

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**

**DANIELLY BERALDO DOS SANTOS SILVA**

**MARCADORES MOLECULARES NO GENE DA LEPTINA ASSOCIADOS COM  
CARACTERÍSTICAS DE CARÇA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Dourados-MS

2012

DANIELLY BERALDO DOS SANTOS SILVA

**MARCADORES MOLECULARES NO GENE DA LEPTINA ASSOCIADOS COM  
CARACTERÍSTICAS DE CARÇA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Trabalho de conclusão de curso de graduação  
apresentado para obtenção do título de  
Bacharel em Biotecnologia.

Faculdade de Ciências Biológicas e  
Ambientais

Universidade Federal da Grande Dourados.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Alexéia Barufatti  
Grisolia

Co-Orientador: Prof<sup>º</sup> Dr Leonardo de Oliveira  
Seno

Dourados-MS

2012

DANIELLY BERALDO DOS SANTOS SILVA

**MARCADORES MOLECULARES NO GENE DA LEPTINA ASSOCIADOS COM  
CARACTERÍSTICAS DE CARCAÇA EM BOVINOS DA RAÇA NELORE**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia da Faculdade de Ciências Biológicas da Universidade Federal da Grande Dourados, pela comissão formada por:

---

Prof. Dr<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Leonardo de Oliveira Seno

---

Prof. Dr<sup>o</sup> Alexandre Rodrigo Mendes Fernandes

Dourados-MS

2012

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pelas graças concebidas, por todos os dias de alegria e paz, por iluminar meu caminho para que eu o trilhasse sem medo e cheio de esperanças.

À minha grande família (Avós, Tios, Tias, Primos e Agregados), que me entenderam, amaram e apoiaram durante minha formação. Em especial, à minha irmãzinha e aos que são “meus pilares” e exemplo de vida, meus pais (Edson e Iraci), por me ensinarem a retidão do caminho, por fazer-me conduzir a vida com dignidade, sabedoria e humildade, por todo amor e carinho.

À Universidade Federal da Grande Dourados pelo apoio logístico e oportunidade na realização do curso de graduação em Biotecnologia.

À professora orientadora Dr<sup>a</sup> Alexéia Baruffatti Grisolia. Muito obrigada pelas oportunidades, amizade e também pela confiança a mim depositada.

Ao professor e co-orientador Dr<sup>o</sup> Leonardo de Oliveira Seno. Obrigada pelas oportunidades, pela paciência, compreensão e profissionalismo.

À “família” do Laboratório de Biotecnologia Aplicada à Produção Animal da FCA (André, Alexandre, Bruno, Camila, Joyce, Jussara e Lara). Obrigada não só pelo auxílio nas pesquisas, como também pela amizade, compreensão e fidelidade. “A vida é curta, mas as emoções que podemos deixar duram uma eternidade” (Clarice Lispector).

À todos os guerreiros da I turma de Biotecnologia, em especial, aos meus amados, fiéis e companheiros de todos os momentos: Carla, Lara, Luiz Augusto, Mônica, Nicholas, Suellen e Thays. Muito obrigada por tornar os meus dias mais alegres, pela paciência, por estarem ao meu lado durante esses quatro anos e por me acolherem como amiga. "E a gente vive junto, e a gente se dá bem, não desejamos mal a quase ninguém" (Lulu Santos).

Aos professores e auxiliares administrativos da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais da UFGD, especialmente aos que estão ligados ao curso de Biotecnologia.

Às minhas queridas amigas Ana Rafaely e Patrícia, em vocês sempre encontrei o apoio para todas as ocasiões e dificuldades da minha vida. Vocês acrescentam a felicidade em meus dias, e foram com vocês que compartilhei muitos momentos importantes, principalmente nossos sonhos e conquistas! Obrigada pela amizade de tantos anos, por toda ajuda direta e indiretamente, pela confiança e cumplicidade.

Aos meus amigos queridos Nayara e Vitor, mesmo que indiretamente me ajudou em todos esses anos, incentivando e confiando. Obrigada pelo carinho e parceria! “Por toda minha vida”.

A todos que fizeram e/ou ainda fazem parte da minha vida que de um jeito ou de outro, me motivaram pra seguir em frente.

*"A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável."*

*(Galileu Galilei)*

*Dedico este trabalho a toda minha família e amigos que lutam diariamente ao meu lado, com alegria e amor incondicional, tornando os meus dias mais felizes. Em especial aos meus pais, minha irmã, minha Tia Augusta, minhas primas Emelyne e Sabrina.*

1 **Marcadores moleculares no gene da leptina associados com características de carcaça**  
2 **em bovinos da raça Nelore**

3

4 **Polimorfismos associados com características de carcaça em Nelore**

5

6 **Danielly Beraldo Dos Santos Silva<sup>1</sup>; Bruno do Amaral Crispim<sup>1</sup>; Lara Endres da Silva<sup>1</sup>;**  
7 **Joyce de Oliveira Azambuja<sup>1</sup>; Leonardo de Oliveira Seno<sup>2</sup>; Alexéia Barufatti Grisolia<sup>1</sup>**

8

9 <sup>1</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, Universidade Federal da Grande Dourados,  
10 Dourados – MS, Brasil.

11 <sup>2</sup>Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados – MS,  
12 Brasil.

13

14 Dirigir correspondência a: Dr<sup>a</sup> Alexéia Barufatti Grisolia. Faculdade de Ciências Biológicas e  
15 Ambientais-FCBA, Universidade Federal da Grande Dourados-UFGD. Caixa postal: 533,  
16 CEP: 798049-70, Dourados/ Mato Grosso do Sul/ Brasil - Tel: (067) 34102223 - E-mail:  
17 alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

18

19 **RESUMO**

20 O objetivo foi caracterizar a diversidade genotípica do gene da leptina por meio do SNP311,  
21 SNP1457 e microssatélite BM1500, e posteriormente associar os marcadores às  
22 características fenotípicas em bovinos machos da raça Nelore. As medidas de peso corporal e  
23 ultrassonográficas foram realizadas em três períodos de manejo dos animais: 1 (pasto e sal  
24 mineral *ad libitum*), 2 (pasto e concentrado: 16% de proteína bruta e 3,1 Mcal/ kg de matéria

25 seca); 3 (confinamento: 15% de proteína bruta e 2,7 Mcal/ kg de matéria seca). Após os  
26 animais atingirem o peso corporal equivalente a 16 arrobas, estes foram enviados para o abate  
27 em um frigorífico comercial onde foram coletadas informações para a classificação e  
28 tipificação da carcaça. Também foram coletadas amostras de tecido sanguíneo para as análises  
29 moleculares. As amostras foram genotipadas por meio PCR-RFLP e marcador microssatélite.  
30 As análises populacionais e estatísticas foram realizadas nos programas Cervus 3.0 e SAS 9.2,  
31 respectivamente. No SNP1457 foram identificados 54% dos animais com genótipo GG, 41%  
32 AG e 5% AA, sendo que o alelo G foi o mais frequente (74,5%). Para o SNP311 foram  
33 identificados 30% dos animais como sendo CT e 70% TT, sendo o alelo T encontrado em  
34 maior frequência (85%). Para o BM1500 foram encontrados três alelos: 138bp, 147bp e  
35 149bp, sendo o último mais abundante. O SNP1457 não indicou associação entre as  
36 características fenotípicas analisadas, entretanto, os alelos produzidos pelo SNP311 foram  
37 associados com a espessura de gordura na garupa e coloração do músculo. Do mesmo modo,  
38 BM1500 foi associado com o peso, espessura de gordura subcutânea, espessura de gordura da  
39 garupa e comprimento de carcaça. A pesquisa demonstrou a eficiência dos marcadores para  
40 caracterização genética do rebanho estudado e também pôde indicar que o SNP311 e o  
41 microssatélite BM1500 são associados às características fenotípicas economicamente  
42 importantes.

43 **Palavras-chave:** PCR-RFLP, microssatélite, características produtivas, bovino de corte

44

45

## INTRODUÇÃO

46 No cenário atual, os bovinos representam a atividade pecuária de destaque no Brasil,  
47 com cerca de 1.097.310 toneladas de carne exportadas de Janeiro a Dezembro de  
48 2011(ABIEC, 2012). O País possui o maior rebanho bovino comercial do mundo, cerca de



49 209 milhões de cabeças segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), com  
50 80% constituído por animais de zebuínos (*Bos taurus indicus*), sendo que 90% desta parcela  
51 são animais Nelores com comprovada rusticidade e adaptabilidade ao ambiente predominante  
52 no Brasil (ABIEC, 2012; ACNB, 2012).

53 A pecuária nacional nas últimas décadas apresenta grandes taxas de crescimento, em  
54 termos de produção, exportação e consumo, entretanto, um dos principais problemas da  
55 indústria de carne bovina do Brasil é a falta de uniformidade em idade de abate, cobertura de  
56 gordura e marmorização da carne (BARBOSA et al., 2010). A combinação de fatores  
57 genéticos e de manejo adequado pode permitir ao País produzir carnes diferenciadas (ABCZ,  
58 2012), mas para que isso ocorra é necessário investimentos em pesquisas que visem aumentar  
59 não só a produtividade como a qualidade de carne do setor pecuário de forma sustentável.

60 O melhoramento genético clássico na pecuária de corte é uma das alternativas para  
61 aumentar a qualidade dos rebanhos (SILVA, 2008), a técnica de obtenção de imagens por  
62 meio de ultrassonografia possibilitou a obtenção de dados fenotípicos (espessura de gordura  
63 subcutânea e área de olho de lombo) sem a necessidade de abate dos animais. Esse tipo de  
64 mensuração permitiu economia no processo produtivo (PRADO et al., 2004).

65 Com os avanços tecnológicos em relação ao DNA, a avaliação fenotípica passou a  
66 contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais e segundo Passos (2006), esses  
67 avanços nas tecnologias do DNA proporcionaram a criação de ferramentas biotecnológicas  
68 que estão sendo utilizadas para auxiliar a seleção animal, oferecendo nova estratégia para a  
69 melhoria da produtividade e da qualidade dos rebanhos.

70 Um das tecnologias utilizadas são os marcadores moleculares em que são baseados  
71 em análises de polimorfismos, constituem ferramentas importantes tanto para identificação,  
72 quanto associação com características de relevância econômica em animais de interesse

73 zootécnico. Dentre os vários tipos de marcadores, dois têm tido ampla utilização, os  
74 microssatélites ou STRs (Short Tandem Repeats) e os SNPs (Single Nucleotide  
75 Polymorphisms), devido ao alto conteúdo de informações polimórficas e distribuição  
76 abundante no genoma (CAETANO, 2009).

77 No caso de bovinos, tais polimorfismos podem estar localizados em genes estruturais  
78 responsáveis por manifestações de características produtivas e assim, permitirem a seleção  
79 precoce, obtendo-se raças com maior produção e melhor qualidade. Dentre os genes ligados  
80 às características produtivas destaca-se o gene da leptina, que vem sendo amplamente  
81 estudado desde sua caracterização e clonagem em ratos e humanos realizadas por Zhang et al  
82 (1994).

83 O gene da leptina apresenta 3 éxons e 2 introns, em bovinos, está localizado no  
84 cromossomo 4 (4q32) e é composto de 16.735 kb (TANIGUCHI et al., 2002). Esse gene, ao  
85 ser transcrito e traduzido, produz como produto o hormônio denominado leptina (proteína de  
86 167 aminoácidos), o qual em ação autócrina exerce efeito inibitório sobre a captação de  
87 glicose estimulada pela insulina, reduz a lipogênese e estimula a lipólise no tecido adiposo  
88 (CEDDIA et al.,1998).

89 Os polimorfismos de base única existentes neste gene e em seus receptores têm sido  
90 associados às características de carcaça e à concentração sérica da leptina em diferentes  
91 espécies, principalmente em bovinos (DELAVAUD et al., 2000; LIEFERS et al., 2002,  
92 LAGONIGRO et al., 2003, NKRUMAH et al., 2005). Também, pesquisas com diversidade  
93 alélica demonstrada em marcador nuclear de microssatélite BM1500 têm indicado associação  
94 à deposição de gordura em gado de corte (FITZSIMMONS et al., 1998; MONTOYA et al.,  
95 2009).

96 O uso de técnicas da biologia molecular para a identificação e associação de  
97 polimorfismos no gene da leptina com características fenotípicas em rebanho Nelore, é  
98 necessário em decorrência de sua importância na bovinocultura de corte brasileira, em que a  
99 raça, leva a geração de economia em muitos municípios do Brasil onde a pecuária ainda é a  
100 maior renda da região.

101 As técnicas moleculares aliadas às técnicas do melhoramento clássico podem  
102 possibilitar novas estratégias para melhoramento genético animal, colaborando para uma  
103 pecuária mais eficiente e sustentável (ABIEC, 2012). Sendo assim, o objetivo deste trabalho  
104 foi avaliar a diversidade genética no gene da leptina por meio de marcadores moleculares e  
105 associá-los a características de carcaça em bovinos Nelore.

106

107

## MATERIAL E MÉTODOS

### 108 **Animais**

109 Os bovinos (100 animais machos não castrados da raça Nelore) utilizados na pesquisa  
110 foram provenientes da Fazenda São Jorge do Maracay, localizada no município de Iguatemi,  
111 MS-Brasil. A recria e a terminação dos animais foram realizadas em três períodos. No  
112 primeiro (1), os animais foram mantidos em pastagem de baixa qualidade (*Brachiaria sp*),  
113 com sal mineral *ad libitum*, até completarem 20 meses de idade. No segundo (2), os animais  
114 permaneceram até os 22 meses em pastagem de *Brachiaria sp* e receberam concentrado (16%  
115 de proteína bruta e 3,1 Mcal/ kg de matéria seca). No terceiro período (3) os animais foram  
116 terminados em confinamento (15% de proteína bruta e 2,7 Mcal/ kg de matéria seca), em que  
117 apresentavam média de 24 meses de idade ao abate. As pesagens, colheitas de sangue e as  
118 medidas ultrassonográficas dos animais foram realizadas nos três períodos.

119

## 120 **Avaliação ultrassonográfica e do desenvolvimento ponderal**

121 Em cada período de coleta, os animais foram submetidos a um período de jejum de 12  
122 horas. O ganho médio diário (GMD) entre os períodos de coleta também foram registrados  
123 (GMD 1/2 e GMD 2/3). As mensurações de carcaça foram obtidas por ultrassom em tempo  
124 real com sonda linear de 17,8 cm e um acoplador acústico. As imagens da área de olho de  
125 lombo (AOL) e espessura de gordura subcutânea (EGS) foram mensuradas transversalmente  
126 sobre o músculo *Longissimus dorsi* na região entre a 12<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costelas. Também foi  
127 mensurada a espessura de gordura subcutânea na garupa (EGSp8), medida na extremidade do  
128 *Biceps femoris* sobre o *Gluteus medius*.

129 Após os animais atingirem o peso corporal aproximado de 16 arrobas, estes foram  
130 enviados para o abate em um frigorífico comercial. Após jejum de 24 horas os animais foram  
131 abatidos de acordo com o artigo nº 110 do RIISPOA - Regulamento de Inspeção Industrial e  
132 Sanitária de Produtos de Origem Animal (Brasil 1968).

133 Vinte e quatro horas após o abate foram coletadas informações frigoríficas das  
134 características de carcaça. Para tanto, foram mensurados na carcaça: pH, maturidade  
135 fisiológica, comprimento, conformação e distribuição da gordura, de acordo com Gomide et  
136 al. (2006). Após as mensurações, as carcaças foram seccionadas nos cortes primários  
137 dianteiro, traseiro especial, entre a 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> costelas. Em seguida foi retirada a ponta de agulha  
138 para a obtenção do traseiro especial (GOMIDE et al. 2006).

139 As medidas de cor, textura, área de olho de lombo (AOL C), espessura de gordura  
140 subcutânea (EGS C) e marmoreio (MAR C) foram realizadas entre a 5<sup>a</sup> e a 6<sup>a</sup> costela. Nesta  
141 região também foi avaliada a colorimetria na carne e gordura (OLIVEIRA et al., 2012).

142

## 143 **Extração de DNA**

144 A extração de DNA foi realizada a partir de 300 µL do sangue total utilizando a  
145 metodologia adaptada de Sambrook et al. (1998). A quantidade e qualidade do DNA  
146 genômico foram determinadas por densidade óptica em espectrofotômetro.

147

#### 148 **Genotipagem do gene da leptina**

149 Os animais foram genotipados para os polimorfismos SNP1457 e SNP311 e um  
150 marcador microssatélite BM1500 existente no gene da leptina e que demonstraram ter  
151 associação com características de relevância econômica em bovinos (FIZSIMMONS et al.,  
152 1998; HEAGEMAN et al., 2002; LIEFERS et al., 2005).

153

#### 154 ***PCR-RFLP nos SNP1457e SNP311***

155 O SNP1457 presente na região promotora do gene da leptina em bovinos  
156 (GenBank: DM077312.1) foi descrito previamente por Liefers et al. (2005), esse  
157 polimorfismo envolve a substituição A por G. Para a amplificação do fragmento de 293 pb,  
158 utilizou-se os oligonucleotídeos iniciadores: LA-F: 5'gtcgtagtgatgctactgcctctat3' e LA-R:  
159 5'tggctaagactccctgcttccaaa3'. O SNP311 presente no exon 2 do gene da leptina em bovinos  
160 (GenBank: NW003103904.1) foi descrito por Heageman et al. (2002), esse polimorfismo  
161 envolve a substituição C por T. Para a amplificação do fragmento de 458 pb utilizou-se os  
162 oligonucleotídeos iniciadores: LH-F: 5'gggaagggcagaaagatag3' e LH-R: 5'  
163 ccaagctctccaagctctc3'.

164 As reações de PCR-RFLP (Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length  
165 Polymorphism) foram realizadas em termociclador. As soluções de amplificação foram  
166 preparadas em volume final de 25µL, constituídos por 12,5µL de PCR Master MIX, 2µL de  
167 cada oligonucleotídeo iniciador (10pmoles) e 2µL DNA genômico (10 a 20ng).

168 O programa utilizado para amplificação do fragmento (SNP1457) foi: desnaturação  
169 inicial de 94°C por 5', 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 40'', pareamento a 56°C por 45''  
170 e extensão a 72°C por 1', seguido da extensão final a 72°C por 5'. Os fragmentos  
171 amplificados foram digeridos em uma reação contendo 5µL do produto de PCR, tampão  
172 enzima [1X]; 5U de enzima *AluI*, obtendo-se solução final de 12µL. O programa utilizado  
173 para amplificação do fragmento (SNP311) foi o descrito por Öztapak et al (2010) com  
174 desnaturação inicial de 94°C por 2', 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30'', pareamento a  
175 57°C por 1' e extensão a 72°C por 30'', seguido da extensão final a 72°C por 15'. Os  
176 fragmentos amplificados foram digeridos em uma reação contendo 7µL do produto de PCR,  
177 tampão enzima [1X]; 2,5U de enzima *HphI*, obtendo-se solução final de 15 µL. As reações de  
178 digestão enzimática, para ambos os marcadores, foram incubadas em termociclador à 37°C  
179 por 4 horas. Os fragmentos gerados foram analisados em gel de agarose 1,5%.

180

### 181 ***Microsatélite BM1500***

182 O microsatélite BM1500 localiza-se próximo ao gene da leptina localizado à 3.9kb  
183 *downstream* (GenBank: G18586). Para a amplificação do microsatélite BM1500, foram  
184 utilizados os iniciadores BM-F: 5'gatgcagcagaccaagtgg3', e BM-R: 5'cccattgctagaaccagg3'.  
185 O volume final da reação foi de 25µL, constituído por 12,5µL de PCR Master MIX  
186 (Promega®, USA), 1,5µL de cada oligonucleotídeo iniciador (10 pmol/µL) e 2µL de DNA  
187 genômico (10 a 20ng). O programa utilizado para a amplificação foi: desnaturação inicial de  
188 94°C por 3'; 25 ciclos de desnaturação a 94°C por 45'', pareamento a 57°C por 30'' e  
189 extensão a 72°C por 45''; concluindo o programa com 4° por 4' (FITZSIMMONS et al.,  
190 1998). Os alelos foram separados por eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida a 7%  
191 corado com nitrato de prata.

## 192 **Análise populacional e estatística**

193 As análises populacionais de frequência gênica, genotípica, teste de equilíbrio de  
194 Hardy-Weinberg (HWE), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) e  
195 conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram calculadas com o auxílio do software  
196 CERVUS 3.0 (KALINOWSKI et al., 2007).

197 As análises estatísticas foram efetuadas com auxílio do pacote computacional SAS 9.2  
198 (SAS Institute 2000). Todas as características foram submetidas aos testes de Shapiro-Wilk,  
199 para verificar a normalidade dos resíduos, e de Bartlett, para homogeneidade entre as  
200 variâncias. As características de peso e ganho, que atenderam as pressuposições (normalidade  
201 e homogeneidade), foram submetidas à análise de regressão para o SNP1457 e BM1500, e  
202 análise de variância para o SNP311.

203 As medidas ultrassonográficas de características de carcaça, por não terem atendido as  
204 pressuposições, foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para os  
205 marcadores SNP1457 e BM1500, e Chi-Quadrado para o SNP311. Para tanto, essas  
206 características foram dicotomizadas pelos valores de suas respectivas medianas. Quando as  
207 frequências observadas e esperadas em uma das caselas da tabela de contigência foi menor ou  
208 igual a 5 para o SNP311, adotou-se o teste de Fisher.

209

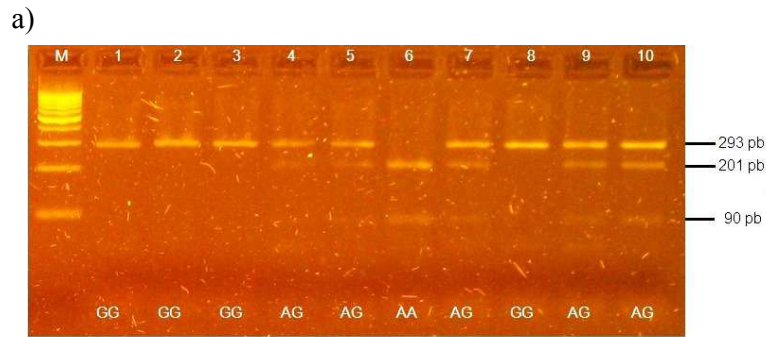
## 210 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

211 A quantidade média de DNA e razão média de 260/280nm obtidas por meio de  
212 espectrofotometria foram de 43,53 ng/ $\mu$ L e 1,62, respectivamente. Os DNAs obtidos tiveram  
213 concentrações e pureza satisfatórias para utilização na PCR.

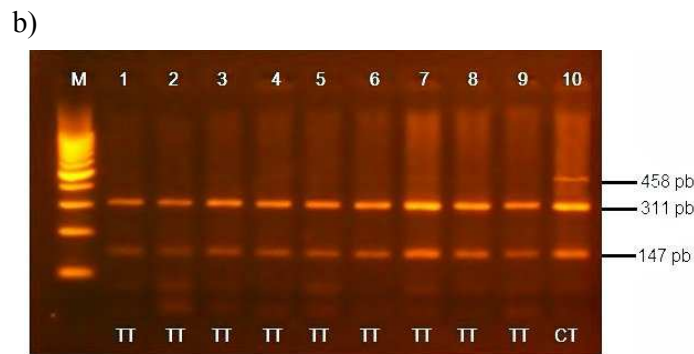
214 Dentre os animais genotipados pelo marcador SNP1457 foi possível distinguir 5  
215 indivíduos homozigotos (AA), 54 heterozigotos (AG) e 41 homozigotos (GG). Para o

216 SNP311, foram encontrados 30 animais heterozigotos (CT) e 70 homozigotos (TT) (Figura 1).  
 217 Por meio do marcador BM1500, foi possível obter 6 genótipos diferentes, no qual o mais  
 218 frequente foi o homozigoto 149/149pb encontrado em 70 animais (Figura 2) e o menos  
 219 frequente foi o 138/138pb encontrado em apenas 2 animais.

220



226



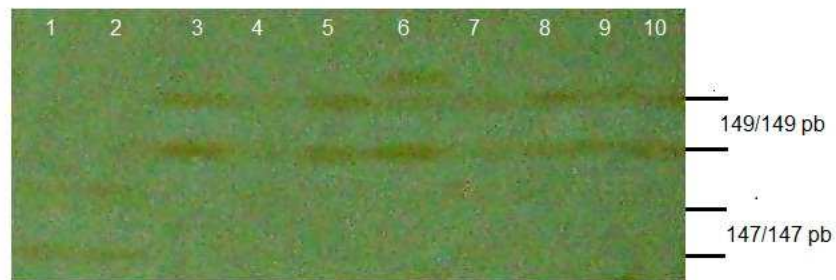
234

**Figura 1** - Eletroforese em gel de agarose 1,5% dos fragmentos da PCR-RFLP produzidos pela enzima *AluI* e *HphI* no gene da leptina. A) M = marcador molecular de 100 pb. Colunas 1, 2, 3 = genótipo GG (293 pb). Colunas 4, 5, 7 = genótipo AG (293, 201 e 92 pb). Coluna 6 = genótipo AA (201 e 92 pb). B) M = marcador molecular de 100pb. Colunas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 = genótipo TT (311 e 147pb). Coluna 10 = genótipo CT (458, 311, 147pb).

238

239

240



246

**Figura 2** - Eletroforese em gel desenaturante de poliacrilamida 7% dos fragmentos da PCR produzidos pelo microsatélite BM1500. Colunas 1 e 2 = genótipo 147/147 pb. Colunas 3 a 10 = genótipo 149/149 pb.

247



248

## 249 **Análise Populacional**

250

251 As estimativas das frequências genotípicas, gênicas, heterozigidade observada e  
252 esperada, e conteúdo de informação polimórfica para os polimorfismos estudados foram  
253 apresentados na Tabela 1.

**Tabela 1-** Análise populacional por meio de marcadores moleculares no gene da leptina

Polimorfismo	Frequência Genotípica	Frequência Alélica	Ho	He	PIC
SNP1457	AA = 0,05 AG = 0,54 GG = 0,41	A = 0,255 G = 0,745	0,41	0,38	0,30
SNP311	CC = 0,00 CT = 0,30 TT = 0,70	C = 0,150 T = 0,850	0,30	0,25	0,22
BM1500	138/138 = 0,02 147/147 = 0,08 149/149 = 0,70 138/147 = 0,055 138/149 = 0,065 147/149 = 0,08	138 = 0,075 147 = 0,150 149 = 0,775	0,20	0,37	0,33

Heterozigidade Observada (Ho); Heterozigidade Esperada (He); Conteúdo de informação polimórfica (PIC).

254

255 Considerando o SNP1457, o genótipo AG foi encontrado em mais da metade da  
256 população e o alelo mais frequente (G), conforme visto na Tabela 1, não foi mais frequente no  
257 trabalho de Silva (2008), que estudou o referido SNP e demonstrou associação significativa  
258 com espessura de gordura subcutânea em animais da raça Nelore. Para o SNP311, o genótipo  
259 TT foi o mais frequente e o CC não foi encontrado nesse rebanho. O alelo mais frequente (T),  
260 também foi o mais frequente no trabalho de Öztabak et al. (2010), que estudou o referido SNP  
261 em raças nativas turcas, dentre elas Turkish Grey (*Bos taurus*).

262 Para o microssatélite BM1500 foi possível observar que o genótipo mais abundante foi  
263 o 149/149pb e o menos foi o 138/138pb. O alelo 149pb foi o mais frequente na população.  
264 Fitzsimmons et al., (1998), ao estudar o mesmo microssatélite em quatro raças de *Bos taurus*,

265 encontraram a maior frequência genotípica (0,47) para o alelo 138pb. A diferença encontrada  
266 no estudo relatado e os observados neste trabalho para o BM1500 pode ser explicada pelo fato  
267 de Fitzsimmons et al. (1998) ter genotipado animais de origem taurina, enquanto no presente  
268 estudo os animais genotipados foram Nelore (*Bos indicus*).

269 Os loci estudados foram considerados polimórficos segundo a classificação de  
270 Menezes et al., 2006, o qual considera um locus polimórfico quando o alelo mais comum tem  
271 frequência inferior a 0,95. Os marcadores utilizados para os sítios polimórficos apresentaram  
272 níveis reduzidos de heterozigidade observada, revelando perda de variabilidade genética, ou  
273 seja, o aumento da homozigose.

274 De acordo com o teste de Chi-Quadrado o rebanho estudado não se encontrava em  
275 Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) para nenhum dos polimorfismos. Esse fato pode ser  
276 consequência da seleção artificial que ocorreu no ambiente de criação dos animais, ou seja, as  
277 frequências gênicas e genotípicas de cada geração foram controladas para melhorar a  
278 produtividade do rebanho.

279 O Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC), descrito por Botstein et al. (1980), é um  
280 indicador da qualidade do marcador em estudos genéticos e segundo a classificação,  
281 marcadores com valores de PIC superiores a 0,5 são considerados muito informativos, com  
282 valores entre 0,25 e 0,50 medianamente informativos, e com valores inferiores a 0,25, pouco  
283 informativos. Os valores de PIC encontrados para o SNP1457 e BM1500 (Tabela 1)  
284 indicaram que os marcadores foram considerados medianamente informativos, entretanto, o  
285 valor de PIC encontrado para o SNP311 foi considerado pouco informativo.

286 Os animais estudados faziam parte de um rebanho comercial que passou por um  
287 programa de melhoramento e conseqüentemente sofreu seleção artificial. A baixa  
288 variabilidade genética na população analisada poderia ser ainda mais reduzida em função das

289 possíveis perdas e fixação de alelos. Tais alterações na variabilidade poderiam ocorrer em  
290 virtude do método de seleção empregado.

### 291 **Análise de associação**

292 Os resultados das análises de variâncias e de regressão linear simples, para a  
293 verificação das associações dos marcadores e as características de peso nos três períodos (P1,  
294 P2, P3) e de ganho médio diário de peso entre os períodos 1/2 e 2/3 (GMD 1/2 e GMD 2/3),  
295 encontram-se apresentados nas Tabelas 2 e 3, respectivamente.

296 Na Tabela 2, foi possível observar que não houve associação significativa entre o  
297 desenvolvimento ponderal dos animais e o SNP311, do mesmo modo o SNP1457 também não  
298 foi associado (Tabela 3). Esses polimorfismos não influenciam diretamente no peso dos  
299 animais, mas podem estar ligados a características de produção e/ou fertilidade (primeira  
300 atividade luteal pós-parto e peso durante a lactação) em outras raças, como relatado nos  
301 trabalhos de Liefers et al. (2005) e de Öztabak et al. (2010).

302 Nota-se, pela Tabela 3, que foi verificada a associação entre o marcador BM1500  
303 ( $p < 0,05$ ) e o peso no terceiro período de tratamento alimentar. Montoya et al. (2009) ao  
304 estudar o mesmo microssatélite, também encontraram associação significativa com o peso  
305 corporal de raças bovinas crioulas colombianas.

306 Os animais possivelmente expressaram ganho compensatório de peso, devido a  
307 alteração de regime alimentar a que foram submetidos, ou seja, de pasto para regime  
308 combinado de pasto e suplementação. As características dos animais e as taxas de crescimento  
309 e de maturação determinam o peso e a idade do animal ao abate. Além do genótipo, estas  
310 taxas são influenciadas pelo ambiente de produção, em que o fenótipo dos indivíduos é o  
311 resultado de seu genótipo, manifestado segundo o ambiente que este indivíduo está exposto  
312 (CORRÊIA et al., 2007), ou seja, um mesmo genótipo em diferentes sistemas de produção

313 geram produtos diferenciados e animais com pesos e idades de abate muito distintos. A  
 314 precocidade, ou a taxa com que o animal se aproxima do seu peso adulto ou peso de abate é  
 315 muito sensível às alterações do ambiente, notadamente à nutrição (SANTOS et al., 2002).

316 Nesse sentido, provavelmente no terceiro período de manejo dos animais, os mesmos  
 317 tenham atingido a maturidade fisiológica. Neste caso, o ambiente poderia ter efeito  
 318 significativo em relação ao genótipo, considerando-se que no terceiro período os animais  
 319 estavam sob condições alimentares controladas.

320

**TABELA 2** - Médias ajustadas para o peso e o ganho médio diário em peso e associação com o SNP311 em bovinos Nelore

Características	Marcador/ Genótipo				p value
	SNP311				
	TT		CT		
	$\mu$	EP	$\mu$	EP	
P1 (kg) <sup>(1)</sup>	397,35	3,11	402,77	2,77	0,43
P2 (kg) <sup>(2)</sup>	412,21	3,11	414,76	3,40	0,72
P3 (kg) <sup>(3)</sup>	475,37	3,62	472,16	3,87	0,70
GMD1/2 (g) <sup>(4)</sup>	0,30	0,02	0,24	0,02	0,45
GMD2/3 (g) <sup>(5)</sup>	1,50	0,04	1,37	0,05	0,24

<sup>(1)</sup> $\hat{Y}$  = 400,06; <sup>(2)</sup> $\hat{Y}$  = 413,48; <sup>(3)</sup> $\hat{Y}$  = 473,76; <sup>(4)</sup> $\hat{Y}$  = 0,27; <sup>(5)</sup> $\hat{Y}$  = 1,43. P= Peso; GMD= Ganho Médio Diário.

321

322

**TABELA 3** – Médias ajustadas para o peso e o ganho médio diário em peso e associação com o microssatélite BM1500 e SNP1457 em bovinos Nelore

Características	Marcador/Genótipos						CV (%)	P value
	B1500							
	138/138	147/147	149/149	138/147	138/149	147/149		
P1 (kg) <sup>1</sup>	408,01	417,60	398,58	384,00	395,38	390,88	7,52	0,12
P2 (kg) <sup>2</sup>	439,15	430,48	412,70	400,01	401,50	406,42	7,60	0,06
P3 (kg) <sup>3</sup>	491,24	491,07	476,37	456,20	456,64	460,20	7,60	0,02
GMD1/2 (g) <sup>4</sup>	0,63	0,26	0,28	0,32	0,12	0,31	122,83	0,50
GMD2/3 (g) <sup>5</sup>	1,24	1,44	1,51	1,34	1,32	1,30	33,09	0,34
	SNP1457							
	AA	AG	GG					
P1 (kg) <sup>6</sup>	399,82	393,18	403,10				7,56	0,21
P2 (kg) <sup>7</sup>	426,93	408,72	414,82				7,73	0,86
P3 (kg) <sup>8</sup>	498,65	466,61	478,33				7,78	0,70
GMD1/2 (g) <sup>9</sup>	0,55	0,31	0,23				120,88	0,06
GMD2/3 (g) <sup>10</sup>	1,69	1,37	1,50				33,22	0,67

<sup>(1)</sup> $\hat{Y} = 399,07$ ; <sup>(2)</sup> $\hat{Y} = 415,04$ ; <sup>(3)</sup> $\hat{Y} = 500,48065 - 7,96185X$ ,  $R^2=0,0483$ ; <sup>(4)</sup> $\hat{Y} = 0,32$ ; <sup>(5)</sup> $\hat{Y} = 1,35$ ; <sup>(6)</sup> $\hat{Y} = 398,7$ ; <sup>(7)</sup> $\hat{Y} = 416,82$ ; <sup>(8)</sup> $\hat{Y} = 481,19$ ; <sup>(9)</sup> $\hat{Y} = 0,36$ ; <sup>(10)</sup> $\hat{Y} = 1,52$ . P= Peso; GMD= Ganho Médio Diário.

324

325 As médias, erros-padrão, mediana e o número de indivíduos para as medidas  
326 ultrassonográficas de características de carcaça foram apresentadas nas Tabelas 4 e 5. As  
327 características de carcaça não foram associadas significativamente ( $p>0,05$ ) com o SNP1457.

328 Essa falta de associação, nesta população de animais, demonstra que o marcador não  
329 teve potencial sobre as variantes investigadas. Em outros trabalhos com animais de origem  
330 taurinas (GIBLIN et al., 2010; LIEFERS et al., 2005), esse marcador, demonstrou alta  
331 potencialidade para estudos de associação com características de fertilidade.

332 Por meio do teste Chi-quadrado para o SNP311 foram verificadas associações  
333 significativas ( $p<0,05$ ) com três características: espessura de gordura na garupa; cor do  
334 músculo na intensidade de vermelho (a\*) e cor do músculo (b\*) conforme observado na  
335 Tabela 5.

336 A EGS mensurada sobre o músculo *Longissimus dorsi* é eficiente indicador de  
337 acabamento da carcaça, sendo inversamente correlacionada com a porcentagem de cortes

338 comerciais (SILVA et al., 2004). A gordura de cobertura é um importante fator de qualidade,  
339 pois protege a carcaça durante o resfriamento. Em relação ao SNP311, o genótipo CT  
340 possivelmente determinou uma carne mais dura e menos suculenta, devido à menor deposição  
341 de gordura, enquanto o genótipo TT esteve associado à maior deposição de gordura (Tabela  
342 4).

343 Em condições normais de conservação, a cor é o principal atrativo dos alimentos. A  
344 cor da carne reflete a quantidade e o estado químico do seu principal pigmento, a mioglobina  
345 (Mb) (FELÍCIO, 1999). A coloração vermelha mais intensa pode significar maior  
346 concentração de mioglobina, e também está associada à idade dos animais. Embora os valores  
347 de cor do músculo na intensidade vermelha tenha sido maior para o genótipo TT que em CT,  
348 como visto na tabela 5, os valores observados para coloração no presente estudo está dentro  
349 de uma faixa de normalidade no que se refere à intensidade de vermelho para a carne bovina.  
350 As diferenças observadas em relação aos genótipos não são perceptíveis pelo consumidor.

351 Com o auxílio do teste Kruskal-Wallis, para o BM1500, foram verificadas associações  
352 significativas ( $p < 0,05$ ) (Tabelas 4 e 5) entre o marcador BM1500 e as seguintes  
353 características: espessura de gordura subcutânea no segundo período; espessura de gordura na  
354 garoupa no primeiro período (pré abate); e comprimento de carcaça (pós abate) conforme  
355 demonstrado na Figura 3.

356  
 357  
 358  
 359  
 360  
 361  
 362  
 363  
 364  
 365  
 366  
 367  
 368  
 369  
 370  
 371  
 372  
 373  
 374  
 375  
 376  
 377

**Tabela 4** - Média ( $\mu$ ), erro-padrão (EP), mediana e número de indivíduos para as características analisadas na população de gado pré-abate

Características	$\mu$	EP	Mediana	Marcador/ Genótipo											
				SNP1457			SNP311			BM1500 <sup>1</sup>					
				AA	AG	AG	CT	TT	138/138	138/147	138/149	147/147	147/149	149/149	
AOL 1	59,46	0,52	60.08	<	26	19	5	16	34	2	3	39	3	0	3
				$\geq$	27	22	0	11	38	0	5	32	2	6	4
AOL 2	62,09	0,50	62.22	<	26	20	4	11	39	2	3	37	3	1	4
				$\geq$	27	27	1	16	33	0	5	34	2	5	3
AOL 3	68,99	0,60	68.55	<	28	17	4	16	33	2	6	33	2	3	3
				$\geq$	25	24	1	11	39	0	2	38	3	3	4
EGS 1	2,29	0,05	2.3	<	9	11	1	5	16	1	0	17	2	1	0
				$\geq$	44	30	4	22	56	1	8	54	3	5	7
EGS 2 <sup>1</sup>	2,58	0,04	2.3	<	2	3	0	1	4	1	0	2	1	1	0
				$\geq$	51	38	5	26	68	1	8	69	4	5	7
EGS 3	3,01	0,05	3.0	<	15	9	0	5	16	1	1	18	0	3	1
				$\geq$	38	32	5	22	53	1	7	53	5	3	6
EGSp8 1 <sup>2</sup>	2,79	0,06	3,0	<	26	19	3	9	39	2	0	36	3	4	3
				$\geq$	27	22	2	18	33	0	8	35	2	2	4
EGSp8 2	2,97	0,06	3,0	<	15	14	1	3	27	2	1	19	3	3	2
				$\geq$	38	27	4	24	45	0	7	52	2	3	5
EGSp8 3	3,42	0,06	3,3	<	24	22	4	12	38	1	4	36	2	5	2
				$\geq$	29	19	1	15	34	1	4	35	3	1	5

<sup>a</sup>AOL 1, 2, 3= medida ultrassonográfica de área de olho de lombo nos três períodos; EGS 1, 2, 3 = medida ultrassonográfica de espessura de gordura nos três períodos; EGSp8 1,2,3=medida ultrassonográfica de espessura de gordura na garupa nos três períodos.

<sup>1</sup>associação entre EGS 2 e BM1500; <sup>2</sup>associação entre EGSp8 1 e BM1500.

378

379

380

381

**Tabela 5** Médias ( $\mu$ ), erros-padrão (EP), medianas e número de indivíduos para as características analisadas na população de gado pós-abate

382

383

384

385

386

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

397

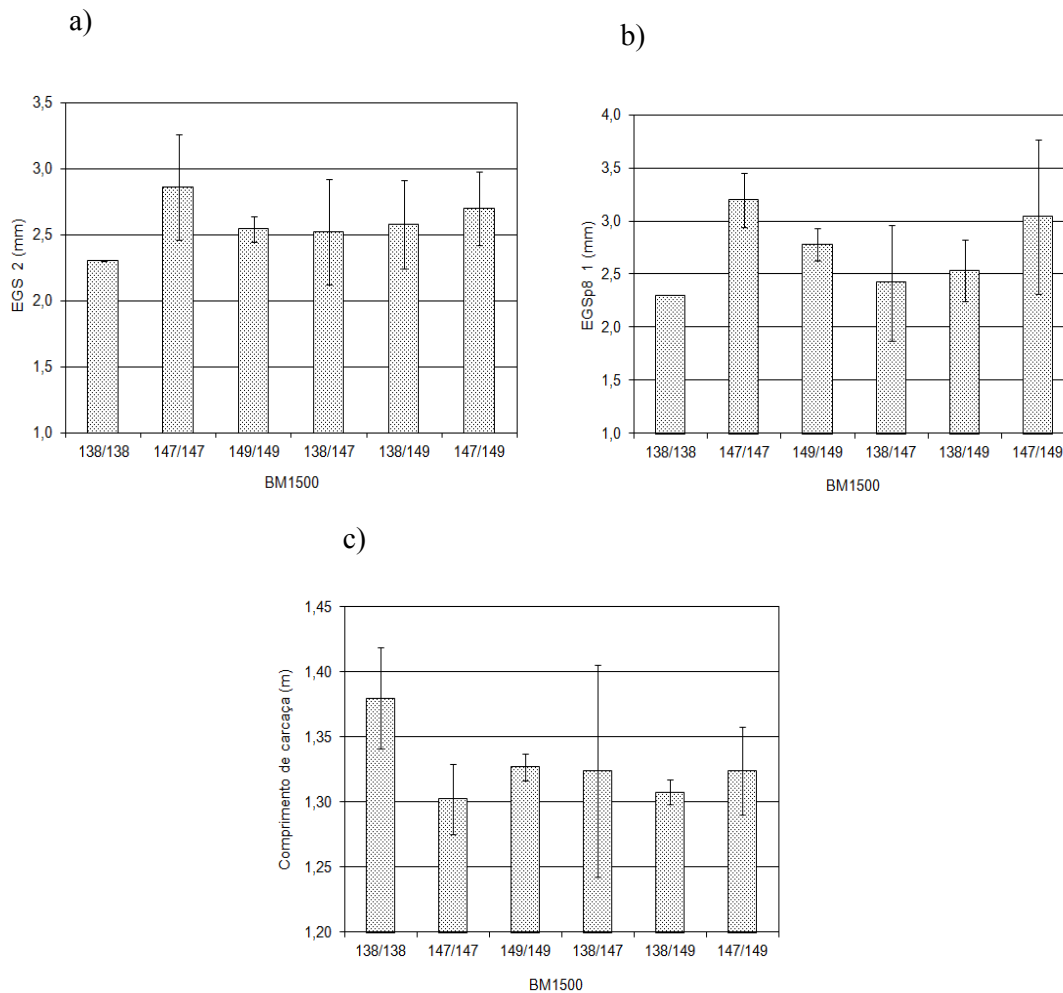
398

Características <sup>a</sup>	$\mu$	EP	Mediana	Marcador/ Genótipo											
				SNP1457			SNP311 <sup>1,3,4</sup>		BM1500 <sup>2</sup>						
				AA	AG	GG	CT	TT	138/138	138/147	138/149	147/147	147/149	149/149	
Maturidade fisiológica	13,62	0,04	13,0	< 1	3	0	1	3	0	1	2	0	0	1	
				≥ 52	38	5	26	69	2	7	69	5	6	6	
Cor	4,32	0,05	4,0	< 4	7	0	2	9	1	2	5	0	1	2	
				≥ 49	34	5	25	63	1	6	66	5	5	5	
Textura	3,88	0,05	4,0	< 21	15	1	13	24	1	4	27	2	2	1	
				≥ 32	26	4	14	48	1	4	44	3	4	6	
AOL C	28,89	0,37	28,85	< 30	22	2	16	380	0	3	41	4	2	4	
				≥ 23	19	3	11	34	2	5	30	1	4	3	
MAR C	4,81	0,25	4,0	< 19	15	3	10	27	0	5	26	1	3	2	
				≥ 34	26	2	17	45	2	3	45	4	3	5	
EGS C <sup>1</sup>	3,23	0,05	3,17	< 26	21	3	12	38	1	4	38	3	1	3	
				≥ 27	20	2	15	34	1	4	33	2	5	4	
Comprimento de carcaça <sup>2</sup>	1,32	0,004	1,33	< 31	26	2	16	43	0	7	38	3	6	5	
				≥ 22	15	3	11	29	2	1	33	2	0	2	
pH	5,81	0,007	5,82	< 27	21	2	14	36	1	4	37	3	1	4	
				≥ 26	20	3	13	36	1	4	3	2	5	3	
Conformação	6,26	0,12	6,0	< 21	15	2	7	31	1	4	23	3	3	4	
				≥ 32	26	3	20	41	1	4	48	2	3	3	
Distribuição de gordura	1,60	0,03	1,5	< 10	9	2	3	18	0	4	15	1	0	1	
				≥ 43	32	3	24	54	2	4	56	4	6	6	
Cor do músculo (a*) <sup>3</sup>	23,96	0,14	23,88	< 27	22	1	18	32	0	4	38	3	2	3	
				≥ 26	19	4	9	40	2	4	33	2	4	4	
Cor do músculo (b*) <sup>4</sup>	11,32	0,10	11,27	< 28	19	3	19	31	0	5	36	2	3	4	
				≥ 25	22	2	8	41	2	3	35	3	3	3	
Cor da gordura (a*)	11,03	0,29	10,35	< 24	25	1	15	35	0	2	39	2	4	3	
				≥ 29	16	4	12	37	2	6	32	3	2	4	
Cor da gordura (b*)	13,99	0,23	14,23	< 24	23	3	13	37	1	1	40	2	3	3	
				≥ 29	18	2	14	35	1	7	31	3	3	4	

<sup>a</sup>AOL C = área de olho de lombo na carne; MAR C = marmoreio na carne; EGS C = espessura de gordura na carne.

<sup>1</sup>associação entre EGS C e SNP311; <sup>2</sup>associação entre EGS C e BM1500; <sup>3</sup>associação entre Cor do músculo (a\*) e o SNP311; <sup>4</sup>associação entre associação Cor do músculo (b\*) e o SNP311.





401

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411 **Figura 3** – Associações significativas entre o microssatélite BM1500 e características fenotípicas em Nelore. a)

412 EGS = Espessura de gordura; b) EGS<sub>p8</sub> = Espessura de gordura subcutânea; c) Comprimento de carcaça.

413

414 Fitzsimmons et al. (1998) relataram que os alelos 138pb e 147pb obtidos pelo

415 marcador BM1500 foram associadas respectivamente com altos e baixos níveis de deposição

416 de gordura em gado de corte em animais das raças Angus, Charolês, Simental e Hereford.

417 Neste trabalho, para o BM1500 foram encontradas associações significativas ( $p < 0,05$ ) com

418 três características (Figura 3), reforçando a hipótese deste ser um bom marcador para

419 avaliação da qualidade de carne.

420 Conforme observado na Figura 3, são apresentados os intervalos de confiança com  
421 95% de probabilidade das estimativas das características em função dos genótipos. Com base  
422 nestas estimativas, foi possível observar na Figura 2 que para a característica EGS 2 existe  
423 uma grande sobreposição dos intervalos enquanto que somente o intervalo correspondente ao  
424 genótipo 138/138 pb não se sobrepõe aos intervalos de confiança dos genótipos 147/147 pb,  
425 149/149 pb e 147/149 pb.

426 Se tratando das características de EGSp8 1 o intervalo de confiança do genótipo  
427 138/138 pb foi significativo para os genótipos 147/147 pb, 149/149 pb e 147/149 pb. Também  
428 foi possível observar que o genótipo 147/147 pb foi significativo para o 138/149 pb e 147/149  
429 pb. Para a característica de Comprimento de Carcaça existe uma grande superposição dos  
430 intervalos enquanto que somente o intervalo correspondente ao genótipo 138/138 pb não se  
431 sobrepõe aos intervalos de confiança dos genótipos 147/147 pb e 138/149 pb.

432 As associações com a EGS, EGSp8 e comprimento de carcaça poderiam estar  
433 relacionadas ao fato que os alelos obtidos pelo BM1500 implicaria na diminuição da  
434 funcionalidade da leptina, proporcionando dessa forma maior acúmulo de gordura. Uma vez  
435 que a leptina é reguladora do balanço energético corporal, ao constatar baixos níveis de  
436 gordura armazenada, o organismo do animal tende diminuir a quantidade do hormônio,  
437 consequentemente não ocorre estimulação da lipólise no tecido adiposo, diminuindo o gasto  
438 de energia corporal e aumentando a quantidade de gordura e consequentemente o peso  
439 (BARSH et al., 2000).

440 Considerando-se que várias características fenotípicas foram avaliadas e apenas  
441 algumas indicaram associação pode-se dizer que o ambiente teve influencia na expressão dos  
442 genes dos animais em estudo, sendo que o fator nutricional também foi decisivo na aparência  
443 e conformação dos animais (MONTROYA et al., 2009). Entretanto, o gene da leptina tem alta  
444 influência no metabolismo, o que indica forte possibilidade de que polimorfismos nesse gene

445 estejam associados com outros traços economicamente importantes (efeito pleiotrópico).  
446 Portanto, pesquisas ainda deverão ser realizadas com outras raças bovinas para avaliação da  
447 qualidade de carcaças e características de desempenho para obter mais informações sobre  
448 estes marcadores e reduzir o risco de erro em programas de seleção.

449

450

## CONCLUSÃO

451 Os marcadores foram eficientes para caracterizar a população demonstrando que existe  
452 baixa variabilidade genética dentro da raça estudada. O SNP1457 não indicou associação  
453 entre as características fenotípicas analisadas. Os alelos identificados pelos marcadores  
454 SNP311 e BM1500 foram associados com o peso e características de tipificação da carcaça.  
455 Essas relações significativas entre os marcadores e as características produtivas indicaram que  
456 os mesmos são eficientes para estudos de associação com traços de produção.

457

458

## AGRADECIMENTOS

459 À Agropecuária Jorge Ferreira (Fazenda São Jorge do Maracay), ao frigorífico  
460 Minerva S/A e à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Gado de Corte.  
461 Também à Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) pelo apoio logístico e à  
462 Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato  
463 Grosso do Sul (FUNDECT-MS) pelo apoio financeiro.

464

465

## REFERÊNCIAS

466 ABCZ. Associação Brasileira dos Criadores de Zebu. Relação entre tamanho corporal e  
467 produtividade em bovinos zebuínos, 2012. Available from <http://www.abcz.org.br/artigos>

468

469 ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. Rebanho Bovino  
470 Brasileiro, 2012. Available from <http://www.abiec.com.br>

471

472 ACNB. Associação dos Criadores de Nelore do Brasil. Caracterização da Raça Nelore, 2012.  
473 Available from <http://www.nelore.org.br>  
474

475 Barsh, G. S., Farooqi, I. S., O'rahilly, S., 2000. Genetics of body-weight regulation. *Nature*,  
476 404: 644-651.  
477

478 Barbosa, V., Magnabosco, C. U., Trovo, J. B. F., Faria, C. U., Lopes, D. T., Viu, M. A. O.,  
479 Lobo, R. B., Mamede, M. M. S., 2010. Estudo genético quantitativo de características de  
480 Carcaça e perímetro escrotal, utilizando inferência Bayesiana em novilhos nelore. *Bioscience*  
481 *Journal*, 26(5): 789-797.  
482

483 Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M., Davis, R. W., 1980. Construction of a genetic  
484 linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *Am. J. Hum. Genet*, 32:  
485 314-331.  
486

487 Brasil. Ministério da Agricultura. Departamento de Defesa e Inspeção Agropecuária.  
488 Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal. São Paulo:  
489 Inspeção do SIPAMA, 1968.  
490

491 Caetano, A. R., 2009. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no  
492 melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec*, 38: 64-71.  
493

494 Ceddia, R. P., Willian Jr, W. N., Lima, F. B., Carpinelli, A. R., Curi, R., 1998. Pivotal role  
495 of leptin in insulin effects. *Braz J Med Biol Res*, 31: 715-22.  
496

497 Corrêa, M. B. B., Dionello, N. J. L., Cardoso, F. F., 2007. Efeito da interação genótipo-  
498 ambiente na avaliação genética de bovinos de corte. *R. Bras. Agrocência*, 13(2): 153-159.  
499

500 Delavaud, C., Bocquier, F., Chilliard, Y., Keisler, D. H., Gertler, A., 2000. Plasma leptin  
501 determination in ruminants: effect of nutritional status and body fatness on plasma leptin  
502 concentration assessed by a specific RIA in sheep. *J. Endocrinol*, 165: 519-526.  
503

504 Felício, P. E., 1999. Qualidade da carne bovina: características físicas e organolépticas. In:  
505 Reunião anual da sociedade brasileira de zootecnia, 36: 89-97 (abstr.).

506 Fitzsimmons, C. J., Schmutz, S. M., Bergen, R. D., Mckinnon J. J., 1998. A potential  
507 association between the BM 1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian*  
508 *Genome*, 9: 432-434.  
509

510 Giblin, L., Butler, S. T., Kearney, B. M., Waters, S. M., Callanan, M. J., Berry, D. P., 2010.  
511 Association of bovine leptin polymorphisms with energy output and energy storage traits in  
512 progeny tested Holstein-Friesian dairy cattle sires. *BMC Genetics*, 11: 73.  
513

514 Gomide, L. A. M.; Ramos, E. M.; Fontes, P. R., 2006. Tecnologia de abate e tipificação de  
515 carcaças. Ed. Universidade Federal de Viçosa, UFV, Brasil.  
516

517 Haegeman, A., Van Zaveren, A., Peelman L. J., 2002. New mutation in exon 2 of bovine  
518 leptin gene. *Anim Genet*, 31: 79.  
519

520 IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da Pecuária Municipal em  
521 2009. Available from <http://www.ibge.gov.br>  
522

523 Kalinowski, S. T., Taper, M. L., Marshall, T. C., 2007. Revising how the computer program  
524 CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment.  
525 *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.  
526

527

528 Lagonigro, R., Wiener, P., Pilla, F., Woolliams, J. A., Williams, J. L., 2003. A new mutation  
529 in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. *Anim Genet*, 34:  
530 371 – 374.  
531

532 Liefers., S. C., Veerkamp, R. F., Te Pas, M. F. W., Delavaud, C., Chilliard, Y., Platje, M.,  
533 Van Der Lende, T., 2005. Leptin promoter mutations affect leptin levels and performance  
534 traits in dairy cows. *Anim Genet*, 36: 111–118.  
535

536 Liefers., S. C., Te Pas, M. F. W., Veerkamp, R. F., Van Der Lende, T., 2002. Associations  
537 between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed  
538 Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *J. Dairy Sci.* 85: 1633–1638.  
539

540 Menezes, M. P. C., Martinez, A. M., Ribeiro, M. N., Pimenta Filho, E. C., Bermejo, J. V. D.,  
541 2006. Caracterização genética de raças caprinas nativas brasileiras utilizando-se 27  
542 marcadores microssatélites. *R. Bras. Zootec*, 35(4): 1336-1341.  
543

544 Montoya, A. E., Cerón-Muñoz, M. F., Trujillo, E., Ramirez, E. J., Angel, P. A., 2009.  
545 Frecuencia de los marcadores del gen leptina en razas bovinas criollas y colombianas: i.  
546 romosinuano, chino santandereano, sanmartinero y Velásquez. *Revista Científica*, 14(1): 38-  
547 48.  
548

549 Nkrumah, J. D., Li, C.; Yu, J., Hansen, C., Keisler, D. H., Moore S. S., 2005. Polymorphisms  
550 in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake,  
551 feeding behavior, and measures of carcass merit. *J Anim Sci*, 83(1): 20-28.  
552

553 Oliveira, E. A., Sampaio, A. A. M., Henrique, W., Pivaro, T. M., Rosa, B. L., Fernandes, A.  
554 R. M., Andrade, A. T., 2012. Quality traits and lipid composition of meat from Nellore young  
555 bulls fed with different oils either protected or unprotected from rumen degradation. *Meat Sci*,  
556 90: 28-35.  
557

558 Öztabak, K., Toker, N. Y., Ün, C., Akiş, I., Mengi, A., Karadağ, O., Soysal, D., 2010. Leptin  
559 Gene Polymorphisms in Native Turkish Cattle Breeds. *Kafkas Univ Vet Fak Derg*, 16(6):  
560 921-924.  
561

562 Passos D. T., 2006. Efeito de polimorfismos no gene LEP na expressão da leptina em  
563 adipócitos de bovinos de corte. *Degree Diss.*, Universidade Federal do Rio Grande do Sul,  
564 Brasil.  
565

566 Prado C. S., Pádua J. T., Corrêa M. P. C., Ferraz J. B. S., Miyagi, E. S., Resende, L. S., 2004.  
567 Comparação de diferentes métodos de avaliação da área de olho de lombo e cobertura de  
568 gordura em bovinos de corte. *Ciênc. Anim. Bras*, 5:141-149.  
569

570 Sambrook, J., Fritsch E. F., Maniats T., 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2. ed.  
571 Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.  
572

573 Santos, E. D. G., Paulino, M. F., Lana, R. P., Valadares Filho, S. C., Queiroz, D. S., 2002.  
574 Influência da Suplementação com Concentrados nas Características de Carcaça de Bovinos F1  
575 Limousin - Nelore, Não-Castrados, durante a Seca, em Pastagens de *Brachiaria decumbens*.  
576 R. Bras. Zootec, 31(4): 1823-1832.  
577  
578 SAS Institute. 2000. SAS/STAT software: changes and enhancement through release 9.2.  
579 Cary.  
580  
581 Silva, S. L., Leme, P. R., Putrino, S. M., Martello, L. S., Lima, C. G., Lanna, D. P. D., 2004.  
582 Estimativa da gordura de cobertura ao abate, por ultra-som, em tourinhos Brangus e Nelore.  
583 R. Bras. Zootec, 33: 511-517.  
584  
585 Silva, R. C. G., 2008. Estudo de caracterização e associação de marcadores moleculares  
586 relacionados à leptina para características de crescimento e precocidade de acabamento em  
587 bovinos da raça Nelore. Degree Diss., Universidade de São Paulo, Brasil.  
588  
589 Taniguchi, Y., Itoh, T., Yamada, T., Sasaki, Y., 2002. Genomic structure and promoter  
590 analysis of the bovine leptin gene. IUBMB Life, 53: 131-135.  
591  
592 Zhang ,Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., Friedman, J. M., 1994.  
593 Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. Nature, 372: 425-432.

## ANEXO A – Normas da Revista a qual o artigo será submetido

### ITALIAN JOURNAL OF ANIMAL SCIENCE

The Italian Journal of Animal Science is an international peer-reviewed journal publishing original scientific papers, reviews and short communications on animal science, animal production and related areas. It includes sections on: animal derived food quality and safety; reproduction and physiology (ruminants and non-ruminants); animal production (management, behaviour, welfare, health); wildlife; livestock management and landscape; nutrition and feeding (ruminant and non-ruminant); genetics (quantitative and molecular) and breeding; aquaculture. Upon request to the Editor, announcements of congresses, presentations of universities, research institutes, books and proceedings may also be published, as well as news regarding the members of the Animal Science and Production Association (ASPA). The Association will be glad to receive proposals for your admission as ordinary or corresponding member: please read regulations and procedures in the ASPA statute. The publication of manuscripts is subject to the approval of referees and in agreement with the Advisory Board's opinions; referees will be selected from among qualified scientists in the international scientific community.

Accessed in: <http://www.aspajournal.it/index.php/ijas/index>

### AUTHOR GUIDELINES

#### *Submission of a manuscript*

The corresponding author must submit the manuscript online-only through our Manuscript Submission System.

#### *Authorship*

All persons designated as authors should qualify for authorship according to the Council of Scientific Editors criteria. Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for the content. Authorship credit should be based only on substantial contributions to (a) conception and design, or analysis and interpretation of data; and to (b) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and on (c) final approval of the version to be published. These three conditions must all be met. Participation solely in the acquisition of funding or the collection of data does not justify authorship. General supervision of the research group is not sufficient for authorship. Any part of an article critical to its main conclusions must be the responsibility of at least one author. Authors should provide a brief description of their individual contributions. In relevant cases of experimentation on animals, Authors may be required to provide the original authorization of their institutional Ethical Committee.

#### *Manuscript preparation*

Manuscripts must be written in English language only. Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscript checked by a language editing service, or by an English mother-tongue colleague prior to submission. The manuscript must be prepared with a standard word processor (preferably Microsoft Word or OpenOffice). Pages should be in A4 format and numbered. Times New Roman 12 pt is the advised font. Lines should be left numbered in continuum, to make the referees' work easier, double-spaced and without interruption of page. The final document must then be converted to PDF for submission.

#### *Full title, authors and running title*

A clear, descriptive title, authors' names and addresses should be on the first page. The title should be in bold face type, with capital and lower case letters, and preceded with a running title (a maximum length of 40 characters, spaces included). The names of the authors (with full first name and initial letter of the middle one if present) should be centred under the title, in bold face type with capital and lower case letters. The current affiliations of the authors should appear centred below the authors' names and should be referred to with numeric footnotes. The original name of institutions (no translation in English) should be used. The indication of the corresponding author with its qualification title (Dr, Prof), full name, postal address, telephone number, fax number and email address must be indicated under the institutional addresses.

*Example:*



Running title: (up to 40 characters) Title without acronyms

John White,<sup>1</sup> Carlo D. Rossi,<sup>2</sup> Edward F. Black<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Animal Science, University of Edinburgh, UK

<sup>2</sup>Dipartimento di Morfofisiologia veterinaria e Produzioni animali, Università di Bologna, Italy

Corresponding author: Dr. Carlo Daniele Rossi, DIMORFIPA, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia (BO), Italy - Tel. +39.051.111111 - Fax: +39.051.222222 - Email: rossi@server.it

### **Abstract**

The abstract should have a maximum length of 250 words and should summarise pertinent results in a brief but understandable form. References or tables are never cited in the abstract. The abstract should start with a clear statement of the objective and must conclude with one or two sentences that highlight important conclusions.

### **Key words**

At the end of the abstract, list up to five key words including the species, variables tested and the major response criteria. It is advisable to select the key words from the most recent issues of the CAB Thesaurus (CAB International, 845 North Park Avenue, Tucson, AZ 85719, USA). The first letter of each key word is capitalized and key words are separated by commas.

### **Body of the paper**

The body of the paper must include the following sections: Introduction, Materials and methods, Results and discussion, Conclusions, References. It may also include implications/applications, acknowledgements, possible divided attribution of the paper to the authors, any additional information concerning research grants and/or previous presentation to a Congress or to a Meeting of part of the results.

### **Abbreviations**

Abbreviations should be limited to a unit of measure followed by digits (point between them only for no., *i.e.* number) and to all others included in the SI list ([http://www.bipm.fr/enus/3\\_SI/si.html](http://www.bipm.fr/enus/3_SI/si.html) and/or, for Italian authors: [http://www.science.unitn.it/~labdid/sisint/si1\\_home/si\\_home.html](http://www.science.unitn.it/~labdid/sisint/si1_home/si_home.html)) and in the Veterinary Abbreviations and Acronyms Glossary (<http://www.library.uiuc.edu/vex/vetdocs/abbreviation.htm>). All other abbreviations must be defined the first time they are used in the abstract and again in the body of the manuscript and as footnotes to the tables. Authors are encouraged to limit the number of abbreviations. Authors' defined abbreviations should be in capital letters without points. Do not begin a sentence with an abbreviation, acronym, symbol or numeral.

*Institutions*: acronym in original language, caption in English or translated in English.

*Examples*: MIPAAF (Ministry of Agricultural, Food and Forestry Policies); INRA (National Institute for Agricultural Research).

### **Measures and numbers**

Units of measurements should be those recommended by the International Committee for the Standardization of Units of Measurements, please check this document ([http://www.bipm.org/en/si/si\\_brochure](http://www.bipm.org/en/si/si_brochure)) for Uniform Requirements. For numbers less than one use zero to the left of the decimal, *e.g.* 0.23. Do not use commas for four digit numbers, *e.g.* 9000, and use commas for numbers with more than four digits, *e.g.* 90,000. Do not use a hyphen when indicating the range, but use "to".

### **Nomenclature**

Use italics to designate genus, species, botanical varieties and words in Latin (*e.g.*: *et al.*) or other languages. For genes, loci and alleles nomenclature use italics and refer to the website: <http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/>

### **Miscellaneous**

Brand and company names and locations for equipment and substances should be included in parentheses within the text.

### **Reference list**

Where available, direct URLs for the references should be provided, *i.e.*

Kai, Y.,H., Su, H.M., Tai, K.,T., Chi, S.C., 2009. **Vaccination of grouper broodfish (*Epinephelus tukula*) reduces the risk of vertical transmission by nervous necrosis virus.** Vaccine 2009 Nov 29. [Epub ahead of print].

All publications cited in the text should be presented in a reference list. Citations are listed in strict alphabetical order by first author' last names. Use capital and lower case letters for authors' names. If all authors are identical for two or more citations, chronological order of publication should dictate the order of citations. When more than one paper in a given year is listed by authors whose names are in the same order in each paper, the papers are arranged in alphabetical order of the paper title. Journal titles mentioned in the reference list should be abbreviated according to the following websites (sequenced by relevance):

- ISI Journal Abbreviations Index
- Biological Journals and Abbreviations
- IJAS Guidelines Integration

or to Gale's Periodical Title Abbreviations (**Leland G. Alkire Jr. Ed., Gale Research Inc.**, USA, 1994 or following editions). Publications in any language other than English (except for those written in non Latin alphabets) should retain their original title. Use the following system for arranging your references (please ensure the use of the style "comma" between the last name and the initial letter of the first name").

*1) periodicals:*

Hennighausen, L. G., Sippel, A. E., 1982. Characterization and cloning of the mRNAs specific for the lactating mouse mammary gland. Eur. J. Biochem. 125:131-141.

*2) books:*

National Research Council, 2001. Nutrient Requirements of Dairy Cattle. 7th rev. ed. National Academy Press, Washington, DC, USA.

*3) multi-authors books:*

Brouwer, I., 1965. Report of the sub-committee on constants and factors. In: K.L. Blaxter (ed.) Energy metabolism. EAAP Publ. N. 11, Academic Press Ltd., London, UK, pp 441-443.

*4) proceedings:*

- Rossi, A., Bianchi, B., 1998. *How writing the references.* Proc. 4th World Congr. Appl. Livest. Prod., Armidale, Australia, 26: 44-46. (Or 44, if one page)

- Blanco, P., Nigro, B., 1970. *Not numbered volumes.* Page 127 (or pp 12-18) in Proc. 3rd Int. Conf. Cattle Dis., Philadelphia, PA, USA.

*5) thesis:*

Rossi, P., 1999. Stima di parametri genetici nella razza Reggiana. Degree Diss., Università di Milano, Italy.

*6) material from a World Wide Web site:*

Food and Drug Administration, 2001. Available from: <http://www.fda.gov>

7) when citing EU laws follow the item "Bibliographic notice" which can be found on the website EUR-Lex (<http://eur-lex.europa.eu/>).

*Example:* European Commission, 1994. Commission Decision of 27 June 1994 concerning certain protection measures with regard to bovine spongiform encephalopathy and the feeding of mammalian derived protein, 94/381/EC. In: Official Journal, L 172, 07/07/1994, pp 23-24.

*8) in press:*

Manuscripts that have been accepted for publication but are not yet published can be listed in the literature cited with the designation (In press) following the journal title.

*9) abstracts:*

Abstracts are cited with the designation (abstr.) following the page number.

10) *other*:

Citations such as personal communication, unpublished data, *etc.* are not accepted.

### **Citations in the text**

The Journal follows the “author, year” style of citation. When a citation has one or two authors, cite the reference throughout using the name(s) and the date. When a citation has more than three authors, cite the reference throughout the text with *et al.* (in italics) following the last name of the first author. When two or more references are included in a grouping within a sentence, they are arranged and separated by a semicolon. The first criterion is the year (former citations precede recent ones); multiple citations for a given year are further arranged alphabetically and multiple citations for the same initial letter are arranged as follows: first the citation with one author, secondly the citation with two authors, then the other (with *et al.*). When the same author has two references with different dates, cite them in chronological order, separating the dates with a comma; when the same author has two references with the same date, arrange the dates as a and b (also in the reference list) and separated by a comma.

*Example:*

(Ross, 1968, 1972; Burns *et al.*, 1970; Allen *et al.*, 1990; White and Hulk, 1990; White *et al.*, 1990a, 1990b). Citation should be made in the text to each reference.

### **Tables**

Tables are numbered consecutively in Arabic numbers without "no." before the number. References should be made in the text to each table. The desired style of presentation can be found in published articles. Titles of tables should be descriptive enough to be able to stand alone. Do not present the same data in tabular and graphic form.

### **Figures**

Figures are numbered consecutively in Arabic numbers. References should be made in the text to each figure. Each figure should have a caption. The term “figure” is used also for graphs and photos. Symbols and abbreviations used in figures can be defined in the figure caption or note or within the figure itself. Please avoid the use of bold face or greater size for the characters. Symbols and abbreviations used in figures can be defined in the figure caption or note or within the figure itself. Please avoid the use of bold face or greater size for the characters. Please remember that in order to promote good management of the space available images must take up the least space possible without compromising clarity. The figures must be submitted as .tif or .jpg files, with the following digital resolution:

- Color (saved as CMYK): minimum 300 dpi
- Black and white/grays: minimum 600 dpi

Lettering of figures must be clearly labelled.

### **IMPORTANT!**

The final file must contain full text, tables, figures and references formatted as specified above (in case of a revised version you must also include to the submission a point-by-point cover letter addressing all changes made and headed to the Editor ). The final document must then be converted to PDF for submission.

Authors also have the possibility to get Supplementary Files to be added to a submission. The files, which can be in any format, might include (a) research instruments, (b) data sets, which comply with the terms of the study's research ethics review, (c) sources that otherwise would be unavailable to readers, (d) figures and tables that cannot be integrated into the text itself, or other materials that add to the contribution of the work. Supplementary Files option must not be used to submit a revised version.

### **Submission Preparation Checklist**

As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.

1. The submission has not been previously published, nor is it before another journal for consideration.
2. The text is double-spaced; uses a 12-point font; employs italics, rather than underlining (except with URL addresses); and all illustrations, figures, and tables are placed at the end of the manuscript. In

general, the text adheres to the stylistic and bibliographic requirements outlined in the Author Guidelines above.

3. The submission file is in **PDF file format**. No other format is allowed. If a revised version of the manuscript is requested, it **MUST** be submitted as a standard word processor file (Microsoft Word or OpenOffice are preferred). The same requirement is valid if a manuscript is accepted: in this case, *authors must provide the final accepted files for publication* (DOC for text and TIFF/JPG for images are preferred).
4. Our journal fights plagiarism: authors are advised that their article will be checked with available tools for discovering plagiarism.
5. This journal charge a publication fee for publication: by submitting their manuscript to IJAS, authors agree to pay the amount due whether their manuscript will be accepted for publication.
6. At the end of submission procedure, authors are asked to include in the Comments to the Editor field at least 3-4 suggested reviewers (name and e-mail).

#### Copyright Notice

PAGEPress has chosen to apply the Creative Commons Attribution License (CCAL) to all manuscripts to be published. An Open Access Publication is one that meets the following two conditions: The author(s) and copyright holder(s) grant(s) to all users a free, irrevocable, worldwide, perpetual right of access to, and a license to copy, use, distribute, transmit and display the work publicly and to make and distribute derivative works, in any digital medium for any responsible purpose, subject to proper attribution of authorship, as well as the right to make small numbers of printed copies for their personal use. A complete version of the work and all supplemental materials, including a copy of the permission as stated above, in a suitable standard electronic format is deposited immediately upon initial publication in at least one online repository that is supported by an academic institution, scholarly society, government agency, or other well-established organization that seeks to enable open access, unrestricted distribution, interoperability, and long-term archiving. Authors who publish with this journal agree to the following terms: 1. Authors retain copyright and grant the journal right of first publication with the work simultaneously licensed under a Creative Commons Attribution License that allows others to share the work with an acknowledgement of the work's authorship and initial publication in this journal. 2. Authors are able to enter into separate, additional contractual arrangements for the non-exclusive distribution of the journal's published version of the work (e.g., post it to an institutional repository or publish it in a book), with an acknowledgement of its initial publication in this journal. 3. Authors are permitted and encouraged to post their work online (e.g., in institutional repositories or on their website) prior to and during the submission process, as it can lead to productive exchanges, as well as earlier and greater citation of published work (See The Effect of Open Access).

#### Privacy Statement

Privacy is an important concern for users of our site, and is something that PAGEPress takes very seriously. Below you will find our policy for protecting users' personal information. Registration on our website is optional and voluntary. Browsing and viewing articles on our website does not require any personal information to be submitted from users. Nor do these functions require the user's browser to be set to accept cookies. Some other aspects of our services published on our website do require the use of cookies, and the supply of information such as name, e-mail, *etc.* This is necessary for security reasons and also for us to be able to assure standards of scientific integrity. Users may submit further personal information (*e.g.* details of research areas of interest) in order to take advantage of present and future personalization facilities on our website. In accordance with European Union guidelines, registrants may decline to provide the information requested. They should be advised, however, that PAGEPress may be unable to deliver its services unless at least the information necessary for security and identification purposes is provided. In order to offer the best possible service to users, PAGE Press tracks the patterns of usage of pages on the site. This enables us to identify the most popular articles and services. Where users have provided details of their research areas of interest, this information can be correlated, helping PAGEPress to provide a useful service for scientists, offering them the most relevant information based on their areas of interest. User information will only be shared with third parties with the explicit consent of the user. Publishing a scientific manuscript is inherently a public (as opposed to anonymous) process. The name and e-mail address of all authors of a PAGEPress manuscript will be available to users of PAGEPress. These details are made available in this way purely to facilitate scientific communication. Collecting these e-mail addresses for commercial use is not allowed, nor will PAGEPress itself send unsolicited e-mail to authors, unless it directly concerns the paper they have published on PAGEPress journals. PAGEPress reserves the right to disclose members' personal information if required to do so by law, or in the good faith and belief that such action is

reasonably necessary to comply with legal process, respond to claims, or protect the rights, property or safety of PAGEPress, employees or members.

#### Author Processing Fee

This journal charges the following author fees.

Article Publication: 500.00 (EUR) The cost for publication in IJAS is € 500 (+VAT) per article, without any limitation in pages number or in coloured figures, completely free; for teams of authors that include an ASPA regular member, or a regular member of the Brazilian Animal Science Society, or an IJAS Advisory Board's member as Corresponding Author, the cost is € 250 (+VAT) per article. In both cases the publication charge includes: professional copyediting and linguistic revision; immediate publication quickly upon acceptance; different format of publication (PDF, HTML); inclusion in many archives as PubMed Central, IndexCopernicus, DOAJ, among others; inclusion in PubMed (once our journals will be accepted). At submission, each corresponding author must confirm that he will pay the publication fee. At the end of peer review all accepted papers are processed for publication: at this time PAGEPress also require payments; as soon as payments are received and all versions of the paper are approved, the paper will be published. Please note that this fee does not include taxes; residents in the European union must add 21% as Value-Added Tax (VAT). Institutions and Organizations paying the fee on behalf of authors can avoid payment of VAT providing their VAT registration number. Authors of papers coming from developing countries may ask, in the cover letter of submission, to have their fee reduced.