

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Análise do Polimorfismo no Gene IGF-1 sobre a
Produção de Leite em Bovinos da Raça
Girolando ⁵/₈**

Paula de Souza Santos

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**Análise do Polimorfismo no Gene IGF-1 sobre a
Produção de Leite em Bovinos da Raça
Girolando ⁵/₈**

Paula de Souza Santos

Luiz Ricardo Goulart

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal de Uberlândia
para a obtenção do grau de Bacharel em
Ciências Biológicas.

Uberlândia – MG
Fevereiro – 2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

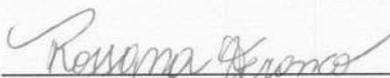
**Análise do Polimorfismo no Gene IGF-1 sobre a
Produção de Leite em Bovinos da Raça
Girolando ⁵/₈**

Paula de Souza Santos

Aprovado pela Banca Examinadora em ___/___/___ Nota _____



Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart
(Suplente: MSc Elaine Cristina Castelhana Barbosa)



Médica Veterinária Rossana Vilela Rezende Franco



Médica Veterinária Luciana Benedetti de Queiroz

Uberlândia, 26 de Fevereiro de 2003.

“Todos remam em direção à margem das vitórias. Mas, se trata de atingir sua meta suprema, todas as metas menores serão alcançadas. O caminho que tento percorrer é espiritual, por isso sei que conseguirei todos os meus objetivos menores. Realizarei todas as minhas aspirações.”

John McLoughlin

*Ofereço à minha família,
pelo carinho e apoio dedicados.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus, pela benção diária e força para realizar este trabalho.

Aos meus pais Antônio Carlos e Marlene, por sempre me incentivarem na busca de meus ideais e por não me deixarem desistir em momentos de dificuldades.

À minha filhinha Isabela, simplesmente por existir.

Ao meu companheiro Christian, pelo amor, paciência e compreensão das dificuldades e ausência durante a realização deste trabalho.

Às minhas irmãs Carla e Roberta, pelos questionamentos inoportunos, mas que de uma certa forma promoveram o meu crescimento.

Ao meu orientador, Luiz Ricardo Goulart, pela confiança e respeito depositados em mim.

À Associação Brasileira de Criadores de Girolando, pelo suporte e contribuição na realização deste trabalho.

Aos proprietários dos rebanhos analisados, pela possibilidade de coleta de material para os estudos.

Ao professor Heyder, pela fundamental ajuda nas análises estatísticas.

Às amigas e membros da banca Luciana e Rossana, pela paciência e apoio nos momentos que precisava.

Aos amigos do grupo Girolando, Tatiane, Fausto, Marcelo e Júlio, pela amizade e pelas palavras de incentivo no momento em que tudo parecia dar errado.

Ao Marcolino, pela amizade e pela ajuda na correção deste trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Molecular, Juliana, Renata, Katiana, Elaine, Guilherme, Carlos, Cícero, e todos que tornam o ambiente de trabalho mais agradável.

Aos meus amigos da 49ª Turma de Ciências Biológicas pelos anos de convivência.

Índice

1- Introdução	1
1.1- A Raça Girolando	3
1.2- O leite	5
1.3- Melhoramento genético em gado de leite	5
1.4- Hormônios do eixo somatotrópico na produção de leite ...	7
1.4.1- Hormônio do Crescimento	7
1.4.2- Fator de crescimento semelhante à insulina	10
1.5- QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>)	12
1.6- PCR	13
1.7- RFLP e marcadores moleculares	13
1.8-PCR-RFLP	14
2- Material e Métodos	15
2.1- Material Biológico	15
2.2- Extração de DNA	16
2.3- Genotipagem dos animais	17
2.4- Análise dos resultados	18
3- Resultados e Discussão	19
4- Conclusões	24
5- Referências Bibliográficas	25

Resumo

O IGF-1 é produzido no fígado, nas glândulas mamárias e fibras musculares e circulante no sangue, com um efeito promotor de crescimento. Além disso, a regulação da produção de leite é estimulada pela secreção de IGF-1. Estudos buscam marcadores moleculares para características favoráveis à produção leiteira. Este trabalho tem como principal objetivo associar o polimorfismo do gene IGF-1 com características quantitativas para produção de leite em bovinos leiteiros da raça Girolando 5/8 por PCR-RFLP. Dos 138 animais genotipados, 10 destes eram do genótipo AA (7,24%), 50 AB (36,23%) e 78 BB (56,52%). As frequências alélicas obtidas foram 25,36% A e 74,63% B. Notou-se diferença significativa na produção leiteira, sendo que o genótipo AA produz maior quantidade de leite, que os demais genótipos. No entanto, não houve diferença significativa na duração da lactação.

Palavras-chave: Polimorfismo, Girolando, IGF-1

1- Introdução

A grande concorrência no setor leiteiro, o elevado custo de produção do produto no mercado, bem como a maior exigência dos consumidores, têm levado a um aumento na produção utilizando-se um menor número de animais. O setor leiteiro de hoje mostra uma preocupação a mais, almejando não somente o aumento da produção, mas também, a melhoria da qualidade do produto, para atender um mercado cada vez maior e mais exigente (Franco, 2002).

A lactação, por tratar-se de uma característica poligênica (condicionada por vários genes), produz diferenças de desempenho, que podem ser devidas às alterações genéticas ocorrendo em um ou mais dos genes que codificam os hormônios e os fatores de crescimento envolvidos na fisiologia deste processo (Rodrigues et al., 1996 citados por Gargalhoni, 1999).

A genética quantitativa pode estimar o valor genético dos indivíduos, assim como a diferença esperada na progênie. À partir daí, o desenvolvimento da genética molecular trouxe novos conceitos que devem ser incorporados pelos produtores, uma vez que tem ampliado as perspectivas do melhoramento animal, seja pelo estudo de marcadores moleculares, seja pela expressão diferencial de genes. Desta forma, o uso da genética no melhoramento animal busca características economicamente representativas para o setor agropecuário.

As diferenças genéticas entre os indivíduos que são fornecidas como resposta da utilização da genética quantitativa, são nada mais que a diferença nas frequências alélicas para os diferentes genes que constituem o genótipo do indivíduo.

A genética molecular é o estudo individual dos genes, sua estrutura e função, envolvendo conhecimentos de bioquímica e fisiologia. O estudo da ação gênica a nível molecular tem demonstrado que o genoma bovino é compreendido de um número finito de genes e que relativamente poucos loci influenciam muitas características quantitativas. Tais loci são descritos como QTL (loci de característica quantitativa), e estão contidos em genes que são relacionados com características de interesse.

A utilização de polimorfismos genéticos a nível de DNA fornecidos pelo mapa genético bovino envolve o conhecimento de técnicas de biologia molecular, principalmente a reação em cadeia da polimerase (PCR) (Borges, 1997).

Partindo das informações geradas pelo mapeamento genético bovino, são utilizados marcadores com efeitos fisiológicos sabidamente importantes (genes candidatos) e que possuem algum polimorfismo a nível de DNA, tentando então, associar esse polimorfismo à variação de características quantitativas (Borges, 1997). A inclusão de marcadores moleculares em programas de melhoramento possibilita o aumento no ganho genético em curto período de tempo.

Assim, este trabalho tem como principal objetivo associar o polimorfismo do gene IGF-1 com características quantitativas para produção de leite em bovinos leiteiros da raça Girolando 5/8., além de auxiliar programas de melhoramento para a produção de leite.

1.1- A Raça Girolando

A origem do primeiro Girolando no Brasil, não dista muito tempo. As primeiras notícias do surgimento desses animais data-se da década de 40, com a cobertura por acaso, de um touro gir em vacas holandesas, no Vale do Paraíba, estado de São Paulo. O resultado disso, foram crias vigorosas e que chegavam precocemente à idade de produção (Menezes, 2002).

Durante anos, o cruzamento de bovinos da raça Gir com o Holandês se destacou e foi o mais praticado pelos criadores brasileiros, pois resultava em animais altamente adaptados e com boa capacidade de produção (Menezes, 2002).

Devido ao excelente resultado obtido, a multiplicação desses animais foi acelerada, pois a raça Holandesa sofria com a adaptação ao sistema tropical, mas já mostrava seu grande potencial de produção de leite, e o Gir, por sua adaptabilidade, proliferou rapidamente (Menezes, 2002).

A raça é fundamentalmente produto do cruzamento do Holandês com o Gir, passando por variados graus de sangue, visando a fixação do padrão racial, no grau 5/8 Hol + 3/8 Gir (Puro Sintético), objetivando um gado produtivo e padronizado (FIGURA 1) (Menezes, 2002).

Os animais da raça Girolando são os responsáveis pela maior parcela do leite produzido no Brasil, cerca de 80%, e também, por parte expressiva da carne consumida no país. Constituem uma expectativa promissora para o mundo tropical pela capacidade que têm de produzir leite e carne em condições bastante adversas, quando comparadas as raças especializadas (Menezes, 2002).

Diagrama I



Diagrama II

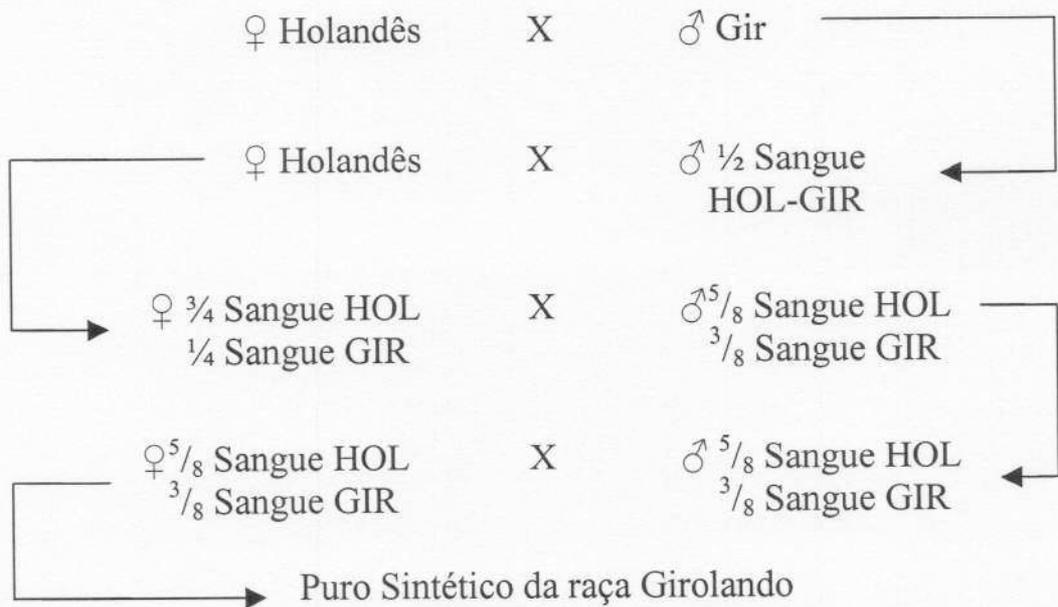


Figura 1: Estratégias de cruzamento para obtenção do Puro Sintético da raça Girolando (Menezes, 2002).

1.2 O Leite

O leite auxilia na ingestão de vitaminas e minerais essenciais na alimentação humana, nutrientes esses, que nem sempre são ingeridos através de outros alimentos. Daí a extrema necessidade da ingestão do leite no período lactente, não deixando assim, de ser importante nas idades posteriores (Lima, 2002).

Pode-se medir o consumo de leite em vários aspectos: na própria forma fluida, seja através do longa vida, pasteurizado, ou até mesmo *in natura*, nas bebidas lácteas, iogurtes, sorvetes, queijos, na preparação de bolos e outros tantos quitutes da vida caseira (Lima, 2002).

Em termos nacionais, a atividade leiteira tem grande importância econômica e social na geração de emprego e na oferta de um alimento essencial a algumas faixas da população (Gomes, 2001). Segundo o mesmo autor, no contexto mundial, o Brasil é um dos maiores produtores de leite, ocupando o sexto lugar. A produção nacional de leite é de 21 bilhões de litros por ano, com uma média abaixo dos dez litros por vaca por dia .

1.3- Melhoramento genético em gado de leite

Segundo Valente *et al.* (2001), em melhoramento genético animal, seleção pode ser definida como sendo um processo contínuo, de longo prazo, em que os indivíduos de diferentes genótipos são escolhidos para produzirem descendentes, ou simplesmente a escolha de indivíduos para a reprodução, sendo que o seu efeito primário é aumentar a frequência gênica favorável, reduzindo, em consequência, a frequência dos genes de efeitos desfavoráveis. Os autores

ainda afirmam que com o desenvolvimento da genética molecular, marcadores genéticos podem ser utilizados na identificação de genes de interesse como instrumentos úteis para acelerar a seleção.

Dois critérios podem ser empregados na seleção de um animal: a sua “capacidade provável de produção”, que permite uma previsão de sua produção em uma próxima lactação baseado em lactações passadas, e o seu “valor genético para produção” estimado usando-se registro do próprio animal e de parentes (Gargalhoni, 1999). Estimativas mostram que é possível mudar a concentração de IGF-1 nos animais pelo uso de seleção (Grochowska, 2001).

Estimular a liberação de hormônio de crescimento (GH) e fator de crescimento semelhante a insulina 1 (IGF-1) são características de herdabilidade em gados de corte jovens. Portanto, estes podem ser úteis indicadores fisiológicos para seleção na produção leiteira (Grochowska, 2001).

É de interesse do produtor, criar animais de boa qualidade, principalmente, vacas boas produtoras de leite e, para saber se o animal transmitirá sua capacidade de produção para a próxima geração, deve-se conhecer a herdabilidade dessas características, pois quanto maior a herdabilidade de uma característica, maior a confiabilidade da seleção, e portanto, maior a resposta à seleção (Valente *et al.*, 2001). Algumas características como quantidade de leite, porcentagem de gordura e proteína, e persistência da lactação, são herdáveis em diferentes proporções em gado de leite, e são avaliadas e levadas em consideração na hora da seleção (Gargalhoni, 1999).

Do ponto de vista estritamente genético, Pereira (1998) citado por Gargalhoni (1999) salientou que a produção de leite sofre variações devido às diferenças genéticas entre raças e entre indivíduos dentro de uma mesma raça.

Segundo Ramalho *et al.*(1990), o termo “grau de sangue” é comumente utilizado para indicar a porcentagem média de alelos de uma determinada raça que o rebanho possui. Nesse caso, de acordo com ele, quando se realizam

cruzamentos entre duas raças diferentes a geração F_1 é denominada de mestiços ou cruzados. Porém, quando se refere a animais puro-sangue, conceitua-se como sendo aquele que apresenta expressões fenotípicas dentro dos padrões raciais e são obtidos por acasalamentos, por tantas gerações quantas são exigidas pelas normas de registro de cada raça. O autor salienta que, ao contrário do que se possa pensar, os animais puros-sangue são altamente heterozigóticos, apresentando homozigose principalmente nos locos que controlam características morfológicas marcantes.

1.4- Genes candidatos associados ao eixo somatotrópico e à produção leiteira

1.4.1- Hormônio do Crescimento

O hormônio do crescimento (GH) é referido como um hormônio somatotrópico e um dos responsáveis pela regulação da produção de leite (Gargalhoni, 1999), além de estimular o desenvolvimento da glândula mamária (Feldman *et al.*, 1993).

De acordo com Burton *et al.*, (1994) a concentração de GH endógeno no sangue e outros tecidos é regulado por um sistema de retornos, os quais operam através de uma cascata de secreção hormonal que regula a secreção do GH e que também pode ser regulada pela taxa de transcrição do gene GH e tradução do GH RNAm. A secreção natural do GH, de acordo com Page *et al.* (1989) citados por Burton *et al.* (1994) é primariamente controlada por dois peptídeos hipotalâmicos neurosecretórios; o estimulatório GHRH (fator de liberação do GH) e o inibitório SS (somatostatina).

A figura 2 mostra o controle da produção e secreção do GH, suas moléculas ativadoras e inibidoras e seus principais locais alvo de ação. Neste cenário, o GH liberado pela pituitária liga-se a receptores específicos nas células para adicionar uma seqüência de eventos bioquímicos que resultam em uma resposta biológica.

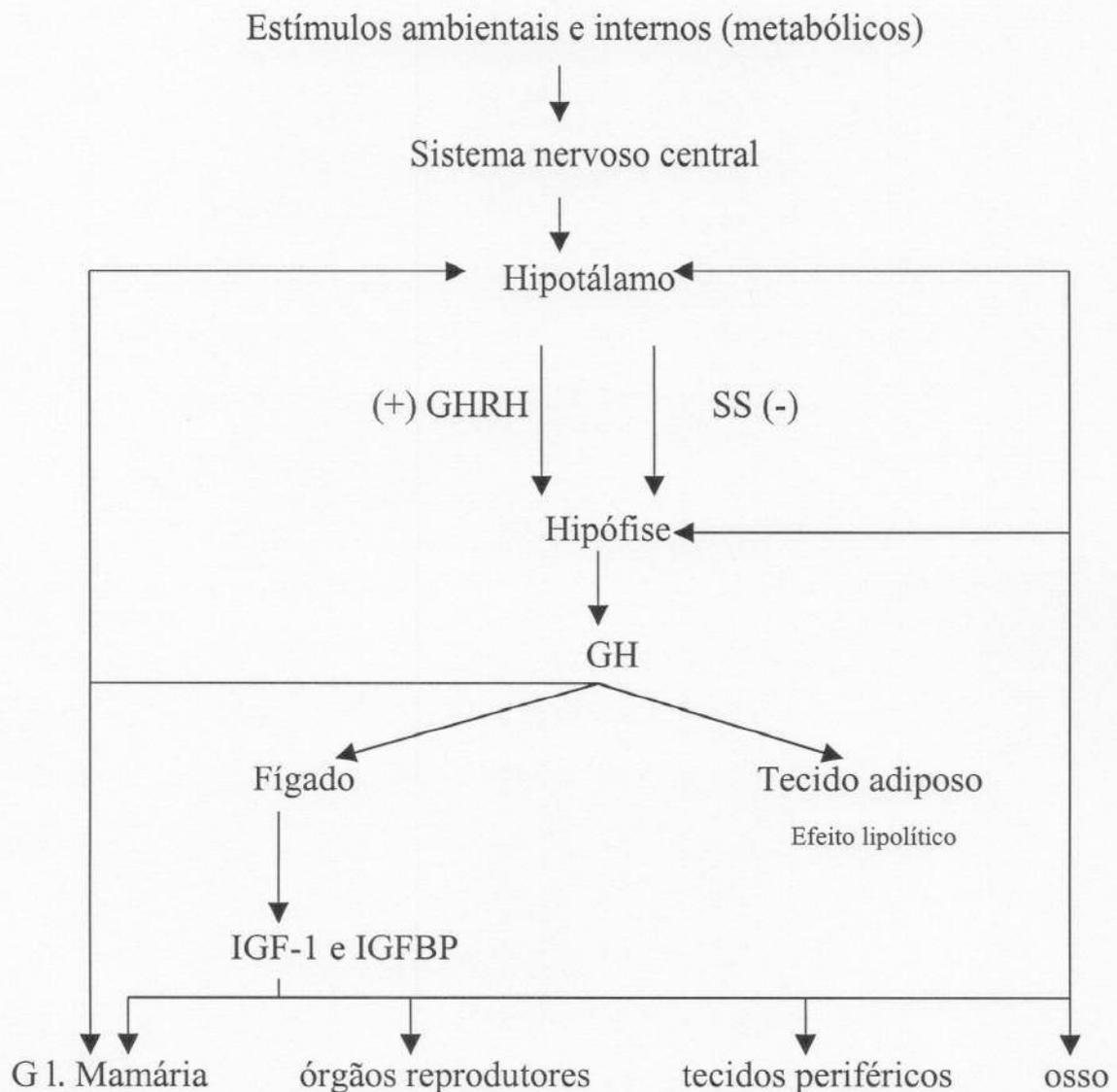


Figura 2. Esquema da regulação neuroendócrina da produção do GH e seus locais de ação (adaptado por Burton *et al.*, 1994)

Somatostatina e GHRH são produzidos no hipotálamo e controlam a secreção de GH. A somatostatina inibe a liberação de GH pela glândula pituitária, enquanto o GHRH estimula essa liberação. Estresse, sono, e exercícios podem realçar a produção de GHRH, aumentando o nível de GH (Kopchick & Andry, 2000). No fígado, o GH estimula a produção dos mediadores de sua ação, ou seja, somatomedinas ou fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFBP), as quais entram na circulação sangüínea e são transportadas aos tecidos alvos, onde exercem múltiplas ações (Rodrigues *et al.*, 1998). Segundo estes autores, na lactação, o GH age aumentando o fluxo sangüíneo do úbere, para maior captação de precursores de leite.

Walden *et al.* (1998) sugeriram que o GH e o IGF-1 mediavam o desenvolvimento da glândula mamária junto com o estrógeno, estabelecendo que elementos do estroma e do epitélio deveriam se interagir para ocorrer o desenvolvimento da glândula.

Flint *et al.* (1994), evidenciaram que o GH age direto na glândula mamária estimulando a síntese de leite, embora havendo possibilidades que este estímulo possa ser por produção local de IGF-1. Segundo Walden *et al.* (1998), o GH estimula a produção de IGF-1 na glândula mamária.

Flint *et al.* (1998), verificaram os efeitos da restrição alimentar nas respostas da glândula mamária e tecidos adiposos aos hormônio do crescimento e à prolactina em ratos lactantes, propondo que o aumento da produção de leite mediada pelo GH é estimulada pela secreção de IGF-1 e que esta resposta ao IGF-1 é sensível a diferentes níveis nutricionais e à sua ação como um sensor do balanço energético. Além disso, o GH foi capaz de estimular a produção de leite, no entanto sua efetividade diminuiu progressivamente, quando a quantidade de alimento foi reduzida. Segundo os autores o aumento da produção de leite devido a ação do GH, foi acompanhada por um aumento das concentrações de IGF-1 no sangue e esta resposta também diminuiu progressivamente quando da

redução da quantidade de alimento, consistente com a hipótese que o IGF-1 determina a produção de leite em resposta ao GH, regulando a ação deste hormônio na glândula mamária em uma dependência nutricional.

1.4.2- Fator de crescimento semelhante à insulina

A constatação da presença dos fatores de crescimento se deu quando foi observado que o hormônio do crescimento (GH) não atuava diretamente sobre os tecidos, mas sim via mensageiros, que por sua vez levavam a proliferação e ao crescimento dos tecidos. Como alguns destes mensageiros eram dependentes do GH e apresentavam propriedades semelhantes à insulina, foram chamados de fatores de crescimento semelhante à insulina (insulin-like growth factor) (Ferreira, 2002). O IGF-1 tem um efeito promotor de crescimento, no entanto em altas concentrações, pode inibir a liberação de GHRH e GH (Kopchick & Andry, 2000).

O fator de crescimento semelhante à insulina I (IGF-I) participa no importante papel fisiológico do crescimento e desenvolvimento de mamíferos, atuando localmente em órgãos específicos ou através de IGF-I circulante (Werner *et al.*, 1994 citados por Ge *et al.*, 2001).

A proteína IGF-1 é expressa e produzida primariamente em células musculares com o desenvolvimento dentro dos tecidos musculares, suportando a hipótese de que o IGF-1 modula o desenvolvimento do músculo fetal (Gerrard, 1998).

Foi comprovado por Buskirk *et al.* (1996), que a deficiência de energia na dieta de bovinos resulta na redução de IGF-1 circulante.

Um polimorfismo de conformação de fita simples (SSCP) na região promotora do gene IGF-I de bovino, pode ter um efeito direto na expressão do

gene IGF-I, e pode estar associado com a concentração de IGF-I no soro de sangue e em características de crescimento (Ge *et al.*, 2001). De acordo com os autores, no locus IGF-I, o polimorfismo do DNA pode ser um marcador eficaz para características de crescimento. Um dos polimorfismos do IGF-I está localizado na extremidade 5' do gene IGF-1 (Marshal & Kim, 2002).

Francis *et al.* (1986) e Honegger & Humbel (1986) citados por Bishop *et al.* (1991), sequenciaram a proteína isolada do IGF-I de bovino, de colostro e soro, respectivamente, e encontraram que a seqüência de bovino é idêntica à seqüência da proteína de humano. O gene IGF-I em humano, é localizado no cromossomo 12, e contem 5 éxons interrompidos por 4 íntrons (Rotwein *et al.*, 1986 citados por Bishop *et al.*, 1991).

Estudos com animais da raça Angus demonstraram uma alta herdabilidade para uma média concentração de IGF-I durante o período pós-desmame, sugerindo uma forte influência do controle genético desse fator de crescimento (Davis & Simmen, 1997).

Com o objetivo de associar o polimorfismo do gene IGF-I com características de crescimento em gado de corte da raça Angus, Ge *et al.* (2001) genotiparam 760 animais sendo que 329 foram do genótipo AA, 314 AB, e 117 BB (A: 63,9%; B: 36,1%). Estes autores identificaram que o alelo A possui 226 e 23 pares de base, e o alelo B, 249. Segundo eles, durante os 20 dias após o desmame, os animais com o genótipo BB ganharam 3,88 Kg a mais que os animais com o genótipo AA, e os heterozigotos ganharam 3,75 Kg a mais que os animais com o genótipo AA. Segundo os mesmos, é possível que IGF-I tenha efeitos diferentes em diferentes estágios do crescimento, porque a expressão do gene IGF-I ocorre de acordo com o desenvolvimento, e é fisiologicamente regulada.

Segundo Marshal & Kim (2002), vacas com o genótipo AA produziram mais leite, e tiveram uma progênie mais pesada do que vacas com genótipos AB ou BB.

1.5- QTL (*Quantitative Trait Loci*)

QTLs são genes relacionados com características de importância econômica (Thaler Neto, 2000). Os procedimentos para identificação de genes relacionados a características de interesse econômico podem ser feitos por meio da utilização de genes candidatos e pelo mapeamento do genoma.

Genes candidatos são eleitos baseados em evidências de que determinado peptídeo codificado pelo gene influencia a característica de interesse (Thaler Neto, 2000).

O mapeamento do genoma para detecção de QTL utiliza marcadores genéticos espalhados por todo genoma para identificar genes que afetam as características quantitativas.

Embora ambos procedimentos possam ser usados de forma alternativa na detecção de genes de interesse, eles também podem ser utilizados de forma complementar, identificando regiões do genoma que contém possíveis QTLs através do mapeamento de todo genoma e pesquisando os genes localizados naquela região através de genes candidatos.

A principal expectativa da aplicação dos QTLs identificados é a seleção auxiliada por marcadores (MAS – *Marker-assisted selection*) (Thaler Neto, 2000), que se trata do desenvolvimento de estratégias de melhoramento e programas para o uso da informação oriunda da genética molecular na seleção e programas de acasalamento. A MAS proporciona melhor resposta a curto prazo, enquanto a seleção fenotípica teve melhores resultados a longo prazo

1.6- PCR

A PCR (*Polimerase Chain Reaction*) é uma técnica que proporciona a amplificação de pequenas quantidades de DNA ou RNA *in vitro* (Franco, 2002). Foi criada em 1986 por Kary Mullis, sendo uma técnica extremamente sensível que envolve uma minuciosa e criteriosa otimização para cada experimento porque implica em complexa interação cinética entre o DNA molde, o DNA amplificado, os *primers*, dNTPs, tampão da enzima, Cloreto de Magnésio e enzima DNA polimerase, além de considerar as variações de temperatura e o tempo que determinam a condição ideal de atividade dos *primers* e da enzima. Nenhum protocolo é ideal para todas as situações, por isso, toda reação requer uma otimização (Gargalhoni, 1999).

1.7- RFLP e marcadores moleculares

Marcador molecular pode ser definido como um segmento cromossômico que pode ser acompanhado através das gerações, devendo portanto, ser informativo, e que está ligado ou associado à alguma característica importante, sendo utilizado para identificar alelos daquele loci (Borges, 1997).

Inúmeras técnicas dentro da biologia molecular estão disponíveis hoje para a detecção da variabilidade genética a nível do DNA e RNA, dentre eles o marcador RFLP, que também pode ser útil nos trabalhos de seleção.

A técnica RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) ou polimorfismo no comprimento de restrição consiste na digestão do DNA genômico com o uso de enzimas de restrição (Ferreira & Grattapaglia, 1996), que cortam o DNA em regiões específicas denominadas sítios de restrição

(Valente *et al.*, 2001). O corte do DNA produz muitos fragmentos de variados tamanhos, os quais podem ser separados por meio da eletroforese em gel de agarose (Borges, 1997). Os marcadores baseados em RFLP possuem expressão co-dominante, isto é, em cada loco estudado é possível identificar genótipos heterozigotos e homozigotos (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

1.8- PCR-RFLP

Após a descoberta e otimização da PCR, juntamente com o domínio da técnica RFLP e a facilidade de se sequenciar o DNA, surgiu a alternativa de se converter marcadores RFLP em marcadores baseados em PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1996). Neste procedimento, o DNA é amplificado por PCR e o produto amplificado é submetido à digestão por uma enzima de restrição, podendo os fragmentos ser visualizados em gel de agarose, sob luz ultra-violeta.

Esta técnica requer o conhecimento da seqüência do DNA para sintetizar os *primers* (Ferreira & Grattapaglia, 1996).

2- Material e Métodos

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG.

2.1- Material biológico

O material biológico utilizado neste trabalho foi constituído por amostras de sangue coletadas de 138 fêmeas da raça Girolando 5/8, provenientes de diversas fazendas dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, e Rio de Janeiro. Foi retirada amostra de sangue de cada animal, colhido na veia mamária, com *vacutainers* contendo solução anticoagulante (EDTA) e usando uma agulha para cada indivíduo. Após a coleta, o material foi encaminhado para o Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foi mantido sob refrigeração a 4-8°C, na posição vertical, para permitir a sedimentação dos eritrócitos e leucócitos, por no mínimo 48 horas.

2.2- Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras do sangue coletado, segundo o método descrito em *A Workshop on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources* (1992), modificado por Borges (1997).

Foram retirados 500µl de sangue fresco, tomado na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação (camada de leucócitos) e colocados em tubos de 2mL. Posteriormente, foi adicionado 1mL de tampão de lise não-diluído (20mM de Tris-HCl, 5mM de EDTA pH 7,5, 640 mM de sacarose, 10mM de MgCl₂ e 4% de Triton X-100) submetendo a solução à uma leve agitação e incubação em gelo por 5 – 10 minutos. O material foi centrifugado a 4000g (~8000rpm) por 3 minutos descartado-se em seguida o sobrenadante. Mais duas lavagens foram necessárias com tampão de lise diluído (1:1) até que o *pellet* ficasse limpo. Em seguida foram acrescentados 100µL de TE + sarcosyl 1% (10 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA pH 7,5 e 1% de Sarcosyl) e 10 µL de proteinase K (10mg/mL). As amostras foram incubadas *overnight* a 65°C, para que o precipitado fosse desfeito. Em seguida, adicionava-se 300µL de 8M guanidina-HCl / 0,49M acetato de amônia e agitava-se a temperatura ambiente por 1 –2 horas até solubilizar todo o *pellet*. Adicionou-se então, 800µL de isopropanol e aguardou-se a precipitação do DNA. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 4000 g por 5 – 10 minutos. Procederam-se mais duas lavagem do pellet com isopropanol 60% ou etanol 70%. Os tubos foram colocados para secar em temperatura ambiente ou mesmo em estufa para uma posterior diluição em 0,5 – 1mL de TE (10mM Tris-HCl e 1mM de EDTA). Foi necessário 1-4 horas de incubação para completa dissolução do precipitado.

2.3- Genotipagem dos animais

Diferentes volumes de DNA durante a otimização das reações de PCR foram testados para que se pudesse ser estipulada uma quantidade fixa de amostra a ser usada em todas reações, não necessitando de uma quantificação por espectrofotometria das amostras de DNA a serem utilizadas nas reações.

A reação de PCR-RFLP foi realizada sob as seguintes condições: 0,65 U de Taq DNA polimerase, 3,65 pmoles de cada *primer*, 0,22 μ l de dNTPs (100 mM de cada base nitrogenada), 2,2 μ L de tampão (10X) contendo 1,5 mM de MgCl₂, 1,0 μ L de DNA, e água completando o volume para 30 μ L em tubos de 500 μ L. A solução foi submetida a 30 ciclos com a seguinte programação:

- Passo 1: 95°C/5 minutos
- Passo 2: 94°C/1 minuto (desnaturação)
- Passo 3: 58°C/45 segundos (anelamento)
- Passo 4: 72°C/1 minuto (extensão)
- Passo 5: voltar ao passo 1, 30 vezes
- Passo 6: 72°C/10 minutos
- Passo 7: 4°C/1 hora

Foi utilizado um par de primers descrito por Ge *et al.* (2001):

5'- ATT ACA AAG CTG CCT GCC CC -3'

5'- ACC TTA CCC GTA TGA AAG GAA TAT ACG T -3'

A amplificação pôde ser observada através da aplicação de 10 μ L da amostra em gel de agarose de 1,5%, corados com Brometo de Etídio (10 μ g/ML) sob corrente elétrica de 120V por 30 minutos, e visualizados através de raios ultravioleta pelo sistema VDS[®] (Pharmacia Biosciences). Após verificado resultados satisfatórios, o restante dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à uma digestão enzimática com a enzima *Sna*1 (2 U da enzima; 2,5 μ L do tampão da enzima (10X); 20 μ L de produto amplificado e completar

com água (2,3 μ L) para 25 μ L de volume final) a 37°C por 5 horas. Os produtos da restrição também foram submetidos à eletroforese como descrito anteriormente, porém, o gel utilizado era de 3%, e a voltagem 120 Volts por 1 hora, também corados e visualizados como descrito anteriormente.

2.4- Análise dos resultados

Os dados (genótipos) encontrados através da PCR-RFLP foram catalogados e discriminados, identificando os genótipos AA, AB e BB. Para associação do marcador molecular (genótipo) com a produção leiteira, os dados foram submetidos à Análise de Variância, tendo como covariável, a ordem de lactação, pelo Software STAT 5.0.

3- Resultados e Discussão

Na amplificação de cada uma das amostras, encontrou-se o fragmento esperado de 249 pb do gene IGF-1, como mostrado na Figura 3.

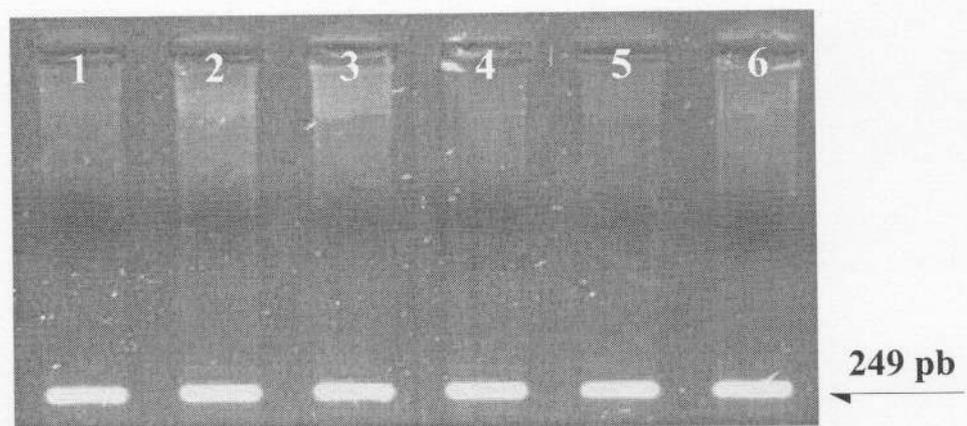


Figura 3: Eletroforese em gel de Agarose, 1,5% do gene IGF-1 (249 pb). Amplificação pré restrição enzimática.

Após a amplificação dos fragmentos, e realizada a restrição enzimática com a enzima *Sna*1, foram verificados os fragmentos de 23 pb e 226 pb para indivíduos de genótipos AA; 226 e 249 pb para genótipos AB e finalmente, 249 pb para genótipos BB, como pode ser observado na Figura 4.



Figura 4: Eletroforese em gel de Agarose 3% de fragmentos gerados por restrição enzimática. Colunas 1 e 2: Genótipo AA; colunas 3 e 4: Genótipo AB; colunas 5 e 6: Genótipo BB. M – Marcador Molecular.

Dos 138 animais genotipados, 10 destes eram do genótipo AA (7,24%), 50 AB (36,23%) e 78 BB (56,52%) (TABELA 1). As freqüências alélicas obtidas foram 25, 36% A e 74, 63% B.

TABELA 1: Freqüências genotípicas para o polimorfismo do gene IGF-1 segundo Ge *et al.* e presente estudo

Genótipos	Autores	
	Ge <i>et al.</i>	Presente estudo
AA	43,28	7,24
AB	41,31	36,23
BB	15,39	56,52

Tabela 1: Freqüências genotípicas encontradas nos estudos de Ge *et al.* (2001), Raça Angus; presente estudo (2003), Raça Girolando ⁵/₈.

A freqüência encontrada nesta população não é semelhante a descrita por Ge *et al.*(2001) em gado Angus, segundo o chi-quadrado. Portanto, a população de Girolando ⁵/₈ usada tem freqüência significativamente diferente,

demonstrando que o gado de corte provavelmente teve seleção favorável ao gene de interesse para produção de carne.

TABELA 2: Análise de variância para duração da lactação, tendo como covariável a ordem de lactação

Origem da variação	GL	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
IGF-1	2	5353.92	0,41	0,6625
Lactação	1	11749.87	0,90	03422
Erro	336	12987.26		
Total	339			

$R^2 = 0,005$; CV= 40,9%

TABELA 3: Análise de variância para produção média de leite, tendo como covariável a ordem de lactação.

Origem da Variação	GL	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
IGF-1	2	55.61	6,16	0,0024
Lactação	1	386.99	42,88	0,0001
Erro	335	9.03		
Total	338			

$R^2 = 0,14$; C.V= 23,85%

Verifica-se na tabela 3 que o efeito da covariável (ordem de lactação) foi altamente significativo ($P < 0,0001$), o que justifica a sua inclusão no modelo. O Teste F para igualdade das médias das classes genotípicas foi altamente significativo, indicando que pelo menos uma delas difere-se estatisticamente das

demais, no intuito de verificar qual (is) classe (s) genotípica (s) diferem-se desdobrou-se a soma de quadrados de genótipos em contrastes ortogonais, obtendo-se os resultados apresentados na tabela 4, na qual observa-se que o contraste AA vs (AB+BB) foi estatisticamente diferente de zero, indicando que este genótipo difere dos demais.

TABELA 4: Análise de covariância para a produção média de leite, tendo como covariável a ordem de lactação, com o desdobramento do efeito de genótipos em contrastes ortogonais.

Origem da Variação	GL	Quadrados Médios	Valor de F	Pr > F
IGF-1	2	55.61	6,16	0,0024
AA vs Resto	1	71.99	7,98	0,0050
AB vs BB	1	6.54	0,73	0,3950
Lactação	1	386.99	42,88	0,0001
Erro	335	9.03		
Total	338			

TABELA 5: Comparação de médias para duração da lactação e produções médias de leites ajustadas em função da ordem de lactação.

Genótipos	Duração da Lactação	Produção média diária	Produção total
AA	294,28 a	14,24 a	4190,54 a
AB	279,82 a	12,28 b	3436,19 b
BB	275,53 a	12,58 b	3466,17 b

Médias seguidas pela mesma letra não são estatisticamente significantes ao nível de 5% de probabilidade segundo o Teste F

De acordo com a tabela 5, não houve diferença significativa entre as classes genóticas (AA, AB e BB) quanto a duração média, em dias da lactação, portanto não podemos afirmar que o polimorfismo deste gene esteja associado a duração da lactação. Observando as produções médias diárias ajustadas apresentadas, verifica-se que a produção média diária dos animais AA foi maior que a média de AB e BB. O contraste entre os animais AB e BB foi não significativo o que indica não haver diferenças entre estes genótipos quanto a produção média diária de leite.

4- Conclusões

O homozigoto AA do gene IGF-1 teve efeito significativo na produção leiteira, mas não na duração da lactação da raça Girolando ⁵/₈. Por outro lado, a baixa frequência do genótipo na população indica que esta raça não sofreu seleção para o genótipo favorável. Portanto, propõe-se o uso de seleção assistida com o gene IGF-1 para a obtenção de animais superiores, podendo tornar-se uma importante alternativa para o melhoramento da raça e o conseqüente aumento da produção leiteira.

5- Referência bibliográfica

BISHOP, M.D. *et al.*. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, v.43, p. 61-70, 1995.

BORGES, M.. Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovinos de corte. **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 119p., 1997.

BURTON, J. L., McBRIDE, B. W., BLOCK, E., GLIMM, D. R., KENNELLY, J. J. A review of bovine growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.167-201, 1994.

BUSKIRK, D. D., FAULKNER, D. B., HURLEY, W. L., KESLER, D.J., IRELAND, F. A., NASH, T. G., CASTREE, J. C., VICINI, J. L. Growth, reproductive performance, mammary development, and milk production of beef heifers as influenced by prepubertal dietary energy and administration of bovine somatotropin. **J. Anim, Sci.**, 74:2649-2662, 1996.

DAVIS, M. E., SIMMEN, R. C. M. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor I concentration and performance traits in angus beef cattle. **J. Anim. Sci.** 75:317-324, 1997

FELDMAN, M., RUAN, W., CUNNINGHAM, B. C., WELLS, J. A. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinology**. V.133. n.4, 1993.

FERREIRA, J.L., TONIOLLI, R., DUARTE, A. B. G., MOREIRA, F. R. C., GARCIA, J. F. Ação do fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-1) e de suas proteínas ligadoras (IGFBPs) no desenvolvimento folicular de bovinos – Revisão. **Rev. Bras. Rep. Anim.**, v.26, n.4, p.306-311, 2002.

FERREIRA, M. E. GRATTAPAGLIA, D.. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. Brasília, 1996.

FLINT, D. J., GARDNER, M. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and the prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status. **Endocrinology**, v.135,n.3,p.1119-1124,1994.

FLINT, D. J., VERNON, R. G. Effects of food restriction on the responses of the mammary gland and adipose tissue to prolactin and growth hormone in the lactating rat. **J. Endocrinol**, v.156, n.2, p.299-305, 1998.

- FRANCIS, G. L. et al., Purification and partial sequence analysis os insulin-like growth factor-I from bovine colostrum. **J. Biochem.** 233:207, 1986 citados por BISHOP, M. D. *et al.*. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis os bovine insulin-like growth factor I. **J. Anim. Sci.** 69:4306-4311, 1991.
- FRANCO, M. M.. Genes da via do hormônio do crescimento e desempenho de suínos. **Dissertação de Doutorado.** Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 87 p., 2002.
- GARGALHONE, A. G.. Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite. **Dissertação de Mestrado.** Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 58 p., 1999.
- GE, W., DAVIS, M. E., HINES, H. C., IRVIN, K. M., SIMMEN, R. C. M.. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.** 79:1757-1762, 2001.
- GERRARD, D. E., OKAMURA, C. S., RANALLETTA, M. A. M., GRANT, A. L. Developmental expression and location of IGF-I and IGF-II m RNA and protein in skeletal muscle. **J. Anim. Sci.** 76:1004-1011, 1998.
- GOMES, S. T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite. p. 21, 2001.

- GROCHOWSKA, R., SORENSEN, P. ZWIERZCHOWSKI, L. SNOCHOWSKI, M., LOVENDAHL, P. Genetic variation in stimulated GH release and in IGF-1 of young dairy cattle and their associations with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **J. Anim. Sci.** 79:450-476, 2001.
- HONEGGER, A. and HUMBEL, R.. Insulin-like growth factors I and II in fetal and adult bovine serum: purification, primary structure and immunological cross-reactivity. **J. Biol. Chem.** p.261-559, 1986 citados por BISHOP, M. D. *et al.*. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor I. **J. Anim. Sci.** 69:4306-4311, 1991.
- KOPCHICK, J. J., ANDRY, J. M. Minireview: Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Molecular genetics and metabolism.**, n.71, p.293-314, 2000.
- LIMA, M. O leite está presente na vida do brasileiro sob várias formas. **O Girolando.** Ano VI. n°28, 2002.
- MARSHALL, D. M., KIM, J.. Associations of beef production traits with polymorphisms in the growth hormone gene and insulin-like growth factor-1 gene. **Beef Reports**, 2002.
- MENEZES, C. O programa girolando. In: **Curso Intensivo de Julgamento da Raça Girolando**, 6., 2002

PAGE, M. D., DIEQUEZ, C., SCANLON, M. F. Neuroregulation of growth hormone secretion. *Biotechnology in growth regulation*. 47:1989 citados por BURTON, J. L., McBRIDE, B. W., BLOCK, E., GLIMM, D. R., KENNELLY, J. J. A review of bovine growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.167-201, 1994.

PEREIRA, J. C. C.. **Melhoramento genético aplicado à produção de leite**. Belo Horizonte. 170p., 1998.

RAMALHO, M. A. P., SANTOS, J. B., PINTO, J. B., C. A. B. P.. **Genética na agropecuária**. 2 ed. São Paulo: Globo.359p., 1990.

RODRIGUES, C. V., GUIMARAES, S. E. F., FONSECA, C. T., LIMA, R. M. G., PINHEIRO, L. E. L. Genotipagem do gene do hormônio do crescimento nas raças nelore, holandês e chianina usando a técnica DA RFLP-PCR. In. CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., Campo Grande, 1996. **Anais...** citados por GARGALHONE, A. G. Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite. **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia. 58 p., 1999.

RODRIGUES, C. V., PINHEIRO, L. E. L., GUIMARÃES, S. E. F. Mecanismos genéticos de crescimento e lactação em bovinos relacionados ao hormônio de crescimento (GH) e aos fatores envolvidos na sua ação. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.22, n.1, p.27-35, 1998.

ROTWEIN, P., POLLOCK, K. M., DIDIER, D. K., KIWI, G. G.. Organization and sequence of the human insulin-like growth factor I gene. **J. Biol. Chem.** 261-4828, 1986 citados por BISHOP, M. D. *et al.*. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor I. **J. Anim. Sci.** 69:4306-4311, 1991.

THALER NETO, A. Situação atual e perspectivas de utilização da genética molecular no melhoramento de bovinos leiteiros In: Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 3, Belo Horizonte, 2000. **Anais...**

VALENTE, J., DURÃES, M. C., MARTINEZ, M. L., TEIXEIRA, N. M.. **Melhoramento genético de bovinos de leite. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite.** 256 p., 2001.

WALDEN, P. D., WEIFENG, R., FELDMAN, M., KLEINBERG, D. J. Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. **Endocrinology.** V.139. n.2, 1998.

WERNER, H., ADAMO, M., ROBERTS, C. T., LEROITH, D.. Molecular and cellular aspects of insulin-like growth factor action. **Vitam. Horm.** 48:1-58, 1994 citados por GE, W., DAVIS, M. E., HINES, H. C., IRVIN, K. M., SIMMEN, R. C. M.. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.** 79:1757-1762, 2001.

This image shows a blank page from a ledger or account book. The page is white with a faint, light gray grid pattern. The grid consists of vertical lines that create columns of varying widths, and horizontal lines that create rows. The left edge of the page is perforated, indicating it is part of a binder. There is no text or data on the page.