo de animais que não apresentam o potencial genético esperado, promovendo maior lucratividade e sustentabilidade.

REFERÊNCIAS

ABIEC; Sumario Beef report, perfil da pecuária do Brasil 2024: <<http://abiec.com.br/publicacoes/beef-report-2024>> Acesso em: setembro 2024.

ALONSO, R.V., WEPPERT, M., GARCIA, J.F., REICHENBACH, H.D. Effect of biopsy by piezo-micromanipulation on developmental capacity of in vitro produced bovine morula and blastocysts. *Acta Sci. Vet.*, v.3, p.215, 2003.

BARENDSE, W. J. Assessing lipid metabolism. *Int. WO 99/23248. US n. 638751.* 23 Oct. 1998, 14 May 1999.



BARENDSE, W.J., BUNCH, R., THOMAS, M., ARMITAGE, S., BAUD, S., DONALDSON, N. O teste do gene da tireoglobulina TG5 para loci de característica quantitativa de marmoreio avaliados em bovinos confinados. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 44. 669-674. 2004.

BARRETO, C., WALKER, C., JULIANO, R., RAMOS, A., BARBOSA, E., ALVES, A., EGITO, A. A. Polimorfismo de base única no gene da tireoglobulina relacionado ao marmoreio cárneo em bovinos da raça pantaneira. *Embrapa Gado de Corte – artigo*, 2012.

OLIVEIRA, C.S., QUINTÃO, C.C.R., FREITAS, C.C. *et al.* Post implantation development reveals that biopsy procedure can segregate “healthy” from “unhealthy” bovine embryos and prevent miscarriages. *Anim. Reprod. Sci.*, v.184, p.51-58, 2017.

OLIVEIRA, P.P. *et al.* Avaliação das características obtidas por ultrassom e a associação do uso de marcador molecular para o marmoreio em bovinos de raça de Nelore. 2017.

SCOT CONSULTORIA - Índices zootécnicos: Taxa de desfrute na pecuária. Publicado em 12 de março de 2024: <https://www.scotconsultoria.com.br/noticias/todas-noticias/57339/taxa-de-desfrute-na-pecuaria.htm>.

SIQUEIRA, F., TORRES JÚNIOR, R.A.A., REGITANO, L.C.A., FEIJÓ, G.L.D. *Genética Molecular Aplicada à Qualidade da Carne Bovina*, 2007. <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/infoteca/handle/doc/326876>.

SIQUEIRA, F., TORRES JUNIOR, R.A.A., REGITANO, L.C.A., ALENCAR, M.M., SILVA, L.O.C., SOARES, C.O., EUCLIDES FILHO, K., ARAÚJO, F.R., ROSINHA, G.M.S., OLIVEIRA, R.M. Determinação das frequências alélicas e genotípicas do gene da tireoglobulina em bovinos de corte. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE CARNES, 4, 2007, Campinas, SP.

TERRY, S.A., BASARAB, J.A., LUOGUAN, L., MCALLISTER, T.A. Strategies to improve the efficiency of beef cattle production. *Canadian Journal of Animal Science*. 101(1): 2021, p. 1-19. <https://doi.org/10.1139/cjas-2020-0022>.



WANG, T.Y., WANG, L., ZHANG, J.H., DONG, W.H. A simplified universal genomic DNA extraction protocol suitable for PCR. *Genet Mol Res.* Mar 29;10(1): 2011, p. 519-25. doi: 10.4238/vol10-1gmr1055. PMID: 21476197.