



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DGAT1 E LEP NO
DESEMPENHO PRODUTIVO EM BOVINO LEITEIRO DA RAÇA GIROLANDO**

ALUNA: SHIRLENY ROMUALDO CARDOSO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

**UBERLÂNDIA-MG
2008**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DGAT1 E LEP NO
DESEMPENHO PRODUTIVO EM BOVINO LEITEIRO DA RAÇA GIROLANDO**

ALUNA: SHIRLENY ROMUALDO CARDOSO

ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ RICARDO GOULART FILHO

**Disertação apresentada à
Universidade Federal de Uberlândia
como parte dos requisitos para
obtenção do Título de Mestre em
Genética e Bioquímica (Área
Genética).**

**UBERLÂNDIA-MG
2008**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

C268
d
Cardoso, Shirleny Romualdo, 1980-
Análise de polimorfismos dos genes DGAT1 e LEP no
desempenho produtivo em bovino leiteiro da raça Girolando/ Shirleny
Romualdo Cardoso. – 2008.

44 f. : il.

Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.

Inclui bibliografia.

1. Genética animal - Teses. 2. Bovino de leite - Teses. 3. Leite -
Produção - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962- II. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e
Bioquímica. III. Título.

CDU: 591.15

Palavras Chaves: Raça Girolando, Bovino, DGAT1, LEP, Produção de leite,
Polimorfis



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DGAT1 E LEP NO
DESEMPENHO PRODUTIVO EM BOVINO LEITEIRO DA RAÇA GIROLANDO**

ALUNO: SHIRLENY ROMUALDO CARDOSO

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: PROF. DR LUIZ RICARDO GOULART FILHO
(Orientador)

Examinadores: PROF. DR. JÚLIO CÉSAR NEPOMUCENO
PROF. DR. MARCO ANTÔNIO MACHADO

Data da Defesa: 01/ 08 / 2008

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação/Tese foram contempladas

(NOME DO ORIENTADOR)

“O Valor da Amizade

Você já parou para pensar sobre o valor da amizade?

Às vezes nos encontramos preocupados, ansiosos, em volta há situações complicadas, nos sentindo meio que perdidos, mas somente o fato de conversarmos com um amigo, desabafando o que nos está no íntimo, já nos sentimos melhor, mesmo que as coisas permaneçam inalteradas. Quantas vezes são os amigos que nos fazem sorrir quando tínhamos vontade de chorar, mas a sua simples presença traz de volta o sol a brilhar em nossa vida. A simplicidade das brincadeiras pueris, da conversa informal, momentos de descontração que muitas vezes pode ser numa conversa rápida ao telefone, no vai e vem do dia ou da noite, no ambiente de trabalho ou de escola, enfim, em qualquer lugar a qualquer hora. Entretanto, não existe só alegria, amor, felicidade nesta relação que como em qualquer outro relacionamento, passa por crises passageiras, por momentos intempestivos, abalos ocasionais. Ainda que tenhamos muito carinho pelo amigo em questão, às vezes por insegurança, por ciúme, por estarmos emocionalmente alterados ou nos sentindo pressionados, acabamos sendo injustos com ele e isso pode ser recíproco. Podemos comparar esse elo de amizade ao tempo que passa por alterações climáticas constantemente, mas é dessa forma que aprendemos a nos conhecer, compartilhar momentos, que se desenvolve uma amizade. Diante do amigo somos nós mesmos, deixamos vir à tona nossos pensamentos a respeito das coisas, da vida, nos mostramos como verdadeiramente somos. Há amigos que nos ensinam muito, nos fazem enxergar situações que às vezes não percebemos o seu real sentido, compartilham a sua experiência conosco, nos falam usando da verdade que buscamos encontrar. São eles também que nos chamam a razão, chamando a nossa atenção quando agimos de modo contraditório, que nos dizem coisas que não queremos ouvir, aceitar, compreender. Ao longo de nossa vida muitos amigos passam por ela e nos deixam saudade, mas também deixam a recordação de tudo que foi vivido. É na amizade verdadeira que encontramos sinceridade, lealdade, afinidade, cumplicidade, simplicidade, fraternidade. Amigos são irmãos que a vida nos deu para caminhar conosco ao longo da nossa jornada espiritual, extrapolando os limites do tempo, continuando quando e onde Deus assim o permitir.”

Sandra Quevedo Demarch Nogueira

Dedico

À minha família, principalmente à minha mãe Tânia Maria Romualdo Cardoso e ao meu padrasto Júlio Cezar Pereira.

“A vocês que estiveram sempre por perto. Que sofreram com a dúvida de minha escolha, torceram com a angústia do resultado, ficaram ansiosos com a chegada do novo.

Vibraram com cada vitória, me acolheram em cada erro e me apoiaram em cada decisão.

Perderam sono com a saudade e abriram sorrisos a cada volta, tiraram de onde não tinham, para me dar o que hoje eu tenho. Dispuseram-se estar ali se alguma coisa desse errado, e agora dividem comigo essa alegria de mais um sonho realizado.

A vocês, conselheiros por excelência, pais por natureza, opção e amor, irmãos queridos, dedico toda a minha conquista, porque ela também é de vocês.”

Ofereço

Aos meus irmãos Karla Romualdo Cardoso, Roberto Cezar Romualdo Pereira, Marcos César Romualdo Pereira, Camilla Romualdo Pereira.

AGRADECIMENTOS

Deus, minha família, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart, Msc Gismar Vieira Silva, Dr. Juarez Ignácio, Prof. Dr. Júlio Cezar Nepomuceno, Prof. Dr. Gerson Barreto Mourão, Prof. Dr. Marco Antônio Machado, Msc Jupyracyara Jandyra de Carvalho Barros e família, Rosa Maria do Nascimento Silva e família, Claudia Ribeiro Borges, Kênia Mendonça Diniz e família, Michelle Alves Coelho, Elaine Silvia Dutra, Irislande Ignácio, Amanda Cristine Queiroz Leles, Msc Luciana Benedetti, Msc Ana Cândida Machado Saraiva, Ms Juliana Julião, Gilvia Peres e Silvia, Márcia Cristina da Silva, Oséas de Paula Ribeiro, Daniela Luiza da Silva, Ana Carolina, Guilherme Linhares Caetano e TODOS os meus colegas e amigos do laboratório Biogenetics Ltda, Direção, Professores e Funcionários do Instituto de Genética e Bioquímica-UFU, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

“A vocês que foram intranscendíveis, ultrapassando os limites científicos, indicando-me não apenas o caminho, mas também ajudando-me a renascer, fazendo com que me despojasse daquela imaturidade e me revestisse deste novo ser, portadora de um conhecimento lógico, mas acima de tudo transformador, minha profunda admiração, carinho, solidariedade e gratidão.”

*“A minha intenção era tamanha... O meu sonho imenso... Tive dúvidas e medos, mas estou feliz e convicta de que busquei o melhor caminho, procurando sempre uma solução mais justa dentre tantas vontades e opiniões diferentes.
Agradeço a todos que confiaram na honestidade deste trabalho, me apoiando e me incentivando. Peço desculpas àqueles os quais não consegui agradar, ou que de alguma maneira se sentiram prejudicados, Dei o melhor de mim. E hoje fica a certeza de que nossos esforços valeram a pena!”*

*“Olhar para trás, após uma longa caminhada, pode fazer perder a noção da distância que percorremos. Mas, se nos detivermos em nossa imagem, quando a iniciamos e ao término, certamente nos lembraremos de quanto nos custou chegar até o ponto final, e, hoje, temos a impressão de que tudo começou ontem. Não somos os mesmos...”
(João Guimarães Rosa)*

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS.....	viii
LISTA DE FIGURAS E TABELAS.....	x
APRESENTAÇÃO	1
CAPÍTULO 1	2
FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	2
1. Implicações da heterozigose em bovinos leiteiros.....	2
2. Importância dos genes DGAT1 e LEP como marcadores do desempenho produtivo em bovinos leiteiro	4
2.1. Diacilglicerol aciltransferase	4
2.2. Leptina.....	6
3. Aplicabilidade de técnicas moleculares à identificação e análise de polimorfismos.....	7
3.1. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR)	7
3.2. PCR-SSCP	7
4. Referências Bibliográficas	8
CAPÍTULO 2	16
Análise de polimorfismos dos genes DGAT1 e LEP no desempenho produtivo em bovino leiteiro da raça Girolando	16
Resumo	16
Abstract	16
1. Introdução.....	17
2. Material e Métodos	19
2.1. Coleta do material	19
2.2. Extração do DNA e Genotipagem	19
2.3. Análises Estatísticas.....	21
3. Resultados	22
4. Discussão e Conclusões	25
5. Referências Bibliográficas	28

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
µL	Microlitros
ABCG	Associação Brasileira dos Criadores de Girolando
cM	Centimorgan
DGAT	Diacilglicerol acil transferase
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DO _{260nm}	Densidade óptica em comprimento de onda igual a 260 nanômetros
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
LABGEM/UFU	Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia
LEP	Leptina
LIS-SSCP	Baixa força iônica - Polimorfismo conformacional de fita simples
mA	Mili amper
mM	Mili molar
Ng	Nanograma
NPY	Neuropeptídeo Y

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
Pb	Par de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PCR-RFLP	Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo de Comprimento de Fragmento de Restrição
PCR-SSCP	Reação em cadeia da polimerase - Polimorfismo conformacional de fita simples
pH	Potencial hidrogeniônico
QTL	Loco de característica quantitativa
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
SCL	Serviço de Controle Leiteiro da Associação
SNAP/MAPA	Secretaria Nacional de Produção Agropecuária do Ministério da Agricultura
SNPs	Polimorfismos de base única
TAG	Triglicerídeos
VNTR	Variações em número repetidos em <i>tandem</i>

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1.** Genotipagem PCR-SSCP dos genes DGAT (A) and LEP (B) por eletroforese em gel de poliacrilamida 12% (49:1, acrilamida:bis), 15mA em tampão 1X TBE durante 16 h à temperatura ambiente, seguido de coloração pela prata. Os genótipos são indicados na parte inferior do gel.....23
- Figura 2.** Análise de regressão das médias dos quadrados mínimos da produção total e da média diária da produção de leite em bovinos da raça Girolando considerando os genótipos do gene DGAT1 (AA, KA e KK)26
- Tabela 1.** Frequências alélicas e genotípicas estimadas dos genes DGAT1 na raça Girolando.....24
- Tabela 2.** Efeitos aditivos e de dominância dos de alelos dos genes DGAT1 e LEP em quatro características de desempenho produtivo da raça Girolando de gado leiteiro.....24
- Tabela 3.** Médias dos quadrados mínimos para os genes DGAT1 e LEP para quatro características do desempenho produtivo em bovino leiteiro da raça Girolando.....26
- Tabela 4.** Apresentação das frequências genotípicas combinadas (%) dos genes DGAT1 e LEP em gado leiteiro da raça Girolando.....27

APRESENTAÇÃO

Diversas estratégias vêm sendo utilizadas pelo setor agropecuário brasileiro para potencializar o desempenho produtivo e reprodutivo do rebanho bovino. Em se tratando de gado leiteiro, a raça Girolando é alvo de várias pesquisas aliadas às técnicas de genotipagem com marcadores moleculares, especificamente em situações que requerem a identificação e análise gênica de interesse econômico.

A genotipagem de genes, intimamente associados à síntese de leite em bovinos, tende a agregar valores à seleção assistida por marcadores. Neste parâmetro, o gene DGAT1 e Leptina, associados à atividade das glândulas mamárias e modulação do apetite, respectivamente, podem ter sua funcionabilidade direcionada como marcadores de caracteres produtivos.

Nesse contexto, técnicas moleculares que apresentem praticidade de execução, bem como reduzido custo, são imprescindíveis à efetividade da genotipagem. Dessa forma, essa pesquisa teve como proposta verificar a aplicabilidade da PCR - SSCP (*Polymerase Chain Reaction - Single Strand Conformation Polymorphism*) na análise do polimorfismo dos genes DGAT1, bem como as variações alélicas referentes à Leptina, visando a utilização desses como marcadores de interesse econômico ao setor agropecuário.

CAPÍTULO 1

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1. IMPLICAÇÕES DA HETEROZIGOSE EM BOVINOS LEITEIROS

A pecuária bovina de leite brasileira apresenta baixos índices de produtividade que podem ser relacionados ao clima, nutrição e genética. Vários fatores têm motivado pesquisas visando um aumento no desempenho produtivo do rebanho bovino (Oliveira e Nogueira, 2006).

Bos taurus taurus (gado Europeu; taurino) e *Bos taurus indicus* (gado Indiano; Zebu) são as duas subespécies de gado domesticado. Baseado na observação de divergência das frequências alélicas dos microssatélites entre eles, MacHugh et al. (1997) observaram que essas subespécies divergiram há mais de 600.000 anos. De acordo com Kaupe et al. (2004), na primeira metade do século XX, várias raças híbridas foram desenvolvidas por cruzamento entre o gado Zebu e taurino, como exemplificado hoje no Brasil pelas raças Girolando (Gir x Holandês), Brangus (Nelore x Angus) e Simbrasil (Guzerat x Simmental). Todas essas raças possuem alta resistência ao calor e umidade do gado indiano e alta produtividade do gado europeu, com um padrão de proporção de 3/8 Zebu e 5/8 taurino (Bicalho et al., 2006).

Williams (2005) ressalta que seleção de animais baseada nas qualidades fenotípicas tem sido extremamente útil no aumento da produção e redução dos custos de produção, sendo que um número limitado de características de produção têm sido melhoradas. Entretanto, na utilização de métodos tradicionais de seleção, o melhoramento de uma característica freqüentemente está comprometido pela seleção simultânea de outras características, na maioria das vezes indesejáveis e/ou muitas vezes associadas a perdas de outras. Em contrapartida, a seleção natural promove o sucesso reprodutivo e a resistência a doenças, enquanto que a seleção artificial em espécies domésticas tem na maioria dos casos, ignorado as características envolvidas com a saúde em favor do melhoramento de características envolvidas com a produtividade visando o lucro.

Dekkers (2004), Javanmard et al. (2005), Abasht et al. (2006), Khatib et al. (2006) e Almeida et al. (2007) relatam que a identificação de genes que controlam as características desejáveis é importante para permitir a seleção destas características baseado no genótipo dos animais. Williams (2005) afirma que indivíduos que possuem os genes desejáveis para várias características, poderiam ser identificados usando marcadores moleculares e seriam direcionados a produzir uma progênie hábil a expressar, simultaneamente, inúmeras características de interesse econômico.

Segundo Kappes et al. (1997) há dois tipos de marcadores genéticos, denominados marcadores ligados e marcadores diretos. Os primeiros são marcadores localizados muito próximos ao gene da característica em questão, sendo na maioria dos casos, herdados juntamente um com o outro. Os marcadores ligados não podem ser usados para predizer o fenótipo, até que se conheça a associação entre os alelos e o marcador, bem como a associação entre os mesmos alelos com o gene da característica, classificada como fase. Para determinar a fase, a herança do marcador e do gene tem que ser estudada dentro da família, sendo as informações obtidas válidas somente dentro dessa família, podendo haver mudanças nas próximas gerações devido à recombinação homóloga.

O marcador direto é um polimorfismo funcional dentro do gene que controla a variação na característica. Uma vez que o polimorfismo funcional é conhecido, é possível predizer o efeito de alelos particulares em todos os animais da população, não tendo que determinar a fase. Por isso, marcadores diretos são mais utilizados do que marcadores ligados para predizer a variação de características alvo dentro da população (Dekkers, 2004).

Os polimorfismos funcionais nos alelos responsáveis por variações fenotípicas na característica de interesse, podem ser provenientes de variações em número repetidos em *tandem* (VNTR), seqüências repetidas de 20 pb a 50 pb em comprimento (mini-satélites), seqüências de 5 a 20 cópias de seqüência curtas entre 2 pb e 4 pb de comprimento repetidas em *tandem* (microsatélites) ou por mutação de ponto em apenas um nucleotídeo, originando polimorfismos de base única (SNPs) (Carlson et al., 2004).

Conforme esclarece Dekkers (2004), as características de interesse econômico possuem uma grande variação no fenótipo, sendo influenciada por muitos genes (por exemplo, as taxas de crescimento e a produção de leite) e pela ação do meio ambiente e são denominadas de características quantitativas (QTL – locos de caracteres quantitativos). A variação nos QTL é controlada por vários locos genéticos, cada um sendo responsável por uma pequena quantidade da variação total (Andersson e Georges, 2004). A localização dos QTL fornece marcadores ligados à característica que podem ser usados no auxílio à seleção em programas de melhoramento (Williams, 2005).

2. IMPORTÂNCIA DOS GENES DGAT1 E LEP COMO MARCADORES DE CARACTERÍSTICAS PRODUTIVAS EM BOVINOS LEITEIROS

2.1. Diacilglicerol aciltransferase

De acordo com Ordoñez et al. (2005) e Sgarbiere (2005) a composição química do leite fluido abrange carboidratos, lipídios e proteínas. A porção lipídica corresponde a cerca de 95 % (Jesen, 2002), sendo constituída por ácidos graxos de cadeia longa, oriundos da alimentação e/ou reservas armazenadas no corpo do animal (Tupak-Yupank et al., 2004); e também por ácidos graxos de cadeia curta que podem ser resultantes de uma reação complexa que envolve o ácido acético e o ácido butírico (Mishra et al., 2007).

Sanders et al. (2006) e Kuehn et al. (2007) suscitam que dentre as principais enzimas atuantes no metabolismo dos triglicerídeos (TAG) destaca-se a acil CoA diacilglicerol aciltransferase, a qual é expressa pelo gene DGAT1. De acordo com Kuhn et al. (2004) essa enzima tem característica microsomal integrante de membrana, participando ativamente nas duas maiores vias da síntese de TAG (Tantia et al., 2007). Esses autores esclarecem que, ocorre uma ligação acil CoA ao diacilglicerol, o qual pode ser fornecido por hidrólise de ácido fosfatídico na via do fosfato glicerol, ou por acilação de monoacilglicerol na via do monoacilglicerol. Cases et al. (1998) relatam a ação de dois acil CoA: diacilglicerol aciltransferases, DGAT1 e DGAT2, no estágios de lactação.

Estudos com o gene DGAT1 (Grisart et al., 2004; Furbass et al., 2006; Kuehn et al., 2007) são exemplos clássicos da aplicação de mapeamento de associação. Coppieters et al. (1999), Grisart et al., 2004 e Kaupe et al. (2004) identificaram o gene DGAT1 como sendo um QTL com efeito significativo na porcentagem de gordura, teor protéico e na produção de leite, localizado na extremidade centromérica do cromossomo 14 bovino (BTA14). O gene DGAT1 foi eleito candidato funcional para este QTL, pois está envolvido na catálise de triglicerídeos (Kuhn et al., 2004; Ripoli et al., 2006) e por ter sido observado que na ausência do gene DGAT1, fêmeas de camundongos tiveram uma deficiência na lactação (Smith et al., 2000). Resultados significativos foram observados em estudos associando polimorfismos neste gene com conteúdo de gordura de leite (Grisart et al., 2001; Spelman et al., 2002; Winter et al., 2002).

Thaller et al. (2003) estudaram o gene DGAT1 com o objetivo de testá-lo como candidato para outros QTLs relacionados à síntese e deposição de gordura. Foram observados efeitos significativos também na deposição de gordura intramuscular e no acabamento de carcaça e, ainda de um SNP (*single nucleotide polymorphism*) presente no promotor do gene humano ter apresentado correlação com índice de massa corpórea. Todos estes resultados se mostram suficientemente consistentes para que se continue buscando marcadores no gene DGAT1 e, explorar os já descritos, com o objetivo de seleção assistida por marcadores para características relacionadas à síntese de triacilglicerídeos.

Com o desenvolvimento de marcadores moleculares cobrindo todas as regiões de todos os cromossomos de bovinos (Georges, 1998), há uma procura extensiva por genes com efeitos significantes nas variações características quantitativas (Wilkins et al., 1997). Técnicas de genética molecular que atualmente estão disponíveis permitem a genotipagem direta de genes candidatos usando PCR. Aplicação de marcadores genéticos na seleção animal pode melhorar drasticamente o melhoramento genético, principalmente em gado de leite.

2.2. Leptina

A leptina é uma proteína sintetizada pelo tecido adiposo e está envolvida na regulação de consumo de alimentos, balanço energético, fertilidade e funções imunes (Itossner, 1998). Tratamento com leptina em animais tem demonstrado causar uma diminuição na ingestão de alimentos, perda de peso corporal, redução do depósito de gordura e acréscimo da energia metabólica.

A ligação da leptina ao neuropeptídeo Y (NPY), encontrado no hipotálamo, é importante no comportamento alimentar envolvendo sinais internos do estado de energia no organismo. NPY também está envolvido no controle da função reprodutiva (Wayne e Fraley, 1995). Estudiosos como Magni et al. (2000) e Buchanan et al. (2002) registraram a ligação da leptina ao receptor do neuropeptídeo Y (NPY), que é importante modulador da energia metabólica e do controle da reprodução (Almeida et al., 2007). Ltenson e Castracane (2000) e Ruas et al. (2005) afirmam que a leptina é um sinal positivo para o sistema reprodutivo, pois sua presença significa que há energia suficiente, proveniente da camada lipídica, para suprir a demanda de energia necessária à gestação. Esses autores reforçam o auxílio dessa proteína no desenvolvimento ovariano, predizendo o início do estagio de procriação, e ainda atua como regulador permissivo da maturação sexual (Bartolome et al., 2005).

Svennersten-Sjaunja e Olsson (2005) mencionam que a seleção de bovinos leiteiros, geneticamente favoráveis à produção de leite, tem uma influência negativa na fertilidade. Akers (2006) relata que as vacas leiteiras possuem um desequilíbrio em seu balanço energético em decorrência da lactação precoce, fato que explica o acréscimo na duração do período entre partos (Veerkamp et al., 2000, Liefers et al., 2002).

Segundo Delevalud et al. (2000) e Ehrhardt et al. (2000), a incidência de leptina no sangue é proporcional ao acréscimo de lipídio no organismo, conseqüentemente, existe uma correlação direta com o aumento do balanço energético. Em bovinos, o gene da leptina localiza-se no cromossomo 4, o qual consiste em 3 *exons* e 2 *introns*, sendo que apenas 2 *exons* expressam a proteína. A região codificante do gene da leptina, de 501 pb, está contida nos *exons* 2 e 3, os quais são separados por um intron de aproximadamente 3 kb

(Stone et al., 1996). Lindersson et al. (1998) encontraram um QTL para produção de leite próximo ao gene da leptina, em uma distância de 82,8 centimorgans (cM). Eles encontraram QTL para produção de leite, gordura e proteína a 65 cM e 85 cM, e QTL para porcentagem de gordura e proteína a 75 cM e 95 cM, respectivamente.

3. APLICABILIDADE DE TÉCNICAS MOLECULARES NA IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DE POLIMORFISMOS

3.1. *Polymerase Chain Reaction* (PCR)

O desenvolvimento da técnica de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) revolucionou a genética molecular. Essa técnica utiliza dois *primers* de fita simples de DNA (normalmente de 20pb a 25pb) para iniciar a replicação do DNA num ponto específico da molécula. Uma enzima polimerase termoestável é utilizada para copiar o DNA molde pela extensão dos *primers*, sintetizando a fita complementar ao DNA. Por meio de vários ciclos de desnaturação do DNA, ligação dos *primers*, e extensão da fita molde, haverá uma amplificação da seqüência alvo do DNA entre os *primers*. O DNA amplificado por PCR pode ser digerido com enzima de restrição e visualizado por eletroforese em gel para determinar se os fragmentos de DNA foram clivados ou não pela *Restriction Fragment Length Polimorphism – Polymerase Chain Reaction* (PCR-RFLP). Essas técnicas são freqüentemente empregadas em genotipagem de uma mutação genética conhecida (Smith et al., 2000).

3.2. PCR-SSCP

As variações alélicas na seqüência de genes podem ser diagnosticadas pelo polimorfismo conformacional de fita simples (SSCP). Bannai et al. (1994), Ortí et al. (1997), Souza et al. (2003), explicam que o SSCP permite a detecção de mutações de ponto ou variações nas seqüências nucleotídicas, devido às mudanças conformacionais nas moléculas de DNA fita simples, durante a eletroforese em gel não desnaturante (Orita et al., 1989). Contudo, fatores como a

quantidade de *primers*, tamanho do fragmento a ser amplificado, posição e natureza da substituição no fragmento, composição da seqüência do fragmento de DNA, influenciam na conformação das fitas simples (Sarkar et al., 1992).

Maruya et al. (1996) esclarecem que, devido à instabilidade da conformação gerada pela fita simples do DNA, foi desenvolvida a técnica de Polimorfismo Conformacional de Fita Simples em Baixa Força Iônica (LIS-SSCP), que consiste numa adaptação da técnica de SSCP. Eles mencionam que a solução desnaturante de formamida é substituída por uma solução de baixa força iônica, LIS. Convém reforçar que a estabilidade das fitas simples de DNA pela LIS é garantida pelo declínio da temperatura de dissociação sob baixas condições iônicas e uma alta diluição entre o DNA amplificado e o tampão LIS, resultando numa menor possibilidade de hibridação entre as fitas *sense* e *antisense*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abasht, B., Dekkers, J. C. & Lamont, S. J. (2006) Review of quantitative trait loci identified in the chicken. *Poultry Science* 85, 2079-96.

Akers, R. M. (2006) Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal Dairy Science* 89, 1222-34.

Almeida, S. E. M., Almeida, E. A. D., Terra, G., Neves, J. P., Gonçalves, P. B. Dias & Weimer, T. D. A. (2007) Associação entre marcadores moleculares ligados ao gene da Leptina e ganho de peso em vacas de corte no pós-parto. *Ciência Rural* 37, 206-11.

Andersson, L. & Georges, M. (2004) Domestic animal genomics: deciphering the genetics of complex traits. *Nature Review Genetict* 5, 202-12.

Bannai, M.; Tokunaga, K.; Lin, L.; Kuwata, S.; Mazda, T.; Amaki, I.; Fujisawa, K.; Juji, T. (1994) Discrimination of human HLA-DRB1 alleles by PCR-SSCP (single-

strandconformation polymorphism) method. *European Journal of Immunogenetics* 21, 1-9.

Bartolome, J. A., Silvestre, F. T., Kamimura, S., Arteché, A. C. M., Melendez, P., Kelbert, D., Mchale, J., Swift, K., Archbald., L. F. & Thatcher, W. W. (2005) Resynchronization of ovulation and timed insemination in lactating dairy cows: use of the ovsynch and heatsynch protocols after non-pregnancy diagnosis by ultrasonography. *Theriogenology* 63, 1617-27.

Bicalho, H.M.; Pimenta, C.G.; Mendes, I.K.; Pena, H.B.; Queiroz, E.M. & Pena S.D. (2006) Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. *Genetics and molecular research* 5, 432-7.

Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Wilkelman-Sim, C. & Schmutz, S. M. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genetic Selection Evolution* 34, 105-16.

Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y.-W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Novak, S., Collins, C., Welch, C. B., Lusi, A. J., Erickson, S. K., Farese Jr, R.V. (1998) Identification of a gene encoding an acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95, 13018-23.

Coppieters, W., Kvasz, A., Arranz, J.-J, Grisart, B. & Riquet, J., Farnir, F. & Georges, M. (1999) The great-grand-daughter design: a simple strategy to increase the power of a grand-daughter design. *Genetics Research* 74, 189-99.

Davis, G. P. & Denise, S. K. (1999) The impact of genetic markers on selection. *Journal Animal Science* 76, 2331-9.

Delevald, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D. H., Gertler, A. & Kann, G. (2000) Plasma leptin determination in ruminants: effect of nutritional status and

body fatness on plasma leptin concentration assessed by a specific RIA in sheep. *Journal Endocrinology* 165, 519-26.

Dekkers J.C.M. (2004). – Commercial application of marker and gene assisted selection in livestock: strategies and lessons. *Journal Animal Science* 82, 313-28.

Ehrhardt, R. A., Slepatis, R. M., Willott, J. S., Amburgh, M. E. V., Bell, A. W. & Boisclair, Y. R. (2000) Development of specific radioimmunoassay to measure physiological changes of circulating leptin in cattle and sheep. *Journal Endocrinology* 166, 519-28.

Furbass, R., Winter, A., Fries, R. & Kuhn, C. (2006) Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome 14 can stimulate gene expression. *Physiological Genomics* 25, 116-20.

Georges, M. (1998) Perspectives of marker assisted selection in dairy cattle breeding: In: milk composition, production and biotechnology, CAB International.

Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., & Snell, R. (2001) Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12, 222-31.

Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J.-J., Kvasz, A., Mni, M., Simon, P., Frere, J.-M., Coppieters, W. & Georges, M. (2004) Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2398-403.

Itossner, K. L. (1998) Cellular, Molecular and Physiological Aspects of leptin: potential application in animal production. *Canadian Journal of Animal Science*, 463-80.

Javanmard, A., Asadzadeh, N., Banabazi, M. H. & Tavakolian, J. (2005) The allele and genotype frequencies of bovine pituitary-specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR-RFLP. *Iranian Journal of Biotechnology* 3, 104-8.

Jensen, R. G. (2002) The composition of bovine milk lipids: january 1995 to december 2000. *Journal of Dairy Science* 85, 295-350.

Júnior, G.B.C.; Klumb, C. E.; Magluta, E.P.S.; Scheiner, M. A.M.; Vasconcelos, F. Da C.; Pires, V.; Andrade, G. V. D.; Carvalho, L. O. D; Dobbin, J. De A. & Maia, R.C. (2007) Uso simultâneo do método do polimorfismo conformacional de fita simples e da citometria de fluxo no aumento da eficácia da detecção de anormalidades do gene e da proteína do p53 na leucemia mielóide crônica. *Revista Brasileira de Análises Clínicas* 39, 103-13.

Kappes, S. M. Keele, J. W.; Stone, R. T.; Macgraw, R. A.; Sonstegard, R. S.; Smith, T. P. L., Lopez-Corrales, N.L. & Beattie, C. W. (1997) A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7, 235-49.

KAUPE, B., WINTER, A. FRIES, R. & ERHARDT, G. (2004) DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research* 71, 188-87.

Khatib, H., Leonard, S. D., Schutzkus, V., Luo, W. & Chang, Y. M. (2006) Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. *Journal Dairy Science* 89, 1753-60.

Kuehn, C., Edel, C., Weikard, R. & Thaller, G. (2007) Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-

acyltransferase (*DGAT1*) gene on milk production traits in German Holstein cows. *Biomed Central Genetics* 8, 1-9.

Kuhn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O. R. P., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M. & Fries, R. (2004) Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* 167, 1873- 81.

Liefers, S. C., Veerkamp, R. F. & Vander, L. T. (2002) Association between leptin gene polymorphism and production, live weight energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. *Journal Dairy Science* 85, 1633-8.

Lindersson, M., Andersson-Eklund, L, Koning De, D. J., Lunden, A., Maki-Tanila, A. & Andersson, L. (1998) Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4. *Journal Dairy Science* 81, 1454-61.

Ltenson, M. C. & Castracane, D. V. (2000) Leptin in pregnancy. *Biology of reproduction* 63, 1219-28.

MACHUGH, De; SHRIVER, M.D., LOFTUS, R. T.; CUNNINGHAM, P. & BRADLEY, D.G. (1997) Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetic* 146, 1071-86.

Magni, P., Motta, M. & Martini, L. (2000) Leptin: a possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regulation Peptidio* 92, 51-6.

Maruya, E., Saji, H. & Yokoyama, S., (1996) PCR-LIS-SSCP (Low Ionic strength Single-stranded conformation polymorphism) – A simple method for high-resolution allele typing of HLA-DRB1, -DQB1, and -DPB1. *Genome Methods* 6, 51-7.

Oliveira; D. J. C. & Nogueira; G. P. (2006) Curvas de crescimento de bezerros da raça girolando. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* 9, 3-8.

Mishra, B. Tandia, M. S., Kumar, S. T. B. & Vijn, R. K. (2007) Characterization of the DGAT1 gene in the Indian buffalo (*Bubalus bubalis*). *Genetics and Molecular Biology* 30, 1097-100.

Ordóñez, J. A., Rodríguez, M. I. C., Álvarez, L. F., Sanz, M. L. G., Minguillón, G. D. E. F., Perales, L. H. & Cortecero, M. D. S. (2005) *Tecnología de Alimentos* 1, 280.

Orita, M.; Iwahama, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989) Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 86, 2766-70.

Ortí, G.; Hare, M. P. & Avise, J. C. (1997) *Detection and isolation of nuclear haplotypes by PCR-SSCP*. *Molecular Ecology* 6, 575-80.

Ripoli, M. V. Corva, P. & Giovambattista, G. (2006) Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. *Research in Veterinary Science* 80, 287-90.

Sanders, K., Bennewitz, J., Reinsch, N., Thaller, G., Prinzenberg, E.-M., Kuhn, C. & Kalm, E. (2006) Characterization of the DGAT1 mutations and the CSN1S1 promoter in the German Angeln dairy cattle population. *Journal Dairy Science* 89, 3164-74.

Ruas, J. R. M., Brandão, F. Z., Silva Filho, J. M., Borges, A. M., Palhares, M. S., Carvalho, B. C. & Borges, L. E. (2005) Indução do estro no pós-parto em vacas primíparas Holandês-Zebu. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* 57, 476-84.

Sarkar, F.H., Sakr, W.A., Li, Y.W., Sreepathi, P. & Crissman, J. D. (1993) Detection of human papillomavirus (HPV) DNA in human prostatic tissues by polymerase chain reaction (PCR). *Prostate*, 22, 171-180.

Sgarbieri, V. C. (2005) Revisão: Propriedades Estruturais e Físico-Químicas das Proteínas do Leite. *Brazilian Journal of Food Technology* 8, 43-56.

Smith J.A., Lewis A.M., Wiener P. & Williams J.L. (2000) Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Animal Genetics* 31, 306-09.

Souza, C.S. De; Kerr, W.E.; Bonetti, A. M.; Souza, C. S.De; Santana, F. A.; Gourlart, L. R.; Oliveira, R.C.; Vieira, C. U. & Vasconcelos, S, M. (2003) *Comparação das técnicas de SSCP, DS-PCR, PCR-RFLP para detecção de mutação no gene mitocondrial 16S RRNA em populações de Melipona Rufilentris*. *Bioscience Journal* 19, 65-70.

Spelman, R. J. (2002) Utilization of molecular information in dairy cattle breeding. Electronic communication 22-02 in Proc. 7th World Congress On Genetics Applied To Livestock Production, Montpellier, France.

Stone, R. T., Kappes, S. M. & Beattie, C. W. (1996) The bovine, homologue of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genetics* 7, 399-00.

Svennersten-Sjaunja, K. & Olsson, K. (2005) Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 241-58.

Thaller, G., Kühn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zühlke, H. & Fries, R. (2003). DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* 34, 354-57.

Tantia, M. S., Vijh, R. K., Mishra, B. P., Mishra, B., Kumar, S, T., Sodhi, M. (2006) DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo

(*Bubalus bubalis*) breeds. Biomed Central Veterinary Research 2, 1-5.

Tupac-Yupanqui, I., Baro, J. A., Dunner, S. (2004) Efecto del gen DGAT1 sobre la cantidad y composición de la leche en la raza bovina Frisona Española. Revista Archivos de Zootecnia 53, 293-99.

Wayne, J. K. & Fraley, G. S. (1995) Neuropeptid Y: It's in the neural regulation of reproductive. Function and food intake in mammalian species 6, 1850-209.

Williams, J. L. (2005) The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. Review of the Office International des Epizooties 24, 379-91.

Wilkins, R. J. & Davey, H. W. (1997) A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. Animal Genetic 28, 376.

Winter, A., Krämer, W., Werner, F. A. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G. & Fries, R. (2002) Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. Proceedings of the National Academy of Sciences 99, 9300-05.

Veerkamp, R. F., Oldenbroek, J. K., Van Der Gaast, H. J. & Van Der Werf, J. H. (2000) Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. Journal Dairy Science 83, 577-83

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DOS GENES DGAT1 E LEP NO DESEMPENHO PRODUTIVO EM BOVINO LEITEIRO DA RAÇA GIROLANDO

RESUMO

Genes candidatos a marcadores genéticos têm sido associados com a produção de leite em bovinos, como o diacilglicerol O-aciltransferase 1 (DGAT1) e a leptina (LEP); entretanto, esses genes não foram investigados simultaneamente e nem foram avaliados na raça brasileira Girolando (Gir x Holandês, retrocruzamento de Holandês). Nosso objetivo foi determinar a influência dos genes relacionados a gordura, DGAT1 e LEP, e seus polimorfismos sobre características de desempenho da produção de leite na raça Girolando. Os resultados indicaram que o alelo K do gene DGAT1 possui uma associação significativa com a produção total e média diária de leite com efeito aditivo. O gene LEP mostrou que o alelo A e suas homozigotos são altamente prevalentes e quase fixos na população e podem ter sido favoravelmente selecionados durante retrocruzamentos para a origem da raça Girolando. O importante impacto do alelo K do gene DGAT1 na produção de leite confirma a iniciativa de realizar programas de melhoramento na raça Girolando assistido por seleções de marcadores genéticos.

Palavras Chaves: Raça Girolando, Bovino, DGAT1, LEP, Produção de leite, Polimorfismos.

ABSTRACT

Candidate genes have been associated with milk production in bovines, such as the diacylglycerol O-acyltransferase 1 (DGAT1) and leptin (LEP); however, they have not been simultaneously investigated nor have been evaluated in the Brazilian Girolando breed (Gir x Holstein, backcrossed to Holstein). Our aim was to determine the influence of fat-related genes, DGAT1

and LEP, and their polymorphisms on performance traits of milk production in the Girolando breed. Results indicated that the K allele of the DGAT1 gene showed a significant association with total and average daily milk production with additive effect. The LEP gene showed that the A allele and its homozygote are highly prevalent and almost fixed in this population and may have been favorably selected during backcrossing for the origin of this breed. The important impact of the K allele of the DGAT1 gene on milk production corroborates the initiative of performing marker-assisted selections with this gene in breeding programs of the Girolando breed.

Keywords: Girolando Breed, Bovine, DGAT, LEP, Milk Production, Polymorphisms

1. INTRODUÇÃO

Programas de criação de bovinos brasileiros apresentam baixos índices de produtividade, o que pode ser relacionado ao clima, nutrição e herança genética. O aumento da performance produtiva em bovinos é um objetivo comum para vários programas de criação bovina em todo o mundo. No intuito de promover uma melhor adaptação de raças bovinas de alto rendimento a ambientes adversos, programas Brasileiros de melhoramento geraram novas raças pelo cruzamento do zebu com o taurino, como por exemplo, as raças brasileiras Girolando (Gir x Holandês), Brangus (Nelore x Angus) e Simbrasil (Guzerat x Simental). Essas raças tem demonstrado uma melhor adaptação ao clima quente e úmido, sendo observado um aumento na produtividade desses gados leiteiros (Bicalho et al., 2006).

Decidimos investigar as variações de polimorfismos de genes específicos na raça Girolando devido a alguns fatores extrínsecos e intrínsecos relacionados com o meio ambiente e com a herança genética, respectivamente. Javanmard et al. (2005) explicam que ambos fatores têm participação incisiva no metabolismo da raça Girolando quanto à síntese do leite. Dentre esses, é possível ressaltar o tipo de alimentação (Restle et al., 2005), o manejo (Cérdotes et al., 2004; Oliveira e Nogueira, 2006), as condições edafo-climáticas (Gonzalez et al., 2004; Khatib et al., 2006; Oliveira e Nogueira, 2006; López et al., 2007) e os aspectos genotípicos

(Smith et al., 2000, Komisarek et al., 2004; Grisart et al., 2004, Khatib et al., 2006).

Seleção de genótipos específicos ou alelos de genes candidatos em bovinos que possuem características economicamente favoráveis são vantajosos (Williams, 2005) e entre eles, o diacilglicerol O-aciltransferase 1 (DGAT1) e Leptina (LEP) genes têm sido considerados de grande interesse para gado leiteiro (Ripoli et al. 2006, 2011).

O gene DGAT1 expressa a proteína acil CoA diacilglicerol aciltransferase, uma enzima microsomal integrante de membrana, atuante na síntese de triglicerídeos em animais (Kuhn et al., 2004; Tanti et al., 2006). Conforme relatado por Smith et al. (2000), a ausência do gene DGAT1 em algumas fêmeas, afeta a síntese de Triacilglicerídeos, contribuindo para redução e/ou extinção da produção de leite pelo animal. Furbass et al. (2006) demonstraram que o gene DGAT1, localizado na porção terminal do centrômero referente ao cromossomo 14 de bovinos, é provavelmente um loco com perfil quantitativo (QTL). Grisart et al. (2001), Winter et al. (2002) e Roos et al. (2007) evidenciaram que a oscilação no perfil QTL é comumente causado por uma substituição de dinucleotídeos não conservativa ApA→ GpC no *exon 8* do gene DGAT1, mudando de lisina para alanina na posição 232 (mutação K232A) na proteína codificada. O aumento de gordura no leite em diferentes raças bovinas está intimamente associado à lisina (K) na posição 232 da proteína codificada por DGAT1 em bovinos (Kaupe et al., 2004), enquanto que uma alanina (A) nessa posição é associada com baixo conteúdo de gordura no leite (Winter et al. 2002; Kuhn et al., 2004).

O gene LEP expressa uma proteína de 16kDa sintetizada pelo tecido adiposo. Tendo sua funcionabilidade aliada ao balanço energético (Bartha et al., 2005; Chilliard et al., 2005), fertilidade (Liefers et al., 2002, 2005) e propriedades imunológicas do rebanho (Fruhbreck et al., 1998; Lord et al, 1998). Em bovinos, o gene da leptina (LEP) localiza-se no cromossomo 4, o qual consiste em 3 *exons* e 2 *introns*, sendo que apenas 2 *exons* expressam a proteína (Stone et al., 1996). Lindersson et al. (1998) encontraram um QTL para produção de leite próximo ao gene da leptina, em uma distância de 82,8 centimorgans (cM). Vários polimorfismos no gene da leptina foram encontrados em bovinos, que influenciam na produção de leite, reprodução e características de ingestão de alimentos, tais

como, três SNPs no *exon 2* (Arg/Cy) e *exon 3* (Ala/Val, Glu/Arg), outros polimorfismos localizados na região promotora e nove SNPs no *intron 2*, também foram encontrados no genoma bovino (Javanmard et al., 2010). Veerkamp et al. (2000), Alfonso (2005) e Williams (2005) indicaram a LEP como um gene candidato para a seleção assistida por marcadores, devido ao seu importante papel fisiológico, e sua suposta associação com o desempenho produtivo de bovinos de leite, o que foi demonstrado em outros estudos (Akers et al., 2006; Liefers et al., 2005).

Este estudo teve como objetivo determinar a influência de polimorfismos dos dois genes DGAT1 e LEP relacionados com metabolismo de gordura e com a produção de leite e seus componentes na raça Girolando.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta do material

Amostras de sangue foram coletadas de 349 fêmeas da raça Girolando (3/8 Gir + 5/8 Holstein). Todos os animais em análise foram ordenhadas duas vezes ao dia. Devido às freqüências diferenciais de lactação, a ordem de lactação superior a sete (8-11) foram considerados como sétima ordem, conforme registrado pela Associação Brasileira de Criadores de Girolando (ABCG), o programa oficial de controle leiteiro monitorado pelo Serviços de Controle Leiteiro da Associação (SCL). Regimes alimentares foram agrupados em 1 = pasto com um suplemento regular de sal mineralizado; 2 = pasto com maior suplementação mineral e/ou animais confinados. Para a produção total, o efeito linear da duração da lactação (em dias) como co-variável também foi considerada. Informações sobre a produção diária e anual de leite, período de lactação da vaca, e os intervalos de nascimento foram fornecidos pelo SCL.

2.2. Extração de DNA e genotipagem

Linfócitos foram isolados de amostras de PBMC por lavagem com solução salina 0,9% e precipitação a 2500 rpm por 10min. O pellet de linfócitos foi lavado

três vezes com um tampão de lise de glóbulos vermelhos (5 mM de sacarose; 10 mM de Tris-HCl pH 7,5; 5 mM de MgCl₂; 1% de Triton X-100) e uma vez com um tampão de lise nuclear (10 mM de Tris-HCl; 2 mM EDTA pH 8,0, 400 mM de NaCl). O pellet resultante foi incubado com uma solução de lise celular contendo proteinase K (10 mg / mL) durante à noite a 37°C. Por fim, o DNA foi extraído das células usando fenol-clorofórmio (Sambrook and Russel, 2001).

Genotipagem de ambos DGAT1 e LEP foi realizada por PCR-RFLP convencional, *Polymerase Chain Reaction- Restriction Fragment Length Polymorphism* conforme já descrito (Liefers et al., 2002) e por PCR-SSCP (PCR – *Single Strand Conformation Polymorphisms*), como descrito por Orita et al. (1989). Os padrões eletroforéticos do PCR-SSCP foram comparados com os perfis anteriores do PCR-RFLP para ambos os genes, dessa forma foram calculados os genótipos e suas frequências. O PCR-SSCP também foi utilizado para verificar se novas mutações estavam presentes na região genômica dos genes analisados.

Para a genotipagem do gene DGAT1, foi utilizado um fragmento de 411 pb, localizado no *exon 8*, que inclui a mutação K232A. As seqüências dos *primers* utilizados foram: *sense* 5'-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3' e *anti-sense* 5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3 (Liefers et al., 2002).

Na reação de PCR (20µL), foi utilizado 1 µL de DNA genômico, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Platinum, Invitrogen), 10 µmol de cada primer, 200µM de dNTP, 1, 5 mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X e água. O programa de PCR incluiu uma desnaturação inicial de 94 °C por 4 min, seguido por 10 ciclos de 60 s a 94 °C, 60 s a 66 °C (1 °C.ciclo⁻¹ por 60 s) e 1 min. a 72 °C, adicionado de 25 ciclos 1 min. a 94 °C, 2 min. a 56 °C e 1 min. a 72 °C, sendo a extensão final de 10 min a 72 °C.

Para a genotipagem do gene da leptina (LEP) por meio de PCR-RFLP and PCR-SSCP, foi utilizado um produto de PCR de 400 pb, localizado no *intron 2* entre os *exons 2* e *3* da leptina. As seqüências dos *primers* foram: *sense* 5'TGGAGTGGCTTGTTATTTTCTTCT3'; *antisense* 5'GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT-3' próximo à localização do polimorfismo (Liefers et al., 2002).

Na mistura de reação para PCR (20 µL) foi utilizado 1 µL de DNA genômico, 0,5 U de Taq DNA polimerase (Platinum, Invitrogen), 10 µmol de cada

primer, 200µM de dNTP, 1, 5 mM de MgCl₂, tampão da enzima 1X e água. O programa de PCR incluiu uma desnaturação inicial de 94 °C por 2 min, seguido por 35 ciclos de 94 °C, 55 °C, e 72 °C (1 min cada) e finalizou com uma extensão final por 15 min a 75 °C.

Dois microlitros do produto de PCR foram adicionados a 18 µL de tampão de Baixa Força Iônica - LIS (10 % sacarose, 0,01 % azul de bromofenol e 0,01 % xileno cianol) homogeneizados e aquecidos a 95 °C por 12 minutos e imediatamente transferidos para um banho de gelo e aplicados em um gel de de poli(acrilamida 12% (49:1; acrilamida:bis-acrilamida). A eletroforese ocorreu em temperatura ambiente, 15 mA (150 W, cerca de 1000 V) em tampão TBE 1X durante 16h. O PAGE foi coloração de prata e a secagem de acordo com Popescu (1983), com adaptações para fixação em papel celofane poroso transparente, realizado à temperatura ambiente por 12 h e esticado sobre a superfície de uma placa de vidro.

2.3. Análises Estatísticas

As freqüências alélicas e genóticas foram calculadas de acordo com Weir (1996). Foram calculados os equilíbrios de Hardy-Weinberg (HWE) para os genes em estudo. As características de produção total de leite, produção diária de leite, duração da lactação e intervalo entre partos foram associados aos polimorfismos dos genes DGAT1 e LEP, usando o seguinte modelo:

$$y_{ijk(l)mnop} = \mu + R_i + G_j + \delta_{ijk(l)} + S_{m(i)} + A_n + M_o + O_p + \beta(I_{ijk(l)mnop} - \hat{I}) + \epsilon_{ijk(l)mnop}$$

onde: $y_{ijk(l)mnop}$ = o valor genético; μ = média geral; R_i = efeitos fixos do i th do rebanho, com $i = 1, 2, \dots, 18$; G_j = efeitos fixos do j th do genótipo; $j = 1, 2, 3$; $\delta_{ijk(l)}$ = efeito aleatório da vaca l th (com $l = 1, 2, \dots, 350$ para a produção total de leite; $l = 1, 2, \dots, 352$ para a produção de leite diária e duração da lactação nos touros k th, com $k = 1, 2, \dots, 136$), nos genótipos j th e rebanho i th; assumindo que $\delta_{ijk(l)} \sim N(0, \sigma^2_{\delta})$, onde σ^2_{δ} é a variância e a matriz de covariância, considerando a independência dos resíduos; $S_{m(i)}$ = efeitos fixos dos regimes alimentares m th dentro do rebanho i th; $m = 1, 2$; A_n = efeito fixo do ano de nascimento n th; $n = 1, 2$,

..., 13 para a produção total de de leite e $n = 1, 2, \dots, 14$ para a produção diária de leite e duração da lactação; M_o = efeito fixo do mês de nascimento oth ; $o = 1, 2, \dots, 12$; O_p = efeito fixo da ordem de nascimento pth ; $p = 1, 2, \dots, 7$; β = coeficiente linear (co-variável) associado com duração da lactação (para a produção total de leite); $I_{ijk(l)mnop}$ = duração da lactação (para a produção total de leite); \hat{I} = duração da lactação média (para a produção total de leite); $\epsilon_{ijk(l)mnop}$ = efeito aleatório associado a vaca lth dentro do touro kth , no genótipo jth e no rebanho ith dentro da ordem de nascimento pth ; assumindo $\epsilon_{ijk(l)mnop} \sim v(0, Vs_e^2)$, onde Vs_e^2 é a variância e a matriz de covariância, considerando a dependência dos resíduos.

Os dados foram analisados através de um modelo misto, adaptado por Buchanan et al (2003), usando o programa estatístico SAS 9.1.3 (System and SAS®, 2005). Esse modelo também incluiu os efeitos fixos de ano e mês do início da lactação, ordem de lactação, sistema de alimentação dentro de fazenda e o genótipo para o gene de interesse. Ainda, foram considerados os efeitos aleatórios do pai da vaca, vaca dentro de fazenda e resíduos. Simultaneamente, foi considerada uma estrutura de componentes de variância devido às medidas repetidas no mesmo animal. Para a produção total, considerou-se também o efeito linear da duração da lactação (em dias) como co-variável.

A média de comparações para os genótipos e os genes, DGAT1 (AA, KK e KA) e LEP (AA, AB e BB), foram realizados usando comparações emparelhadas através do teste t de Student, com uma probabilidade de 5% de significância. Análise de regressão foi realizada para investigar o efeito de substituição alélica sobre as características de desempenho. Frequências gênicas e alélicas foram plotadas umas contra as outras para analisar a distribuição das mesmas entre a população.

3. RESULTADOS

A técnica PCR-SSCP foi bem sucedida na substituição da análise por PCR-RFLP, e facilmente distinguiu todos os genótipos para ambos genes DGAT1 e LEP. O padrão de bandas do DNA mostrado na eletroforese PAGE modificado, apresentaram perfis muito específicos (Fig.1). Genótipos foram identificados com

base em *cross-matched* perfis apresentados pela análise com PCR-RFLP, que evidenciou os mesmos padrões de bandas descrito por Liefers et al. (2002, dados não mostrados). Nenhuma mutação ou perfis de banda diferenciais foram observados em PCR-SSCP; portanto, esses polimorfismos são os únicos dentro das regiões genômicas investigados. No entanto, os nossos padrões de bandas para os alelos A e K não correspondem com os perfis descritos em outros lugares (Riploli et al., 2006). Provavelmente por causa dos muitos parâmetros diferentes utilizados, tais como: voltagem da eletroforese, tempo de corrida no gel, temperatura, concentração do gel, a relação acrilamida: bis-acrilamida, e o tampão de baixa resistência iônico utilizado para a desnaturação da amostra amplificada (LIS-SSCP), pode ter influenciado no padrão conformacional de cada molécula de DNA de fita simples.

As freqüências alélicas e genótípicas para os genes DGAT1 e LEP estão apresentados na Tabela 1. A freqüência do gene DGAT1 teve uma maior prevalência do alelo K (0,54), com KK e genótipos KA predominante na população, com freqüências de 0,27 e 0,54, respectivamente. No entanto, os polimorfismos do gene LEP nesta raça foram mais restrito, houve maior freqüência do alelo A (0,87), com freqüências muito altas para os genótipos AA (0,75) e AB (0,24). As freqüências genótípicas de ambos os genes (DGAT1 e LEP) estão de acordo com o equilíbrio de Hardy-Weinberg para a população em estudo ($p > 0,05$).

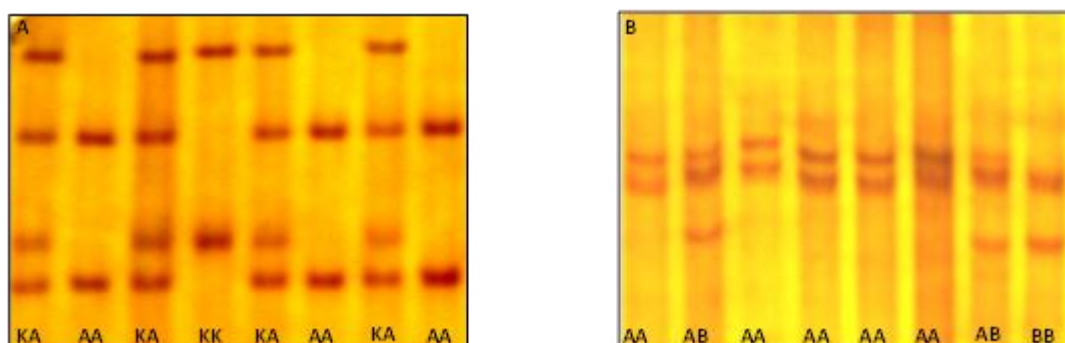


Figura 1. Genotipagem PCR-SSCP dos genes DGAT (A) and LEP (B) por eletroforese em gel de poli-acrilamida 12% (49:1, acrilamida:bis), 15mA em tampão 1X TBE durante 16 h à temperatura ambiente, seguido de coloração pela prata. Os genótipos são indicados na parte inferior do gel.

Tabela 1

Freqüências alélicas e genóticas estimadas dos genes DGAT1 na raça Girolando.

Genes	Alélicas		Genóticas		
	A	K	AA	KA	KK
DGAT1	0,46	0,54	0,19	0,54	0,27
LEP	A	B	AA	AB	BB
	0,87	0,13	0,75	0,24	0,01

Um efeito aditivo significativo foi observado nos alelos do gene DGAT1, especificamente para a produção total de leite e produção média diária de leite ($p > 0,05$) (Tabela 2). Foi também verificado que o efeito da substituição alelo A→K promove um aumento de 106,46 kg na produção de leite total e 0,365 kg na média diária de produção de leite (Fig. 2). Os alelos e genótipos LEP não apresentaram qualquer impacto significativo em nenhuma das quatro características investigadas ($p > 0,05$).

A média de comparações entre os genótipos para todas as quatro características de desempenho produtivo da raça Girolando são apresentados na Tabela 3. Valores médios para os genótipos DGAT1 foram significativamente diferentes para a produção de leite total e média de produção diária de leite ($p > 0,05$).

Tabela 2

Efeitos aditivos e de dominância dos de alelos dos genes DGAT1 e LEP em quatro características de desempenho produtivo da raça Girolando de gado leiteiro.

GENES EFEITOS	Produção Total de Leite		Produção Diária de Leite		Intervalo entre Partos		Duração da Lactação	
	GL	Pr>F	GL	Pr>F	GL	Pr>F	GL	Pr>F
DGAT1								
Aditivo	213	0,05*	212	0,05*	111	0,15	165	0,76
Dominante	239	0,41	227	0,52	133	0,35	167	0,34
LEP								
Aditivo	175	0,63	162	0,55	76,4	0,21	78,5	0,76
Dominante	169	0,23	155	0,19	79,8	0,23	76,6	0,56

GL = graus de liberdade; Pr>F(probabilidade para o teste F) * = Pr < 5.

A fim de investigar possíveis interações entre genes, realizamos uma análise combinada de frequências simples. E, apesar das frequências genóticas individuais para ambos os genes seguirem o equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas combinadas (Tabela 4) mostraram um desequilíbrio parcial para interações genóticas específicas, especificamente o AA (DGAT1) x BB (LEP), os quais não foram observados. Devido às frequências muito baixas de genótipos BB, o tamanho da amostra não apresentou poder estatístico para testar interações genóticas; no entanto, é interessante ressaltar que o genótipos KA e KK do gene DGAT1 foram mais favoráveis comparado com o genótipo AA do gene LEP, o qual apresentou um frequência de 0,62.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Os valores encontrados do gene DGAT1 foram aqueles esperados, pois o resultado do cruzamento entre as raças taurina e zebuína resultam na raça Girolando, com maior adaptação tropical, com a apresentação de uma alta frequência do alelo K (Winter et al., 2002). Na raça Holandês, um grande espectro de variações na frequência alélica do gene DGAT1 em populações selecionadas para a produção leiteira pode ser encontrado, com a frequência do K variando 0,35 a 0,7, conforme relatado por Grisart et al. (2001) e Spelman (2002). Komisarek et al. (2004) encontraram uma frequência de 0,83 e 0,71 para o K e A, respectivamente alelos na raça Jersey.

Raças européias têm altas frequências do alelo K, apesar de serem criados tradicionalmente para produção de carne e, como tal, este alelo é considerado parte do haplótipo ancestral do DGAT1. Por outro lado, uma baixa frequência do alelo K é encontrada em populações das raças zebuínas (Winter et al., 2002). Em touros indianos Holandês, os resultados indicaram que a frequência do alelo K (0,59) foi maior em relação ao alelo A (0,41) no gene DGAT1 (Patel et al., 2009).

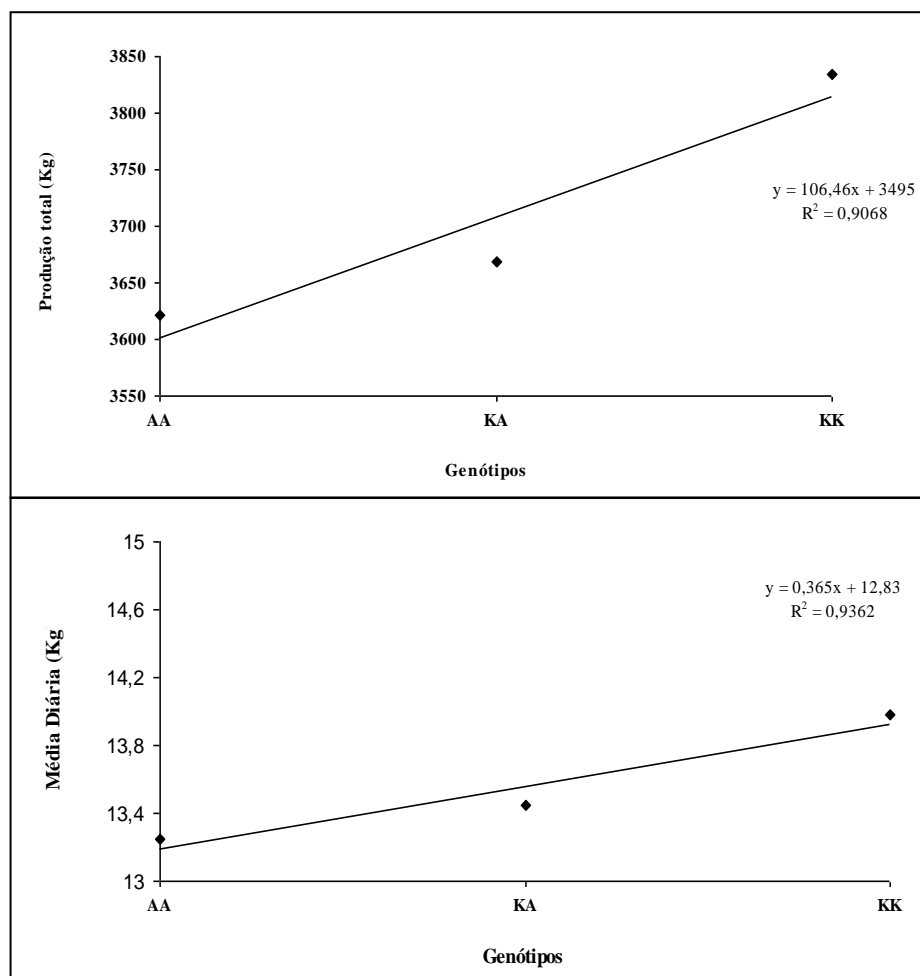


Figura 2. Análise de regressão das médias dos quadrados mínimos da produção total e da média diária da produção de leite em bovinos da raça Girolando considerando os genótipos do gene DGAT1 (AA, KA e KK).

Tabela 3. Médias dos quadrados mínimos para os genes DGAT1 e LEP para quatro características do desempenho produtivo em bovino leiteiro da raça Girolando.

Genótipos	Médias dos Quadrados Mínimos (Erro Padrão)*			
	Produção Total de Leite	Produção Diária de leite	Intervalo entre Partos	Duração da Lactação
DGAT1				
AA	3621,2 (105,7) ^a	13,2 (0,4) ^a	397,7 (12,7) ^a	278,9 (7,6) ^a
KA	3668,6 (79,5) ^{ab}	13,4 (0,3) ^{ab}	412,7 (10,2) ^a	285,1 (5,6) ^a
KK	3834,1 (103,2) ^b	13,9 (0,3) ^b	413,5 (11,8) ^a	281,3 (7,2) ^a
LEP				
AA	3708,2 (69,7) ^a	13,5 (0,2) ^a	406,5 (8,6) ^a	284,72 (5,0) ^a
AB	3583,0 (91,3) ^a	13,1 (0,3) ^a	407,3 (10,4) ^a	281,61 (6,4) ^a
BB	3857,0 (310,3) ^a	14,2 (1,1) ^a	374,6 (25,5) ^a	290,77 (19,8) ^a

* Médias seguidas por letras diferentes dentro das colunas e características são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste t de Student.

Em relação à frequência de alelos do gene LEP, resultados semelhantes foram relatados por Liefers et al. (2002), onde apenas um animal homocigoto para o alelo B foi encontrado, e em Ripoli et al. (2011), onde as frequências entre raças bovinas foram 0,900, 0,100 e 0,00 para AA, AB e BB, respectivamente ($p < 0.21$). Além disso, no trabalho de Liefers et al. (2002), as vacas com o genótipo Sau3IA-AB produziram 1,32 kg / d mais leite e consumiram 0,73 kg / d mais alimento em comparação com o genótipo SauAI-AA, sugerindo que o alelo RFLP-B poderia obter uma maior produção de leite sem ter um efeito negativo sobre o balanço de energia e de fertilidade dos animais. Este resultado decorre do efeito aditivo exclusivamente do gene DGAT1 na população estudada. Uma série de estudos têm associado o alelo K com alta produção de gordura no leite de gado leiteiro, uma tendência que é apoiada pela alta frequência deste alelo em indivíduos da raça Holandês selecionados para este fim (Komisarek et al., 2004). Este comportamento da variante K do polimorfismo do gene DGAT1, também foi observado em outras raças de gado leiteiro, tais como: no Holstein-Friesian (Grisart et al, 2001; Spelman, 2002; Thaller et al, 2003), no Jersey e Ayrshire, (Spelman, 2002), no Fleckvieh (Thaller et al., 2003).

Tabela 4. Apresentação das frequências genotípicas combinadas (%) dos genes DGAT1 e LEP em gado leiteiro da raça Girolando.

Genes/genótipos	DGAT1		
	AA	KA	KK
LEP			
AA	12,77%	40,78%	21,28%
AB	5,67%	13,12%	5,32%
BB	0%	0,71%	0,35%

Grisart et al. (2004) demonstraram que o alelo do gene DGAT1 que codifica lisina na diacilglicerol transferase sintetiza 1,5 vezes mais do que os triacilglicerídeos variante para alanina, o que pode explicar os efeitos fenotípicos mostrado aqui. Os resultados do gene LEP corroboram os achados de Zwierzchowski et al. (2002) que também não conseguiram encontrar uma relação significativa entre os alelos do gene da leptina e componentes da produção leiteira. No entanto, a controvérsia permanece, como outros estudos, utilizando diferentes polimorfismos, têm demonstrado o impacto do gene LEP sobre o

aumento da produção de leite (Veerkamp et al, 2000;. Liefers et al, 2002; Buchanan et al, 2003). O efeito aditivo do alelo K do gene DGAT1 e seu impacto significativo sobre a produção de leite, além da maior frequência do genótipo específico interação KK / KA (DGAT1) x AA (LEP) podem sugerir que ambos os genes estão sob seleção na raça Girolando. Mas o alelo favorável LEP (A) foi escolhido e fixado em um ritmo mais rápido, o que pode explicar em parte o genótipo falta (BB) e a frequência pequena do heterozigotos (AB). A raça Girolando brasileiro é originado por retrocruzamentos entre as raças zebu e taurina visando a adaptação ao ambiente com maiores rendimentos de leite e, portanto, a importância do gene LEP não pode ser descartado, principalmente por causa da maior frequência de seu genótipo mais produtivo (AA) em combinação com KK e KA genótipos do gene DGAT1. Embora os polimorfismos do gene LEP não apresentaram nenhum impacto significativo sobre a produção de leite e características associadas, foi demonstrado que o alelo A e seus homozigotos são predominantes e quase fixos na população e pode ter sido favoravelmente selecionados durante retrocruzamentos para originar esta raça brasileira.

Em resumo, nós mostramos a importância do impacto do alelo K do gene DGAT1 sobre a produção total e na produção média diária de leite com um efeito aditivo, o que corrobora a iniciativa de realizar seleções assistida por marcadores em programas de melhoramento da raça Girolando.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pelas agências Brasileira de Pesquisa, CNPq e CAPES com bolsas de estudo para SRC e LBQ, respectivamente; pela Associação Brasileira de Criadores Girolando (ABCG), com amostras de animais valiosos e dados; e pela empresa privada, Laboratórios Biogenetics, que forneceu os reagentes.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Akers, R.M., 2006. Major advances associated with hormone and growth factor regulation of mammary growth and lactation in dairy cows. *Journal of Dairy*

Science 89, 1222–1234.

Alfonso, L., 2005. Use of meta-analysis to combine candidate gene association studies: application to study the relationship between the ESR Pvull polymorphism and sow litter size. *Genetics, Selection and Evolution* 37, 417–435.

Bartha, T., Sayed-Ahmed, A., Rudas, P., 2005. Expression of leptin and its receptors in various tissues of ruminants. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 193–202.

Bicalho, H.M., Pimenta, C.G., Mendes, I.K., Pena, H.B., Queiroz, E.M., Pena, S.D., 2006. Determination of ancestral proportions in synthetic bovine breeds using commonly employed microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research* 5, 432–437.

Buchanan, F.C., Van Kessel, A.G., Waldner, C., Christensen, D.A., Laarveld, B., Schmutz, S.M., 2003. Hot topic: an association between a leptin single nucleotide polymorphism and milk and protein yield. *Journal of Dairy Science* 86, 3164–3166.

Cerdótes, L., Restle, J., Alves Filho, D.C.B., Nörnberg, M.D.F.B.L., Nörnberg, J.L., Heck, I., Silveira, M.F.D., 2004. Produção e composição do leite de vacas de quatro grupos genéticos submetidas a dois manejos alimentares no período de lactação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33, 610–622.

Chilliard, Y., Delavaud, D., Bonnet, M., 2005. Leptin expression in ruminants: nutritional and physiological regulations in relation with energy metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 3–22.

Fruhbreck, G., Jebb, S.A., Prentice, A.M., 1998. Leptin: physiology and pathophysiology. *Clinical Physiology* 18, 399–419.

Furbass, R., Winter, A., Fries, R., Kuhn, C., 2006. Alleles of the bovine DGAT1 variable number of tandem repeat associated with a milk fat QTL at chromosome

14 can stimulate gene expression. *Physiological Genomics* 25, 116–120.

Gonzalez, H. L., Fischer, V., Ribeiro, M. E. R., Gomes, J. F., Stumpf Jr., W. & Silva, M. A. (2004) Avaliação da qualidade do leite na bacia leiteira de Pelotas, RS. Efeito dos meses do ano. *Revista Brasileira de Zootecnia* 33, 1531-43.

Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R., 2001. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Research* 12, 222–231.

Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, N., Kim, J.-J., Kvasz, A., Mni, M., Simon, P., Frere, J.-M., Coppieters, W., Georges, M., 2004. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 2398–2403.

Javanmard, A., Asadzadeh, N., Banabazi, M.H., Tavakolian, J., 2005. The allele and genotype frequencies of bovine pituitary-specific transcription factor and leptin genes in Iranian cattle and buffalo populations using PCR–RFLP. *Iranian Journal of Biotechnology* 3, 104–108.

Javanmard, A., Khaledi, K., Asadzadeh, N., Solimanifarjam, A.R., 2010. Detection of polymorphisms in the bovine Leptin (LEP) gene: Association of a single with nucleotide Polymorphism with breeding value of milk traits in Iranian Holstein cattle. *Journal of Molecular Genetics* 02, 10–14.

Kaupe, B., Winter, A., Fries, R., Erhardt, G., 2004. DGAT1 polymorphism in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of Dairy Research* 71, 187–188.

Khatib, H., Leonard, S.D., Schutzkus, V., Luo, W., Chang, Y.M., 2006. Association of the OLR1 gene with milk composition in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy*

Science 89, 1753–1760.

Komisarek, J., Waskowicz, K., Michalak, A., Dorynek, Z., 2004. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in Jersey cattle. *Animal Science Papers and Reports* 22, 307–313.

Kuhn, C., Thaller, G., Winter, A., Bininda-Emonds, O.R.P., Kaupe, B., Erhardt, G., Bennewitz, J., Schwerin, M., Fries, R., 2004. Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. *Genetics* 167, 1873–1881.

Liefers, S.C., Veerkamp, R.F., Vander, L.T., 2002. Association between leptin gene polymorphism and production, live weight energy balance, feed intake and fertility in Holstein heifers. *Journal of Dairy Science* 85, 1633–1638.

Liefers, S.C., Veerkamp, R.F., Te Pas, M.F., Chilliard, Y., Van Der Lende, T., 2005. Genetics and physiology of leptin in periparturient dairy cows. *Domestic Animal Endocrinology* 29, 227–238.

Lindersson, M., Andersson-Eklund, L., De Koning, D.J., Lunden, A., Andersson, A., 1998. Mapping of serum amylase-1 and quantitative trait loci for milk production traits to cattle chromosome 4. *Journal of Dairy Science* 81, 1454–1461.

López, S., López, J., Stumpf Junior, W., 2007. Produção e composição do leite e eficiência alimentar de vacas da raça Jersey suplementadas com fontes lipídicas. *Archivos latinoamericanos de Producción Animal* 15, 1–9.

Lord, G.N., Mataresi, G., Howard, J.K., Baker, R.J., Bloom, S.R., Lechler, R.I., 1998. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression. *Nature* 395, 897–900.

Madeja, Z., Adamowicz, T., Chmurzynska, A., Jankowski, T., Melonek, J., Switonski, M., Strabe, T., 2004. Effect of leptin gene polymorphisms on breeding

value for milk production traits. *Journal of Dairy Science* 87, 3925–3927.

Oliveira, D.J.C., Nogueira, G.P., 2006. Curvas de crescimento de bezerros da raça girolando. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia* 9, 3–8.

Orita, M., Iwahama, H., Kanazawa, H., Hayashi, K., Sekiya, T., 1989. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2766–2770.

Patel, R.K., Chauhan, J.B., Soni, K.J., Singh, K.M., 2009. Genotype and allele frequencies of DGAT1 gene in Indian Holstein Bulls. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* 3, 4.

Popescu, O., 1993. A simple method for drying polyacrilamide slabs gels using glycerol and gelatin. *Electrophoresis* 4, 432–435.

Restle, J., Senna, D.B.D., Pacheco, P.S., Pádua, J.T., Vaz, R.Z., Metz, P.A.M., 2005. Grupo genético e heterose na produção de leite de vacas de corte submetidas a diferentes sistemas de alimentação. *Revista Brasileira de Zootecnia* 34, 1329–1338.

Ripoli, M.V., Corva, P., Giovambattista, G., 2006. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR SSCP methods. *Research in Veterinary Science* 80, 287–290.

Ripoli, M.V., Rogberg Muñoz, A., Lirón, J.P., Francisco, E., Villegas Castagnasso, E.E., Peral Garcia, P., 2011. History and selection imprinting on genetic relationship among bovine breeds analysed through five genes related with marbling. *Research in Veterinary Science* 90, 245–252.

Roos, A.P.W.D., Schrooten, C., Mullaart, E., Calus, M.P.L., Veerkamp, R.F., 2007. Breeding value estimation for fat percentage using dense markers on *Bos taurus*

autosomal 14. *Journal Dairy Science* 90, 4821–4829.

Sambrook, J., Russell, D.W., 2001. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Vol. 1, third ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Smith, J.A., Lewis, A.M., Wiener, P., Williams, J.L., 2000. Genetic variation in the bovine myostatin gene in UK beef cattle: allele frequencies and haplotype analysis in the South Devon. *Animal Genetics* 31, 306–309.

Spelman, R.J., 2002. Utilization of molecular information in dairy cattle breeding. Electronic communication 22–02 in Proc. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Montpellier, France.

Statistical Analysis System, SAS[®], 2005, 2005. Institute Incorporated. User's Guide, Version 9.1.3. Cary, North Carolina, USA.

Stone, R.T., Kappes, S.M., Beattie, C.W., 1996. The bovine, homologous of the obese gene maps to chromosome 4. *Mammalian Genetics* 7, 399–400.

Tantia, M.S., Vijn, R.K., Mishra, B.P., Mishra, B., Kumar, S.T., Sodhi, M., 2006. DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *Biomed Central Veterinary Research* 2, 1–5.

Thaller, G., Kuhn, C., Winter, A., Ewald, G., Bellmann, O., Wegner, J., Zuhlke, H., Fries, R., 2003. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. *Animal Genetics* 34, 354–357.

Veerkamp, R.F., Oldenbroek, J.K., Van Der Gaast, H.J., Van Der Werf, J.H., 2000. Genetic correlation between days until start of luteal activity and milk yield, energy balance, and live weights. *Journal of Dairy Science* 83, 577–583.

Weir, B.S., 1996. *Genetic Data Analysis Methods for Discrete Population Genetic*

Data, second ed. Massachusetts, Sinauer Associates. p. 445.

Williams, J.L., 2005. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Review of the Office International des Epizooties* 24, 379–391.

Winter, A., Krämer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G., Fries, R., 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 9300–9305.

Zwierzchowski, L., Krzyzewski, J., Strzalkowska, N., Siadkowska, E., Ryniewicz, Z., 2002. Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1 and leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish Black-and-White cows. *Animal Science Papers and Reports* 20, 213–227.