

## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

### **Associação do gene Osteopontina com a produção de leite em animais da raça Girolando<sup>1</sup>**

Fernanda de Mello<sup>2</sup>, Daisyléa de Souza Paiva<sup>3</sup>, Jaime Araújo Cobuci<sup>2</sup>, Marta Fonseca Martins Guimaraes<sup>3</sup>, Marcos Vinícius Barbosa da Silva<sup>3</sup>, José Braccini Neto<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Parte da dissertação de mestrado do primeiro autor, financiada pela Capes

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, email: [fernandade.mello@gmail.com](mailto:fernandade.mello@gmail.com)

<sup>3</sup>Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Resumo:** A busca por marcadores moleculares associados com a produção do leite, visando à seleção assistida (SAM), é crescente na bovinocultura leiteira. Neste 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, por meio das variáveis produção de leite em até 305 dias (P305) e capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite, em animais participantes do Teste de Progenie da raça Girolando. Foram analisados 32 touros e de 159 vacas da raça Girolando. Para amplificação foram utilizados *primers* descritos para a raça Holandesa e a diferenciação dos alelos C/T deste 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, P305 e PTA, na raça Girolando. A estimativa do coeficiente de regressão para o número de cópias para o alelo C indica que este alelo não está relacionado com a produção 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. O SNP 8514 do íntron quatro do gene *OPN* não está associada com a produção de leite em até 305 dias e com a capacidade prevista de transmissão na população de animais da raça Girolando analisados.

**Palavras-chave:** Girolando, marcador molecular, osteopontina, seleção, SNP

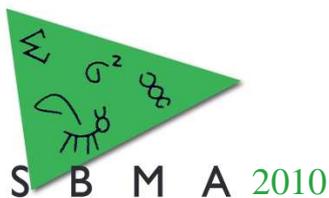
### **Osteopontin gene association with Milk production in animals Girolando**

**Abstract:** The search for molecular markers associated with milk production, aiming at assisted selection (MAS) is increasing in dairy cattle. In this sense, the gene of 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 through milk production variables in 305 days (P305) and predicted transmitting ability (PTA) for milk animals participating in the Test Progeny Girolando. We analyzed 32 bulls and 159 cows Girolando. Primers used for amplification were described for the Holstein and differentiation of alleles C/T of this SNP was obtained by PCR-RFLP. The association analysis was performed using regression analysis. No association was found between *OPN* gene and variables, P305 and PTA, in Girolando. The estimated regression coefficient for the number of copies for the C allele indicates that this allele is not related to milk production in 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. The mutation in íntron four 8514 *OPN* gene is not associated with the production of milk in 305 days and with predicted transmitting ability in the population of animals analyzed Girolando.

**Key Words:** Girolando, molecular marker, osteopontin, selection, SNP

### **Introdução**

A seleção assistida por marcadores (SAM) representa importante ferramenta para o progresso genético da bovinocultura leiteira nacional, podendo resultar em melhoria na eficiência e na precocidade da seleção dos animais. 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, identificar marcadores moleculares associados com as características produtivas. Estudos de mapeamento identificaram QTLs (locus de característica quantitativa) afetando as



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

características de produção de leite no cromossomo 6 (BTA6) em bovinos, na região onde se localiza o gene da Osteopontina (*OPN*), sendo este considerado candidato posicional para a associação com produção do leite (Zhang et al., 1998; Olsen et al., 2004). Esse gene codifica uma glicoproteína fosforilada que participa de diferentes processos fisiológicos, mas sua presença no leite e sua alta expressão nas células epiteliais da glândula mamária sugerem um importante envolvimento na produção de leite (Nagatomo et al., 2004). Leonard et al. (2005), identificaram um polimorfismo do tipo SNP (single nucleotide polymorphism) (C/T) na posição 8514 localizado no íntron quatro no gene *OPN* que foi associado com o percentual de gordura e proteína no leite em diferentes populações da raça Holandesa (Leonard et al., 2005). Posteriormente, esta associação foi confirmada para as mesmas características por Khatib et al. (2007). A associação do gene *OPN* com a característica de produção de leite reforça a importância deste gene candidato no desenvolvimento das características produtivas justificando um estudo de associação entre a produção de leite e o gene *OPN* na raça Girolando. Assim, objetivou-se analisar a associação entre o polimorfismo C/T 8514 localizado no íntron quatro do gene *OPN* e a característica de produção de leite em animais participantes do Teste de Progenie da raça Girolando.

### Material e Métodos

As amostras de sangue e de sêmen foram obtidas de 32 touros e 159 vacas participantes do teste de progênie da raça Girolando coordenado pela Embrapa Gado de Leite e pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando. O DNA foi extraído utilizando o Dneasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, Valencia, CA, EUA). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop®1000) e genotipadas para o gene *OPN* pela técnica de PCR-RFLP. Para a amplificação da região de interesse do gene *OPN* foram utilizados *primers* já descritos por Leonard et al. (2005). A característica fenotípica avaliada foi à produção de leite referente à primeira lactação por meio da produção de leite em até 305 dias (P305) e capacidade prevista de transmissão (PTA) de leite para o grupo de vacas e touros. O grupo de touros avaliados apresenta composição genética de 3/4 e 5/8 da raça Holandesa e o grupo de vacas apresenta à composição genética igual ou superior a 5/8 da raça Holandesa. Os dados fenotípicos de produção de leite 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 vacas avaliadas, são provenientes da avaliação genética realizada pela Embrapa Gado de Leite.

Para análise de associação entre o gene *OPN* e os dados de PTA de touros e vacas, o seguinte modelo de substituição alélica foi utilizado:

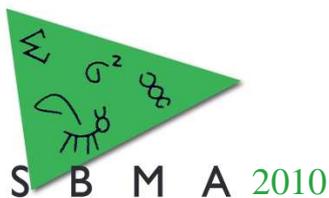
$$Y_{ij} = \mu + S_i + \beta_{x_{ij}} + \varepsilon_{ij},$$

onde  $Y_{ij}$  é o valor relativo da PTA filho(a)  $j$  do touro  $i$ ;  $\mu$  é uma constante geral,  $S_i$  é o efeito fixo do touro  $i$ ;  $\beta$  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 locus do gene *OPN* no filho(a)  $j$  de touro  $i$  e  $\varepsilon_{ij}$  é o efeito residual. As predições de PTAs foram ponderadas pelos valores das confiabilidades para obter estimativas de quadrados mínimos ponderados do efeito de substituição alélica.

Os dados de P305 foram analisados seguindo o modelo de efeitos fixos:

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

onde  $Y_{ijklm}$  representa os desvios de produção da vaca  $i$ , filha do touro  $j$ ;  $\mu$  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* ( $m=CC, CT, TT$ );  $\varepsilon_{ijklm}$  efeito residual. O efeito genético aditivo do locus foi estimado como metade da diferença entre os dois grupos de homocigotos, como  $\hat{O}_{CC} - \hat{O}_{TT}/2$ . Efeito de dominância foi estimado como a diferença entre o grupo de heterocigotos e a média dos grupos



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 01 e 02 de julho de 2010

*Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA*

dos 2 homocigotos no locus. A associação foi realizada por meio da análise de regressão linear utilizando o procedimento GLM do SAS.

### Resultados e Discussão

Os animais analisados foram segregantes para os alelos do gene *OPN*. A associação entre o SNP 8514 C/T e as variáveis P305 e PTA não foi significativa para os grupos de touros e vacas (Tabela 1). 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 este alelo não está relacionado com as variáveis, havendo um decréscimo na PTA (-12,29 Kg) de vacas e touros e no efeito aditivo da P305 (-41,10 Kg) para as vacas na sua presença, embora não significativo.

Tabela 1. Estimativas dos efeitos de aditividade, dominância e substituição alélica ( $\alpha/2$ ) e seus respectivos *p*-valor associados com o SNP 8514 do gene da Osteopontina (*OPN*) no grupo de vacas e touros da raça Girolando para a produção de leite em até 305 dias (P305) e capacidade prevista de transmissão (PTA).

Variáveis	Substituição alélica ( $\alpha/2$ )	Efeito aditivo	Efeito dominância
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, onde as variantes deste gene não apresentaram nenhum efeito significativo sobre a produção de leite, apenas sobre o percentual de gordura e proteína (Leonard et al., 2005; Khatib et al., 2007). A raça Girolando, sendo o resultado do cruzamento entre duas subespécies (*Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*), representa um grupo genético muito particular, resultando em possíveis interações peculiares para a característica produção de leite, pois é sabido que a composição genética é um fator importante e afeta a expressão da característica produção de leite. Por outro lado, o baixo número de animais amostrados pode não ter propiciado a sensibilidade necessária para a detecção da associação genética.

### Conclusões

O SNP 8514 do íntron quatro do gene *OPN* não está associada com a produção de leite em até 305 dias e com a capacidade prevista de transmissão nos animais da raça Girolando analisados. 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 deste gene na produção de leite na raça Girolando.

### Literatura citada

- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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**, Baltimore, v.149, p.1959–1973, 1998.