



**Universidade Federal do Pará**  
**Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural**  
**Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - Amazônia Oriental**  
**Universidade Federal Rural da Amazônia**  
**Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Sebastião Tavares Rolim Filho**

**Polimorfismos no Gene da Osteopontina e suas Associações com a Fertilidade de Búfalos  
na Amazônia**

**Belém**  
**2012**

**Sebastião Tavares Rolim Filho**

**Polimorfismos no Gene da Osteopontina e suas Associações com a Fertilidade de Búfalos  
na Amazônia**

Tese apresentada para obtenção do grau de Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Núcleo de Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural. Universidade Federal do Pará. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Amazônia Oriental. Universidade Federal Rural da Amazônia.

Área de concentração: Reprodução Animal  
Orientador Prof.Dr. Haroldo Francisco Lobato  
Ribeiro

**Belém  
2012**

**Sebastião Tavares Rolim Filho**

**Polimorfismos no Gene da Osteopontina e suas Associações com a Fertilidade de Búfalos  
na Amazônia**

Tese apresentada para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência Animal. Núcleo de  
Ciências Agrárias e Desenvolvimento Rural.  
Universidade Federal do Pará. Empresa  
Brasileira de Pesquisa Agropecuária –  
Amazônia Oriental. Universidade Federal  
Rural da Amazônia.

Data da aprovação. Belém - PA: \_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_

Banca Examinadora

---

Prof. Dr. Haroldo Francisco Lobato Ribeiro  
Universidade Federal Rural da Amazônia - UFRA  
Presidente

---

Prof. Dr. Humberto Tonhati  
Universidade Estadual Paulista/UNESP-Jaboticabal  
Membro Titular

---

Profª. Dr. José Ribamar Felipe Marques  
Pesquisador Embrapa/CPATU  
Membro Titular

---

Profª. Dra. Maria Rosa Travassos da Rosa Costa  
Pesquisadora Embrapa/CPATU  
Membro Titular

---

Profª. Dra. Simone Cristina Méo Niciura  
Pesquisadora Embrapa Pecuária Sudeste  
Membro Titular

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre ter me dado muito mais do que ofereci e por está realizando mais este sonho.

A minha mãe: Maria do Remédio Ribeiro, minha fonte de inspiração e exemplo de dedicação e amor. Ao Meu pai (em memória). À minha família: meus amores Niedja, Ossean (em memória), Vanda, Milena, Lidiana, Lucas, Maria Luiza, Melani, Maria Antonieta e Guenaely.

Ao meu orientador, amigo e “pai” Prof. Dr. Haroldo Ribeiro, por todos os ensinamentos e conselhos, por acreditar e confiar em mim.

Ao professor Dr. Humberto Tonhati, por ter me dado a oportunidade de desenvolver este trabalho em seu laboratório (Unesp-Jaboticabal), bem como, pela amizade e por ter conhecido pessoas maravilhosas, que me ensinaram muito e que farão sempre parte da minha vida: Diercles, Gregório, Patrícia, Daniel, Francisco, Fernanda, Raul, Naldin, Mônica e todos que participaram da minha passagem por Jaboticabal, meus sinceros agradecimentos.

Ao professor William Vale, por todas as contribuições, neste e em outros trabalhos e pela amizade. Ao professor Ribamar Marques e professora Maria Rosa pelas contribuições durante a defesa de qualificação.

Aos meus amigos, por estarem sempre ao meu lado nas horas boas e difíceis.

Aos produtores rurais Kim Nunes e Paulo Costa por cederam os animais para o desenvolvimento deste trabalho e por acreditarem na pesquisa.

A Universidade Federal do Pará e a Universidade Federal Rural da Amazônia por possibilitar a realização deste trabalho.

Aos búfalos, minha paixão.

A todos que incentivaram, confiaram e apoiaram o desenvolvimento deste trabalho.

Meu muito obrigado

“Hoje me sinto mais forte mais feliz quem sabe,  
só levo a certeza de que muito pouco sei, ou nada sei...”

Renato Teixeira

## RESUMO

Este trabalho teve como objetivo identificar polimorfismos neste gene e associar os mesmos aos parâmetros de fertilidade de búfalos criados de forma extensiva. Foram utilizados 306 machos bubalinos, acima de 18 meses de idade, criados em duas propriedades, uma no estado do Amapá e outra no estado do Pará. Os resultados obtidos para a extração de DNA através de pêlos foram de excelente quantidade, com concentração maior que 50ng/ $\mu$ l. Ambos pares de *primers* amplificaram as regiões específicas do gene da osteopontina. Foram identificados 3 polimorfismos do tipo SNP para a região amplificada pelo primer OS4 (5`UTR) e 4 polimorfismos do tipo SNP para a região amplificada pelo primer OS9 (éxon 5 ao éxon 6). Os polimorfismos foram nas posições 1478, 1513 e 1611 na região amplificada pelo OS4 e nas posições 6690, 6737, 6925 e 6952 na região amplificada pelo OS9. Para todas as características estudadas foram encontrados SNPs significativos a 5%. Para circunferência escrotal, o SNP 6690; para volume testicular, o SNP 6737; para a concentração, o SNP 6690; para motilidade, o SNP 6690 e para patologia espermática, o SNP 6690. Estando os polimorfismos do SNP 6690 relacionado com quatro características. Para a característica CE o genótipo AA foi associado ( $P < 0,05$ ) com os animais que apresentaram maior média de circunferência escrotal, maior média de concentração espermática, maior média de motilidade e menor número de patologias totais. Entretanto, para a característica volume testicular, os animais que apresentaram maior volume estão correlacionados com a presença do genótipo GG, para o SNP 6737. Isso indica que o gene da osteopontina pode influenciar as características reprodutivas em machos bubalinos.

**Palavras-chave:** Búfalos. SNPs. Osteopontina.

## ABSTRACT

Because the osteopontin gene can influence the fertility of water buffaloes, the aim of this work was to identify polymorphisms in this gene and associate them with fertility parameters of animals kept under extensive grazing. We used 306 male buffaloes older than 18 months, bred on two farms, one in the state of Amapá and the other in the state of Pará. We identified three SNP for the region amplified by the primer OS4 (5`UTR) and four SNP polymorphisms for the region amplified by the primer OS9 (exon 5 to exon 6). The polymorphisms were in positions 1478, 1513 and 1611 in the region amplified by OS4 and positions 6690, 6737, 6925 and 6952 in the region amplified by OS9. We calculated correlations with the traits scrotal circumference and volume and sperm motility, concentration and pathology. There were SNPs for all the traits studied at 5% significance: for circumference, SNP 6690; for volume, SNP 6737; for concentration, SNP 6690; for motility, SNP 6690; and for pathology, SNP 6690. Therefore, SNP 6690 was related to four traits. The AA genotype of SNP 6690 presented the highest averages for scrotal circumference, sperm concentration and motility and the lowest total number of pathologies. However, for the scrotal volume trait, the animals with the largest volume were correlated with the presence of the GG genotype of SNP 6737. This indicates that the osteopontin gene is important because it can have a substantial influence on the reproductive traits of male buffaloes.

**Keywords:** Buffalo. SNPs. Osteopontin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Representação do Gene da osteopontina (OPN) em búfalos com 7 éxons e 6 íntrons.....	22
Figura 2-	Fragmentos de 508 pb amplificados por PCR com uso do iniciador específico (OS4) para a região 5`UTR do gene da osteopontina em búfalos.....	30
Figura 3-	Fragmentos de 890 pb amplificados por PCR com uso do iniciador específico (OS9) para a região do éxon 5 ao 6 do gene da Osteopontina em búfalos.....	30
Figura 4-	Cromatograma obtido do sequenciamento produto de PCR de região parcial 5`UTR do gene da Osteopontina em búfalos.....	31
Figura 5-	Saída da análise da sequência de três animais no programa CodonCode Aligner com exemplo de um SNP identificado. A primeira sequência refere-se a um animal heterozigoto A/G (dois picos), a segunda refere-se a um animal homozigoto A/A e a última a um animal homozigoto GG.....	32



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Programação do termociclador utilizado nas reações de PCR para o gene da Osteopontina em búfalos.....	29
Tabela 2-	Exemplo de concentrações de DNA obtidas pelo método de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, de alguns animais (sete), a partir de folículos pilosos, de búfalos, quantificados pelo aparelho NanoDrop® .....	35
Tabela 3-	Indicação da posição, região e substituição dos SNPs identificados e depositados no NCBI JQ613157.....	35
Tabela 4-	Frequências alélicas e genotípicas para os SNPs genotipados e adesão ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5%.....	36
Tabela 5-	Valores estimados de $r^2$ para sete SNPs (1478, 1513, 1611, 6690, 6737, 6925, 6952) no gene da osteopontina.....	37
Tabela 6-	Valores de $P$ dos SNPs encontrados para características estudadas. Estão em negrito os significativos a 5%.....	37
Tabela 7-	Média de genótipos para efeito do SNP mais significativo de acordo com as características andrológicas estudadas.....	38

## LISTA DE SIGLAS

ACR - Receptor de Acrosina  
ALB - Albumina  
AR - Receptor de andrógenos  
CE - Circunferência escrotal  
CSN3 - Fragmento do gene da Caseína  
DNA - Ácido desoxiribonucleotídico  
ESR - Receptor de estrógeno  
FIV - Fertilização in vitro  
FSH - Hormônio folículo-estimulante  
GH - Hormônio de crescimento  
GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina  
GnRHR - Receptor do hormônio liberador de gonadotrofinas  
IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
IGF1 - Fator de crescimento semelhante a insulina 1  
IPP - Idade ao primeiro parto  
LEP- Leptina  
LH - Hormônio luteinizante  
LHR - Receptor do hormônio luteinizante  
MAS - Seleção Assistida por Marcadores Moleculares  
MHC - Complexo de histocompatibilidade  
mRNA - Ácido ribonucleotídico mensageiro  
mtDNA - Ácido desoxiribonucleotídico mitocondrial  
OPN - Osteopontina  
OS4 - Iniciador do gene da osteopontina  
OS9 - Iniciador do gene da osteopontina  
PCI - Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico  
PCR - Reação em Cadeia da Polimerase  
PGD - Fosfogliconato desidrogenase  
pH - Potencial Hidrogeniônico  
PIF - Fator inibidor da prolactina  
PIT1 - Fator de transcrição pituitária  
eCG - Gonadotrofina coriônica equina

PPP - Peso ao primeiro parto

QTL - *loci* que interferem em características quantitativas

QTN - Nucleotídeo que interfere em caracteres quantitativos

RAPD - Polimorfismo em região amplificada aleatória

RFLP - Polimorfismo do comprimento do fragmento de restrição

RGD - Arginina-Glicina-Aspartato

RNA - Ácido ribonucleotídico

SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único

SPP1 - Gene Secretor de Fosfoproteína 1

TFAM - Genes moderadores da energia da mitocôndria

TPN-1 - Proteína Nuclear de Transcrição

UPC2 - Genes moderadores da energia da mitocôndria

UV - Luz ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	14
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	15
3.1	BUBALINOCULTURA NO BRASIL.....	15
3.2	SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES.....	16
3.3	MARCADORES MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BÚFALOS.....	18
3.4	MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS.....	19
3.5	OSTEOPONTINA (OPN).....	21
<b>3.5.1</b>	<b>Osteopontina e sua influência na fertilidade</b> .....	21
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	25
4.1	ANIMAIS.....	25
4.2	EXAME CLÍNICO GERAL E BIOMETRIA TESTICULAR.....	25
4.3	COLHEITA E ANÁLISE DOS EJACULADOS.....	26
4.4	COLETA DE PÊLOS.....	27
4.5	ANÁLISES MOLECULARES.....	27
<b>4.5.1</b>	<b>Extração de DNA</b> .....	27
<b>4.5.2</b>	<b>Verificação de quantidade e qualidade do DNA obtido</b> .....	28
<b>4.5.3</b>	<b>Primers utilizados</b> .....	28
<b>4.5.4</b>	<b>Reação de Amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)</b> .....	29
<b>4.5.5</b>	<b>Sequenciamento</b> .....	31
<b>4.5.6</b>	<b>Análises estatísticas</b> .....	32
4.5.6.1	Frequências alélicas e genotípicas.....	32
4.5.6.2	Teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	33
4.5.6.3	Desequilíbrio de ligação.....	33
4.5.6.4	Análises de associação entre as variantes encontradas e os fenótipos das características estudadas.....	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	35
5.1	POLIMORFISMOS ENCONTRADOS.....	35

5.2	FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS.....	36
5.3	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	36
5.4	ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPS COM VALORES FENOTÍPICOS DAS CARACTERÍSTICAS ANALISADAS.....	37
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>39</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>40</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os bubalinos possuem potencial genético para características produtivas (ASPILCUETA-BORQUIS et al., 2010a; ASPILCUETA-BORQUIS et al., 2010b; TONHATI et al., 2011) e reprodutivas (GALEAZZI et al., 2010a).

Galeazzi et al. (2010b) demonstraram, em um estudo de simulação, que o teste de progênie aliado à seleção permite obter ganho genético para características reprodutivas.

Estudos realizados nas áreas de melhoramento genético e reprodução animal demonstraram que a implantação da técnica de seleção assistida por marcadores (SAM) em sistemas de produção de carne e leite, é responsável pelo encurtamento dos ciclos de produção e o aumento do ganho genético do rebanho (BONILHA, 2003). Dessa forma, a SAM permite que os processos de seleção de reprodutores sejam mais eficientes e confiáveis, aumentando assim a produtividade e a rentabilidade da pecuária.

Sabe-se que o reprodutor tem papel fundamental na disseminação do material genético e na fertilidade do rebanho (OHASHI et al., 2011) seja em monta natural ou com o uso de biotecnologias.

Pequenas mudanças nas características reprodutivas, como a porcentagem de bezerros nascidos, podem ter grande efeito na lucratividade da produção (KRIESE et al., 1991). Economicamente, o mérito reprodutivo é cinco vezes mais importante que a performance de crescimento e dez vezes mais importante que a qualidade do produto (carcaça) (PALASZ et al., 1994).

A análise da qualidade seminal apresenta grande eficiência na detecção de touros de baixa fertilidade, porém não permite distinguir entre touros de moderada a alta fertilidade (RAJAMAHENBRAN et al., 1994; GARNER, 1997). Desta maneira, faz-se necessário a complementação do exame andrológico com análises que aumentem a acuidade da estimativa do verdadeiro potencial reprodutivo do touro (FONSECA, 2000).

Em bubalinos, diversos trabalhos têm sido realizados na tentativa de encontrar genes candidatos que possam ser utilizados para selecionar características reprodutivas em machos e fêmeas (PANIGAH; YADAV, 2010; CARCANGIU et al., 2011).

Os principais genes candidatos, estudados para a detecção de polimorfismos genéticos para características reprodutivas em bubalinos são: receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1), receptor do fator de

crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1R) (AHMED et al., 2011), bem como, o gene da osteopontina (CANCEL et al., 1997).

O gene da osteopontina foi descrito em bubalinos por Tania et al. (2008). De acordo com Cancel et al. (1997) é uma proteína que está envolvida em diferentes eventos biológicos e presente em diferentes tecidos, como por exemplo, no plasma seminal de bovinos. Silva (2011) verificou que diversas proteínas presentes no plasma seminal estão presentes em maiores quantidades em animais de alta fertilidade quando comparados aos de baixa fertilidade e dentre elas está a osteopontina (CANCEL et al., 1997).

Desta forma, o presente estudo propõe verificar a existência de polimorfismos no gene da osteopontina, buscando associar esses polimorfismos as características biométricas, físicas e morfológicas do andrológico de búfalos criados de forma extensiva na região Amazônica.

## **2 OBJETIVO GERAL**

Verificar a existência de polimorfismos no gene da Osteopontina (OPN) e determinar possíveis associações entre estes polimorfismos e características de biometria testicular e qualidade do sêmen de machos bubalinos criados de forma extensiva no estado do Pará.



### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 BUBALINOCULTURA NO BRASIL

De acordo com dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatísticas (IBGE, 2010) o rebanho bubalino brasileiro cresceu 4,3% entre os anos de 2009/2010, passando de 1.135.191 cabeças em 2009 para 1.184.511 milhões de cabeças em 2010, representando um aumento superior ao ocorrido com o rebanho bovino no Brasil que foi de 2,1% no mesmo período.

A região Norte detém o maior efetivo de bubalinos do país com aproximadamente 752.830 mil cabeças, estando no Pará e Amapá os maiores rebanhos, 457.075 e 214.271 mil cabeças respectivamente. Entre os anos de 2009 e 2010, a região norte registrou um aumento do rebanho bubalino de aproximadamente 5,3%. Entretanto, de acordo com a mesma pesquisa, a região que teve o maior aumento do rebanho bubalino foi a região sudeste com 15,8% de crescimento em relação a 2009. Se compararmos esse crescimento com outros animais, veremos que o rebanho bovino praticamente não cresceu na região sudeste (0,6%) e cresceu menos que o rebanho bubalino na região norte (4,1%) no mesmo período (IBGE, 2010).

Isso reflete o maior interesse dos criadores destas regiões pela criação de bubalinos, principalmente por estes apresentarem grande adaptabilidade a diversos tipos de clima, sendo criados em regiões extremamente áridas como no norte da África até regiões extremamente frias como a Suíça, bem como, o maior valor agregado que seus produtos, como a mussarela, têm alcançado no mercado nacional e internacional (BERNARDES, 2007).

Segundo Bernardes (2007), diversamente do que se imaginava no passado, que a bubalinocultura estaria destinada a somente ocupar os chamados vazios pecuários ou regiões consideradas inadequadas à criação de bovinos, o que se tem verificado é que, nas regiões em que os criadores lograram organizar cadeias agro-industriais, seja na produção de carne, seja na cadeia de derivados lácteos, sua expansão tem sido expressiva e sua exploração vem se revelando alternativa significativa, não só em propriedades de melhor nível tecnológico como, principalmente, nas pequenas explorações nas quais a bubalinocultura tem se mostrado importante fator de elevação da renda média e fixação do homem no campo.

O mesmo autor cita que, no Brasil, a exploração de búfalos destina-se fundamentalmente à produção de carne, porém, a partir dos anos 80/90, verificou-se um interesse crescente em sua exploração leiteira ou com duplo propósito (carne e leite).

Com a melhoria das técnicas de manejo e o advento de biotécnicas da reprodução, a produtividade desses animais vem aumentando a cada ano, entretanto a quantidade de problemas de caráter infecciosos e genéticos também (VALE e RIBEIRO, 2009).

Sabe-se que o reprodutor tem papel fundamental na disseminação do material genético e na fertilidade do rebanho (OHASHI et al., 2011).

Por este motivo, é necessário que exames criteriosos da higidez clínico-reprodutiva, bem como, a avaliação da progênie (teste de progênie) sejam realizados nesses reprodutores, evitando-se, com isso, a disseminação de características indesejáveis no rebanho, especialmente no caso do rebanho bubalino brasileiro, em que a consanguinidade é alta (VALE et al., 2002; VALE; RIBEIRO, 2009, OHASHI et al., 2011).

### 3.2 SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES

Segundo Bishop et al. (1994), o processo que utiliza a informação dos marcadores genéticos para auxiliar na seleção dos animais é denominado seleção assistida por marcadores (SAM). A palavra “assistida” implica que a seleção é também influenciada por outras fontes de informações tais como o desempenho observado, ou seja, o fenótipo (HAYWARD et al., 1994).

De modo geral, a MAS consiste em encontrar o QTLs (“Quantitative Trait Loci”) cujo efeito esteja significativamente mais associado à característica de interesse (COUTINHO; REGITANO, 1995). Em seguida, deve-se conduzir a seleção para este QTL juntamente com a seleção para os poligenes (MEUWISSEN; GODDARD, 1999).

Embora a seleção convencional realizada nos programas de melhoramento genético possua alta acurácia, o intervalo de gerações é elevado. Assim, estudos têm sido conduzidos para a identificação de QTL que sejam responsáveis por parte da variação fenotípica das características produtivas e reprodutivas dos bovinos de corte para aplicação da MAS (ROTHSCHILD; PLASTOW, 1999).

As diferenças entre indivíduos nas sequências de nucleotídeos que compõem um gene podem produzir diferenças nas sequências de aminoácidos ou proteínas que são codificadas (SILVA, et al., 2007). Estas proteínas podem por si só levar a alterações fenotípicas ou controlar a produção de outras enzimas ou proteínas que ocasionarão diferenças fenotípicas entre os animais (CIERO e BELATTO, 2003).

Villanueva et al. (2002) verificaram que o uso da informação de QTL causa aumento significativo no ganho genético anual. Entretanto, o benefício da MAS é limitado pela

proporção de variância fenotípica que é explicada pelos QTL (MEUWISSEN et al., 2001; OLIVEIRA; HENKES, 2001).

O uso de marcadores moleculares, permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão, antes mesmo da expressão do seu fenótipo (REGINATO; COUTINHO, 2001). Sendo que a capacidade de produção de um animal (fenótipo) é o reflexo da interação de seu material genético (genótipo) com o ambiente.

Considerando que a MAS viabiliza o uso da informação dos marcadores moleculares para auxiliar na seleção dos animais, Van Der Werf (2001) afirmou que este processo é importante nas situações em que a acurácia de seleção é baixa, e para características que só podem ser medidas em um dos sexos, no final da vida do animal, após o abate ou para características de baixa herdabilidade.

Na bovinocultura de corte, várias são as pesquisas sobre associação de polimorfismos em genes candidatos com características de crescimento (PEREIRA et al., 2005).

Dentre eles, o IGF1 (Fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1) e o GH (hormônio do crescimento) compõem o eixo somatotrópico, um sistema hormonal com papel fundamental na regulação do crescimento dos animais (RENAVILLE et al., 2002). O PIT1 (Fator de transcrição pituitária) é um fator de regulação para a síntese de hormônio do crescimento, prolactina e tirotrópina (OPRZADEK et al., 2003).

O IGF1 é de extrema importância para compreensão dos fatores de produção e reprodução, pois influencia na atividade ovariana, incluindo o sinergismo e a amplificação dos efeitos das gonadotrofinas no crescimento e na estereoidogênese das células ovarianas (WERNER; LEROITH, 2000; MONGET et al., 2002), bem como, no estabelecimento da dominância folicular (RIVERA et al., 2001). Além disso, este gene é o principal mediador dos efeitos do GH e segundo Breier e Gluckman (1991) é capaz de causar uma grande variabilidade de efeitos sobre vários tecidos, acarretando no crescimento corporal do animal.

Shoenau et al. (2005), estudando bovinos da raça Holandesa, não encontraram associação entre a idade ao primeiro parto (IPP) e o polimorfismo do gene IGF1. Em estudos com bovinos de leite, Silva et al. (2007) constataram que o gene IGF1 pode ser usado como critério de seleção para obter menor peso ao nascimento, em um rebanho de bovinos cruzados F2 resultantes de acasalamentos de F1(½ Gir, ½ Holandês).

Portanto, as informações obtidas por meio de DNA, juntamente com os registros fenotípicos, podem ser extremamente úteis no aumento da acurácia na predição dos valores

genéticos e, conseqüentemente, da resposta obtida no processo de seleção (DE VRIES et al., 1998).

### 3.3 MARCADORES MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO NA PRODUÇÃO DE BÚFALOS

Vários são os marcadores genéticos utilizados em populações de búfalos possibilitando a adoção de genes e características ligadas a produção e reprodução, bem como possibilitando o monitoramento da diversidade e a evolução no nível genético (ALIM et al., 2011).

Albuquerque et al. (2006), utilizaram marcadores RAPD, para caracterizar dois grupos genéticos de búfalos, Carabao e Baio, que são conservados in situ, assim como, para verificar as relações genéticas entre eles e outros três grupos genéticos de búfalos no Brasil, Murrah, Jafarabadi e Mediterrâneo. A variabilidade genética dentro e entre os grupos foi estimada em 26,5 e 73,5%, respectivamente, sugerindo divergência significativa entre os grupos. Esse estudo demonstrou que os cinco grupos são geneticamente distintos, indicando a necessidade de conservação das raças Carabao e Baio, dois grupos genéticos em perigo de extinção em Brasil.

Abdel-Rahman (2006) analisando o segmento de DNA mitocondrial (Citocromo b) através da técnica PCR-RFLP não observou qualquer diferenças entre bovinos e bubalinos. A descoberta deste estudo revelou que os bovinos e bubalinos são evolutivamente derivados do mesmo ancestral.

Um estudo desenvolvido por Ahmed et al. (2011), destinado a detecção de polimorfismos genéticos para características reprodutivas em genes candidatos como FSHR, IGF-1, IGF-1R, observaram que a região do gene FSHR estudada está associada a menor intervalo de partos, com acurácia de 70%. Já o gene IGF-1 não teve impacto sobre a fertilidade e o gene IGF-1R apresentou associação com animais de fertilidade elevada, com cerca de 83,3% de acurácia.

Em estudo realizado por Mukhopadhyay et al. (2011) com genes específicos do cromossomo Y, em búfalos reprodutores, pode-se verificar a presença de SNPs nos genes estudados pelos autores, entretanto não foram encontradas associações entre o genótipo e os parâmetros andrológicos estudados.

O começo do mapeamento genético do búfalo já foi iniciado na Itália (IANNUZZI et al., 1999). Entretanto, ainda há muito o que ser estudado. No Brasil, diversos trabalhos têm

sido desenvolvidos com marcadores moleculares, na tentativa de associar possíveis polimorfismos às características produtivas e reprodutivas dos bubalinos (TONHATI et al., 2003).

Gil et al. (2009) estudaram os polimorfismos do gene da grelina em búfalas da raça Murrah no estado de São Paulo e verificaram que a seleção para aumento da produção de leite, não tem ocasionado alteração na frequência gênica da população, estando a mesma em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Outro estudo realizado em São Paulo por Lima (2009) verificou que o gene da enzima *Estearoil-Coenzima A desaturase* na espécie *Bubalus bubalis* apresentou polimorfismos pontuais (SNPs) na região promotora do gene, sendo que o genótipo AA foi associado com maior teor de ácidos graxos produzidos no leite.

Os genes da Albumina (ALB) e Fosfogliconato desidrogenase (PGD) foram estudados em populações de búfalos por Nakayama et al. (2009) no estado do Pará. Os autores verificaram que as subpopulações de cada uma das quatro raças estudadas (Murrah, Mediterrâneo, Carabao e Jafarabadi) estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

### 3.4 MARCADORES MOLECULARES PARA CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS

A seleção para fertilidade, normalmente, é efetuada objetivando a redução da idade da vaca ao primeiro parto e intervalo entre partos, além de características conformacionais (tipo), como por exemplo: distância entre ísquios e úbere para vacas e aprumos para touros, e ausência de doenças reprodutivas (SCHWERIN et al., 1995).

A abordagem do gene candidato para estudos de fertilidade tem sido utilizada para identificação de marcadores genéticos. Os principais genes selecionados para estudos de associação são os hormônios do eixo hipotalâmico-hipofisário como: hormônio liberador de gonadotropinas (GnRH), prolactina, fator inibidor da prolactina (PIF), hormônio folículo estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH)”, ocitocina, gonadotrofina coriônica equina (eCG), seus respectivos receptores e enzimas das vias de biossíntese (HAFEZ, 1988).

Bindon e Piper (1986) descreveram o fenótipo conhecido por “Boroola” em ovinos associado ao aumento no índice de fertilidade de aproximadamente 20%.

Associação entre polimorfismo do gene receptor de estrogênio (ESR) e tamanho de leitegada foi evidenciado em suínos com efeito de substituição de 0,8-1,0 leitões por leitegada (ROTHSCHILD et al., 1994).

A associação entre antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) e fertilidade de bovinos da Noruega foi estudada por Mejdell et al. (1994). Os autores obtiveram efeito significativo de alelos BOLA-A no aparecimento de cio. Os autores sugerem que este efeito é devido a desequilíbrio de ligação entre MHC e a enzima 21-hidroxilase, relacionada à biossíntese de glicocorticoides e mineralocorticoides a partir de progesterona.

Hastings et al. (2006), estudando três SNPs no éxon 11 no gene receptor de hormônio luteinizante (LHR) em bovinos da raça Holandesa, observaram correlação deles com intervalo de partos e com o número de dias para o primeiro serviço, no Reino Unido.

Milazzotto et al. (2008) estudaram, em 100 fêmeas Nelore, parcialmente, o exon 10 do gene LHR, parcialmente, o exon 11 do gene receptor do hormônio FSH (FSHR) e os exons 1, 2 e 3 do gene receptor do hormônio GnRH (GnRHR). Foram encontrados dezenove SNPs, sendo que, em oito deles existia substituição aminoacídica. Segundo os autores três SNPs localizados no FSHR foram correlacionados com precocidade sexual. Esse fato mostra que existe grande variação de nucleotídeos nos genes dos hormônios diretamente ligados à reprodução e que a busca por associações entre essa variabilidade e as características reprodutivas nos animais de produção é plausível.

Marson et al. (2008) estudaram seis dos SNPs identificados por Milazzotto et al. (2008) para os genes LHR e FSHR em 370 novilhas de diferentes composições raciais zebu-auricular e avaliaram a precocidade sexual por meio da probabilidade de prenhez. Apesar de as novilhas heterozigotas terem apresentado melhores índices de concepção, nenhuma correlação foi estabelecida entre os SNPs e a característica analisada.

Grupioni et al. (2009), em bovinos da raça Canchim, verificaram efeito significativo do gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 na idade ao primeiro parto (IPP) e Grossi et al. (2009), em estudo com a mesma população, verificaram efeito de substituição alélica do mesmo gene para as características IPP e peso ao primeiro parto (PPP).

Em um trabalho com o gene da Proteína Nuclear de Transcrição (TPN-1) a qual é fundamental no processo de espermatogênese, em búfalos da raça Murrah, Panigrahi e Yadav (2010), observaram a presença de três SNPs, encontrando correlação com a maturação espermática, embora não tenham encontrado correlação com motilidade individual e com a atividade de massa dos espermatozoides.

Em estudo realizado por Mukhopadhyay et al. (2011) com genes específicos do cromossomo Y, em reprodutores búfalos, pode-se verificar a presença SNPs nos genes estudados, entretanto, não foram encontradas associações entre o genótipo e os parâmetros andrológicos.

Clempson et al. (2011a,b) estudaram polimorfismos para genes moderadores da energia da mitocôndria (TFAM e UCP2) e para o gene da leptina (modulador de ingestão alimentar) em bovinos leiteiros e encontraram associação significativa com características reprodutivas em novilhas e vacas. Segundo estes autores, em novilhas, os polimorfismos no gene UCP2 estão correlacionados com idade ao primeiro parto e início da atividade luteal e no gene da leptina, com idade ao primeiro serviço, número de serviços por concepção, número total de serviços e idade ao primeiro parto. Em vacas, polimorfismos no TFAM foram correlacionados com número de serviço por concepção, dias para a concepção e porcentagem de concepção e no gene da leptina, com início da atividade luteal.

### 3.5 OSTEOPONTINA (OPN)

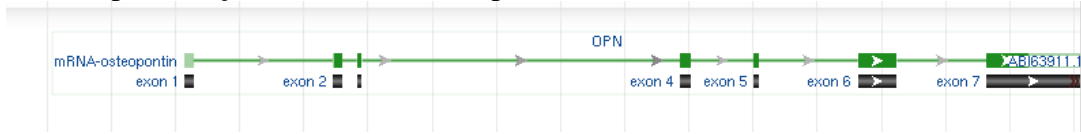
#### 3.5.1 O gene da osteopontina e sua influência na fertilidade

A primeira descrição da proteína desse gene foi como um marcador de transformação das células epiteliais em humanos (SENGER et al. 1989), mas com expressão em uma variedade de tecidos indicando uma multiplicidade de funções, embora não tenha sido estabelecido um papel definitivo para o gene (CHABAS, 2005). O termo SPP1 (*secreted phosphoprotein 1*) foi introduzido como um nome alternativo que reflete o vasto papel funcional do gene, que pode apresentar diferentes funções na fisiologia da glândula mamária (SCHEEHY et al., 2009).

O gene da OPN já foi identificado em diferentes espécies, por exemplo, bovinos, humanos e camundongos, estando localizado nos cromossomos 6, 1 e 5, respectivamente (FISHER et al., 2001).

No genoma bovino a OPN compreende 7 éxons abrangendo cerca de 7kb (Genbank: NW\_255516, GeneID: 281499) codificando uma proteína de 278 aminoácidos (PAREEK et al., 2008). Fazendo um paralelo ao descrito em búfalos (Figura 1), 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).

Figura 1 - Representação do Gene da osteopontina (OPN) em búfalos com 7 éxons e 6 íntrons.



Fonte: Genbank (2012).

A proteína está envolvida em diferentes eventos biológicos e presente em diferentes tecidos, por exemplo, no plasma seminal de 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  $1 \times 10^3$  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).

Uma das proteínas presentes no fluido do oviduto bovino é a osteopontina (OPN). A osteopontina foi descrita pela primeira vez na matriz óssea (LUEDTKE et al., 2002), mas tem sido detectada em células epiteliais e nas secreções do trato gastrointestinal, rins, tireoide, glândula mamária, oviduto, útero, placenta, ovário e testículos (JOHNSON et al., 1999).

Possui peso molecular de 55 kDa, é rica em ácido aspártico, ácido glutâmico e serina (SORENSEN; PETERSEN, 1994).

A OPN foi isolada na glândula vesicular e na ampola do ducto deferente (RODRIGUEZ et al., 2000) e apresenta-se em alta concentração no plasma seminal em animais de alta fertilidade (CANCEL et al., 1997). A OPN liga-se à membrana espermática por meio das integrinas (CRAIG et al., 1989, CANCEL et al., 1999), e esse complexo OPN-integrinas interage com receptores na membrana oocitária (D'CRUZ, 1996).

Souza et al. (2008) também sugerem a participação da OPN na interação espermatozóide-oócito (VINATIER, 1995) e a influência desta proteína na fertilização e no desenvolvimento embrionário.



Killian et al. (1993) identificaram em touros bovinos de alta fertilidade uma proteína de 55 kDa, pI 4,5, posteriormente identificada por Cancel et al. (1997), como a osteopontina.

A OPN também pode modificar características da membrana plasmática do espermatozóide, o que também deve favorecer, a fertilidade (CANCEL et al., 1999). Alguns estudos têm demonstrado que os índices de fertilidade de touros Holstein são associados a uma maior expressão de osteopontina, confirmando a relação positiva desta proteína com a fertilidade (MOURA et al, 2006).

Silva (2011) observou que a OPN está presente em maior quantidade no plasma seminal de animais que apresentaram maior motilidade e menor número de patologias espermáticas.

A osteopontina é uma glicoproteína ácida, que possui várias funções, detectada em várias espécies (CRIVELLO e DELVIN, 1992) e que se liga aos espermatozóides por ocasião da ejaculação (SOUZA et al., 2008). A osteopontina bovina possui um sítio de ligação ao cálcio, e liga-se a várias integrinas, que permite a participação desta proteína na adesão e comunicação intracelular (DENHARDT et al., 2001).

Outros estudos mostram que a OPN do fluido das glândulas acessórias de reprodutores Holandeses de alta fertilidade está associada com um aumento na capacidade de penetração do espermatozóide no oócito (MOURA et al., 2007), na capacitação espermática (MONACO et al. 2009) e na prevenção da polispermia na espécie suína (HAO et al., 2006) e bovina (ERIKSON et al., 2007).

A OPN também induz a capacitação do espermatozóide bovino, através de mecanismos indeterminados, tendo igualmente um efeito positivo na viabilidade espermática, possivelmente através de bloqueio de vias apoptóticas (ERIKSON et al., 2007).

O papel da OPN no processo reprodutivo também é demonstrado em experimentos conduzidos com fertilização “in vitro” (FIV), que demonstram que anticorpos contra a osteopontina, quando adicionados ao meio de FIV, causam reduções significativas na percentagem de fertilização dos oócitos (GONÇALVES et al., 2007).

Dessa maneira, o gene da osteopontina apresenta grande importância para seleção de características reprodutivas, despontando como um gene candidato para uso em programas de seleção de fêmeas e machos de alta fertilidade.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

O estudo foi conduzido em dois rebanhos distintos, um (Fazenda 1) localizado na Ilha de Marajó, no município de Soure (00°40'30"S e 48°30'27"W), estado do Pará e o outro (Fazenda 2), localizado no município de Itaubal (00°50'51"S e 52°31'36"W), estado do Amapá.

Foram avaliados 306 touros, sendo 125 animais da Fazenda 1 e 181 animais da Fazenda 2. As fazendas são especializadas na criação de bubalinos em regime extensivo, em sistema de pastagens nativas e pastagens cultivadas, além da suplementação mineral à vontade, com o objetivo de produzir carne, leite, tourinhos e matrizes para a comercialização.

Todos os animais apresentaram escore de condição corporal acima de 3, avaliado de acordo com (VALE, 2005) e idade variando de 18 meses a 60 meses.

Dos 306 animais avaliados apenas 226 animais apresentaram ejaculados de qualidade, o qual pudesse ser avaliado de acordo com as normas do CBRA (2010). Destes 226 animais, 50 animais não amplificaram o fragmento de DNA desejado não sendo utilizados nas análises de polimorfismo e de associações com os parâmetros reprodutivos. Assim, foram avaliados 176 animais.

### 4.2 EXAME CLÍNICO GERAL E BIOMETRIA TESTICULAR

O método de inspeção foi utilizado para avaliação de aprumos, cascos, pele e pêlos, presença de ectoparasitos, pênis e prepúcio.

Os testículos e epidídimo, quanto à consistência, mobilidade e posição, normalidade dos cordões espermáticos e bolsa escrotal foram avaliados através de palpação (VALE, 2005).

Dados como: identificação do animal, raça, idade, escore de condição corporal (ECC) foram transcritos para fichas clínicas individuais.

A circunferência escrotal foi mensurada com auxílio de uma fita métrica plástica milimetrada até 50 cm. Essa medida foi realizada na região de maior diâmetro dos testículos envolvendo as duas gônadas e a pele escrotal e ainda foram aferidos comprimento e largura de ambos os testículos com o auxílio de um paquímetro (OHASHI et al., 2007; ALIM et al., 2011).

#### 4.3 COLHEITA E ANÁLISE DOS EJACULADOS

Foi realizada uma coleta de sêmen de cada animal. O ejaculado foi submetido a uma avaliação física e morfológica para determinação de: volume (mL), aspecto (aquoso, turvo, leitoso, leitoso-espesso, cremoso e cremoso-espesso), turbilhonamento, motilidade individual progressiva (MIP, 0-100%), vigor (0-5), concentração espermática ( $\times 10^9$  spz/mL) e patologias espermáticas (maiores e menores) segundo metodologia preconizada por Vale et al. (2001) e Pant et al. (2003).

O volume em cada amostra foi mensurado imediatamente após a colheita, pela leitura diretamente no copo coletor ou tubo de ensaio graduado, convenientemente aferido em ml (RIBEIRO et al., 2007; ALIM et al., 2011).

O aspecto foi avaliado através de inspeção visual e representa principalmente a cor e a aparência, do ejaculado, que depende fundamentalmente da concentração de espermatozoides (RIBEIRO et al., 2007; ALIM et al., 2011).

Para o turbilhonamento, uma alíquota do ejaculado foi retirada, com auxílio de micropipeta, sendo colocada uma gota sobre lâmina previamente aquecida a 37°C e, com auxílio de microscópio óptico, foi observado o movimento em forma de onda dos espermatozoides, utilizando-se uma classificação de 0-5 (onda fraca-forte) no aumento de 10X (VALE et al., 2001; ALIM et al., 2011).

A motilidade foi avaliada através de uma gota de sêmen puro, entre uma lâmina e uma lamínula em placa previamente aquecida a 37°C. Com auxílio de microscópio óptico em 40X, foi observado o percentual de espermatozoides em movimento progressivo retilíneo. Da mesma forma, foi analisado o vigor e classificado numa escala de 0 a 5.

De cada ejaculado foram preparados dois esfregaços em lâminas para coloração e verificação das patologias espermáticas. As lâminas foram coradas pelo método de Cerovsky, de acordo com a seguinte descrição: o método consiste na colocação de lâminas submersas dentro de cubetas, na solução de Vermelho do Congo a lâmina permaneceu por um minuto, sendo esta posteriormente lavada com água destilada. Depois de secar submergiu-se por trinta segundos em solução de Violeta Genciana e lavou-se novamente com água destilada. A lâmina corada foi analisada sob imersão, em microscópio óptico com aumento de 1000X.

Foram contados 200 espermatozoides e as anormalidades espermáticas foram classificadas em defeitos menores e maiores e dadas em porcentagens (PANT et al., 2003; OHASHI et al., 2007).

#### 4.4 COLETA DE PÊLOS

Foram coletados folículos pilosos de 306 animais com idade variando de 18 a 60 meses. As amostras foram colocadas em envelopes, identificadas e armazenadas a 4 ° C até a extração de DNA.

#### 4.5 ANÁLISES MOLECULARES

As análises laboratoriais foram executadas no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp / Jaboticabal – SP.

##### 4.5.1 Extração de DNA

As extrações de DNA das amostras de pêlo coletadas foram realizadas a partir da metodologia descrita por Lima (2009). Aproximadamente, 40 folículos/animal foram depositados em um tubo de microcentrífuga (1,5 mL) e centrifugados rapidamente. Em seguida, adicionaram-se 500 µL de solução TE-Tween (Tris 50 mM, EDTA 1 mM, 0,5% Tween 20) em cada amostra, seguindo à incubação em banho maria a 65 °C por 1,5 horas, com agitação periódica; após esse período, adicionaram-se 2 µL de proteinase K/tubo (600 µg/µL) e incubou-se a 55° C por 6 horas, com agitação periódica e após esse período incubou-se a 37 °C por uma noite.

Após esses procedimentos, adicionou-se 1 volume de PCI (Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico) para 1 volume de amostra, agitou-se vigorosamente os tubos por 10 segundos em agitador automático. Posteriormente, centrifugou-se por 10 minutos a 12000 rpm a 23 °C e o sobrenadante foi transferido para novo tubo.

O volume final dessa fase foi de aproximadamente 300 µL. Em seguida foi feita a precipitação do DNA com 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0,3 M (aproximadamente 30 µL) e etanol absoluto gelado (aproximadamente 1 mL). Após misturar por inversão, os tubos foram colocados no freezer à -80 °C por 1 hora. Prosseguiu-se com centrifugação a 4 °C por 25 minutos a 12000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o DNA remanescente foi completamente seco em temperatura ambiente, e em seguida armazenado em 100 µL de TE (10:1).

Após as extrações, as amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (0,8%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) com gel red (4µL/mL) a 100V, por aproximadamente 50 minutos, observando-se posteriormente em luz ultravioleta.

#### **4.5.2 Verificação da quantidade e qualidade do DNA obtido**

A verificação de quantidade e qualidade do material obtido foi feita com uso do espectrofotômetro (Nanodrop 1000, Thermo Scientific, EUA, 2008). A quantificação baseada na absorvância advém do fato de o DNA possuir pico de absorvância de luz no comprimento de 260 nm. Assim, a concentração é medida pela relação  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg/mL DNA}$ .

A qualidade é medida pela relação de absorvância  $A_{260}/A_{280}$ . Proteínas têm pico de absorvância de 280nm e essas podem ser possíveis contaminantes da solução de DNA. Assim sendo, espera-se que a relação  $A_{260}/A_{280}$  esteja entre 1,8 e 2,0. A relação inferior a 1,8 e superior a 2,0, sugere contaminação com proteína. Após a constatação desses parâmetros, a solução estoque foi diluída a 50 µg/mL. Ambas foram congeladas em freezer.

#### **4.5.3 Primers utilizados**

O gene da proteína OPN possui cerca de 9 kb, sendo constituído por sete éxons com 72 pb, 68 pb, 39 pb, 81 pb, 42 pb, 306 pb e 727 pb (éxons 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7, respectivamente) e seis íntrons de 1086 pb, 118 pb, 2478 pb, 492 pb, 771 pb e 699pb (íntrons 1, 2, 3, 4, 5 e 6, respectivamente). A região codificante da proteína está nos éxons 2, 3, 4, 5, 6 e 7 (TANTIA et al., 2006).

Os pares de *primers* utilizados foram o OS4 que amplifica uma região 5'UTR de 508pb e o OS9 que amplifica uma região do éxon 5 ao éxon 6 de 890pb de acordo com Tantia et al. (2008).

#### **4.5.4 Reação de Amplificação de DNA por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

As amostras de DNA genômico tiveram as regiões específicas dos *primers*, amplificadas por PCR (Reação em cadeia de Polimerase), em reações de volume final de 15µL, contendo

1,5µL de DNA (50 ng/µL) , 1,5µL de cada um dos *primers* (15 pM), 6,5µL de GoTaq Colorless Master Mix 2X Taq DNA Polymerase e 4,0 de água (nuclease free).

Os *primers* utilizados foram o OS4 (5' CAGTAACCCTGCTCGGTCAT 3' e 5' AGCACTGACTTCCAGCATCC 3') que amplificaram uma região de 508pb (do nucleotídeo 1289 ao nucleotídeo 1796) e o OS9 (5' CCTCTGAGGAACTGATGACAA 3' e 5' AGAGTTGACGTCCTGGCTGT 3') que amplificaram uma região de 890pb (do nucleotídeo 6513 a 7402) seguindo o que foi descrito por Tantia et al. (2008). Os ciclos de amplificação seguiram a programação em termociclador MasterCycler Gradient 5331 Eppendorff®, Alemanha, 2005. Foi feita uma PCR gradiente a fim de identificar a temperatura ideal de anelamento dos *primers* que foi de 57 ° C para ambos os pares, de acordo com a programação descrita na Tabela 1.

Tabela 1- Programação do termociclador utilizado nas reações de PCR para o gene da Osteopontina em búfalos.

Passo	Temperatura (°C)	Tempo	Ação
1°	94	5 min	Desnaturação inicial
2°	94	45 seg	Desnaturação
3°	57	45 seg	Pareamento dos <i>primers</i>
4°	72	45 seg	Extensão
5°	72	10 min	Extensão final

O ciclo repetiu-se do segundo ao quarto passo por 35 vezes. Após o quinto passo, as amostras foram mantidas a 4° C até a retirada do termociclador.

Após a amplificação, uma alíquota de 3 µl de cada amostra foi diluída com 2 µL de tampão de corrida (4µL/mL de gelred) e foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,5 %), em tampão TBE 1 X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH 8,3) a 90 V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização foi feita em luz UV, o gel foi fotodocumentado em aparelho Gel-Doc (Bio-Rad) e analisado com o software Image Analysis da Kodak, visando avaliar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado.

Ambos os pares de *primers* amplificaram as regiões específicas do gene da osteopontina (Figuras 2 e 3). Os tamanhos correspondiam aos tamanhos indicados anteriormente.

Figura 2 - Fragmentos de 508 pb amplificados por PCR com uso do iniciador específico (OS4) para a região 5'UTR do gene da osteopontina em búfalos.

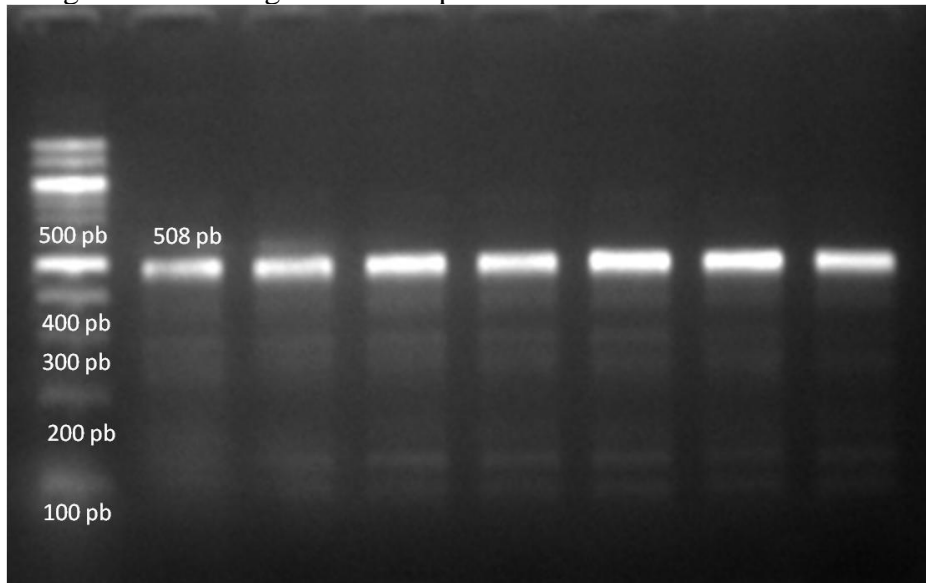
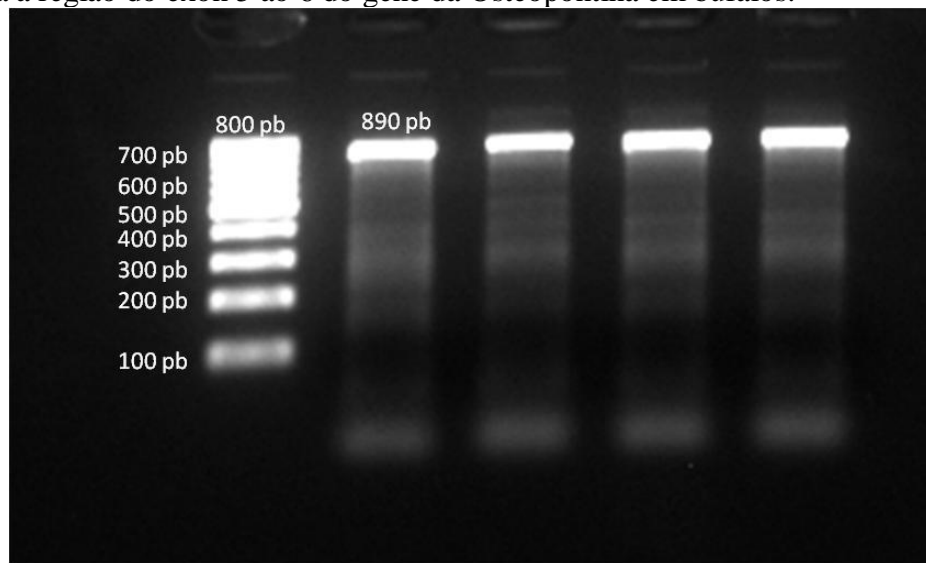


Figura 3 - Fragmentos de 890 pb amplificados por PCR com uso do iniciador específico (OS9) para a região do éxon 5 ao 6 do gene da Osteopontina em búfalos.



#### 4.5.5 Sequenciamento

Os produtos de PCR foram amplificados novamente para um volume final de 20 $\mu$ L então submetidos à purificação, seguindo o protocolo recomendado pelo kit Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System, Promega, EUA.

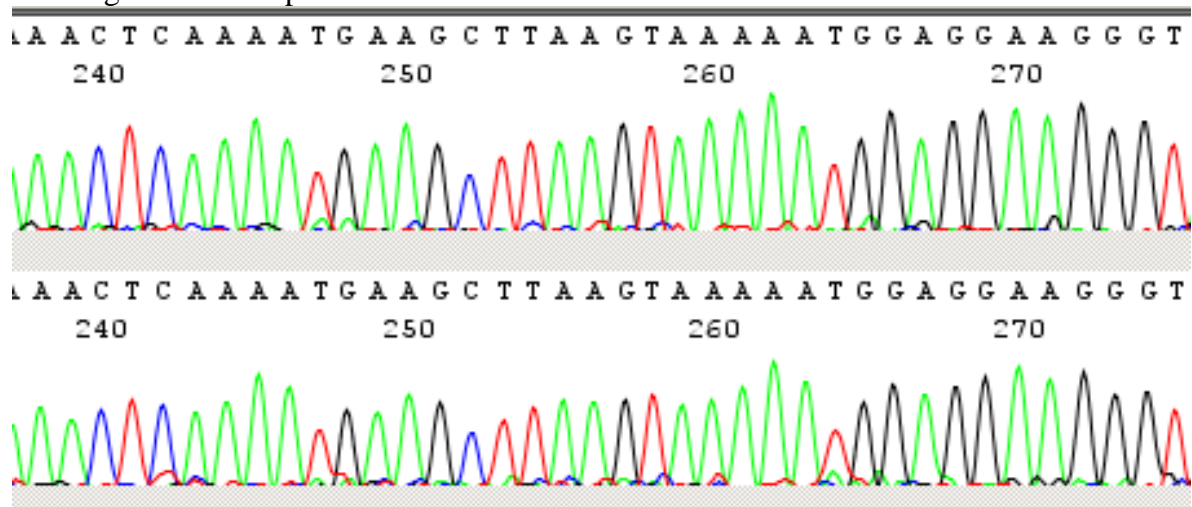
O produto de PCR foi sequenciado a partir de ambos os *primers* (*forward* e *reverse*) usando a técnica de terminação de cadeia por dideoxynucleotídeos (ddNTPs), descrita por SANGER et al. (1977) utilizando o ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready

Reaction Kit, (Applied Biosystems) em um sequenciador automático ABI 3730 XL (Applied Biosystems) em serviço terceirizado pelo laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Departamento de Tecnologia da FCAV.

Para a análise e identificação dos polimorfismos, as sequências obtidas foram analisadas e visualizadas com os programas CodonCode Aligner (CODONCODE CORPORATION).

Os eletrogramas foram de qualidade e permitiram a investigação dos SNPs. Na Figura 4, encontra-se região parcial do produto amplificado pelo par de *primers* OS4.

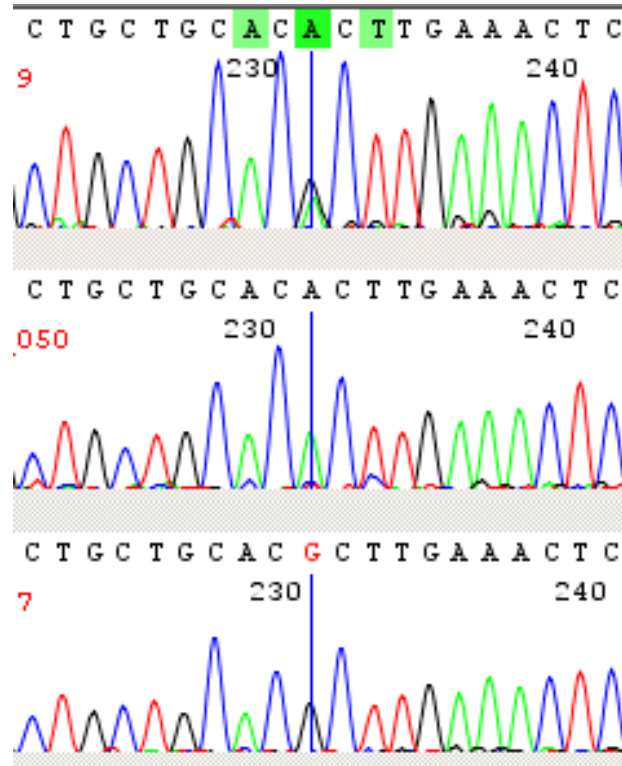
Figura 4 - Cromatograma obtido do sequenciamento produto de PCR de região parcial 5'UTR do gene da Osteopontina em búfalos.



O polimorfismo foi identificado pela presença de dois picos de cores diferentes no eletroferograma em indivíduos heterozigotos bem como por comparação em indivíduos homozigotos usando-se o programa CodonCode Aligner (Figura 5). A anotação dos genótipos dos animais foi feita alinhando-se e comparando-se as sequências de cada um dos animais.



Figura 5 - Saída da análise da sequência de três animais no programa CodonCode Aligner com exemplo de um SNP identificado. A primeira sequência refere-se a um animal heterozigoto A/G (dois picos), a segunda refere-se a um animal homozigoto A/A e a terceira a um animal homozigoto GG.



#### 4.5.6 Análises estatísticas

##### 4.5.6.1 Frequências alélicas e genotípicas

As frequências alélicas ( $x_i$ ) e genotípicas ( $x_{ij}$ ) para as variantes do gene da Osteopontina (i), foram estabelecidas para a população, pelas equações 1 e 2:

Equação 1

$$x_i = \frac{2n_{ii} + n_{ij}}{2n}$$

Equação 2

$$x_{ij} = \frac{n_{ij}}{n}$$

Em que  $n_{ii}$  e  $n_{ij}$  correspondem ao número de homozigotos e heterozigotos observados no alelo  $i$ , respectivamente;  $n$  corresponde ao número de indivíduos analisados.

#### 4.5.6.2 Teste de aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg

Pelo teorema de Hardy-Weinberg, as frequências genotípicas esperadas, em equilíbrio, podem ser estimadas a partir da expansão do binômio:

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

Em que  $x_i^2$  = frequência esperada dos homocigotos para o alelo  $i$ ;  $2x_ix_j$  = frequência esperada para heterocigotos  $ij$ ;  $x_j^2$  = frequência esperada dos homocigotos para o alelo  $j$ .

#### 4.5.6.3 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) foi estimado com o uso do programa computacional Plink com o objetivo de verificar quais os SNPs segregavam juntos.

Considerando-se dois *loci* com dois alelos para cada *locus* (A1/A2 e B1/B2), tem-se que:

$$r^2 = D^2 / [\text{freq}(A1) * \text{freq}(A2) * \text{freq}(B1) * \text{freq}(B2)] \text{ (HILL e ROBERTSON, 1966) em}$$

que:

$$D = \text{freq}(A1\_B1) * \text{freq}(A2\_B2) - \text{freq}(A1\_B2) * \text{freq}(A2\_B1), \text{ segundo Hill (1981).}$$

#### 4.5.6.4 Análises de associação entre as variantes encontradas e os fenótipos das características estudadas.

Para as características circunferência escrotal, volume testicular, concentração espermática, motilidade espermática e patologias espermáticas, as análises foram realizadas utilizando modelos lineares através do aplicativo PROC MIXED do pacote estatístico do SAS 8.0 (SAS Institute, Inc., 2000), assumindo distribuição normal dos dados. O efeito dos genótipos identificados para o gene da osteopontina usando o modelo:

$$Y_{ij} = \mu + F_k + I_i + G_j + e_{ij}$$

Onde  $Y_{ij}$  = característica para o  $ij^{\text{ésimo}}$  animal;  $\mu$  = média da característica na população;  $F_k$  = efeito fixo associado a  $k^{\text{ésima}}$  fazenda;  $I_i$  = efeito fixo associado à  $i^{\text{ésima}}$  classe de idade;  $G_j$  = efeito fixo associado ao  $j^{\text{ésimo}}$  genótipo do gene da osteopontina;  $e_{ijklm}$  = erro aleatório associado com a  $ij^{\text{ésima}}$  observação.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos para a extração de DNA estavam dentro do padrão recomendado, pois as amostras tinham concentração maior que 50ng/μL e qualidade, com relação 260/280 entre 1,80 a 2,0 (Tabela 2).

Tabela 2 - Exemplo de concentrações de DNA obtidas pelo método de Fenol-Clorofórmio-Álcool Isoamílico, de alguns animais (sete), a partir de folículos pilosos de búfalos, quantificados pelo aparelho NanoDrop®.

<b>Animal</b>	<b>Concentração (ng/μL)</b>	<b>Relação 260/280</b>
1	59,55	1,82
2	64,28	1,96
3	57,62	2,00
4	59,87	1,98
5	56,82	2,00
6	58,86	1,92
7	61,32	2,02

### 5.1 POLIMORFISMOS ENCONTRADOS

Foram identificados 3 polimorfismos do tipo SNP para a região amplificada pelo primer OS4 (5'UTR) do gene da osteopontina e 4 polimorfismos do tipo SNP para a região amplificada pelo primer OS9 (éxon 5 ao éxon 6), através do sequenciamento de 176 animais. Os polimorfismos foram nas posições 1478, 1513 e 1611 na região amplificada pelo OS4 e nas posições 6690, 6737, 6925 e 6952 na região amplificada pelo OS9 (Tabela 3).

Tabela 3 - Indicação da posição, região e substituição dos SNPs identificados e depositados no NCBI JQ613157.

<b>Localização (pb)</b>	<b>primer</b>	<b>Região</b>	<b>SNP</b>
1478	OS4	5'UTR	T/C
1513	OS4	5'UTR	A/G
1611	OS4	5'UTR	A/T
6690	OS9	Íntron 5	A/T
6737	OS9	Íntron 5	A/G
6925	OS9	Íntron 5	A/G
6952	OS9	Íntron 5	C/T

As sequências e polimorfismos presentes foram submetidas ao NCBI (National Center for Biotechnology Information) pelos números de acesso JQ613157.

No presente estudo podemos observar dois polimorfismos que também foram descritos por Tántia et al. (2008) localizados nas regiões 1478 e 6925 pb do gene da osteopontina, entretanto os SNPs localizados nas regiões 1513, 1611, 6690, 6737, 6925pb estão sendo descritos pela primeira vez.

Tántia et al. (2008) ao descreverem o gene da osteopontina em búfalos observaram seis SNPs, cinco em regiões intrônicas e um na região UTR. Os SNPs na região UTR (indel) foi o mesmo relatado por Schnabel et al. (2005) em *B. taurus*.

## 5.2 FREQUÊNCIAS ALÉLICAS E GENOTÍPICAS

As frequências alélicas e genotípicas encontram-se na Tabela 4. Três das seis frequências genotípicas não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg pelo teste de  $X^2$  a 5%, indicando que esses *loci* podem estar sob processo de seleção.

Tabela 4 - Frequências alélicas e genotípicas para os SNPs genotipados e adesão ao equilíbrio de Hardy-Weinberg a 5%.

		<b>freqCC</b>	<b>freqTC</b>	<b>freqTT</b>	<b>freqT</b>	<b>freqC</b>	<b>equilibrio HW</b>
SNP	<b>1478</b>	0,29	0,41	0,30	0,50	0,50	Não
	<b>6952</b>	0,93	0,07	0	0,04	0,96	Sim
		<b>freqGG</b>	<b>freqGA</b>	<b>freqAA</b>	<b>freqG</b>	<b>freqA</b>	
	<b>1513</b>	0,6	0,35	0,05	0,78	0,22	Sim
	<b>6737</b>	0,35	0,65	0	0,68	0,32	Não
	<b>6925</b>	0,49	0,44	0,07	0,71	0,29	Sim
		<b>freqAA</b>	<b>freqAT</b>	<b>freqTT</b>	<b>freqA</b>	<b>freqT</b>	
	<b>1611</b>	0,28	0,42	0,30	0,49	0,51	Não
	<b>6690</b>	0,93	0,07	0	0,96	0,04	Sim

## 5.3 DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO

Na Tabela 5, encontram-se os valores estimados de  $r^2$  entre os quatro SNPs genotipados em toda a população.

Tabela 5 - Valores estimados de  $r^2$  para sete SNPs (1478, 1513, 1611, 6690, 6737, 6925, 6952) no gene da osteopontina.

	<b>1478</b>	<b>1513</b>	<b>1611</b>	<b>6690</b>	<b>6737</b>	<b>6925</b>	<b>6952</b>
<b>1478</b>	-	0,245	0,953	0,012	0	0,025	0,012
<b>1513</b>		-	0,242	0,009	0,003	0,215	0,009
<b>1611</b>			-	0,013	0,002	0,022	0,013
<b>6690</b>				-	0,017	0,019	1,00
<b>6737</b>					-	0,001	0,017
<b>6925</b>						-	0,019

Considerou-se que se o  $r^2$  for maior que 0,33, existe desequilíbrio de ligação (ARLIE et al., 2002). Os valores de  $r^2$  variaram de 0 a 1. Os SNPs 1478 e 1611 apresentaram valores  $r^2$  maiores que 0,33 entre si (0,953), significando que estão em desequilíbrio e são herdados juntos. Assim, escolheu-se o SNP 1611 para representar os dois na análise de variância, pois havia um número maior de animais genotipados para esse SNP. Alguns animais não foram genotipados para o SNP 1478, pois ele estava no início do fragmento sequenciado e para alguns animais, perdeu-se essa informação. Os SNPs 6690 e 6952 apresentaram os mesmos genótipos para os mesmos animais, por isso tiveram desequilíbrio de 1, assim sendo descartou-se o SNP 6952 da análise. Acredita-se que isso se deve ao fato de amostra ser pequena, pois o esperado é que estivessem em desequilíbrio, visto que ambos os SNPs estão em desequilíbrio com os demais.

#### 5.4 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO DOS SNPS COM VALORES FENOTÍPICOS DAS CARACTERÍSTICAS ANALISADAS.

Os SNPs encontrados foram correlacionados com os parâmetros reprodutivos dos animais (Tabela 6).

Tabela 6 - Valores de  $P$  dos SNPs encontrados para características estudadas. Estão em negrito os significativos a 5%.

<b>SNPs/ Características</b>	<b>CE (cm)</b>	<b>VT (cm<sup>3</sup>)</b>	<b>Concentração x10<sup>9</sup></b>	<b>Motilidade</b>	<b>Patologia</b>
<b>1513</b>	0,3841	0,7583	0,4152	0,2624	0,1123
<b>1611</b>	0,6712	0,3338	0,7851	0,3977	0,3698
<b>6690</b>	<b>0,0028</b>	0,2045	<b>0,0093</b>	<b>&lt;0,001</b>	<b>&lt;0,001</b>
<b>6737</b>	0,2886	<b>0,0449</b>	0,3277	0,1227	0,3307
<b>6925</b>	0,2112	0,3164	0,1643	0,0840	0,1370

CE (Circunferência escrotal), VT (Volume testicular)

Para todas as características estudadas foram encontrados SNPs significativos a 5%. Para CE, o SNP 6690; para volume testicular, o SNP 6737; para a concentração, o SNP 6690; para motilidade, o SNP 6690 e para patologia, o SNP 6690. Estando o SNP 6690 relacionado com quatro características.

Isso sugere que o gene da osteopontina influencia as características reprodutivas em machos bubalinos. A Tabela 7 mostra quais são os genótipos mais significativos para cada característica andrológica estudada.

Tabela 7 - Média de genótipos para efeito do SNP mais significativo de acordo com as características andrológicas estudadas.

SNPs	Características Andrológicas								
	CE (cm)		Volume testicular (cm <sup>3</sup> )	Concentração espermática x 10 <sup>9</sup>		Motilidade (%)		Patologia (%)	
	AA	AT		AA	AT	AA	AT	AA	AT
<b>6690</b>	25,86 <sup>a</sup>	23,76 <sup>b</sup>		0.580 <sup>a</sup>	0.384 <sup>b</sup>	74.0 <sup>a</sup>	40.0 <sup>b</sup>	23.8 <sup>b</sup>	40.9 <sup>a</sup>
<b>6737</b>			<b>GG</b>	<b>AG</b>					
			168.97 <sup>a</sup>	161.67 <sup>b</sup>					

Para a característica CE o genótipo AA foi associado ( $P < 0,05$ ) com os animais que apresentaram maior média de circunferência escrotal, maior média de concentração espermática, maior média de motilidade e menor número de patologias totais, para o SNP 6690. Para a característica volume os animais que apresentaram maior volume estão correlacionados com a presença do genótipo GG, para o SNP 6737.

Panigrahi e Yadav (2010) trabalhando com o gene das proteínas nucleares de transição (TPS/ TNP-1), encontrados na cromatina de espermátides, observaram em búfalos da raça Murrah 3 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) nas posições 205, 340 e 346 pb em região intrônica. O efeito destes polimorfismos foi associado a motilidade individual, a atividade de massa e maturação dos espermatozóides, sendo encontrado efeito significativo somente sobre a maturação dos espermatozóides.

Mukhopadhyay et al. (2011) estudando o gene TSPY (Marcador específico para o cromossomo Y) verificaram que não existe correlação significativa entre os SNPs encontrados neste gene e os parâmetros andrológicos de búfalos.

## **6 CONCLUSÃO**

O gene da osteopontina apresenta polimorfismos do tipo SNPs, os quais podem ser correlacionados com características reprodutivas de machos bubalinos.

A associação entre as características andrológicas estudadas e os SNPs encontrados, indica que o gene da osteopontina, pode influenciar significativamente essas características em machos bubalinos, entretanto, existe a necessidade de mais estudos.

## REFERENCIAS

- ABDEL-RAHMAN, S.M. Evidences reveal that cattle and buffalo evolutionary derived from the same ancestor based on cytogenetic and molecular markers. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 22, p. 1-6, 2006.
- AHMED, S.S. et al. Genetic polymorphism of some genes related to reproductive traits and their association with calving interval in Egyptian buffalo. **Genomics Quantitative Genetics**, v. 3, p. 1-8, 2011.
- ALBUQUERQUE, M.M.S. et al. Variabilidade genética em búfalos estimada por marcadores RAPD. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, p. 623-628, 2006.
- ALIM, M.A. et al. Genetic markers and their application in buffalo production. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v 10, n. 14. p. 1789-1800, 2011.
- ARDLIE, K.G; LUNETTA, K.L; SEIELSTAD, M. Testing for population subdivision and association in four case-control studies. **American Journal of Human Genetics**, v. 71, p. 304-311, 2002.
- ASPILCUETA-BORQUIS, R.R. et al. Genetic parameters for buffalo milk yield and milk quality traits using Bayesian inference. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 2195-2201, 2010a.
- ASPILCUETA-BORQUIS, R.R. et al. Genetic parameters for milk, fat and protein yields in Murrah buffaloes. **Genetics Molecular Biology**, v. 33, n.1, p.71-77, 2010b.
- 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.309-314, 1997.
- BERNARDES, O. Bubalinocultura no Brasil: situação e importância econômica. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.293-298, jul./set. 2007.
- BINDON, B.M.; PIPER, L.R. Boorola (F) gene: major gene affecting ovine ovarian function. In: EVANS, J.W.; HOLLAENDER, A. (Ed.). **Genetic Engineering of Animals: an Agriculture Perspective**. New York: Plenum Press, 1986, p. 678-693.
- BISHOP, M.D. et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, Bethesda, v.136, p.619-39, 1994.
- BONILHA, S.F.M. **Efeito da seleção para peso pós-desmama sobre características de carcaça, rendimento de cortes e composição corporal de Nelore e Caracu**. 2003. 55f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Piracicaba, 2003.



BREIER, B.H.; GLUCKMAN, P.D. The regulation of postnatal growth: nutritional influences on endocrine pathways and function of the somatotrophic axis. **Livestock Production Science**, Amsterdam, v. 27, p. 77-94, 1991.

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**, v.57, p.1293-1301, 1997.

CANCEL, A.M.; CHAPMAN, D.A.; KILLIAN, G.J. Osteopontin localization in the holstein bull reproductive tract. **Biology of Reproduction**, v.60, p.454-460, 1999.

CARCANGIU, V. et al. Characterization of the Mediterranean Italian buffaloes melatonin receptor 1A (MTNR1A) gene and its association with reproductive seasonality. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 419-426, 2011.

CHABAS, D. L'ostéopontine, une molécule aux multiples facettes. **Medecine Sciences**, v. 21, p. 832-838, 2005

CIERO, L.D.; BELLATO, C.M. PROTEOMA: Avancos Recentes em Tecnicas de Eletroforese Bidimensional e Espectrometria de Massas. **Biotechnologia Ciência e Desenvolvimento**, v. 29, p. 158-164, 2003.

CLEMPSON, A.M. et al Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v.94, n. 7, p.3618–3628, 2011b.

CLEMPSON, A.M. et al. Polymorphisms in the autosomal genes for mitochondrial function TFAM and UCP2 are associated with performance and longevity in dairy cows. **Animal**, v.5, n.9, p.1335-1343, 2011a.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. O uso de marcadores moleculares na indústria animal. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 11, p. 195-205, 1995.

CRAIG, A.M.; SMITH, J.H.; DENHARD, D.H. Osteopontin, a transformation-associated cell adhesion phosphoprotein, is induced by 12-0-tetradecanoylphorbol 13-acetate in mouse epidermis. **Journal of Biological Chemistry**, v.264, p.9682-9689, 1989.

CRIVELLO, J.F.; DELVIN, E. Isolation and characterization of a cDNA for osteopontin-k, a kidney cell adhesion molecule with high homology to osteopontin. **Journal of Bone and Mineral Research**, v.7, p. 693-699, 1992.

D'CRUZ, O.J. Adhesion molecules in human sperm-oocyte interaction: relevance to infertility. **Frontiers in Bioscience**, v.1, p.161-176, 1996.

DE VRIES, A.A. et al. The role of major genes and DNA technology in selection for meat quality in pigs. **Meat Science**, v. 49s, p. 245, 1998.

DENHARDT, D.T.; GIACHELLI, C.M.; RITTLING, S. Role of osteopontin in cellular signaling and toxicant injury. **Annual Reviews Pharmacology Toxicology**, v.41, p.723-749, 2001.

DENHARDT, D.T.; GUO, X. Osteopontin: a protein with diverse functions. **Faseb Journal**, v.7, p.1475-1482, 1993.

DENHARDT, D.T.; NODA, M. Osteopontin expression and function: role in bone remodelling. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.1, p.92-102, 1998.

ERIKSON, D.W. et al. Detection of osteopontin on Holstein bull spermatozoa, in cauda epididymal fluid and testis homogenates, and its potential role in bovine fertilization. **Reproduction**, v.133, p.909-917, 2007.

FISHER, L.W. et al. Flexible structures of SIBLING proteins, bone sialoprotein, and osteopontin. **Biochemical Biophysical Research Communications**, v.280, p.460-465, 2001.

FONSECA, V.O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva do rebanho. **Informe Agropecuário**, v. 21, n.205, p.48-63, jul./ago., 2000.

GALEAZZI, P.M. et al. Analysis of culling probability in dairy buffalo using survival models. **Animal**, The Animal Consortium, p. 1-5, 2010b

GALEAZZI, P.M. et al. Genetic parameters for stayability in Murrah buffaloes. **Journal of Dairy Research**, v. 77, p. 252-256, 2010a.

GARNER, D.L. Ancillary tests of bull semen quality. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.13, n.2, July, 1997.

GIL, F.F.M. et al. Caracterização de polimorfismo no éxon 1 do gene da grelina em búfalos da raça murrah (*Bubalus bubalis*). In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 55, 2009, Goiania-GO. **Anais...**Goiania: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2006, p. 192.

GONÇALVES, R.F.; WOLINETZ, C.D.; KILLIAN, G.J. Influence of arginine-glycine-aspartic acid (RGD), integrins alpha(V) and alpha(5) and osteopontin on bovine sperm-egg binding, and fertilization in vitro. **Theriogenology**, v.67, p.468-474, 2007.

GROSSI, D.A. et al. Genetic associations between age at first calving and heifer body weight and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Malden, v.126, p.387-393, 2009.

GRUPIONI, N.V. et al. Efeito dos marcadores genéticos IGF1, GH e PIT1 sobre os valores genéticos da idade ao primeiro parto e peso ao primeiro parto em bovinos da raça Canchim. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 46, 2009, Maringá-PR. **Anais...**Maringá: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2009, p.68.

HAFEZ, I. S. E. **Reprodução animal**. 4. ed. São Paulo: Manole, 1988. 720 p.

HAO, Y. et al. Osteopontin reduces polyspermy during in vitro fertilization of porcine oocytes. **Biology Reproduction**, v.75, p.726-733, 2006.

HASTINGS, N. et al. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p. 583-585, 2006.

HAYWARD, M.D. et al. Genetic markers and the selection of quantitative traits in forage grasses. **Euphytica**, v.77, p.269-75, 1994.

HILL, H.G. Estimation of effective population size from data on linkage disequilibrium. **Genetic Research**, v. 38, p. 209-216, 1981.

HILL, H.G.; ROBERTSON, A. The effect of linkage on limits to artificial selection. **Genetic Research**, v. 8, p. 269-294, 1966.

IANNUZZI, L. et al. Comparative FISH-mapping of six expressed gene loci to river buffalo and sheep chromosomes. **Cytogenetics and Cell Genetics**, v. 84, p.161-163, 1999.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Censo 2010**. Disponível em <http://www.ibge.gov.br/>. Acesso em: 15 de março de 2012.

JOHNSON, G.A. et al. Ovine osteopontin. II. Osteopontin and alpha(v) beta(3) integrin expression in the uterus and conceptus during the periimplantation period. **Biology Reproduction**, v. 61, n.4, p. 892-899, 1999.

KILLIAN, G.J.; CHAPMAN, D.A.; ROGOWSKI, L.A. Fertility-associated proteins in Holstein bull seminal plasma. **Biology Reproduction**, v.49, p.1202-1207, 1993.

KOHAN, M. et al. Enhanced osteopontin expression in a murine model of allergen-induced airway remodelling. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, p. 1444-1454, 2007.

KRIESE, L. A., et al. Age adjustment factors, heritabilities and genetics correlations for scrotal circumference and related growth traits in Hereford and Brangus bulls. **Journal of Animal Science**, v.69, p.478-89, 1991.

LIMA, A.L.F. **Caracterização Molecular da Região Promotora do Gene da Enzima *Estearoil-coenzima A dessaturase* em Búfalas Leiteiras**. 2009. 96 f. Tese (Doutorado em Melhoramento Genético) – Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Jaboticabal/SP, 2009.

LUEDTKE, C.C. et al. Osteopontin expression and regulation in the testis, efferent ducts, and epididymis of rats during postnatal development through to adulthood. **Biology Reproduction**, v.66, p.1437-1448, 2002.

MARSON, E.P. et al. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v. 7, n.1, p. 243-251, 2008.

MEJDELL, C.M. et al. Association of major histocompatibility complex antigens (BOLA-A) with AI bull progeny test results for mastitis, Ketosis and fertility in Norwegian cattle. **Animal Genetics**, v. 25, p. 99-104, 1994.

MEUWISSEN, T.H.E.; GODDARD, M.E. Marker assisted estimation of breeding values when marker information is missing on many animals. **Genetics Selection Evolution**, London, v.31, p.375-394, 1999.

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

MILAZZOTTO, M. P. et al. New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos taurus indicus* (Nellore). **Livestock Science**, v. 114, p. 274-279, 2008.

MONACO, E. et al. Effect of osteopontin (OPN) on in vitro embryo development in cattle. **Theriogenology**, v.71, p. 450-457, 2009.

MONGET, P. et al. Regulation of ovarian folliculogenesis by IGF and BMP system in domestic animals. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v.23, n.1, p.139-154, 2002.

MOURA, A.A. et al. Identification of accessory sex gland fluid proteins as related to fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. **Journal of Andrology** , v.27, p.201-211, 2006.

MOURA, A.A. Proteins of the accessory sex glands associated with the oocytepenetrating capacity of cauda epididymal sperm from Holstein bulls of documented fertility. **Molecular Reproduction Development**, v.74, p.214-222, 2007.

MUKHOPADHYAY, C.S. et al. Exploration of Y-chromosome specific markers to discover SNP associated with sub fertility traits in dairy bulls. **Indian Journal of Biotechnology**, v. 10, p.178-182, 2011.

NAGATOMO, T. 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.

NAKAYAMA, L. et al. Variantes Genéticas de Albumina e Fosfogliconato Desidrogenase em Búfalos de Água e Bovinos Nelore Criados no Estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, Belém, v. 51, p.211-223, jan./jun., 2009.

NEMIR, M. et al. Targeted inhibition of Osteopontin expression in the mammary gland causes abnormal morphogenesis and lactation deficiency. **Journal of Biological Chemistry**, v.275, p. 969-976, 2000.

OHASHI, O.M. et al. Desenvolvimento reprodutivo do macho bubalino: circunferência escrotal, atividade espermática e endocrinologia. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.299-306, jul./set., 2007.

OHASHI, O.M. et al. Morfologia do sistema genital, distúrbio reprodutivo e manejo do macho bubalino (*Bubalus bubalis*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.35, n.2, p.88-94, abr./jun., 2011.

OLIVEIRA, J.F.C.; HENKES, L.H. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: GONSALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Varela, p. 261-279, 2001.

OPRZADEK, J. et al. Polymorphisms at loci of leptin (LEP), PIT1 and STAT5A and their association with growth, feed conversion and carcass quality in Black-and-White bulls. **Animal Science Papers and Reports**, Mrokwow, v. 21, n. 2, p. 135-145, 2003.

PALASZ, A. T. et al. The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. **Theriogenology**, v.42, n.8, p.715-26, 1994.

PANIGRAHI, S.K.; YADAV, B.R. Polymorphism in *TNP-1* gene of Murrah buffalo bulls. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n.43, p. 7224-7229, 2010.

PANT, H.C. et al. Testicular development and its relationship to semen production in Murrah buffalo bulls. **Theriogenology**, v.60, p.27-34, 2003.

PAREEK, C.S. 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, 2008.

PEREIRA, A.P. et al. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 28, p. 230-236, 2005.

RAJAMAHENBRAN, R.; AMBROSE, J.D.; LEE, C.Y.G. Anti-human sperm monoclonal antibody HS-11: a potential marker to detect bovine sperm capacitation and acrosome reaction *in vitro*. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.101, p.539-45, 1994.

REGINATO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 2001. 215p.

RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTETELLE, D. Role of the somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domestic Animal Endocrinology**, New York, v. 23, p. 351- 360, 2002.

RIBEIRO, H.F.L.; VALE, W.G. Dag defect in murreh buffalo bulls in Brazil. **Italian Journal Animal Science**, v.6, n.2, p. 667-670, 2007.

RIVERA, G. M. et al. A potential role for insulin-like growth factor protein-4 proteolysis in the establishment of ovarian follicular dominance. **Biology of Reproduction**, Champaign, v. 5, n. 1, p. 102-111, 2001.

ROTHSCHILD, M.F. et al. A major gene for litter size in pigs. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5, 1994, Guelph, Canada. **Proceedings...** Guelph: World Congress on Genetics, 1994. v.21, p. 225-228.

ROTHSCHILD, M.F., G. PLASTOW. Advances in pig genomics and industry applications. **Ag. Biotech. Net.**, v.1, n.1, 1999.

SCHEEHY, P. A. et al. A functional genomics approach to evaluate candidate genes located in a QTL interval for milk production traits on BTA6. **Animal Genetics**, v. 40, p. 492-498, 2009.

SCHNABEL, R.D. et al. Fine-mapping milk production quantitative trait loci on BTA6: Analysis of the bovine osteopontin gene. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 102, p.6896-6901, 2005.

SCHWERIN, M. et al. Perspectives of molecular genome analysis in livestock improvement-An overview. **Animal Research and Development**, v. 42, p. 15-26, 1995.

SENGER, D.R. et al. Purification of a human milk protein closely similar to tumor secreted phosphoproteins and osteopontin. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 996, p. 43-48, 1989.

SHOENAU, W. et al. Associação entre Polimorfismos do gene IGF-1R e características produtivas e reprodutivas em fêmeas bovinas da Raça Holandesa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 57, p. 772-776, 2005.

SILVA, A. M .S.; CORRÊA, G. C.; REIS, E. M. Proteômica – Uma abordagem funcional do estudo do genoma. **Saúde e Ambiente em revista**, v.2, p.1-10, 2007.

SILVA, M.M. **Proteínas do plasma seminal de touros *bos indicus* e associações com parâmetros seminais**. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). 74 f. Fortaleza/CE. 2011.

SODEK, J.; GANSS, B.; MCKEE, M.D. Osteopontin. **Critical Reviews Oral Biology and Medicine**, 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**, v.198, p.200-205, 1994.

SOUZA, C.E. et al. Binding patterns of bovine seminal plasma proteins BSP A1/A2, BSP 30 kDa and osteopontin on ejaculated sperm before and after incubation with isthmic and ampullary oviductal fluid. **Animal Reproduction Science**, v.105, p.72-89, 2008.

TANTIA, M.S. et al. Characterization of Osteopontin gene of *Bubalus bubalis*. **Animal**, v. 2, n.7, p. 987-990, 2008.

TANTIA, M.S. et al. DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. **BMC Veterinary Research**, v.2, n. 32, p. 1746-1748, 2006.

TONHATI, H. et al. Partial characterization of exon 3 of JY-1 gene in *Bos taurus indicus*. In: REUNIÓN ALPA, 22, 2011, Montevideo, Uruguay. **Anais...**Montevideo: Reunión Alpa, 2011, p.256.

TONHATI, H.; LIMA, A.L.F. Buffalo Meat : Production and Quality In: CONGRESSO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFALO, 2, 2003, Monterotondo, Italy. **Proceedings...** Monterotondo: Congresso Nazionale Sull'allevamento del Bufalo, 2003, v.1, p. 67-79.

VALE, W. G. et al. Arrested development of the mesonephric ducts in a Murrah buffalo bull. In: BUFFALO SYMPOSIUM OF AMERICAS, 1, 2002, Belém, Pará. **Anais...**Belém: Buffalo Symposium of Americas, 2002, p. 479-81.

VALE, W. G. The challenges and constrains for buffalo husbandry in world: dealing with pathology hereditary problems. In: CONGREZZO NAZIONALE SULL'ALLEVAMENTO DEL BUFALO, 3, Capaccio-Paestum, Italia. **Proceedings...** Capaccio-Paestum: Congresso Nazionale del Bufalo, 2005. v.1, p.20-30.

VALE, W.G. et al. Relationship of age, bodyweight and scrotal circumference in Murrah buffalo bulls. In: WORLD BUFFALO CONGRESS, 6, 2001, Maracaibo, Venezuela. **Anais...** Maracaibo: World Buffalo Congress, 2001, v. 2, p. 256-262.

VALE, W.G.; RIBEIRO, H.F.L. Inheritance causes of buffalo bulls infertility in Brazil. **Buffalo Newslett**, v.24, p.3-9, 2009.

VAN DER WERF, J. Basics of marker assisted selection. In: KINGHORN, B.; VAN DER WERF, J (Org.). **Identifying and incorporation genetic markers and major genes in animal breeding programs**. New England: University of New England Armidale, 2001, p. 119-127.

VILLANUEVA, B.; PONG-WONG, R.; WOOLLIAMS, J.A. Marker assisted selection with optimized contributions of the candidates to selection. **Genetics Selection Evolution**, London, v. 34, p. 679-703, 2002.

VINATIER, D. Integrins and reproduction. **European Journal of Obstetric Gynecology and Reproductive Biology**, v.59, p.71-81, 1995

WERNER, H.; LEROITH, D. New concepts in regulation and function of the insulin-like growth factors: implications for understanding normal growth and neoplasia. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 57, n. 6, p. 932-942, 2000.