

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**

**Diversidade genética e associação do gene da
osteopontina com a produção de leite em bovinos da
raça girolando**

Fernanda de Mello
Bióloga/ULBRA

Dissertação apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Mestre em
Zootecnia
Área de Concentração Produção Animal - Melhoramento Genético Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro de 2010

CIP - CATALOGAÇÃO INTERNACIONAL NA PUBLICAÇÃO
Biblioteca Setorial da Faculdade de Agronomia da UFRGS

M527d Mello, Fernanda de
Diversidade genética e associação do gene da osteopontina com
a produção de leite em bovinos da raça Girolando / Fernanda de
Mello. -- Porto Alegre : F. de Mello, 2010.

xi, 80f.; il.

Dissertação(Mestrado – Produção Animal) – Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia,
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

1.Gado leiteiro : Girolando : Produção leiteira : Genética : Gene:
Osteopontina. I, Título

CDD: 636

FERNANDA DE MELLO
Bióloga

DISSERTAÇÃO

Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de


MESTRE EM ZOOTECNIA


Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

Aprovado em: 24.02.2010
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 05.05.2010
Por

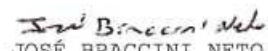

JAIME ARAUJO COBUCI
Orientador-PPG-Zootecnia



CARLOS NABINGER
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


MARTA FONSECA MARTINS GUIMARÃES
Co-Orientadora - EMBRAPA Gado de Leite


MARCOS VINÍCIUS GUALBERTO BARBOSA DA SILVA
EMBRAPA Gado de Leite


HEDEN LUIZ MARQUES MOREIRA
UFPel


JOSÉ BRACCINI NETO
PPG-Zootecnia- UFRGS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de
Agronomia

*Dedico à minha família,
meus pais, Vera e Jonas, e minha irmã Luciana,
por acreditarem e apoiarem meu trabalho incondicionalmente.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor Jaime Araujo Cobuci, pela orientação e confiança no desenvolvimento deste projeto.

A Marta Fonseca Martins Guimarães, pela co-orientação, pela grande contribuição no desenvolvimento desta dissertação e por me receber de portas abertas em seu laboratório.

A toda a equipe do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, em especial a Daisyléa de Souza Paiva, pela valiosa ajuda no processamento das amostras, sem a qual não seria possível a conclusão deste trabalho em tempo hábil.

A todos os colegas do Melhoramento Genético Animal do Departamento de Zootecnia da UFRGS.

Ao Leandro Lunardini Cardoso, pela grande ajuda no entendimento dos meus dados.

Ao professor José Braccini, por todas as explicações e ajustes na análise dos dados, além de toda discussão e ajuda.

As minhas queridas amigas, Ana Carolina e Graciela, obrigada pela ajuda nos momentos difíceis, por toda experiência compartilhada e por todos os momentos de descontração, risadas e cafés. Nossas longas conversas me ajudaram a relaxar durante o estressante período de construção desta dissertação.

Ao Rodrigo Bechara, por todo amor, apoio e motivação a mim dedicado, mesmo que distante. Seu impulso foi fundamental para a conclusão desta etapa e para as muitas outras que estão por vir.

A Embrapa Gado de Leite, pelo imprescindível apoio técnico no desenvolvimento deste trabalho.

Ao presidente da Associação Brasileira dos Criadores da Raça Girolando, José Donato Dias Filho, por todo suporte e inúmeras informações de controle leiteiro disponibilizadas para a realização deste trabalho.

A Capes, pela concessão da bolsa e ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia pelo apoio financeiro durante a minha estadia em Minas Gerais.

DIVERSIDADE GENÉTICA E ASSOCIAÇÃO DO GENE DA OSTEOPONTINA COM A PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO¹

Autora: Fernanda de Mello
Orientador: Jaime Araujo Cobuci
Co-orientadora: Marta Fonseca Martins Guimarães

Resumo: Objetivou-se no presente trabalho obter índices de diversidade genética para o SNP (*single nucleotide polymorphism*) 8514 do íntron quatro do gene *OPN* e analisar a associação entre esse polimorfismo e a produção de leite em animais participantes do Teste de Progênie da raça girolando, por meio da análise das variáveis de produção de leite em até 305 dias (P305) e capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. Para o estudo de diversidade genética, foram analisados 87 touros e 347 vacas ($n = 434$) e para a análise de associação foram avaliados 32 touros e 159 vacas ($n = 204$), os quais apresentavam dados fenotípicos disponíveis. Para amplificação dessa região gênica, foram utilizados os *primers* descritos para a raça holandesa e a diferenciação dos alelos C/T desse SNP foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. As frequências dos genótipos encontradas foram TT (52,53%), CT (38,71%) e CC (8,76%) e as frequências alélicas de T (71,9%) e C (28,1%) estando de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$). Foi estimado um baixo nível de endogamia ($Fis = 0,043$), o que sugere que a população apresenta mais indivíduos homocigotos para o alelo T devido à provável herança deste alelo o da raça zebuína e não pela prática de endogamia realizada no rebanho. O estudo de associação entre o gene *OPN* e a produção de leite não detectou associação com as variáveis analisadas, P305 e PTA. Os resultados deste trabalho estão de acordo com os observados na raça holandesa, na qual não foi observado efeito aditivo dos alelos desse SNP com a produção de leite. Outros estudos devem ser conduzidos para se inferir com maior precisão a importância desse gene na produção de leite na raça girolando.

¹ Dissertação de Mestrado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 80 p.

GENETIC DIVERSITY AND ASSOCIATION OF OSTEOPONTIN GENE WITH MILK PRODUCTION IN GIROLANDO BREED¹

Author: Fernanda de Mello
Advisor: Jaime Araújo Cobuci
Co-lead: Marta Fonseca Martins Guimarães

Abstract: The objective of the present work to obtain indices of genetic diversity for the SNP (single nucleotide polymorphism) of the 8514 intron four of *OPN* gene and analyze the association between this polymorphism and milk production in animals participating in the Progeny Test Girolando through analysis of the yield of milk in 305 days (P305) and predicted transmitting ability (PTA) of milk. For the study of genetic diversity, we analyzed 87 bulls and 347 cows (n=434) and the association analysis were evaluated 32 bulls and 159 cows (n=204), which showed phenotypic data available. For amplification of this gene region, we used the primers described for the Holstein and differentiation of alleles C/T SNP that was obtained by PCR-RFLP. The frequencies of TT genotypes were found (52.53%), CT (38.71%) and CC (8.76%) and allele frequencies of T (71.9%) and C (28.1%) being according to the Hardy-Weinberg equilibrium ($p>0.05$). We estimated a low level of inbreeding ($Fis=0.043$), suggesting that the population has more individuals homozygous for the T allele likely due to the inheritance of this allele of the zebu breed and not held by the practice of inbreeding in the herd. The study of association between the *OPN* gene and milk production did not detect association with variables, P305 and PTA. These results are consistent with those observed in Holstein, which was not observed additive effect of alleles of this SNP with milk production. Other studies should be conducted to infer more precisely the importance of this gene in milk production in girolando breed.

¹ Master of Science dissertation in Animal Science, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, (80 p). February, 2010.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	1
1. Introdução	2
2. Revisão Bibliográfica	5
2.1. A raça girolando: histórico de formação da raça e produção	5
2.2. A prática de seleção nos rebanhos leiteiros.....	9
2.3. Identificação de genes associados à produção de leite e seus constituintes	14
2.4. O gene da osteopontina.....	18
3. Hipóteses	25
4. Objetivos	26
5. Material e Métodos	27
5.1. Dados.....	27
5.2. Extração do DNA	27
5.3. Amplificação do gene <i>OPN</i> e genotipagem.....	28
5.4. Análise estatística	29
5.4.1. Análise de diversidade genética para o SNP (C/T) no íntron quatro do gene <i>OPN</i>	29
5.4.2. Análise de associação do SNP (C/T) do íntron quatro do gene <i>OPN</i> com a produção de leite.....	30
CAPÍTULO II	33
Resumo.....	34
Abstract.....	35
Introdução	36
Material e Métodos.....	37
Resultados e Discussão.....	39

Conclusões	42
Referências	43
CAPÍTULO III.....	45
Resumo.....	46
Abstract.....	47
Introdução	48
Material e Métodos.....	50
Resultados e discussão	53
Conclusões	56
Referências.....	57
6. Considerações Finais.....	59
7. Referências Bibliográficas.....	60
Apêndices.....	71
Vita	80

RELAÇÃO DE TABELAS

Capítulo I	Página
Tabela 1. Sequências dos <i>primers</i> utilizados para amplificação do íntron quatro do gene da osteopontina (<i>OPN</i>).	29
Capítulo II	
Tabela 1. Frequências alélicas e genóticas do polimorfismo C/T do íntron 4 do gene da osteopontina e o equilíbrio de Hardy-Weinberg da população de animais participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando.....	40
Capítulo III	
Tabela 1. Médias, desvio-padrão (DP), valores mínimos e máximos para as variáveis de produção de leite em até 305 dias (P305), capacidade prevista de transmissão (PTA) em animais girolando e média das confiabilidades das PTAs.....	51
Tabela 2. Estimativas dos efeitos de aditividade, dominância, estimativas da substituição alélica ($\alpha/2$) e <i>p-valor</i> associados com o SNP 8514 do gene da osteopontina (<i>OPN</i>) na população de vacas e touros da raça girolando para a produção de leite.....	54

RELAÇÃO DE FIGURAS

Capítulo I	Página
Figura 1. Produção mundial de leite fluido em mil toneladas.	10
Figura 2. Mapa do genoma bovino com a posição dos QTL para a característica do leite; barras vermelhas representam QTL significativos a nível genômico (1%).	17
Figura 3. Mapa de ligação do cromossomo 6 (BTA6); barras vermelhas representam QTL significativos para a produção de leite a nível genômico (1%) e barras verdes representam a localização do pico do QTL.	17
Figura 4. Mapa de ligação do cromossomo 6 (BTA6); região de 420 Kb (vermelho) e genes na região do QTL (verde).	19
Figura 5. Representação esquemática da organização do gene <i>OPN</i> em bovinos do banco de dados de sequência do genoma bovino.	20
 Capítulo II	
Figura 1. Perfil genotípico do SNP C/T nos animais participantes do PMGG. Gel de agarose 1,5%. À esquerda: marcador molecular de 100 pb, bandas de 500 pb e 300 pb identificadas; à direita: genótipos do SNP C/T identificados; alelo T (290 pb) e alelo C (200 pb).	39

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>ABCG2</i>	ATP-obrigatória de ligação, subfamília G, membro 2
ASSOLEITE	Associação dos Criadores de Gado de Leite do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba
BLAD	Deficiência de adesão leucocitária bovina
BLUP	Melhor predição linear não viesada
BTA	Cromossomo Bovino de <i>Bos taurus</i>
<i>DGAT 1</i>	Diacilglicerol O-Aciltransferase
dNTP	Deoxinucleotídeos Trifosfatos
DUMPS	Deficiência de uridina monofosfato sintetase
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<i>Fis</i>	Estatística F de Wright
GIROLANDO	Associação Brasileira dos Criadores da Raça Girolando
GLM	Modelo linear geral
GRGDS	Glicina-Arginina-Glicina-Ácido Aspártico-Serina
GWS	Seleção genômica
He	Heterozigosidade esperada
Ho	Heterozigosidade observada
<i>IBSP</i>	Integrina sialoproteína
<i>LAP3</i>	Leucina Aminopeptidase 3
LD	Desequilíbrio de Ligação
LGM	Laboratório de Genética Molecular
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
<i>MEPE</i>	Matrix extracelular de fosfoglicoproteína com motivo

	ASARM
MY	Produção de leite
NAGRP	Programa nacional de pesquisa em genoma animal
OPN	Osteopontina
P305	Produção de leite em até 305 dias
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase – Polimorfismo de comprimento dos fragmentos de restrição
<i>PKD 2</i>	Doença do rim policístico 2
PMGG	Programa de melhoramento genético da raça girolando
PROCRUZA	Programa de cruzamentos dirigidos
PTA	Capacidade prevista de transmissão
QTL	Loco de característica quantitativa
QTN	Nucleotídeo de característica quantitativa
SNP	Polimorfismos de nucleotídeo simples
<i>SPP1</i>	Fosfoproteína secretada 1
SSR	Simplex sequência repetida
Σ	Somatório

CAPÍTULO I

1. Introdução

A formação da raça girolando veio ao encontro da busca por cruzamentos que resultassem em uma maior produção de leite e adaptação ao clima tropical, aumentando a produção leiteira a fim de atender a maior demanda por leite e derivados. A raça destaca-se no cenário nacional como responsável por 80% da produção total do país. Estabelecida em 1996 como uma nova raça sintética pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), é resultante da preferência dos cruzamentos realizados pelos criadores de gado leiteiro entre animais das raças gir e holandesa, unindo rusticidade e alta produção, respectivamente.

Com o tempo, a Associação De Criadores de Gado de Leite do Triângulo Mineiro e Alto Paraíba (ASSOLEITE) passou a conduzir o programa de criação da raça girolando em todo país, denominada posteriormente de GIROLANDO (Associação Nacional dos Criadores de Girolando). Assim, surgiu a necessidade da condução de um trabalho amplo que colocasse à disposição do rebanho girolando opções de touros e matrizes de linhagens existentes, identificando aquelas de qualidade superior. Então, em parceria com a Embrapa Gado de Leite, a GIROLANDO instituiu em 1997 o Teste de Progênie dentro do Programa de Melhoramento Genético da Raça Girolando (PMGG), com o intuito de efetuar a avaliação genética dos animais com diferentes proporções genéticas das raças formadoras, gir e holandês. A distância genética evolutiva existente entre as raças formadoras, taurina e zebuína, é identificada pela diferença na arquitetura genética no controle de

características, por exemplo, produtivas, reprodutivas e de resistência a doenças, possibilitando, a partir do seu cruzamento, a obtenção de animais com maior expressão de heterose e, conseqüentemente, mais produtivos. Embora existam muitos estudos sobre raças taurinas e zebuínas, existem muitos aspectos da composição genética e das interações gênicas que regem as características produtivas em raças mestiças, como a raça girolando, que necessitam ser elucidados, principalmente do ponto de vista molecular.

Estudos com a finalidade de melhor compreender os processos biológicos envolvidos na produção de leite são fundamentais na cadeia produtiva e no desenvolvimento de soluções tecnológicas. A identificação e caracterização dos fatores genéticos que estão por trás do controle da expressão diferencial do fenótipo têm grande impacto no progresso genético da raça, pois permitiria uma seleção baseada não apenas na expressão da característica, mas nos genes responsáveis por essa expressão diferencial. Identificar genes responsáveis pela produção e caracterizar a sua variabilidade, utilizando essas informações para a seleção assistida, é uma abordagem efetiva para o incremento genético da raça, o que aumenta a produtividade e a competitividade da pecuária leiteira.

Estudos de associação entre polimorfismos gênicos e a produção de leite têm sido incorporados ao PMGG, como, por exemplo, polimorfismos dos genes *DGAT 1* e *kappa-caseínas*. Outros genes já tiveram seus polimorfismos descritos e associados à característica do leite na raça holandesa, como o íntron quatro do gene da osteopontina (*OPN*). *OPN* é um forte candidato para o estudo de associação com a produção de leite na raça girolando devido ao seu

comprovado envolvimento biológico na característica e no desenvolvimento da glândula mamária. Polimorfismos identificados no gene *OPN* no íntron quatro, do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*), e na região regulatória, do tipo microssatélite, foram associadas à característica do leite na raça holandesa e poderão ser utilizados como marcador molecular na raça girolando, desde que essa associação seja comprovada. O conhecimento gerado pelo estudo de associação aos polimorfismos do gene candidato *OPN* poderá ser utilizado na seleção de animais com maior potencial para a produção de leite. A seleção baseada no conhecimento do perfil genético dos animais possibilita a redução de custos na produção, uma vez que essa seleção estaria voltada apenas para animais de alto potencial genético.

Dessa forma, é importante identificar e caracterizar o gene *OPN* nos animais da raça girolando para associar esse SNP à produção de leite da raça e, para posteriormente, utilizá-lo como marcador molecular para a característica auxiliando a seleção assistida. Assim, o objetivo do presente trabalho foi analisar a diversidade do gene *OPN* caracterizando a distribuição do polimorfismo C/T no íntron quatro em animais da raça girolando participantes do Teste de Progênie e verificar a associação entre os alelos desse gene e a produção de leite.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. A raça girolando: histórico de formação da raça e produção

O ato de selecionar os melhores animais é realizado há muitos anos com intuito de se obter animais relativamente melhores, que apresentem produções superiores aos da geração anterior. Os criadores de gado de leite brasileiros iniciaram, na década de 40, cruzamentos entre as raças gir e holandesa, na tentativa de melhorar as características leiteiras buscando uma melhor adaptação ao nosso clima tropical conciliada a uma maior produção de leite. O clima tropical é notoriamente prejudicial à produção de leite dos animais de raças puras taurinas como a holandesa, tanto que estudos têm verificado o antagonismo da produção de leite e a tolerância ao calor comprovando que a seleção continuada para maior produção, sem considerar a tolerância ao calor, resultara em diminuição da produtividade (Bohmanova et al., 2005). Assim, a multiplicação dos animais mestiços ocorrera de forma intensa, devido à boa produtividade e eficiência reprodutiva, o que levou a distribuição desse gado leiteiro a grande parte do território nacional (Freitas, 2003).

Em 1988, o MAPA encerrou o PROCRUZA (Programa de cruzamentos dirigidos), que teve duração de 10 anos e revelou a preferência do cruzamento entre as raças gir e holandesa por parte dos criadores. Assim, em 1989, foram definidas as normas para a formação da raça e teve início o Programa Girolando (PRT 266/1988). O MAPA delegou à Associação dos Criadores de Gado de Leite do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (ASSOLEITE) a condução do programa de criação da raça girolando em todo o

Brasil.

A criação da raça bovina girolando, em princípio, teve por objetivo a formação de uma raça leiteira capaz de produzir leite, em sistema produtivo economicamente viável, nas condições tropicais e subtropicais (Freitas, 2003). Conforme a Portaria Nº 79 de 07 de fevereiro de 1996 (PRT 79/1996), a raça girolando foi oficializada pelo MAPA, e a ASSOLEITE foi encarregada do registro genealógico. Em 1996, a ASSOLEITE tornou-se GIROLANDO com registro Nº 59, da série entidade de âmbito nacional, no cadastro das associações encarregadas do registro genealógico tendo por finalidade precípua incrementar de maneira racional a criação da raça girolando. Atualmente, a raça girolando é uma das principais raças leiteiras brasileiras em número de animais registrados, possui cerca de 97 mil bovinos inscritos e exportação de sêmen para as Filipinas e outros países tropicais (ABCG, 2009).

A raça é fundamentalmente produto do cruzamento do holandês (H) com o gir (G), passando por variadas frações gênicas. O direcionamento dos acasalamentos busca a fixação do padrão racial do bimestiço, no grau de 5/8 H com 3/8 G, objetivando um gado produtivo e padronizado. As principais características resultantes desse cruzamento são a rusticidade presente nos animais da raça gir com a alta produção dos animais da raça holandesa, explorando a heterose e a complementaridade das duas raças em um único tipo de animal, fenotipicamente superior aos demais mestiços leiteiros.

As fêmeas girolando são grandes produtoras de leite, sendo que o pico de sua produção chega até os 10 anos de idade. A capacidade de autorregulação do calor corporal, sua estrutura muscular e esquelética,

aprumos e pés fortes, hábito de pastejo, capacidade ruminal são condições que lhe atribuem grande resistência e adaptação ao ambiente tropical e subtropical (ABCG, 2009).

A GIROLANDO é responsável pela realização do controle leiteiro nos rebanhos da raça. Essa prova zootécnica consiste na mensuração e correspondente registro da produção individual das vacas, visando à seleção, o manejo, à pesquisa e à promoção da raça. Com base nesses dados coletados, podem-se reconhecer as reais potencialidades de cada animal, identificando os indivíduos superiores que transmitirão boas características aos seus descendentes, promovendo assim o melhoramento genético da raça. Essa é a premissa de todos os programas de melhoramento genético animal.

O PMGG vem sendo conduzido pela GIROLANDO com a colaboração técnica da Embrapa Gado de Leite há 12 anos por meio do Teste de Progênie da raça. De 1997 a 2009, já foram liberados os resultados de cinco grupos de touros, totalizando 32 reprodutores avaliados pela predição da capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. Os demais reprodutores, pertencentes aos sete grupos restantes, encontram-se em fase de teste. Em 2009, houve um aumento do número de animais em prova, foram selecionados 19 touros para o teste, ao passo que no ano anterior foram apenas oito, revelando o crescente interesse pela raça e pelo desenvolvimento do Teste de Progênie. Com os animais selecionados neste último ano somam 93 touros ao teste. Embora os animais mais jovens ainda não tenham filhas em fase de produção e, portanto, não apresentam registros fenotípicos para análise, parte desses animais foi genotipado.

O PMGG estrutura-se no controle leiteiro e no uso da inseminação artificial nos rebanhos para a realização do Teste de Progênie. O teste avalia os touros responsáveis por mais da metade do melhoramento genético do rebanho, por meio de suas filhas. Todos os touros participantes da avaliação genética têm seu sêmen disponibilizado nas centrais de inseminação, mesmo antes da publicação dos resultados. Para a realização do teste, é necessária a participação dos criadores para testar seus touros e de outros criadores que tenham interesse em inseminar as matrizes de seu rebanho com sêmen dos touros inscritos no teste, sendo esses rebanhos conhecidos como rebanhos colaboradores (Freitas, 2008).

Os resultados obtidos são anualmente publicados por meio do sumário de touros, em que é disponibilizado o valor genético dos touros expresso pela PTA, que é a estimativa da metade do valor genético do animal, ou seja, o efeito aditivo médio dos genes de um animal transmitidos a sua prole por meio de seus gametas (Pereira, 2004). A seleção dos animais é realizada com base no valor genético predito, mas esses animais também são genotipados por meio de marcadores moleculares associados aos genes envolvidos com a característica do leite e com doenças autossomais recessivas, sendo tais resultados também divulgados no sumário. Alguns genes avaliados estão comprovadamente associados às características do leite na raça girolando e nas raças européias como os genes *DGAT 1* (Diacilglicerol O-Aciltransferase) e a *Kappa-caseína*, e outros ainda estão em fase de validação na raça girolando, como é o caso do gene da osteopontina (*OPN*). Os próximos grupos de touros jovens deverão ser genotipados com

marcadores moleculares para genes deletérios antes de entrarem no Teste de Progênie (comunicação pessoal, Guimarães, 2010).

O controle de doenças genéticas recessivas como a BLAD (Deficiência de Adesão Leucocitária Bovina) (Nagahata et al., 1987; Shuster et al., 1992) e a DUMPS (Deficiência de Uridina Monofosfatase Sintase) (Robinson *et al.*, 1983; Shanks et al., 1987) tem recebido grande atenção nos rebanhos, devido à utilização e comercialização do sêmen dos touros em teste, principalmente aqueles com melhores predições de valor genético. Desse modo, marcadores moleculares são utilizados como ferramenta auxiliar aos métodos de seleção tradicional para avançar no melhoramento genético da raça obtendo animais mais produtivos com maior acurácia. A incorporação de novas tecnologias para a cadeia produtiva do leite, como a análise por meio de marcadores moleculares, propicia um aumento da produção tornando a bovinocultura mais competitiva.

2.2. A prática de seleção nos rebanhos leiteiros

A produção de leite, assim como a sua composição, tem significativo impacto sobre a economia nacional. Em 2007, a produção foi de 26,4 bilhões de litros gerando um valor bruto da produção de aproximadamente 15 bilhões de reais (Zoccal; Carneiro, 2008). Em termos mundiais, o Brasil é o sexto maior produtor, com um aumento de 5,5% em relação ao ano anterior, ficando atrás da União Européia, dos EUA, da Índia, China e Rússia (USDA, 2008) (Figura 1). Entretanto, a baixa produtividade por animal (1,24 toneladas/cabeça/ano) reflete a existência de animais pouco produtivos e de sistemas de criação por

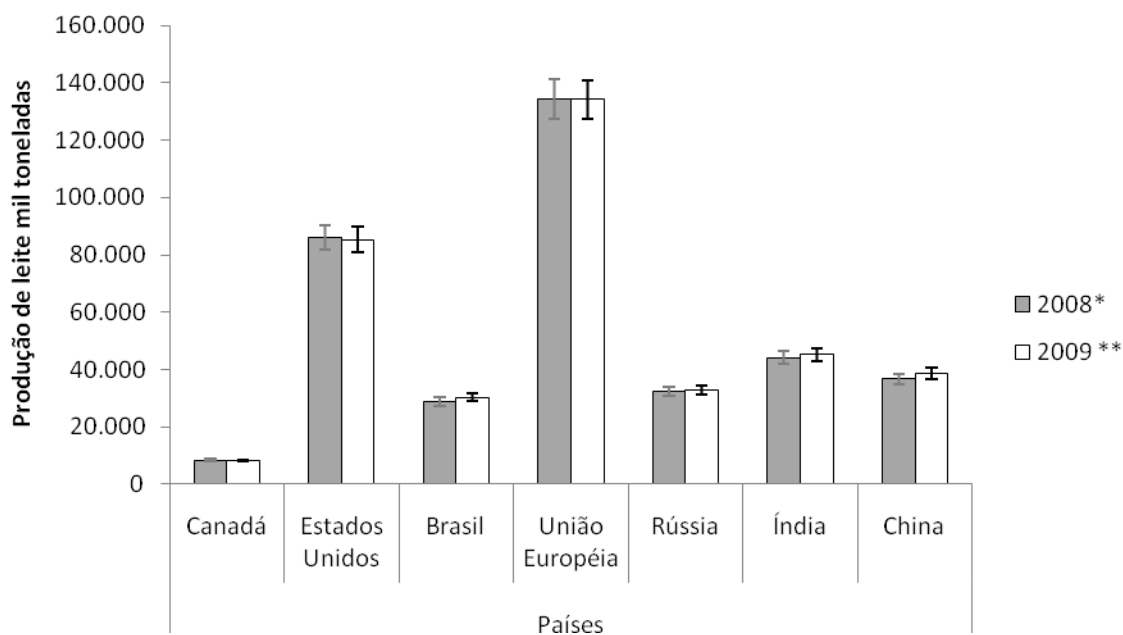


Figura 1. Produção mundial de leite fluido em mil toneladas. *dados preliminares, ** projeção para o ano. Fonte: USDA/2008.

vezes inadequados à produção leiteira nacional. Esses dados indicam a baixa produtividade dos animais dos rebanhos do país, principalmente quando comparados à produtividade de países de maior produção como os EUA, com 9,22 toneladas/cabeça. Dessa forma, será ineficiente apenas melhorar hábitos de manejo se o rebanho não possuir potencial genético capaz de responder a esse investimento (Marques, 2005).

Sabe-se que o fenótipo é o resultado do ambiente e dos genes responsáveis pelo desenvolvimento da característica, denominada interação genótipo-ambiente. A expressão das características do leite é o resultado da soma dos efeitos genéticos, do ambiente e da interação entre eles, ou seja, o fenótipo dos indivíduos é o resultado de seu genótipo, manifestado de acordo

com o ambiente a que esse indivíduo está exposto. Assim, a interação genótipo-ambiente é caracterizada quando as diferenças fenotípicas entre diferentes genótipos são desiguais de um ambiente para outro.

Ao se promover seleção para a predição do resultado, é importante uma estimativa da segurança que se terá ao se adotar determinado procedimento. Essa segurança é definida pela acurácia da seleção (Filho, 1999). O método de seleção BLUP (melhor predição linear não viesada), utilizado atualmente nos programas de melhoramento, seleciona indiretamente indivíduos com genótipos favoráveis ao desenvolvimento das características produtivas, por exemplo, produção de leite. Metodologias clássicas de seleção podem não resultar em uma seleção com grande acurácia para as características quantitativas, como a produção de leite, que apresenta moderada herdabilidade, pois dependem da acurácia de predição dos valores genéticos dos candidatos à seleção. De acordo com Bertrand *et al.* (1985), a acurácia dos valores genéticos dos animais avaliados em diversos ambientes é reduzida quando existir interação genótipo-ambiente. Portanto, a modelagem apropriada na avaliação genética para a seleção de bovinos leiteiros deve considerar a magnitude dos valores genéticos e ganhos genéticos nos diferentes ambientes (Costa, 1999).

Técnicas de biologia molecular permitiram novas perspectivas para o progresso genético, especialmente para as características poligênicas. Com o advento da biologia molecular, o estudo direto na variabilidade das sequências de DNA propiciou melhor entendimento da expressão diferencial da característica do leite. A diversidade genética nos animais surge como

resultado de forças evolutivas como a mutação e o fluxo gênico resultante da introdução de novos animais no rebanho, trazendo novos alelos para a população. É essa variação genética que pode ajudar a explicar parte das diferenças de produção entre animais de um mesmo rebanho. No entanto, a variabilidade pode ser diminuída principalmente pela seleção direcional para determinada característica, como a produção de leite. A variabilidade genética é condição fundamental para que haja progresso genético da raça, uma vez que, por meio da seleção, é possível obter uma mudança das frequências gênicas e/ou nos haplótipos da população.

O avanço obtido na área de análise de dados possibilitou o desenvolvimento de novas metodologias para o melhoramento genético animal, as quais utilizam informações geradas a partir do estudo do polimorfismo das sequências dos genes por meio do estudo de marcadores moleculares juntamente com os dados fenotípicos de produção de leite, o que possibilita uma seleção com maior acurácia. Assim, o uso de marcadores moleculares em conjunto com métodos de seleção tradicionais para o cálculo da estimativa do valor genético animal torna-se pertinente.

Um marcador molecular pode ser definido como todo e qualquer fenótipo decorrente de um gene expresso (proteínas e caracteres morfológicos) ou de um segmento específicos de DNA, cuja sequência e função podem ou não ser conhecidas e possuem herança de acordo com as leis de Mendel (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Diferentes marcadores moleculares são utilizados na detecção de polimorfismo genético na população, o que possibilita a seleção indireta para genes de interesse para o melhoramento.

Entretanto, o uso de marcadores moleculares nos programas de seleção não é tão simples, em virtude da natureza quantitativa da característica do leite. Contudo, apesar de muitos genes estarem envolvidos na expressão da característica, percebe-se que é possível encontrar alguns genes que tenham um efeito maior e mensurável na determinação da característica, com efeito preponderante em relação aos demais, sendo chamados de genes de efeito maior ou *major genes* (Franco; Melo, 2006). Assim, com o advento dos marcadores moleculares, o número de associações entre esses marcadores e caracteres de herança poligênica foi ampliado significativamente. A utilização de marcadores em desequilíbrio de ligação com *major genes* que controlam preponderantemente as características de interesse econômico permite a identificação de animais geneticamente superiores em idade precoce e com maior acurácia, contribuindo significativamente para melhorar a eficiência dos rebanhos.

Atualmente, estudos para a identificação de genes relacionados à produção de leite estão sendo associados a genes candidatos, genes que possivelmente sejam *major genes* no controle da característica. Uma forma eficiente de utilizar os marcadores moleculares, com maior possibilidade de aplicação em curto prazo, é o estudo dos polimorfismos localizados diretamente em genes candidatos (Pappas et al., 2004). Os genes candidatos são genes de sequência e ação biológica conhecida e que estão envolvidos com o desenvolvimento ou a fisiologia de uma determinada característica de interesse produtivo, em que as mutações espontâneas possam ser associadas à característica de interesse econômico (Ferreira; Grattapaglia, 1998). Dessa

forma, pode-se utilizar o polimorfismo no gene candidato como marcador molecular para o estudo de características de interesse, de forma a permitir alta eficiência seletiva, grande rapidez na obtenção de ganhos genéticos com a seleção e baixo custo, em comparação com a tradicional seleção baseada em dados fenotípicos. A seleção genômica ou seleção genômica ampla (*Genome Wide Selection - GWS*) (Meuwissen et al., 2001) foi desenvolvida vislumbrando esses objetivos de seleção. A GWS usa associações de grande número de marcadores SNPs em todo o genoma com os fenótipos.

A seleção genômica elevaria a qualidade do rebanho, visto que seriam mantidos apenas os animais que apresentam a forma alélica dos genes que favorecem a maior produção. Isso, conseqüentemente, geraria uma redução nos custos de criação gastos com os animais com estimativas de valor genético menores para produção de leite, tendo em vista que tais animais seriam descartados do rebanho precocemente. No entanto, deve ser utilizada com cautela, uma vez que os efeitos das interações genômicas são desconhecidos e podem ocorrer correlações indesejadas.

No que diz respeito a uma maior produção de leite, o melhor entendimento das bases genéticas responsáveis pela variação na expressão da produção de leite ajudaria no estabelecimento de novos critérios de seleção para o melhoramento dos rebanhos leiteiros.

2.3. Identificação de genes associados à produção de leite e seus constituintes

Bovinos, caprinos, ovinos, suínos, etc., são selecionados visando o

melhoramento das características economicamente importantes durante várias gerações. Muitas das características de importância econômica, como crescimento, fertilidade, produção de leite e resistência a doenças, são influenciadas por diversos genes, cada um contribuindo com um pequeno efeito e por fatores ambientais (Burt; Hocking, 2002). Uma estratégia utilizada para a identificação dos genes com efeito sobre a característica é a identificação de regiões do genoma que influenciam características quantitativas (QTL - *Quantitative Trait Loci*). O uso de marcadores moleculares distribuídos ao longo do genoma ou em cromossomos específicos permite detectar os QTLs sem a necessidade de conhecimento prévio da função fisiológica de genes (Plastow, 2003). O principal objetivo de mapear QTL é encontrar genes e/ou marcadores ligados à expressão da característica e que possam ser implementados nos programas de melhoramento genético animal via SAM (Khatkar et al., 2004).

O desenvolvimento de novas tecnologias na área da biologia molecular e bioinformática e o recente sequenciamento do genoma bovino propiciaram um maior conhecimento das sequências nucleotídicas do genoma como um todo, proporcionando maior ênfase na detecção de QTL para características envolvendo a produção de leite (Khatkar et al., 2004) (Figura 2). A detecção de QTL ao longo do genoma auxilia a determinação de genes que possam estar influenciando uma característica, seja por comparação com regiões homólogas de outras espécies, seja pela proximidade física de um dado gene com a região ocupada pelo QTL encontrado no genoma estudado (Zhao et al., 2003).

Diferentes estudos detectaram QTL para produção de leite, gordura

e de proteína em todos os 29 cromossomos autossômicos e no cromossomo X do genoma bovino (Khatkar et al., 2004). Tais informações geradas nessas análises moleculares sobre o genótipo dos indivíduos podem ser um complemento importante para os sistemas de seleção tradicional em gado leiteiro que utilizam os dados fenotípicos, mas que, em virtude de sua natureza quantitativa, algumas características apresentam baixa herdabilidade resultando em pequenos ganhos genéticos para as características. Dentre os 29 cromossomos bovinos, o cromossomo 6 de *Bos taurus* (BTA6) está entre os que portam o maior número de QTL para a produção de leite apresentando associações significativas (Khatkar et al., 2004; Olsen et al., 2004; Harder et al., 2006; Kucerova, et al., 2006; Bagnato et al., 2008; Lillehammer et al., 2008; Gao et al., 2009) (Figura 3).

Nesse contexto, Olsen et al. (2004) identificaram um QTL no BTA6 em uma extensão de 7,5 cm entre os marcadores BMS2508 e FBN12 correlacionado a pequeno aumento na produção de leite e redução significativa no percentual de gordura e proteína na raça holandesa. O mesmo grupo (Olsen et al., 2005), posteriormente, realizou um mapeamento fino na região em que havia sido detectado o QTL para a produção de leite, por meio do aumento na densidade de marcadores, e assim, identificaram uma região de 420 kb entre os genes *ABCG2* (ATP-obrigatória de ligação, subfamília G, membro 2) e o que apresentava maior efeito sobre QTL detectado (Figura 4). Essa região cromossômica contém seis genes, dentre os quais, quatro são conhecidos devido a estudos do genoma humanos: *IBSP* (integrina sialoproteína), *MEPE* (matrix extracelular de fosfoglicoproteína com motivo ASARM), *PKD2* (doença

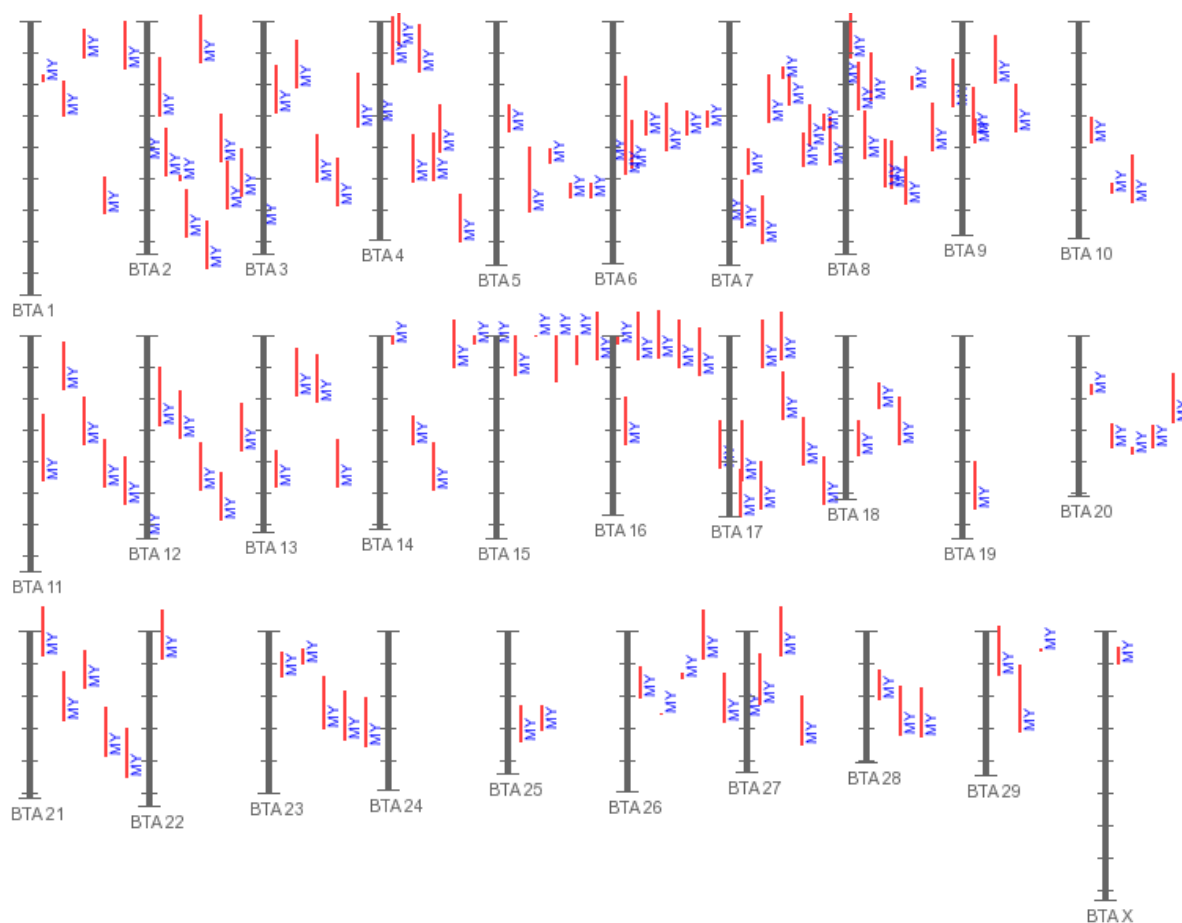


Figura 2. Mapa do genoma bovino com a posição dos QTL para a característica do leite; barras vermelhas representam QTL significativos em nível genômico (1%). Fonte: NAGRP, 2009.

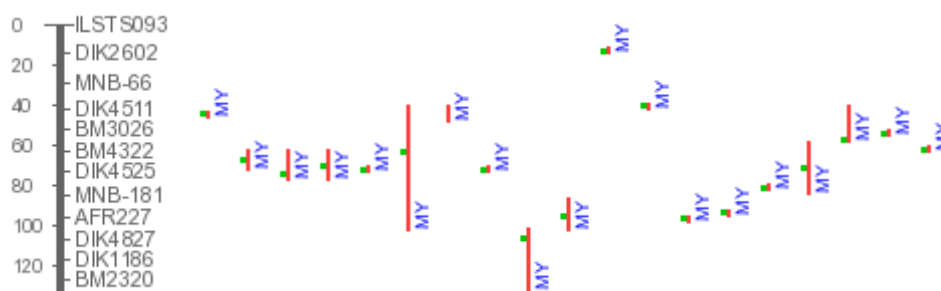


Figura 3. Mapa de ligação do cromossomo 6 (BTA6); barras vermelhas representam QTL significativos para a produção de leite em nível genômico (1%) e barras verdes representam a localização do pico do QTL. Fonte: NAGRP, 2009.

do rim policístico 2) e *OPN* (osteopontina).

Este último gene foi associado significativamente às características

do leite na raça holandesa em diferentes populações (Schnabel et al., 2005; Leonard et al., 2005; Khatib et al., 2007). Sheehy et al. (2009) analisaram quatro genes candidatos para esse QTL encontrado no BTA 6 relacionado com a produção de leite (*OPN*, *ABCG2*, *LAP3* e *PKD2*), nos quais foi detectado uma expressão mais evidente da proteína OPN nas células da glândula mamária durante o ciclo de lactação, sendo esse ciclo considerado o provável responsável pelo efeito do QTL e um importante regulador da expressão genética das proteínas do leite em bovinos. Entretanto, não foi descartado o efeito dos demais possíveis genes candidatos analisados.

Os dados apresentados por Sheehy et al. (2009) demonstraram o potencial impacto da análise e do uso dos polimorfismos do *OPN* visando à seleção assistida por marcadores (SAM) para a produção de leite.

2.4. O gene da osteopontina

O gene *OPN* (Figura 5) é conhecido nos estudos de genoma humano e um forte gene candidato para o estudo de associação com a produção de leite em bovinos devido a seu comprovado envolvimento biológico tanto com a característica e como no desenvolvimento da glândula mamária (Senger et al., 1989; Nemir et al., 1989; Sorensen & Petersen, 1994; Bayless et al., 1997; Nagatomo et al., 2004; Kumura et al., 2004; Christensen et al., 2005).

A primeira descrição da proteína desse gene foi como um marcador de transformação das células epiteliais em humanos (Senger et al., 1979), mas com expressão em uma variedade de tecidos indicando uma multiplicidade de funções, embora não tenha sido estabelecido um papel definitivo para o gene

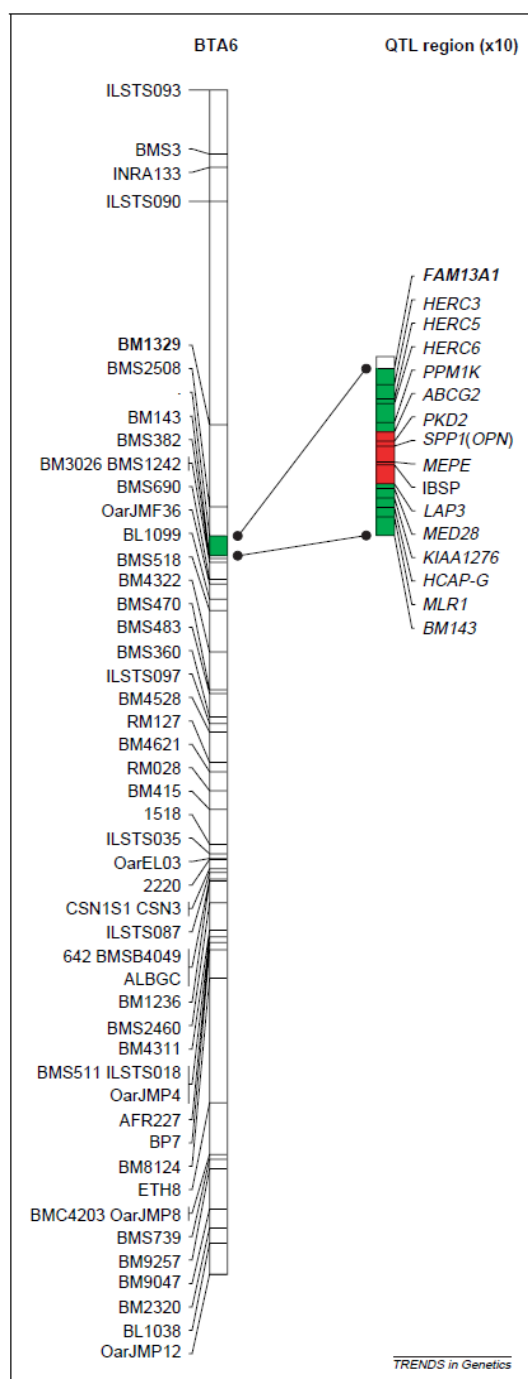


Figura 4. Mapa de ligação do cromossomo 6 (BTA6); região de 420 Kb (vermelho) e genes na região do QTL (verde). Fonte: de Koning, 2006.

(Chabas, 2005). O termo *SPP1* (*secreted phosphoprotein 1*) foi introduzido como um nome alternativo e reflete o vasto papel funcional do gene, que pode apresentar diferentes funções na fisiologia da glândula mamária (Scheehy et

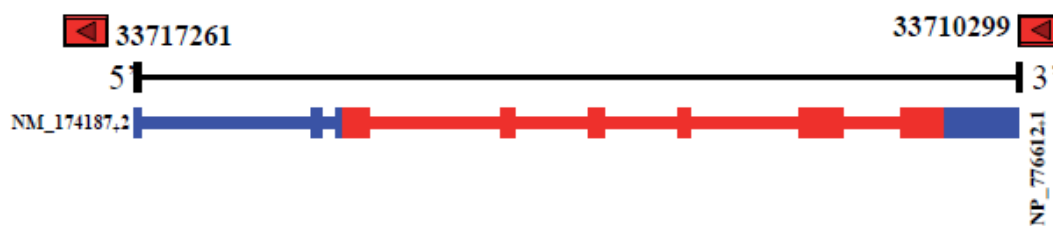


Figura 5. Representação esquemática da organização do gene *OPN* em bovinos do banco de dados de sequência do genoma bovino. Azul: região não traduzida; Vermelho: região codificante. Fonte: Ensembl, 2009.

al., 2009). A proteína OPN é uma glicoproteína altamente fosforilada já identificada em diferentes espécies, por exemplo, bovinos, humanos e camundongos, localizada nos cromossomos 6, 1 e 5, respectivamente (Fisher et al., 2001). No genoma bovino, o *OPN* compreende 7 éxons abrangendo cerca de 7 kb (GenBank: NW_255516, GeneID: 281499) codificando uma proteína de 278 aminoácidos (Pareek et al., 2008a). Fazendo um paralelo ao gene descrito em búfalos, a sequência das regiões compreendidas de éxons apresenta 6 nucleotídeos diferentes sendo algumas modificações não sinônimas, estão presentes duas inserções, o que resulta em uma proteína com 280 aminoácidos nessa espécie (Tantia et al., 2008). As modificações pós-transcricionais e a natureza ácida da proteína OPN possivelmente são os responsáveis pelas diferenças no tamanho molecular da proteína nas diferentes espécies (Nemir et al., 1989). A proteína OPN identificada no leite bovino é composta por 262 aminoácidos e tem uma massa molecular estimada de 66 kDa (Sorensen; Petersen, 1994). Christensen et al. (2005) relataram modificações pós-transcricionais de 36 sítios de fosforilação nessa proteína presente no leite humano.

A proteína está envolvida em diferentes eventos biológicos e

presente em diferentes tecidos, por exemplo, no plasma seminal em bovinos (Cancel et al., 1997), no crescimento e na remodelação óssea em humanos (Denhardt; Noda, 1998), nas células imunes mediadoras, na remodelação do tecido, na cicatrização em humanos (Denhardt; Guo 1993; Sodek et al. 2000) e no pulmão (Kohan et al., 2007). Um modelo de camundongo transgênico expressando o mRNA anti-senso do gene *OPN* na glândula mamária mostrou que essa proteína é necessária para o desenvolvimento normal da glândula e para a lactação (Nemir et al., 2000). A proteína foi identificada no leite de diferentes espécies, incluindo o leite humano, no qual é encontrado em uma concentração superior a 1×10^3 mg/L, sugerindo importante papel na diferenciação e na proliferação das células epiteliais da glândula mamária (Nagatomo et al., 2004). No leite bovino, foi detectado uma concentração de 8 mg/L no leite cru (Bayless et al., 1997) e também foi identificada na glândula mamária de ratos (Nemir et al., 2000). Em contraste, a abundância de OPN na secreção mamária bovina não é identificada na fase inicial da lactação, mas no leite produzido alguns dias após o parto, sendo a concentração de OPN na persistência da lactação em bovinos estimada em cerca de 10 mg/L (Kumura et al., 2004). Em outro estudo, Senger et al. (1989) encontraram uma concentração de 3 a 10 $\mu\text{g/mL}$ da proteína no leite humano. Embora existam diferenças nas concentrações encontradas no leite humano, há grandes diferenças entre os níveis de proteína no leite bovino e no leite humano, mesmo na fase tardia da lactação. O papel biológico da proteína no leite humano, especialmente em fase final de lactação, ainda é discutido (Nagatomo et al., 2004; Sheehy et al., 2009).

Diferentes estudos em animais da raça holandesa detectaram o gene *OPN* associado à produção de leite e de seus constituintes (Cohen et al., 2004; Leonard et al., 2005; Schnabel et al., 2005; Khatib et al., 2007). Cohen et al. (2004) investigaram a associação de 12 SNP de 10 genes, localizados na região do marcador microssatélite BM143 no meio do BTA6, com a produção de leite e de seus constituintes em 420 touros da raça holandesa. Entre os 10 genes analisados, o *OPN* apresentou o maior desequilíbrio de ligação e efeitos sobre o percentual de proteína. Além disso, com a análise de expressão na glândula mamária em bovinos, Cohen *et al.* (2004) concluíram que esse gene candidato é o que fundamentalmente influencia o percentual de proteína do leite.

Leonard et al. (2005) identificaram um SNP C/T no íntron quatro do gene *OPN* associado ao aumento do percentual de gordura e de proteína no leite. Schnabel et al. (2005), utilizando marcador microssatélite (SSR - *single sequence repeat*) na região regulatória desse gene, detectaram associação com as características do leite, por meio de uma deleção *upstream* do promotor de *OPN* (OPN_3907). A região é a portadora de elementos regulatórios tecido-específico do gene. Khatib et al. (2007) confirmaram a associação detectada por Leonard et al. (2005), analisando duas populações independentes da Universidade de Wisconsin da raça holandesa. Contudo, a correlação negativa existente entre a produção de gordura e proteína com a produção do leite sugere o envolvimento de um mecanismo de modulação do potencial osmótico do leite, resultando em um leite mais fluido e com menos sólidos, apesar de a expressão do gene *OPN* estar relacionada com as proteínas do leite β -caseína

e κ -caseína (Sheehy et al., 2009).

Cohen-Zinger et al. (2005) sugeriram o gene *ABCG2* como candidato para a produção de leite, sendo a mutação Y581S a causal para o efeito do QTL detectado no BTA6, pois a região em que se encontra o *OPN_3907* descrito por Schnabel et al. (2005) é uma região hipervariável. de Koning (2006) revisou o trabalho desses dois grupos e sugeriu que ambos os alelos, do gene *OPN* e do gene *ABCG2*, estão em LD com a mutação responsável pelo efeito no QTL no BTA6. Olsen et al. (2007), analisando novamente essa região, incluindo os alelos do *OPN* e *ABCG2*, reportaram que o *OPN_3907* poderia ser excluído e sugeriram o gene *ABCG2* (Y581S) por estar em LD com a mutação causal.

A significativa associação de diferentes polimorfismos do gene *OPN* com a característica do leite em diferentes estudos com animais da raça holandesa são consistentes, apesar de o conflito de opiniões apontarem para diferentes genes candidatos responsáveis pelo efeito do QTL no BTA6 (de Koning, 2006). Uma análise do polimorfismo (C/T) localizado no íntron quatro do gene *OPN*, analisado primeiramente por Leonard et al. (2005), avaliando características de crescimento, associou o alelo T desse SNP ao alto peso corporal em touros jovens e novilhas da raça holandesa (Pareek et al., 2008b). Essa associação vem ao encontro dos resultados obtidos por White et al. (2007) e Allan et al. (2007), que avaliaram o provável QTN (nucleotídeo de característica quantitativa) descrito e associado às características do leite por Schnabel et al. (2005), para características de crescimento em sete principais raças de gado de corte nos EUA, reforçando a importância desse gene

candidato, também, para características como ganho de peso e crescimento.

O envolvimento do gene *OPN* para a produção de leite e a comprovada associação do SNP (C/T) localizado no íntron quatro desse gene com constituintes do leite na raça holandesa reforçam a importância de caracterização desse gene na raça girolando. Neste trabalho, avaliamos a diversidade genética do SNP localizado no íntron quatro do gene *OPN* em animais da raça girolando e avaliamos a sua associação com a produção de leite.

3. Hipóteses

O polimorfismo C/T localizado no íntron quatro do gene *OPN* estaria presente nos animais da raça girolando.

O polimorfismo C/T do gene *OPN* estaria associado à produção de leite em animais da raça girolando.

Os alelos desse gene apresentariam efeitos aditivos sobre a produção de leite na raça girolando, conforme o observado em outras características do leite na raça holandesa.

4. Objetivos

Avaliar a diversidade genética do polimorfismo C/T no íntron quatro do gene candidato *OPN* utilizando marcador molecular do tipo SNP em uma população de animais da raça girolando.

Verificar a associação entre os alelos do polimorfismo C/T desse gene com a produção de leite nesses animais.

Estimar os efeitos de aditividade e de dominância dos alelos desse SNP nos animais para a produção de leite.

5. Material e Métodos

5.1. Dados

Para o isolamento do DNA genômico, foram coletadas amostras de sêmen de 87 touros da raça girolando, compreendendo os 10 grupos em teste, e de sangue de 347 vacas filhas desses animais, todos esses participantes do Teste de Progênie da raça girolando coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela GIROLANDO. Os animais são provenientes de fazendas de diferentes localidades do Brasil, todas colaboradoras do Teste de Progênie da raça. As amostras foram coletadas pela associação de criadores quando das visitas para controle leiteiro ou de classificação linear dos animais.

Para cada vaca, foram coletadas duas amostras de 2 mL de sangue coletados em tubos Vaccuteiner® com EDTA 0,5%. As amostras de sangue coletadas nas diferentes propriedades participantes do Teste de Progênie foram transportadas em caixas isotérmicas até a associação de criadores de girolando e de lá encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular (LGM) da Embrapa Gado de Leite, em Juiz de Fora (MG). As amostras de sêmen foram coletadas nas centrais de inseminação e armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) e assim enviadas para o LGM.

5.2. Extração do DNA

O DNA genômico foi extraído das células do sangue e do sêmen utilizando-se o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), conforme recomendado pelo fabricante. O DNA total extraído foi quantificado

por espectrofotometria (Nanodrop®1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, EUA), sendo a relação A_{260}/A_{280} utilizada para avaliação da qualidade do material. As concentrações de DNA obtidas foram padronizadas para uma solução de trabalho a 20 ng/ μ L e estocadas a -20°C até o uso.

5.3. Amplificação do gene *OPN* e genotipagem

O estudo da variabilidade do gene *OPN* foi realizado por meio da análise do marcador molecular do tipo SNP, localizado no íntron quatro desse gene, utilizando a técnica de PCR-RFLP (Haliassos et al., 1989) para diferenciação dos alelos. Para a análise, foram utilizados os *primers* descritos por Leonard et al. (2005), desenhados para uma população americana da raça holandesa (Tabela 1). As condições da reação da PCR foram otimizadas seguindo o procedimento descrito por Leonard et al. (2005), com algumas modificações. As reações foram realizadas em um volume final de 25 μ L contendo 2 mmoles/L de cada dNTP, 1X de *GoTaq®Green Master Mix* (Promega Corporation, Madison, EUA), 5 picomoles de cada *primer* e 70 ng de DNA. As reações foram conduzidas em termociclador GeneAmp® PCR System 9.700 (Applied Biosystems Inc., Foster City, EUA) com um período inicial de desnaturação a 95°C por 5 min, seguidas de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 45 s, 50°C por 45 s e 72°C por 45 s e um período adicional de polimerização a 72°C por 7 min.

Para distinguir as duas formas variantes do SNP (C/T) do gene *OPN*, 15 μ L do produto da reação de PCR foi digerido com 2,5 U da enzima de restrição *Bsr I* (New England Biolabs, Inc., Ipswich, EUA) em um volume final

Tabela 1. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação do íntron quatro do gene da osteopontina (*OPN*).

Primer	Sequência (5' → 3')	
<i>OPN</i>	F	GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC
	R	CCAAGCCAAACGTATGAGTT

de 20 µL incubada a 65°C por 3 h, seguido por período adicional de inativação de 80°C por 20 minutos, conforme recomendado pelo fabricante. O padrão dos fragmentos foi observado em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo (0,02 µL/mL) para o estabelecimento dos genótipos. A eletroforese foi realizada a 80 V durante 50 min, para a separação completa dos fragmentos amplificados de acordo com seu tamanho em pb. Os fragmentos foram visualizados em fotodocumentador modelo *Eagle Eye II* (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, EUA) e o seu tamanho foi comparado com os fragmentos do marcador de 100 pb DNA *Ladder* (Fermentas INC., Hanover, EUA) para verificar se os tamanhos gerados pela digestão correspondem aos descritos na literatura.

5.4. Análise estatística

5.4.1. Análise de diversidade genética para o SNP (C/T) no

íntron quatro do gene *OPN*

As medidas de diversidade genética na população para o gene *OPN* foram obtidas pela utilização dos programas Genepop web version 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Rousset, 2008). A partir das frequências alélicas, foram obtidos os índices de diversidade genética da população. Com o objetivo de avaliar a variabilidade e o grau de estruturação da população, foram

estimados os parâmetros F_{IS} e F_{ST} , sendo este último realizado por meio da avaliação entre cada sexo, formando duas populações. O parâmetro F_{IS} é a correlação de genes de cada indivíduo dentro da sua população e indica o desvio de heterozigosidade entre os indivíduos em relação à sua população; o F_{ST} indica se existe diferenciação populacional (Weir; Cockerman, 1984). Analisar o parâmetro F_{ST} é importante para se avaliar a diferenciação entre touros e vacas, tendo em vista que os touros sofrem maior pressão e intensidade de seleção dentro do rebanho.

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi obtido por teste de probabilidade utilizando o método de cadeias de Markov mediante análise dos seguintes parâmetros: 2.500 de desmemorização, 120 batches e 1.000 permutações.

5.4.2. Análise de associação do SNP (C/T) do íntron quatro do gene *OPN* com a produção de leite

Os dados fenotípicos de produção de leite das 159 vacas utilizados no estudo de associação são provenientes do serviço de controle leiteiro da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (GIROLANDO) e compõem o Arquivo Zootécnico Nacional de Gado de Leite, gerenciado pela Embrapa Gado de Leite. As estimativas de PTA para a produção de leite, utilizadas para a análise dos 32 touros e 159 vacas avaliadas, são provenientes da avaliação genética realizada pela Embrapa Gado de Leite.

A análise de associação entre o SNP (C/T) no íntron quatro do gene *OPN* e a produção de leite foi realizada utilizando dados de produção até 305

dias (P305) e a capacidade prevista de transmissão (PTA). Para os dados de PTA, os efeitos positivos de um adicional alelo nos filhos(as) de determinado reprodutor são necessariamente aditivos, pois essa estimativa baseia-se no valor genético de cada animal, que representa a soma de todos os efeitos dos alelos. Assim, para esse conjunto de dados, o seguinte modelo de substituição alélica foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \beta_{x_{ij}} + \varepsilon_{ij},$$

onde, Y_{ij} é o valor relativo da PTA do filho(a) j do touro i ; μ é uma constante geral, S_i é o efeito fixo do touro i ; β é o coeficiente de regressão representando metade do efeito de substituição de alélica ($\alpha / 2$), x_{ij} é o número alelos C (0, 1 ou 2) no loco do gene *OPN* no filho(a) j de touro i e ε_{ij} é o efeito residual. As estimativas de PTAs foram ponderadas pelos valores das confiabilidades para obter estimativas de quadrados mínimos ponderados do efeito de substituição alélica.

Os dados de P305 utilizados foram os registros individuais de cada vaca, portanto, os efeitos alélicos não são necessariamente aditivos. Assim, os dados foram analisados seguindo o seguinte modelo de efeitos fixos:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_j + GC_k + CG_l + O_m + \varepsilon_{ijklm}$$

no qual Y_{ijklm} representa os desvios de produção da vaca i , filha do touro j μ é uma constante geral; S_j é o efeito fixo do j -ésimo touro; GC_k é o efeito fixo do k -

ésimo grupo contemporâneo ($k = 1, 2, \dots, 45$) (rebanho e estação de parto); CG_l é o efeito fixo da *l-ésima* composição genética ($l = 1, 2, 3, 4$); O_m é o efeito do *m-ésimo* genótipo do OPN ($m=CC, CT, TT$); ε_{ijklm} efeito residual.

O efeito genético aditivo do loco foi estimado como metade da diferença entre os dois grupos de homozigotos, como $\delta_{CC} - \delta_{TT}/2$. O efeito de dominância foi estimado como a diferença entre o grupo de heterozigotos e a média dos grupos dos 2 homozigotos no loco. A associação foi realizada por meio do procedimento GLM do SAS 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary).

CAPÍTULO II

Análise de diversidade genética do gene da osteopontina em bovinos da raça girolando¹

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia (Apêndice 1).

Análise de diversidade genética do gene da osteopontina em bovinos da raça girolando

Fernanda de Mello¹, Marta Fonseca Martins Guimarães², Jaime Araújo Cobuci¹, Marcos Vinícius Barbosa da Silva², José Braccini Neto¹, Daisyléa de Souza Paiva³

Resumo: O objetivo deste trabalho foi obter os índices de diversidade genética para o SNP (*single nucleotide polymorphism*) do íntron quatro do gene da osteopontina (*OPN*) para 434 animais (87 touros e 347 vacas) participantes do Teste de Progênie da raça Girolando no Brasil. Para a amplificação, foram utilizados *primers* descritos para a raça holandesa, e a diferenciação dos alelos C/T desse SNP foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. As frequências genotípicas TT (52,53%), CT (38,71%) e CC (8,76%) e as frequências alélicas de T (71,9%) e C (28,1%) indicam que a população encontra-se em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) ($p > 0,05$). Apesar do loco do gene *OPN* estar em EHW, a frequência superior do alelo T do SNP nesses animais pode sugerir uma tendência de fixação do alelo T na raça. Não foi observada diferenciação entre o grupo de touros e vacas ($F_{st} = -0,018$), corroborando a estimativa de equilíbrio da população. Por meio dos valores estimados pelo F_{IS} (0,043), sugerimos que os altos números de indivíduos homocigotos para o alelo T observados na população aconteçam em virtude da provável herança desse alelo vindo raça zebuína, e não a endogamia. Assim, para melhor caracterização do polimorfismo do gene *OPN*, avaliações em um maior número de animais devem ser realizadas, uma vez que só foram avaliados animais participantes do Teste de Progênie.

Palavras-chave: diversidade genética, girolando, osteopontina, SNP

¹ UFRGS, Porto Alegre, RS, email: fernandade.mello@gmail.com

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

³ UFJF, Juiz de Fora, MG

Analysis of genetic diversity of osteopontin gene in cattle girolando

Abstract: The objective was to obtain the indices of genetic diversity for the SNP (single nucleotide polymorphism) of the four intron gene osteopontin (*OPN*) for 434 animals (87 bulls and 347 cows) participants in the Progeny Test Girolando in Brazil. For amplification, primers used were described for the Holstein breed, and differentiation of alleles C/T SNP that was obtained by PCR-RFLP. TT genotype frequency (52.53%), CT (38.71%) and CC (8.76%) and allele frequencies of T (71.9%) and C (28.1%) indicate that the population is in Hardy-Weinberg (EHW) ($p > 0.05$). Despite the *OPN* gene locus being in EHW, the higher frequency of allele T of SNP in these animals may suggest a trend-setting T allele in the race. No difference was observed between the group of bulls and cows ($F_{st} = -0.018$), supporting the estimate of population balance. Through the values estimated by the F_{is} (0.043), suggest that high numbers of individuals homozygous for the T allele observed in the population occur because of possible inheritance of this allele been zebu breed, not inbreeding. Thus, to better characterize the *OPN* gene polymorphism, assessments in a larger number of animals must be performed, since only animals were assessed participants Progeny Test.

Key Words: genetic diversity, girolando, osteopontina, SNP

Introdução

Animais da raça girolando destacam-se no cenário nacional em função de sua representatividade na produção de leite, sendo responsáveis por 80% da produção total no Brasil (ABCG, 2009). Estudos sobre a diversidade genética de raças sintéticas permitem aumentar a eficiência do processo de resposta seleção assegurando a diversidade genética. Na diversidade genética, reside toda a capacidade de se promover seleção, e conseqüentemente melhoramento genético (Filho, 1999). A manutenção da diversidade é necessária para que os indivíduos se adaptem às mudanças, evitando a conseqüente perda da diversidade alélica que pode tornar a população mais suscetível a novas doenças e parasitoses, por exemplo. Além do mais, a perda da heterozigosidade em populações selecionadas reduz a probabilidade de fixar genes favoráveis diminuindo a resposta genética à seleção, a médio e longo prazo (Cunha et al., 2004).

Estudos prévios identificaram o gene da osteopontina (*OPN*) como candidato posicional para a produção de leite na raça holandesa (Zhang et al., 1998; Olsen et al., 2004). Esse gene, também conhecido como *SPP1* (*Secreted Phosphoprotein 1*), apresenta expressão em diferentes tecidos, mas a sua presença no leite e sua alta expressão nas células epiteliais da glândula mamária sugerem a importância dessa glicoproteína no desenvolvimento das características do leite (Nagatomo et al., 2004). Um polimorfismo de um único nucleotídeo (SNP) C/T no gene *OPN* localizado no íntron quatro foi associado ao aumento nos percentuais de proteína e gordura no leite, sendo o alelo C responsável por efeito aditivo das características (Leonard et al., 2005). Khatib et al. (2007) confirmaram os resultados encontrados por Leonard et al. (2005) na raça holandesa, reforçando a importância desse gene na expressão das características produtivas em bovinos leiteiros.

Para melhor entendimento da variabilidade genética e, principalmente, sua importância, há necessidade de se conhecer a constituição genética da população (Filho, 1999). Avaliar animais da raça girolando para o polimorfismo do gene *OPN* permite verificar como esse gene está distribuído na população e, futuramente, relacioná-lo com os registros produtivos visando a uma possível associação desse gene com a de produção de leite. Assim, o objetivo deste trabalho consiste em investigar a diversidade genética do polimorfismo C/T do íntron quatro do gene *OPN* em animais participantes do Teste de Progênie da raça girolando.

Material e Métodos

Para a obtenção dos dados genotípicos, foram coletadas amostras de sêmen de 87 touros da raça, representando a totalidade de reprodutores participantes do Teste de Progênie disponíveis até julho de 2009, e sangue de 347 vacas filhas desses animais. Todos os animais avaliados são participantes do Teste de Progênie da raça girolando coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando - GIROLANDO, totalizando 434 animais avaliados. Os animais (touros e vacas) participantes deste trabalho são provenientes de diferentes propriedades distribuídas por diferentes localidades do Brasil, todas colaboradoras oficiais do Teste de Progênie da raça girolando.

O DNA genômico foi extraído das células do sangue e do sêmen utilizando-se o DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA) como recomendado pelo fabricante. O DNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA), sendo a relação A_{260}/A_{280} utilizada para a avaliação da qualidade. O polimorfismo no gene *OPN*

(GenBank NW_255516; GeneID: 281499) foi acessado por meio do SNP, localizado no íntron quatro desse gene por meio dos *primers* descritos por Leonard et al. (2005) e utilizando a técnica de PCR-RFLP para diferenciação dos alelos. A amplificação do DNA genômico foi realizada com o volume final de 25 μ L contendo 2 mmoles/L de cada dNTP, 1X de GoTaq®Green Master Mix (Promega), 5 picomoles de cada *primer* e 70 ng de DNA. As temperaturas e os ciclos para a amplificação foram os seguintes: um período inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por 45 s e um período adicional de polimerização a 72°C por 7 min. Para distinguir as duas formas variantes do SNP do gene *OPN*, 15 μ L do produto da reação de PCR foram digeridos com 2,5 U da enzima de restrição Bsr I (New England Biolabs, Inc., Ipswich, EUA) em um volume final de 20 μ L incubados a 65°C por 3 h, seguidos de um período de 20 min a 80°C para a inativação total da enzima. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1,5% para a detecção dos genótipos. O alelo T é identificado pela presença de uma banda não digerida de 290 pb, e o alelo C é identificado por uma banda clivada com 200 pb.

As medidas de diversidade genética na população para o gene da *OPN* foram obtidas pela utilização do programa Genepop web version 4.0 (<http://genepop.curtin.edu.au/>) (Rousset, 2008). A partir das frequências alélicas, foram obtidos os índices de diversidade genética da população. Com o objetivo de avaliar a variabilidade e o grau de estruturação da população, foram estimados os parâmetros F_{IS} e F_{ST} , sendo este último realizado por meio da avaliação dos indivíduos dentro de cada sexo na população. O parâmetro F_{IS} é a correlação de genes de cada indivíduo dentro da sua população e indica o desvio de heterozigosidade entre os indivíduos em relação à sua população, enquanto o F_{ST} indica se existe diferenciação populacional (Weir &

Cockerman, 1984). Analisar o parâmetro F_{ST} é importante para se avaliar a diferenciação entre touros e vacas, tendo em vista que os touros sofrem maior pressão e intensidade de seleção dentro do rebanho.

O equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi obtido por teste de probabilidade utilizando o método de cadeias de Markov mediante análise dos seguintes parâmetros: 2.500 de desmemorização, 120 *batches* e 1.000 permutações.

Resultados e Discussão

Como produto da amplificação do polimorfismo C/T do SNP no íntron quatro do gene *OPN*, foi obtida uma banda de 290 pb, com dois alelos polimórficos representados por três fragmentos de 290, 200 e 90 pb, a partir da digestão enzimática do produto da PCR, sendo o alelo T identificado por uma banda não digerida de 290 pb, e o alelo C com duas bandas digeridas de 200 e 90 pb (Figura 1).

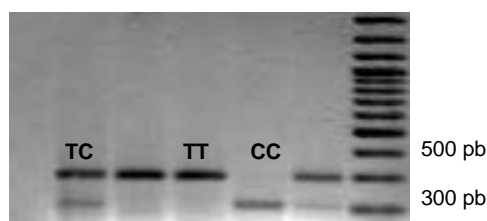


Figura 1. Perfil genotípico do SNP C/T nos animais participantes do PMGG. Gel de agarose 1,5%. À direita: marcador molecular de 100 pb DNA Ladder (Fermentas INC., Hanover, EUA), fragmentos de 500 pb e 300 pb identificados; à esquerda: genótipos do SNP C/T identificados; alelo T (290 pb) e alelo C (200 pb).

As frequências dos alelos T (0,719) e C (0,281) não estão igualmente distribuídas na população, tampouco as frequências genotípicas. Embora haja um número menor de heterozigotos observados, a população está em equilíbrio (Tabela 1).

Os resultados observados neste estudo estão de acordo com os encontrados por

Tabela 1. Frequências alélicas e genótípicas, equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e estatísticas F (F_{IS} e F_{ST}) da população de animais participantes do programa de melhoramento genético da raça girolando para o polimorfismo C/T do íntron quatro do gene da osteopontina.

Genótipos	Frequências observadas		Frequências alélicas	E-HW (p -valor)	F_{IS}	F_{ST}
	Genótípicas (%)	Esperada				
CC	8,76	7,88	28,1			
CT	38,71	40,46		0,4061*	0,043	-0,018
TT	52,53	51,66	71,9			

* $P > 0,05$

Pareek et al. (2008a) que constataram frequência superior do alelo T (60,8%) em relação ao alelo C (39,2%) em populações das raças leiteiras Polish Red e Polish Holstein. O que contrasta com a distribuição encontrada por Leonard et al. (2005) nas análises de populações leiteiras da raça holandesa, apresentando frequência de 49 e 51% para o alelo C e T, respectivamente. Khatib et al. (2007) observaram frequências genótípicas do gene *OPN* de 26, 51 e 23%, respectivamente, para os genótipos TT, CT e CC desse SNP divergindo das frequências genótípicas encontradas nos animais girolando, nos quais houve uma preponderância do alelo T. De acordo com Belonsky e Kenedy (1988), citados por Euclides (1996), o fato de a seleção baseada no BLUP atribuir maior importância às informações da família aumenta o grau de homozigose, acentuando assim as perdas na diversidade genética.

As estimativas de heterozigosidade observada e esperada não diferiram, pois a população encontra-se em EHW ($P > 0,05$). Em um estudo avaliando o SNP C/T do gene *OPN* em raças de gado de corte dos EUA, no qual a seleção é direcionada para característica de crescimento e de ganho de peso, a frequência do alelo T foi superior ao do alelo C em animais jovens das raças Limousine (60,4%) e Hereford (54,3%), sugerindo a importância desse alelo no desenvolvimento das características corporais

(Pareek et al., 2008a). Posteriormente, essa associação foi confirmada em famílias co-segregantes da raça holandesa da Polônia, onde foi detectado efeito significativo do alelo T do gene *OPN* com o maior peso corporal em novilhas e touros jovens com 3, 6 e 12 meses de idade (Pareek et al., 2008b). O alelo C desse mesmo SNP (C/T) do gene *OPN* foi associado ao aumento no percentual de gordura e proteína do leite em duas diferentes populações da raça holandesa (Leonard et al., 2005; Khatib et al., 2007).

A raça girolando historicamente foi selecionada para a produção de leite, em razão de a correlação genética entre produção de leite e seus constituintes ser negativa. Sendo o alelo C associado ao percentual de gordura e proteína no leite na raça holandesa, são compreensíveis os resultados encontrados de baixa frequência para esse alelo. Um estudo realizado com zebuínos da raça Nelore mostrou a ausência do alelo C na população analisada, sugerindo que a presença do alelo T é uma característica de *Bos taurus indicus*, mas não foi descartada a hipótese de seleção indireta nesse loco (Souza, 2007).

O método de avaliação utilizado na raça girolando favorece indivíduos dentro de uma mesma família e, conseqüentemente, pode aumentar o nível de homozigose na população, além de diminuir a variabilidade. Certo grau de consanguinidade é aparentemente inevitável, em função de que determinados indivíduos selecionados são utilizados de maneira intensa, o que tem como consequência o acasalamento de indivíduos com algum grau de parentesco maior do que aquele que ocorreria em estrutura totalmente aleatória de acasalamento (Filho, 1999). O parâmetro F_{IS} (0,043) é comparável à estimativa do f de Wright (1931) (Weir & Cockerman, 1984), portanto, com as baixas estimativas de endogamia encontradas, podemos sugerir que a população analisada apresenta um maior número de indivíduos homozigotos para o alelo T em

função de esse alelo ser herdado da raça zebuína e não devido à endogamia. Tendo em vista que o loco encontra-se em equilíbrio e, portanto, não sofre pressão de seleção diretamente, essa hipótese reforçaria os resultados encontrados por Souza (2007). Não foi observada diferenciação entre o grupo de touros e vacas ($F_{st} = -0,018$), corroborando a estimativa de equilíbrio para esse loco na população.

Conclusões

Os animais avaliados participantes do Teste de Progênie da raça girolando apresentam-se em EHW para o loco do SNP do íntron quatro do gene *OPN*. Apesar disso, observou-se uma frequência superior do alelo T desse SNP nesses animais, o que pode sugerir uma tendência de fixação do alelo T na raça. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de o alelo T ser uma característica de preponderância da raça zebuína sobre a taurina e isso estar estabelecido na raça girolando, ou então que tenha ocorrido uma seleção indireta nesse loco devido aos critérios de seleção aplicados na população. Assim, para futuras avaliações do polimorfismo no gene *OPN* em um maior número de animais da raça girolando devem ser realizados, uma vez que só foram avaliados animais participantes do Teste de Progênie.

Referências

- ABCG - Associação Brasileira de Criadores de Girolando [2009]. **Girolando-A Raça Mais Versátil Do Mundo Tropical**. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/site/ogirolando/performance.php>> Acesso em: 19/3/2009.
- CUNHA, E.E.; EUCLYDES, R.F.; TORRES, R.A. Variabilidade genética e limite da seleção em populações de diferentes tipos de acasalamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.2, p.242-250, 2004.
- EUCLYDES, R.F. **Uso do sistema para simulação Genesys na avaliação de métodos de seleção clássicos e associados a marcadores moleculares**. 1996. 149f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento). Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.
- FILHO, E.K. **Melhoramento genético animal no Brasil. Fundamentos, história e importância**. 1. ed. Campo Grande: Embrapa, v. 500, 1999. 63 p.
- KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; WIEBELHAUS-FINGER, J. et al. The Association of Bovine *PPARGCIA* and *OPN* Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2966–2970, 2007.
- LEONARD, S.; KHATIB, H.; SCHUTZKUS, V. et al. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4083–4086, 2005.
- NAGATOMO, T.; OHGA, S.; TAKADA, H. et al. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. **Clinical and Experimental Immunology**, v.138, p.47–53, 2004.
- OLSEN, H.G.; LIEN, S.; SVENDSEN, M. et al. Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.690–698, 2004.
- PAREEK, C.S.; ZIĘBA, M.; MICHNO, J. et al. Study of SNP C>T polymorphism within the candidate genes for dairy and beef traits in a panel of selected cattle breeds. **Journal of Agrobiology**, v.25, n.1, p.121-124 (a), 2008.
- PAREEK, C.S.; CZARNIK, U.; PIERZCHAŁA, M. et al. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within íntron IV of osteopontin encoding gene (*SPPI*) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. **Animal Science Papers and Reports**, v.26, n.4, p.251-257 (b), 2008.
- ROUSSET, F. **Genepop'007: a complete reimplementación of the Genepop software for Windows and Linux**. Mol. Ecol. Resources 8: 103-106 [2008]. Disponível em:<<http://genepop.curtin.edu.au/>> Acesso em 25/09/2009.

- SOUZA, F.R.P. **Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 96p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v.38, p.1358-1370, 1984.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, p.97-159, 1931.
- ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I. et al. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. **Genetics**, v.149, p.1959–1973, 1998.

CAPÍTULO III

Associação do gene da osteopontina com a produção de leite em bovinos da raça girolando¹

¹ Artigo elaborado de acordo com as normas da Revista Brasileira de Zootecnia (Apêndice 1).

Associação do gene osteopontina com a produção de leite em animais da raça girolando

Fernanda de Mello¹, Jaime Araújo Cobuci¹, Marta Fonseca Martins Guimarães², José Braccini Neto¹, Marcos Vinícius Barbosa da Silva².

Resumo: A busca por marcadores moleculares associados à produção do leite visando à seleção assistida (SAM) é crescente na bovinocultura leiteira. Nesse sentido, o gene da osteopontina (*OPN*) destaca-se em diferentes estudos como um forte gene candidato posicional para a produção do leite. O objetivo deste trabalho foi avaliar a associação entre o polimorfismo do íntron quatro do gene *OPN* e a produção de leite em animais participantes do Teste de Progênie da raça girolando, analisando as variáveis de produção em até 305 dias (P305) e a capacidade prevista de transmissão (PTA). Foram analisados 32 touros e 159 vacas, segregantes para os alelos desse gene. Para amplificação foram utilizados *primers* descritos para a raça holandesa, sendo que a diferenciação dos alelos C/T desse SNP foi obtida por meio da técnica de PCR-RFLP. A análise de associação foi realizada por meio da análise de regressão. Não foi detectada associação entre o gene *OPN* e as variáveis analisadas, P305 e PTA, na raça girolando. A estimativa do coeficiente de regressão para o número de cópias para o alelo C indica que esse alelo não está relacionado com a PTA de leite em vacas e touros, havendo um decréscimo na PTA das vacas (-12,29 Kg) e no efeito aditivo da P305 (-41,10 Kg) na sua presença, embora não significativo. Outros estudos devem ser conduzidos, avaliando maior número de características produtivas e maior número de SNPs nesse gene para melhor caracterização do seu envolvimento na produção de leite nessa raça.

Palavras-chave: Associação, girolando, osteopontina, SNP

¹ UFRGS, Porto Alegre, RS, email: fernandade.mello@gmail.com

² Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

Osteopontin gene association with Milk production in animals Girolando

Abstract: The search for molecular markers associated with the production of milk in order to assisted selection (MAS) is increasing in dairy cattle. Accordingly, the gene osteopontin (*OPN*) stands out in various studies as a strong positional candidate gene for milk production. The aim of this study was to evaluate the association between polymorphism of íntron four *OPN* gene and milk production in animals participating Progeny Test Girolando, analyzing production variables in 305 days (P305) and predicted transmitting ability (PTA). We analyzed 32 bulls and 159 cows, segregating for the alleles of this gene. Primers used for amplification were described for the Holstein breed, and the differentiation of alleles C/T SNP that was obtained by PCR-RFLP. The association analysis was performed using regression analysis. No association was found between *OPN* gene and the other variables, P305 and PTA, race girolando. The estimated regression coefficient for the number of copies for the C allele indicates that this allele is not related to PTA of milk cows and bulls, with a decrease in the PTA of cows (-12.29 kg) and the additive effect of P305 (-41.10 kg) in its presence, although not significant. Other studies should be conducted, evaluating a larger number of productive characteristics and a higher number of SNPs in this gene for further characterization of their involvement in the production of milk in this breed.

Key Words: association, girolando, osteopontin, SNP

Introdução

A raça girolando apresenta grande expressividade na produção de leite brasileira (ABCG, 2009). A Associação de Criadores da Raça Girolando (GIROLANDO) em parceria com a Embrapa Gado de Leite desenvolve o programa de melhoramento da raça girolando (PMGG) que visa, dentre outras metas, a identificar marcadores moleculares para a raça associados às características do leite. A seleção assistida por marcadores (SAM) representa uma importante ferramenta para o progresso genético, de modo que pode resultar em melhoria na eficiência e na precocidade da seleção dos indivíduos dentro do rebanho.

Diferentes estudos de mapeamento identificaram QTLs (locos de característica quantitativa) afetando as características do leite no cromossomo 6 (BTA6) em bovinos, na região em que se encontra o gene da osteopontina (*OPN*), sendo esse gene considerado candidato posicional para a produção do leite (Zhang et al., 1998; Nadesalingam et al., 2001; Ron et al., 2001; Ashwell et al., 2004; Olsen et al., 2004). Esse gene, também conhecido como SPP1 (Fosfoproteína Secretada 1), codifica uma glicoproteína fosforilada com funções pleiotrópicas e envolvida em diferentes eventos biológicos (Denhardt & Guo, 1993; Denhardt & Noda, 1998; O'Regan et al., 2000). A molécula participa de processos fisiológicos de adesão celular, comunicação entre célula e matriz extracelular via células GRGDS, mineralização tecidual, deposição de fosfato de cálcio no osso, entre outros processos (Chabas, 2005). Sua presença no leite e sua alta expressão nas células epiteliais da glândula mamária sugerem um importante envolvimento do *OPN* na produção de leite (Nagatomo et al., 2004).

Schnabel et al. (2005) identificaram um provável QTN (nucleotídeo de característica quantitativa) (T9/T10) denominado OPN_3907, localizado na região

regulatória do gene *OPN* na raça holandesa, com efeito significativo sobre a produção de leite, percentual de gordura e proteína. Similarmente, Leonard et al. (2005) descreveram um polimorfismo do tipo SNP (*single nucleotide polymorphism*) (C/T) na posição 8514, localizado no íntron quatro no gene *OPN*, e esse gene foi associado ao aumento no percentual de gordura e proteína no leite em duas diferentes populações da raça holandesa (Leonard et al., 2005).

Cohen-Zinger et al. (2005) sugeriram o gene *ABCG2* como candidato para a produção de leite, sendo a mutação Y581S a causal para o efeito do QTL detectado no BTA6, pois a região em que se encontra o provável QTN (T9/T10) descrito por Schnabel et al. (2005) é uma região hipervariável. de Koning (2006) revisou o trabalho desses dois grupos e sugeriu que ambos os alelos, do gene *OPN* (T9/T10) e do gene *ABCG2* (Y581S), estão em LD com a mutação responsável pelo efeito no QTL no BTA6. Olsen et al. (2007), ao analisar novamente essa região, incluindo os mesmos alelos do *OPN* e *ABCG2*, reportaram que *OPN_3907* poderia ser excluído e sugeriram que o gene *ABCG2* (Y581S) estaria em LD com a mutação causal. Posteriormente, a associação entre o SNP (C/T) 8514 localizado no íntron quatro do gene *OPN* com o aumento no percentual de gordura e proteína no leite foi confirmada em animais da raça holandesa por Khatib et al. (2007).

O envolvimento do gene *OPN* para a produção de leite e a consistente associação do SNP (C/T) 8514 do íntron quatro desse gene com constituintes do leite na raça holandesa reforçam a importância do gene no desenvolvimento da característica e de um estudo de associação desse gene na raça girolando. Neste trabalho, objetivou-se analisar a associação entre o polimorfismo C/T 8514 localizado no íntron quatro do gene *OPN* e a produção de leite em animais participantes do Teste

de Progênie da raça girolando.

Material e Métodos

Obtenção dos dados:

Para a extração de DNA, foram coletadas amostras de sêmen de 32 touros e sangue de 159 vacas, sendo todos participantes do Teste de Progênie da Raça Girolando coordenado pela Embrapa Gado de Leite e a GIROLANDO, totalizando um grupo de 191 animais.

A característica fenotípica avaliada foi a produção de leite referente à primeira lactação desse grupo de vacas, analisadas de acordo com a produção de leite em até 305 dias (P305) e a capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite. O grupo de touros avaliados apresenta composição genética de $\frac{3}{4}$ e $\frac{5}{8}$ da raça holandesa e o grupo de vacas apresenta a composição genética igual ou superior a $\frac{5}{8}$ da raça holandesa. Essas vacas nasceram entre os anos de 2003 e 2006, tendo seus partos entre 2005 e 2008. Grupos contemporâneos foram caracterizados pela combinação da estação de parto e o rebanho ao qual pertencia cada animal. Os dados foram editados para a eliminação de registros de lactação incompletos.

Os dados fenotípicos de produção de leite das 159 vacas são provenientes do Serviço de Controle Leiteiro da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando (GIROLANDO) e compõem o Arquivo Zootécnico Nacional de Gado de Leite, gerenciado pela Embrapa Gado de Leite. As estimativas de PTA para a produção de leite, utilizadas para a análise dos touros e suas filhas avaliadas, foram provenientes da avaliação genética realizada pela Embrapa Gado de Leite. Informações sobre os

registros de produção e dados de PTA para leite dos reprodutores e de suas filhas estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Médias, desvio-padrão (DP), valores mínimos e máximos para as variáveis de produção de leite em até 305 dias (P305), capacidade prevista de transmissão (PTA) em animais girolando e média das confiabilidades das PTAs.

Variáveis	Touros					Vacas				
	Média	DP	Min.	Máx.	Conf %	Média	DP	Min.	Máx.	Conf %
PTA	53.6	106.1	-81	308	71.8	22.6	81.2	-97	371	50.8
P305	-	-	-	-	-	3711.3	1530.8	1048	8190	-

Extração de DNA, detecção e genotipagem do polimorfismo:

O DNA genômico foi extraído das células do sangue e do sêmen utilizando-se o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA) conforme recomendado pelo fabricante. O DNA total obtido foi quantificado por espectrofotometria (Nanodrop®1000, Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, USA), sendo a relação A_{260}/A_{280} utilizada para avaliação da qualidade. O polimorfismo no gene *OPN* (GenBank NW_255516; GeneID: 281499) foi acessado por meio do SNP 8514 C/T localizado no íntron quatro desse gene utilizando o *primer OPNF*: 5' – GCAAATCAGAAGTGTGATAGAC - 3' e *OPNR*: 5' - CCAAGCCAAACGTATGAGTT - 3'. A genotipagem foi realizada por meio da técnica de PCR-RFLP para diferenciação dos alelos de acordo com Leonard et al. (2005). A amplificação do DNA genômico foi realizada com o volume final de 25 μ L contendo 2 mmoles/L de cada dNTP, 1X de GoTaq®Green Master Mix (Promega), 5 picomoles de cada *primer* e 70 ng de DNA. As temperaturas e os ciclos para a amplificação foram os seguintes: um período inicial de desnaturação a 95°C por 5 min., seguido de 40 ciclos de amplificação de 95°C por 45 s, 50°C por 45 s, 72°C por

45 s e um período adicional de polimerização a 72°C por 7 min. Para distinguir as duas formas variantes do SNP do gene *OPN*, 15 µL do produto da reação de PCR (290 pb) foram digeridos com 2,5 U da enzima de restrição *Bsr* I (New England Biolabs, Inc., Ipswich, EUA) em um volume final de 20 µL incubada a 65°C por 3 h, seguida de um período de 20 min a 80°C para a inativação total da enzima. O produto da digestão foi analisado em gel de agarose 1,5% para a detecção dos genótipos. O alelo T é identificado pela presença de uma banda não digerida de 290 pb, enquanto o alelo C é identificado por duas bandas de 200 pb e 90 pb.

Análise Estatística:

A análise de associação entre o gene *OPN* e a produção de leite foi realizada utilizando dados das variáveis P305 e de PTA de leite. Nos dados de PTA, os efeitos positivos de um alelo adicional nos filhos(as) de determinado reprodutor são necessariamente aditivos, pois essa variável representa o valor genético de cada animal, sendo este a soma de todos os efeitos dos alelos envolvidos na expressão da característica. As predições de PTAs foram ponderadas pelos valores das confiabilidades para obter estimativas de quadrados mínimos ponderados do efeito de substituição alélica. Assim, para o conjunto de dados de PTA do grupo de touros e vacas, o seguinte modelo de substituição alélica foi utilizado:

$$Y_{ij} = \mu + S_i + \beta_{x_{ij}} + \epsilon_{ij},$$

Em que, Y_{ij} é o valor relativo da PTA filho(a) j do touros i ; μ é uma constante geral, S_i é o efeito fixo do touro i ; β é o coeficiente de regressão representando metade do efeito de substituição de alélica ($\alpha / 2$), x_{ij} é o número alelos C (0, 1 ou 2) no loco do gene *OPN* no filho(a) j de touro i e ϵ_{ij} é o efeito residual.

Os dados de P305 utilizados foram os registros individuais de cada vaca, portanto, os efeitos alélicos não são necessariamente aditivos. Assim, os dados do grupo de vacas foram analisados seguindo o modelo de efeitos fixos:

$$Y_{ijklm} = \mu + S_j + GC_k + CG_l + O_m + \varepsilon_{ijklm}$$

No qual, Y_{ijklm} representa os desvios de produção da vaca i , filha do touro j ; μ é uma constante geral; S_j é o efeito fixo do j -ésimo touro; GC_k é o efeito fixo do k -ésimo grupo contemporâneo ($k = 1, 2, \dots, 45$); CG_l é o efeito fixo da l -ésima composição genética ($l = 1, 2, 3, 4$); O_m é o efeito do m -ésimo genótipo do *OPN* ($m = CC, CT, TT$); ε_{ijklm} efeito residual.

O efeito genético aditivo do loco foi estimado como metade da diferença entre os dois grupos de homozigotos, como $\delta_{CC} - \delta_{TT}/2$. Efeito de dominância foi estimado como a diferença entre o grupo de heterozigotos e a média dos grupos dos 2 homozigotos no loco. A associação foi realizada por meio da análise de regressão linear utilizando o procedimento GLM do SAS 9.1 (SAS Institute, Inc., Cary,).

Resultados e discussão

As variáveis para a produção de leite foram analisadas para a associação com o gene *OPN* no SNP 8514 C/T no grupo de touros e vacas. Os animais analisados foram segregantes para os alelos do gene. A associação entre o SNP 8514 C/T e as variáveis da produção de leite não foi significativa para os grupos avaliados de touros e vacas (Tabela 2). A estimativa do coeficiente de regressão para o número de cópias para o alelo C (metade dos efeitos da substituição alélica, $\alpha/2$) indica que esse alelo não está relacionado com a produção de leite nas vacas e touros, sendo que há um decréscimo

na PTA (-12,29 Kg) e no efeito aditivo da P305 (-41,10 Kg) das vacas na sua presença, embora não significativo.

Tabela 2. Estimativas dos efeitos de aditividade, dominância, estimativas da substituição alélica ($\alpha/2$) e *p*-valor associados ao SNP 8514 do gene da osteopontina (*OPN*) na população de vacas e touros da raça girolando para a produção de leite.

Variáveis	Substituição alélica ($\alpha/2$)	Efeito aditivo	Efeito dominante
P305	-	-41,10 (0,8590)	261,07 (0,4076)
PTA vacas	-12,29 (0,1973)	-	-
PTA touros	19,69 (0,5612)	-	-

Os resultados encontrados estão de acordo com os obtidos em estudos com animais da raça holandesa, nos quais as variantes desse gene não apresentaram nenhum efeito significativo sobre a produção de leite (Leonard et al., 2005; Khatib et al., 2007). O baixo percentual das confiabilidades para as estimativas de PTA nas fêmeas deve também ser levado em consideração, pois pode representar um maior erro, entretanto, os percentuais de confiabilidade utilizado por Leonard et al. (2005) para a análise no grupo de vacas foi similar aos obtidos em nossa população (55,6%), apesar de o número de vacas analisados ser superior ($n = 1362$ vacas).

A raça girolando, resultado do cruzamento entre duas subespécies (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), constitui um grupo genético muito particular, resultando em possíveis interações peculiares para a produção de leite, pois é sabido que a composição genética é um fator importante e afeta a produção de leite. Um estudo realizado com zebuínos da raça Nelore para esse SNP do gene *OPN* revelou a ausência do alelo C na população analisada, sugerindo que o alelo T constitui uma característica de *Bos taurus indicus*, mas não foi descartada a hipótese de seleção indireta nesse loco

(Souza, 2007). Na população de animais girolando participantes do Teste de Progênie da raça, a frequência do alelo T foi superior para esse loco podendo ser um indicativo da origem zebuína na raça girolando e, portanto, não sendo associado à produção de leite (dados não apresentados). Ou então, o baixo número de animais amostrados pode não ter proporcionado a sensibilidade necessária para a correta avaliação de tal associação.

A falta de conhecimento a respeito da magnitude dos efeitos das demais mutações presentes nesse gene pode resultar em resultados equivocados, e isso pode ficar evidente na raça girolando, na qual o grupamento genético diferente revela diferentes níveis de LD entre as mutações já conhecidas associadas às características do leite. Dado um grande número de estudos que QTL no BTA6 (Khatkar et al., 2004), existem muitas mutações e gene candidatos a serem testados.

Conclusões

A mutação 8514 do íntron quatro do gene *OPN* não está associada à produção de leite em até 305 dias nem à capacidade prevista de transmissão nos animais da raça girolando analisados neste trabalho. Futuramente, outros estudos devem ser conduzidos, avaliando um maior número de características produtivas na raça e um maior número de SNPs no gene *OPN* para melhor caracterização do envolvimento do gene na produção de leite na raça girolando.

Referências

- ABCG - Associação Brasileira de Criadores de Girolando [2009]. **Girolando-A Raça Mais Versátil Do Mundo Tropical**. Disponível em: <<http://www.girolando.com.br/site/ogirolando/performance.php>> Acesso em: 19/3/2009.
- ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTEGARD, T.S. et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**., v.87, p.468–475, 2004.
- CHABAS, D. L'ostéopontine, une molécule aux multiples facettes. **Medecine Sciences**, n.10, v.21, p.832-838, 2005.
- COHEN-ZINDER, M. et al. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and composition in Holstein cattle. **Genome Research**, v.15, p.936–944, 2005.
- de KONING, D.J. Conflicting candidates for cattle QTLs. **Trends in genetics : DNA differentiation & development**, v.22, p.301–305, 2006.
- DENHARDT, D.T.; GUO X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **The FASEB Journal**, v.7, p.1475-1482, 1993.
- DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, 30–31, 92–102, 1998.
- KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; WIEBELHAUS-FINGER, J. et al. The Association of Bovine *PPARGCIA* and *OPN* Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.2966–2970, 2007.
- KHATKAR, M.S.; THOMSON, P.C.; TAMMEN, I. and H. W. Raadsma. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, v.36, p.163–190, 2004.
- LEONARD, S.; KHATIB, H.; SCHUTZKUS, V. et al. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v.88, p.4083–4086, 2005.
- NADESALINGAM, J.; PLANTE, Y.; GIBSON, J.P. Detection of QTL for milk production on chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. **Mammalian Genome**, v.12, p.27–31, 2001.
- NAGATOMO, T.; OHGA, S.; TAKADA, H. et al. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. **Clinical**

and Experimental Immunology, v.138, p.47–53, 2004.

O'REGAN, A.W.; HAYDEN, J.M.; BERMAN, J.S. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Leukocyte Biology**, v.68, p.495-502, 2000.

OLSEN, H.G.; NILSEN, H.; HAYES, B. et al. Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the *ABCG2* gene affecting milk composition of dairy cattle. **BMC Genetics**, v.8, p.32, 2007.

OLSEN, H.G.; LIEN, S.; SVENDSEN, M. et al. Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. **Journal of Dairy Science**, v.87, p.690–698, 2004.

RON, M.; KLIGER, D.; FELDMESSER, E. et al. Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. **Genetics**, v.159, p.727–735, 2001.

SAS INSTITUTE INC., SAS 9.1.3, Cary, NC: SAS Institute Inc., 2002-2005.

SCHNABEL, R.D.; KIM, J.J.; ASHWELL, M.S. et al. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.6896–6901, 2005.

SOUZA, F.R.P. **Polimorfismo dos genes *MUC1* e *Osteopontina* em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 96p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.

ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I. et al. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. **Genetics**, v.149, p.1959–1973, 1998.

6. Considerações Finais

O gene da osteopontina (*OPN*) está em equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) na população de animais da raça girolando participantes do Teste de Progênie do PMGG. Os animais avaliados também se apresentam em EHW para o loco do SNP do íntron quatro do gene *OPN*. Apesar disso, observamos uma frequência superior do alelo T desse SNP nesses animais, o que pode sugerir uma tendência de fixação do alelo T na raça. Entretanto, não se pode descartar a hipótese de o alelo T ser uma característica herdada da raça zebuína e isso estar estabelecido na raça girolando, ou então, que essa frequência seja resultado de seleção indireta nesse loco devido aos critérios de seleção aplicados nesses animais. A mutação 8514 do íntron quatro do gene *OPN* não está associada à produção de leite em até 305 dias nem à capacidade prevista de transmissão nos animais da raça girolando analisados neste trabalho. Futuramente, outros estudos devem ser conduzidos, avaliando um maior número de características produtivas na raça e um maior número de SNPs no gene *OPN* para melhor caracterização do envolvimento do gene na produção de leite na raça girolando.

7. Referências Bibliográficas

- ABCG - Associação Brasileira de Criadores de Girolando, 2009. Uberaba, MG. [Informações]. Disponível em: <www.girolando.com.br> Acesso em: 19 mar. 2009.
- ALLAN, M.F.; THALLMAN, R.M.; CUSHMAN, R.A.; ECHTERNKAMP, S.E.; WHITE, S.N.; KUEHN, L.A.; CASAS, E.; SMITH, T.P.L. Association of a single nucleotide polymorphism in *SPP1* with growth traits and twinning in a cattle population selected for twinning rate. **Journal of Animal Science**, Champaign, Ill, v.85, p.341-347, 2007.
- ASHWELL, M.S.; HEYEN, D.W.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; DA, Y.; VANRADEN, P.M.; RON, M.; WELLER, J.I.; LEWIN, H.A. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, 87:468–475, 2004.
- BAGNATO, A.; SCHIAVINI, F.; ROSSONI, A.; MALTECCA, C.; DOLEZAL, M.; MEDUGORAC, I.; SÖLKNER, J.; RUSSO, V.; FONTANESI, L.; FRIEDMANN, A.; SOLLER, M.; LIPKIN, E. Quantitative trait loci affecting milk yield and protein percentage in a three-country Brown Swiss population. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.91, p.767-783, 2008.
- BAYLESS, K.J.; DAVIS, G.E.; MEININGER, G.A. Isolation and biological properties of osteopontin from bovine milk. **Protein Expression and Purification**, San Diego, v. 9, p.309–14, 1997.
- BERTRAND, J.K. Sire x environment interactions in beef cattle weaning weight field data. **Journal of Animal Science**, Champaign, Ill, v.60, n.6, p.1396-1402, 1985.

- BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; TSURUTA, S.; NORMAN, H.D.; LAWLOR, T.J. National genetic evaluation of milk yield for heat tolerance of United States Holsteins. **Interbull Bulletin**, Uppsala, v.33, p.160-162, 2005.
- BURT, D.W.; HOCKING, P.M. Mapping quantitative trait loci and identification of genes that control fatness in poultry. **Proceedings and Nutrition Society**, Cambridge, v.61, n.4, p.441-446, 2002.
- CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in holstein bull seminal plasma. **Biology of Reproduction**, Champaign, Ill, v.57, p.1293–1301, 1997.
- CHABAS, D. L'ostéopontine, une molécule aux multiples facettes. **Medicine Sciences**, Montrouge, n.10, v.21, p.832-838, 2005.
- CHRISTENSEN, B.; NIELSEN, M.S.; HASELMANN, K.F.; PETERSEN, T.E.; SORENSEN, E.S. Post-translationally modified residues of native human osteopontin are located in clusters : identification of 36 phosphorylation and five O-glycosylation sites and their biological implications. **Biochemical Journal Immediate**, London, v.390, p.285–292, 2005.
- COHEN, M.; SEROUSSI, E; BAND, M.R.; LEWIN, H.A.; DRACKLEY, J.K.; LARKIN, D.M.; EVERTS-VAN DER WIND, A.; HEON-LEE, J.; LOOR, J.J.; SHANI, M.; WELLER, M.I.; RON, M. *SPP1* is a candidate gene for the QTL affecting milk protein concentration on BTA6 in Israeli Holstein. 29th Int. **Animal Genetics**, Oxford, 2004.
- COHEN-ZINDER, M.; SEROUSSI, E.; LARKIN, D.M; LOOR, J.J; EVERTSVAN, DER WIND, A.; LEE, J.H.; DRACKLEY, J.K.; BAND, M.R.; HERNANDEZ, A.G.; SHANI, M.; LEWIN, H.A.; WELLER, J.L.; RON, M. Identification of a missense mutation in the bovine ABCG2 gene with a major effect on the QTL on chromosome 6 affecting milk yield and

- composition in Holstein cattle. **Genome Research**, Cold Spring Harbor, v.15, p.936–944, 2005.
- COSTA, C.N. Interação genótipo e ambiente em gado de leite. In: SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, 426, 1999, Viçosa. **Anais ... Viçosa**, 1999. 161p.
- CUNHA, E.E.; EUCLYDES, R.F.; TORRES, R.A. Variabilidade genética e limite da seleção em populações de diferentes tipos de acasalamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.2, p.242-250, 2004.
- CUNHA, E.E.; EUCLYDES, R.F.; TORRES, R.A. Variabilidade genética e limite da seleção em populações de diferentes tipos de acasalamento. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v.56, n.2, p.242-250, 2004.
- DE KONING, D.J. Conflicting candidates for cattle QTLs. **Trends in Genetics : DNA differentiation & development**, Amsterdam, v.22, p.301–305, 2006.
- DENHARDT, D.T.; GUO X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **The FASEB Journal**, Bethesda, Md, v.7, p.1475-1482, 1993.
- DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodeling. **Journal of Cellular Biochemistry. Supplement**, New York, 30–31, 92–102, 1998.
- ENSEMBL – WTSI. Wellcome Trust Sanger Institute, 2009. Cambridge, UK. **[Bos taurus]**. Disponível em: [<http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index.>](http://www.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Index.>) Acesso em: 04 jan. 2010.

EUCLYDES, R.F. Uso do sistema para simulação Genesys na avaliação de métodos de seleção clássicos e associados a marcadores moleculares. 1996. 149f. Tese (Doutorado - Genética e Melhoramento) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa – Cernargen, 1998. 220p.

FISHER, L.W.; TORCHIA, D.A.; FOHR B. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.280, p.460-465, 2001.

FRANCO, M.M; MELO, E.O. **Melhoramento Animal**: O uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida. Brasília: Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, 14p. (Documentos/Embrapa Recursos Genético e Biotecnologia, 0102-0110; 188), 2006.

FREITAS, A.F.; COSTA, C.N.; MENEZES, C.R.A.; PAIVA, L.C. **Programa de Melhoramento da Raça Girolando** – Teste de Progênie: Sumário de Touros 2008. Julho 2008. Juiz de Fora : Embrapa Gado de Leite, 2008. 20p. (Embrapa Gado de Leite. Documentos, 126).

FREITAS, M.S. **Utilização de modelos de regressão aleatória na avaliação genética de animais da raça Girolando**. 2003. 89f. Tese (Doutorado - Zootecnia) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, Minas Gerais, 2003.

HALIASSOS, A.; CHOMEL, J.C.; TESSON, L.; BAUDIS, M.; KRUIH, J.; KAPLAN, J.C.; KITZIS, A. Modification of enzymatically amplified DNA for the detection of point mutations. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v.17, p.3606, 1989.

- HARDER, B.; BENNEWITZ, J.; REINSCH, N. Mapping of quantitative trait loci for lactation persistency traits in German Holstein dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v.123, p.89–96, 2006.
- KHATIB, H.; ZAITOUN, I.; WIEBELHAUS-FINGER, J.; CHANG, Y.M.; ROSA, G.J.M. The Association of Bovine PPARGC1A and OPN Genes with Milk Composition in Two Independent Holstein Cattle Populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.90, p.2966–2970, 2007.
- KHATKAR, M.S.; THOMSON, P.C.; TAMMEN, I.; RAADSMA, H.W. Quantitative trait loci mapping in dairy cattle: Review and meta-analysis. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.36, p.163–190, 2004.
- KOHAN, M.; BADER, R.; PUXEDDU, I.; LEVI-SCHAFFER, F.; BREUER, R.; BERKMAN, N. Enhanced osteopontin expression in a murine model of allergen-induced airway remodelling. **Clinical and Experimental Allergy**, Oxford, n.37, p.1444–1454, 2007.
- KUCEROVA, J.; LUND, M.S.; SORENSEN, P.; SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; NIELSEN, V.H.; THOMSEN, B.; BENDIXEN, C. Multitrait quantitative trait loci mapping for milk production traits in danish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.89, p.2245–2256, 2006.
- KUMURA, H.; MIURA, A.; SATO, E.; TANAKA, T.; SHIMAZAKI, K. Susceptibility of bovine osteopontin to chymosin. **Journal of Dairy Research**, Cambridge, v.71, p.500–504, 2004.
- LEONARD, S.; KHATIB, H.; SCHUTZKUS, V.; CHANG, Y.M.; MALTECCA, C. Effects of the osteopontin gene variants on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.88, p.4083–4086, 2005.

LILLEHAMMER, M.; GODDARD, M.E.; NILSEN, H.; SEHESTED, E.; OLSEN, H.G.; LIEN, S.; MEUWISSEN, T.H.E. Quantitative trait locus-by-environment interaction for milk yield traits on *Bos taurus* autosome 6. **Genetics**, Austin, n.179, v.3, p.1539-46, 2008.

MARQUES, J.R.F. **Criação de Gado Leiteiro na Zona Bragantina**. Embrapa Amazônia Oriental Sistemas de Produção, 2005. Disponível em: <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Leite/GadoLeiteiroZonaBragantina/paginas/composicao.htm>> Acesso em: 24 set. 2009.

MEUWISSEN, T.H.E.; GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, Austin, v.157, p.1819-1829, 2001.

NADESALINGAM, J.; PLANTE, Y.; GIBSON, J.P. Detection of QTL for milk production on chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. **Mammalian Genome**, New York, v.12, p.27–31, 2001.

NAGAHATA, H.; NODA, H.; TAKAHASHI, K.; KUROSAWA, T.; SONODA, M. Bovine granulocytopeny syndrome: Neutrophil dysfunction in Holstein Friesian calves. **Zentralbl Veterinarmed A**, Berlin, v.34, p.445–451, 1987.

NAGATOMO T.; OHGA S.; TAKADA H.; NOMURA A.; HIKINO S.; IMURA M.; OHSHIMA K.; HARA T. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.138, p.47–53, 2004.

NAGATOMO, T.; OHGA, S.; TAKADA, H. et al. Microarray analysis of human milk cells: persistent high expression of osteopontin during the lactation period. **Clinical and Experimental Immunology**, Oxford, v.138, p.47–53, 2004.

NAGRP - Nacional Animal Genome Research Program, 2009. [Informações].

Disponível em: <http://www.genome.iastate.edu/cgi-in/QTLdb/BT/draw_traitmap?trait_ID=1044> Acesso em: 27 dez. 2009.

NEMIR, M.; BHATTACHARYYA, D.; LI, X.; SINGH, K.; MUKHERJEE, A.B.; MUKHERJEE, B.B. Targeted inhibition of osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md, v.275, p.969–76, 2000.

NEMIR, M.; DE VOUGE, M.W.; MUKHERJEE, B.B. Normal rat kidney cells secrete both phosphorylated and non-phosphorylated forms of osteopontin showing different physiological properties. **Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, Md, v.264, p.18202-18208, 1989.

O'REGAN, A.W.; HAYDEN, J.M.; BERMAN, J.S. Osteopontin augments CD3-mediated interferon-gamma and CD40 ligand expression by T cells, which results in IL-12 production from peripheral blood mononuclear cells. **Journal of Leukocyte Biology**, New York, v.68, p.495-502, 2000.

OLSEN, H.G.; LIEN, S.; GAUTIER, M.; NILSEN, H.; ROSETH, A.; BERG, P.R.; SUNDSAASEN, K.K.; SVENDSEN, M; MEUWISSEN, T.H.E. Mapping of a milk production quantitative trait locus to a 420-kb region on bovine chromosome 6. **Genetics**, Austin, v.169, p.275–283, 2005.

OLSEN, H.G.; LIEN, S.; SVENDSEN, M.; NILSEN, H.; ROSETH, A.; AASLAND OPSAL, M.; MEUWISSEN, T.H.E. Fine mapping of milk production QTL on BTA6 by combined linkage and linkage disequilibrium analysis. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.87, p.690–698, 2004.

OLSEN, H.G.; NILSEN, H.; HAYES, B.; BERG, P.R.; SVENDSEN, M.; LIEN, S.; MEUWISSEN, T. Genetic support for a quantitative trait nucleotide in the *ABCG2* gene affecting milk composition of dairy cattle. **BMC Genetics**,

London, v.8, p. 32, 2007.

PAPPAS, M.C.R.; LOURENÇO, I.T. **Investigação do Polimorfismo K232A do gene *DGAT1* em raças de *Bos indicus* e seus cruzamentos**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 2004. (Circular Técnica, 35).

PAREEK, C.S.; CZARNIK, U.; PIERZCHAŁA, M.; ZWIERZCHOWSKI, L. An association between the C>T single nucleotide polymorphism within intron IV of osteopontin encoding gene (*SPP1*) and body weight of growing Polish Holstein-Friesian cattle. **Animal Science Papers and Reports**, Jastrzębiec, v.26, n.4, p.251-257, 2008 (b).

PAREEK, C.S.; ZIĘBA, M.; MICHNO, J.; CZARNIK, U.; ZWIERZCHOWSKI, L. Study of SNP C>T polymorphism within the candidate genes for dairy and beef traits in a panel of selected cattle breeds. **Journal of Agrobiology**, České Budějovice, v.25, n.1, p.121-124, 2008 (a).

PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal**. 4.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2004.

PLASTOW, G.S. The changing world of genomics and its impact on the pork chain. **Advances in Pork Production**. Alberta, v.14, p.67-71, 2003.

ROBINSON, J.L.; DRABIK, M.R.; DOMBROWSKI, D.B.; CLARK, J.H. Consequences of UMP synthase deficiency in cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.80, p. 321–323, 1983.

RON, M.; KLIGER, D.; FELDMESSER, E.; SEROUSSI, E.; EZRA, E.; WELLER, J.I. Multiple quantitative trait locus analysis of bovine chromosome 6 in the Israeli Holstein population by a daughter design. **Genetics**, Austin, v.159, p.727–735, 2001.

ROUSSET, F. Genepop'007: a complete reimplementations of the Genepop

software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v.8, p.103-106, 2008.

SAS INSTITUTE INC. **SAS 9.1.3**. Cary, NC, 2002-2005.

SCHNABEL, R.D.; KIM, J.J.; ASHWELL, M.S.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSELL, C.P.; CONNOR, E.E.; TAYLOR, J.F. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.102, p.6896–6901, 2005.

SENGER, D.R.; PERRUZZI, C.A.; PAPADOPOULOS, A.; TENEN, D.G. Purification of a human milk protein closely similar to tumor-secreted phosphoproteins and osteopontin. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.996, p.43-48, 1989.

SENGER, D.R.; WIRTH, D.F.; HYNES, R.O. Transformed mammalian cells secrete specific proteins and phosphoproteins. **Cell**, Cambridge, v.16, p.885–893, 1979.

SHANKS, R.D.; BRAGG, D.S.A.; ROBINSON, J.L. Deficiency of uridine monophosphate synthase in Holstein cattle: inheritance and body measurements. **Journal of Dairy Science**, Champaign, Ill, v.64, p.695–700, 1987.

SHEEHY, P.A.; RILEY, J.G.; RAADSMA, H.W.; WILLIAMSON, P.; WYNN, P.C.. A functional genomics approach to evaluate candidate genes located in a QTL interval for milk production traits on BTA6. **Animal Genetics**, Oxford, v.40, p.492–498, 2009.

SHUSTER, D.E.; KEHRLI, M.E.; ACKERMANN JR, M.R.; GILBERT, R.O. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte

- adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v.89, p.9225–9229, 1992.
- SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M.D. Osteopontin. Critical Reviews. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, Bristol, v.11, p.279–303, 2000.
- SORENSEN, E.S.; PETERSEN, T.E. Identification of two phosphorylation motifs in bovine osteopontin. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v.198, p.200-205, 1994.
- SOUZA, F.R.P. **Polimorfismo dos genes *MUC1* e Osteopontina em novilhas da raça Nelore (*Bos taurus indicus*)**. 2007. 96f. Tese (Doutorado - Ciências Biológicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2007.
- TANTIA, M.S.; MISHRA, B.; BHARANI KUMAR, S.T.; MISHRA, B.P.; KATARIA, R.S.; MUKESH, M.; VIJH, R.K. Characterization of Osteopontin gene of *Bubalus bubalis*. **Animal**, Cambridge, v.2, n.7, p. 987–990, 2008.
- USDA – United State Department of Agriculture, 2009. [Informações]. Disponível em: http://www.usda.gov/wps/portal/!ut/p/s.7_0_A/7_0_1OB?navtype=FT&navid=HOME> Acesso em: 20 jan. 2010.
- WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution: international journal of organic evolution**, Lancaster, v.38, p.1358-1370, 1984.
- WHITE, S.N.; CASAS, E.; ALLAN, M.F.; KEELE, J.W.; SNELLING, W.M.; WHEELER, T.L.; SHACKELFORD, S.D.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T.P.L. Evaluation in beef cattle of six deoxyribonucleic acid markers developed for dairy traits reveals an osteopontin polymorphism associated

with postweaning growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, Ill, v.85, p.1-10, 2007.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, Austin, v. 16, p.97-159, 1931.

ZHANG, Q.; BOICHARD, D.; HOESCHELE, I.; ERNST, C.; EGGEN, A.; MURKVE, B.; PFISTERGENSKOW, M.; WITTE, L.A.; GRIGNOLA, F.E.; UIMARI, P.; THALLER, G.; BISHOP, M.D. Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree. **Genetics**, Austin, v.149, p.1959–1973, 1998.

ZHAO, H.; ROTHSCHILD, M.F; FERNANDO, R.L; DEKKERS, J.C. Tests of candidate genes in breed cross populations for QTL mapping in livestock. **Mammalian Genome**, New York, New York, v.14, n.7, p.472-482, 2003.

ZOCCAL, R.; CARNEIRO, A.V. Conjuntura atual do leite brasileiro. **Balde Branco**, São Paulo, p. 94 – 95, 2008.

Apêndices

Apêndice 1 – Normas utilizadas para a preparação do Capítulo II

**Normas para preparação de trabalhos científicos para publicação na
Revista Brasileira de Zootecnia**

A fim de prestigiar a comunidade científica nacional, é importante que os autores citem mais artigos disponíveis na literatura brasileira.

Instruções gerais

A RBZ publica artigos científicos originais nas áreas de Aquicultura, Forragicultura, Melhoramento, Genética e Reprodução, Monogástricos, Produção Animal, Ruminantes, e Sistemas de Produção e Agronegócio.

O envio dos manuscritos é feito exclusivamente pela *home page* da RBZ (<http://www.sbz.org.br>), link Revista, juntamente com a carta de encaminhamento, conforme instruções no link "Envie seu manuscrito".

O texto deve ser elaborado segundo as normas da RBZ e orientações disponíveis no link "Instruções aos autores".

O pagamento da taxa de tramitação (pré-requisito para emissão do número de protocolo), no valor de R\$ 40,00 (quarenta reais), deverá ser realizado por meio de boleto bancário, disponível na *home page* da SBZ (<http://www.sbz.org.br>).

A taxa de publicação para 2009 é diferenciada para associados e não-associados da SBZ. Para associados, será cobrada taxa de R\$ 115,00 (até 8 páginas no formato final) e R\$ 45,00 para cada página excedente. Uma vez aprovado o manuscrito, todos os autores devem estar em dia com a anuidade da SBZ do ano corrente, exceto co-autor que não milita na área zootécnica (estatístico, químico, entre outros), desde que não seja o primeiro autor e que não publique mais de um artigo no ano corrente (reincidência). Para não-associados, serão cobrados R\$ 90,00 por página (até 8 páginas no formato final) e R\$ 180,00 para cada página excedente.

No processo de publicação, os artigos técnico-científicos são avaliados por revisores *ad hoc* indicados pelo Conselho Científico, composto por especialistas com doutorado nas diferentes áreas de interesse e coordenados pela Comissão Editorial da RBZ. A política editorial da RBZ consiste em manter o alto padrão científico das publicações, por intermédio de colaboradores de renomada conduta ética e elevado nível técnico. O Editor Chefe e o Conselho Científico, em casos especiais, têm autonomia para decidir sobre a publicação do artigo.

Língua: português ou inglês

Formatação de texto

O texto deve ser digitado em fonte Times New Roman 12, espaço duplo (exceto Resumo, Abstract e Tabelas, que devem ser elaborados em espaço 1,5), margens superior, inferior, esquerda e direita de 2,5; 2,5; 3,5; e 2,5 cm, respectivamente.

O manuscrito pode conter até 25 páginas, numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. As páginas devem apresentar linhas numeradas (a numeração é feita da seguinte forma: MENU ARQUIVO/CONFIGURAR PÁGINA/LAYOUT/NÚMEROS DE LINHA.../NUMERAR LINHAS), com paginação contínua e centralizada no rodapé.

Estrutura do artigo

O artigo deve ser dividido em seções com cabeçalho centralizado, em negrito, na seguinte ordem: Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados e Discussão, Conclusões, Agradecimentos e Literatura Citada.

Não são aceitos cabeçalhos de terceira ordem.

Os parágrafos devem iniciar a 1,0 cm da margem esquerda.

Título

Deve ser preciso e informativo. Quinze palavras são o ideal e 25, o máximo. Digitá-lo em negrito e centralizado, segundo o exemplo: Valor nutritivo da cana-de-açúcar para bovinos em crescimento. Deve apresentar a chamada "1" somente no caso de a pesquisa ter sido financiada. Não citar "parte da tese...."

Autores

Deve-se listar até seis autores. A primeira letra de cada nome/sobrenome deve ser maiúscula (Ex.: Anacleto José Benevenuto). Não listá-los apenas com as iniciais e o último sobrenome (Ex.: A.J. Benevenuto).

Outras pessoas que auxiliaram na condução do experimento e/ou preparação/avaliação do manuscrito devem ser mencionadas em Agradecimentos.

Digitar o nome dos autores separados por vírgula, centralizado e em negrito, com chamadas de rodapé numeradas e em sobrescrito, indicando apenas a instituição e/ou o endereço profissional dos autores. Não citar o vínculo empregatício, a profissão e a titulação dos autores. Informar o endereço eletrônico somente do responsável pelo artigo.

Resumo

Deve conter no máximo 1.800 caracteres com espaço. As informações do resumo devem ser precisas e informativas. Resumos extensos serão devolvidos para adequação às normas.

Deve sumarizar objetivos, material e métodos, resultados e conclusões. Não deve conter introdução. Referências nunca devem ser citadas no resumo.

O texto deve ser justificado e digitado em parágrafo único e espaço

1,5, começando por RESUMO, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Abstract

Deve aparecer obrigatoriamente na segunda página e ser redigido em inglês científico, evitando-se traduções de aplicativos comerciais.

O texto deve ser justificado e digitado em espaço 1,5, começando por ABSTRACT, em parágrafo único, iniciado a 1,0 cm da margem esquerda.

Palavras-chave e Key Words

Apresentar até seis (6) palavras-chave e Key Words imediatamente após o RESUMO e ABSTRACT, respectivamente, em ordem alfabética. Devem ser elaboradas de modo que o trabalho seja rapidamente resgatado nas pesquisas bibliográficas. Não podem ser retiradas do título do artigo. Digitá-las em letras minúsculas, com alinhamento justificado e separado por vírgulas. Não devem conter ponto final.

Introdução

Deve conter no máximo 2.500 caracteres com espaço. Deve-se evitar a citação de várias referências para o mesmo assunto.

Trabalhos com introdução extensa serão devolvidos para adequação às normas.

Material e Métodos

Descrição clara e com referência específica original para todos os procedimentos biológicos, analíticos e estatísticos. Todas as modificações de procedimentos devem ser explicadas.

Resultados e Discussão

Os resultados devem ser combinados com discussão. Dados suficientes, todos com algum índice de variação incluso, devem ser apresentados para permitir ao leitor a interpretação dos resultados do experimento. A discussão deve interpretar clara e concisamente os resultados e integrar resultados de literatura com os da pesquisa para proporcionar ao leitor uma base ampla na qual possa aceitar ou rejeitar as hipóteses testadas.

Evitar parágrafos soltos e citações pouco relacionadas ao assunto.

Conclusões

Devem ser redigidas em parágrafo único e conter no máximo 1.000 caracteres com espaço.

Não devem ser repetição de resultados. Devem ser dirigidas aos leitores que não são necessariamente profissionais ligados à ciência animal. Devem explicar claramente, sem abreviações, acrônimos ou citações, o que os resultados da pesquisa concluem para a ciência animal.

Agradecimentos

Deve iniciar logo após as Conclusões.

Abreviaturas, símbolos e unidades

Abreviaturas, símbolos e unidades devem ser listados conforme indicado na *home page* da RBZ, link "Instruções aos autores".

- Usar **36%**, e não 36 % (sem espaço entre o n^o e %)
- Usar **88 kg**, e não 88Kg (com espaço entre o n^o e kg, que deve vir em minúsculo)
- Usar **136,22**, e não 136.22 (usar vírgula, e não ponto)
- Usar **42 mL**, e não 42 ml (litro deve vir em L maiúsculo, conforme padronização internacional)
- Usar **25°C**, e não 25 °C (sem espaço entre o n^o e °C)
- Usar **(P<0,05)**, e não (P < 0,05) (sem espaço antes e depois do <)
- Usar **521,79 ± 217,58**, e não 521,79±217,58 (com espaço antes e depois do ±)
- Usar **r² = 0,95**, e não r²=0,95 (com espaço antes e depois do =)
- Usar asterisco nas tabelas apenas para probabilidade de P: (*P<0,05; **P<0,01; ***P<0,001)

Deve-se evitar o uso de abreviações não consagradas e de acrônimos, como por exemplo: "o T3 foi maior que o T4, que não diferiu do T5 e do T6". Esse tipo de redação é muito cômoda para o autor, mas é de difícil compreensão para o leitor.

Tabelas e Figuras

É imprescindível que todas as tabelas sejam digitadas segundo menu do Word "Inserir Tabela", em células distintas (não serão aceitas tabelas com valores separados pelo recurso ENTER ou coladas como figura). Tabelas e figuras enviadas fora de normas serão devolvidas para adequação.

Devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos e apresentadas logo após a chamada no texto.

O título das tabelas e figuras deve ser curto e informativo, devendo-se adotar as abreviaturas divulgadas oficialmente pela RBZ.

A legenda das Figuras (chave das convenções adotadas) deve ser incluída no corpo da figura. Nos gráficos, as designações das variáveis dos eixos X e Y devem ter iniciais maiúsculas e unidades entre parênteses.

Figuras não-originais devem conter, após o título, a fonte de onde foram extraídas, que deve ser referenciada.

As unidades, a fonte (Times New Roman) e o corpo das letras em todas as figuras devem ser padronizados.

Os pontos das curvas devem ser representados por marcadores contrastantes, como círculo, quadrado, triângulo ou losango (cheios ou vazios).

As curvas devem ser identificadas na própria figura, evitando o excesso de informações que comprometa o entendimento do gráfico.

As figuras devem ser gravadas no programa Word, Excel ou Corel Draw (extensão CDR), para possibilitar a edição e possíveis correções.

Usar linhas com, no mínimo, 3/4 ponto de espessura. No caso de gráfico de barras, usar diferentes efeitos de preenchimento (linhas horizontais, verticais, diagonais, pontinhos etc.). Evite os padrões de cinza porque eles dificultam a visualização quando impressos.

As figuras deverão ser exclusivamente monocromáticas. Não usar negrito nas figuras.

Os números decimais apresentados no interior das tabelas e figuras devem conter vírgula, e não ponto.

Citações no texto

As citações de autores no texto são em letras minúsculas, seguidas do ano de publicação. Quando houver dois autores, usar & (e comercial) e, no caso de três ou mais autores, citar apenas o sobrenome do primeiro, seguido de et al.

Comunicação pessoal (ABNT-NBR 10520).

Não fazem parte da lista de referências, sendo colocadas apenas em nota de rodapé. Coloca-se o sobrenome do autor seguido da expressão “comunicação pessoal”, a data da comunicação, o nome, estado e país da Instituição à qual o autor é vinculado.

Literatura Citada

Baseia-se na Associação Brasileira de Normas Técnicas – ABNT (NBR 6023).

Devem ser redigidas em página separada e ordenadas alfabeticamente pelo(s) sobrenome(s) do(s) autor(es).

Digitá-las em espaço simples, alinhamento justificado e recuo até a terceira letra a partir da segunda linha da referência. Para formatá-las, siga as seguintes instruções: No menu FORMATAR, escolha a opção PARÁGRAFO...RECUO ESPECIAL, opção DESLOCAMENTO... 0,6 cm.

Em obras com dois e três autores, mencionam-se os autores separados por ponto-e-vírgula e, naquelas com mais de três autores, os três primeiros vêm seguidos de et al. As iniciais dos autores não podem conter espaços. O termo et al. não deve ser italizado nem precedido de vírgula.

O recurso tipográfico utilizado para destacar o elemento título será negrito e, para os nomes científicos, itálico.

Indica(m)-se o(s) autor(es) com entrada pelo último sobrenome seguido do(s) prenome(s) abreviado (s), exceto para nomes de origem espanhola, em que entram os dois últimos sobrenomes.

No caso de homônimos de cidades, acrescenta-se o nome do estado (ex.: Viçosa, MG; Viçosa, AL; Viçosa, RJ).

Obras de responsabilidade de uma entidade coletiva

A entidade é tida como autora e deve ser escrita por extenso, acompanhada por sua respectiva abreviatura. No texto, é citada somente a abreviatura correspondente.

Quando a editora é a mesma instituição responsável pela autoria e já tiver sido mencionada, não é indicada.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY - AOAC. **Official methods of analysis**. 16.ed. Arlington: AOAC International, 1995. 1025p.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA - UFV. **Sistema de análises estatísticas e genéticas - SAEG**. Versão 8.0. Viçosa, MG, 2000. 142p.

Livros e capítulos de livro

Os elementos essenciais são: autor(es), título e subtítulo (se houver), seguidos da expressão "In:", e da referência completa como um todo. No final da referência, deve-se informar a paginação.

Quando a editora não é identificada, deve-se indicar a expressão *sine nomine*, abreviada, entre colchetes [s.n.].

Quando o editor e local não puderem ser indicados na publicação, utilizam-se ambas as expressões, abreviadas, e entre colchetes [S.l.: s.n.].

LINDHAL, I.L. Nutrición y alimentación de las cabras. In: CHURCH, D.C. (Ed.) **Fisiologia digestiva y nutrición de los ruminantes**. 3.ed. Zaragoza: Acríbia, 1974. p.425-434.

NEWMANN, A.L.; SNAPP, R.R. **Beef cattle**. 7.ed. New York: John Wiley, 1997. 883p.

Teses e dissertações

Deve-se evitar a citação de teses, procurando referenciar sempre os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados. Entretanto, caso os artigos ainda não tenham sido publicados, devem-se citar os seguintes elementos: autor, título, ano, página, área de concentração, universidade e local.

CASTRO, F.B. **Avaliação do processo de digestão do bagaço de cana-de-**

açúcar auto-hidrolisado em bovinos. 1989. 123f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1989.

Boletins e relatórios

BOWMAN, V.A. **Palatability of animal, vegetable and blended fats by equine.** (S.L.): Virgínia Polytechnic Institute and State University, 1979. p.133-141 (Research division report, 175).

Artigos

O nome do periódico deve ser escrito por extenso. Com vistas à padronização desse tipo de referência, não é necessário citar o local; somente volume, número, intervalo de páginas e ano.

RESTLE, J.; VAZ, R.Z.; ALVES FILHO, D.C. et al. Desempenho de vacas Charolês e Nelore desterneiradas aos três ou sete meses. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.30, n.2, p.499-507, 2001.

Congressos, reuniões, seminários, etc.

Citar o mínimo de trabalhos publicados em forma de resumo, procurando sempre referenciar os artigos publicados na íntegra em periódicos indexados.

CASACCIA, J.L.; PIRES, C.C.; RESTLE, J. Confinamento de bovinos inteiros ou castrados de diferentes grupos genéticos. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 30, 1993, Rio de Janeiro. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1993. p.468.

EUCLIDES, V.P.B.; MACEDO, M.C.M.; OLIVEIRA, M.P. Avaliação de cultivares de *Panicum maximum* em pastejo. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Zootecnia/Gmosis, [1999]. (CD-ROM).

Artigo e/ou matéria em meios eletrônicos

Na citação de material bibliográfico obtido via internet, o autor deve procurar sempre usar artigos assinados, sendo também sua função decidir quais fontes têm realmente credibilidade e confiabilidade.

Quando se tratar de obras consultadas *on-line*, são essenciais as informações sobre o endereço eletrônico, apresentado entre os sinais < >, precedido da expressão "Disponível em:" e a data de acesso do documento, precedida da expressão "Acesso em:".

- NGUYEN, T.H.N.; NGUYEN, V.H.; NGUYEN, T.N. et al. [2003]. Effect of drenching with cooking oil on performance of local yellow cattle fed rice straw and cassava foliage. **Livestock Research for Rural Development**, v.15, n.7, 2003. Disponível em: <<http://www.cipav.org.co/lrrd/lrrd15/7/nhan157.htm>> Acesso em: 28/7/2005.
- REBOLLAR, P.G.; BLAS, C. [2002]. **Digestión de la soja integral en rumiantes**. Disponível em: <http://www.ussoymeal.org/ruminant_s.pdf.> Acesso em: 12/10/2002.
- SILVA, R.N.; OLIVEIRA, R. [1996]. Os limites pedagógicos do paradigma da qualidade total na educação. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPe, 4., 1996, Recife. **Anais eletrônicos...** Recife: Universidade Federal do Pernambuco, 1996. Disponível em: <<http://www.propesq.ufpe.br/anais/anais.htm>> Acesso em: 21/1/1997.

Vita

Fernanda de Mello nasceu aos 23 dias do mês de julho de 1982, na cidade de Canoas no estado do Rio Grande do Sul. É filha de Vera Lúcia de Mello e Jonas Antônio Rosendo de Mello, naturais deste estado.

Cursou o ensino fundamental na instituição confessional católica Colégio Espírito Santo, e o ensino médio na Escola Paula Soares. Em 2001, ingressou no curso de Ciências Biológicas na Universidade Luterana do Brasil (ULBRA), graduando-se no ano de 2007.

Em março de 2008, ingressou o mestrado no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, desenvolvendo sua pesquisa na área de Melhoramento Genético-animal, na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).