

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

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO NO GENE
PIT-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE LEITE EM
BOVINOS (*Bos taurus*) RAÇA GIROLANDO
^{5/8}**

Fausto Emílio Capparelli

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia
para 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
PIT-1 SOBRE A PRODUÇÃO DE LEITE EM
BOVINOS (*Bos taurus*) RAÇA GIROLANDO
^{5/8}**

Fausto Emílio Capparelli

Luiz Ricardo Goulart Filho

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Uberlândia
para 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 PFT-1 sobre
a Produção de Leite em Bovinos (*Bos taurus*)
da Raça Girolando ⁵/₈**

Fausto Emillio Capparelli

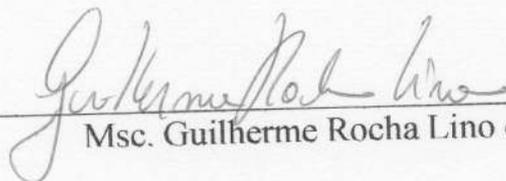
Aprovado pela Banca Examinadora em 26/02/03 Nota 100,0



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



Msc. Marcus Teixeira Marcolino



Msc. Guilherme Rocha Lino de Souza

Uberlândia, 26 de Fevereiro de 2003.

*“Só existem dois dias no ano em que nada pode ser feito
Um se chama “ONTEM”
E o outro “AMANHÃ”,
Portanto “HOJE” é o dia certo para amar,
Acreditar, fazer e principalmente viver”*

Dalai Lama

Agradecimentos:

Agradeço ao meu pai, Júlio, pelos conselhos, oferecidos sempre nas horas em que eu não tinha mais saída para problemas, e minha mãe, Ione, pela sua força espiritual, que, mesmo a distância, era depositada em mim.

Ao meu irmão e amigo Emmanoel que, apesar do estilo “durão”, sabia que torcia por mim “às escondidas”; agradeço à ele e minha cunhada Rose, por trazerem à mim a Júllia, a sobrinha e afilhada mais linda que já vi e que adoro tanto e sinto tanta saudade do simples sorriso

À Priscila, pelo amor e carinho demonstrados e, sem esquecer, da paciência em relação à minha ausência devido às várias horas que passava dentro do laboratório.

Ao Gustavo, Geraldo, Getúlio, Oduvaldo, Jorge, João Neto, Cristiano pela sincera e eterna amizade.

Ao Dr Luiz Ricardo Goulart Filho, meu orientador, por ter possibilitado a realização do meu sonho de trabalhar num laboratório de Genética.

Ao Machaim, que apesar de não estar mais no laboratório, sou grato por ter me ensinado, mesmo quando não tinha tempo, muitas das coisas que sei hoje no meu trabalho.

Ao pessoal do grupo Girolando, Rossana, Luciana, por proporcionarem tão corretamente o andamento deste projeto, através de seus esforços, dedicação e confiança depositados mim.; Tatiane, Júlio e Marcelo por tornarem novos amigos; Paula, pela ajuda, sempre presente na realização do meu projeto.

Às minhas “irmãs”, que nunca tive, Narcisa, Luciana, Teresa, Juliana, Daniela, Lúbia, Lorraine, Vanessa e Carminha pela amizade, ajuda e conselhos sempre que precisei.

À um dos melhores amigos que fiz em Uberlândia, Marcolino, por tudo em todas horas.

Aos amigos do Laboratório Waldesse, pela indispensável ajuda no entendimento dos resultados deste trabalho; Carlos pelas ajudas nunca negadas a mim; Katiana por aguentar minhas chatices e, sem esquecer, da ajuda essencial nos estudos para a prova do Mestrado; Elis, Renata, Roni, Jaqueline, Walter ...que direta ou indiretamente colaboraram na realização do meu trabalho.

Aos amigos do outro Laboratório, Alcione, Flávia e Carlos por suportarem minhas “visitas” para pegar material emprestado.

Aos amigos da 49ª Turma de Ciências Biológicas, pela convivência, a qual espero que continue.

À Elaine e ao Guilherme pelo convívio no laboratório e por aceitar fazer parte da minha banca.

Ao professor Heyder pelo fundamental auxílio nas análises estatísticas.

Mais uma vez aos meus familiares, que me desculpem pela ausência

Por fim, a Deus, por ter colocado essas pessoas tão importantes no meu caminho, pois foram elas que me ajudaram a crescer e a querer ao menos tentar vencer.

Índice

1- Introdução.....	1
2- Objetivos.....	3
3- Revisão Bibliográfica.....	4
3.1-Produção Leiteira.....	4
3.2-O Girolando.....	7
3.3-PCR.....	10
3.4-RFLP.....	11
3.5-Marcadores Moleculares.....	12
3.6-QTLs.....	13
3.6-GH.....	15
3.7-PIT-1.....	18
4-Material e Métodos.....	20
4.1-Material Biológico.....	20
4.2-Extração de DNA.....	21
4.3-PCR-RFL- Restrição Enzimática.....	22
4.4-Análises Estatísticas.....	23
5-Resultados e Discussões.....	24
6-Conclusões.....	31
7-Referências Bibliográficas.....	32

Resumo

PIT-1 tem sido identificado como um fator transcricional pituitário-específico que regula a expressão dos genes do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL) na adeno-hipófise (genes relacionados com características de importância econômica), daí o interesse no estudo deste gene no presente trabalho, que teve o objetivo de verificar sua associação com características quantitativas (QTLs) como a produção leiteira e duração da lactação em animais 5/8 da raça Girolando. As frequências genótípicas obtidas (7,55% para o genótipo AA, 27,36% para AB e 65,10% para BB) foram semelhantes às de Renaville *et al.* (1997), porém não houve correlação do polimorfismo *HinfI*-PIT-1 com duração de lactação ou com a produção leiteira média dos animais, surgindo a idéia de continuidade deste estudo buscando analisar a ação independente de cada alelo com as mesmas características.

Palavras-chave: QTL, PIT-1, Polimorfismo, Girolando.

1-Introdução

Estudos sobre nutrição humana na primeira metade do século 20 apontavam os produtos de origem animal como completos, versáteis e saudáveis para os seres humanos, portanto importantes para a saúde. O leite, em especial, parecia ocupar uma posição singular entre os vários alimentos por ser o único durante a primeira parte do desenvolvimento da vida dos mamíferos. Assim, o leite contém tudo que o organismo jovem necessita para o crescimento e desenvolvimento, incluindo, em particular, suficiente concentração de proteínas e minerais. Historicamente na cultura ocidental e em muitas outras culturas, o leite e os produtos lácteos têm sido considerados parte importante de uma dieta balanceada, também para os adultos, por conterem todos os nutrientes importantes para sua nutrição. O leite e os produtos lácteos suprem exigências de alguns nutrientes que seriam difíceis de serem atendidas de outra forma (Madalena *et al.*, 2001).

O grande objetivo da produção agropecuária é o de satisfazer necessidades humanas. Entretanto, no caso do leite, a produção, industrialização e comercialização deste produto e seus derivados, geram atividades econômicas, cabendo então maximizar a eficiência de utilização dos recursos disponíveis para gerar riqueza ou lucro, bem como empregos. Assim, a cadeia do leite deve

objetivar aspectos nutricionais, econômicos, sociais e ambientais (Madalena *et al.*, 2001).

Nas próximas décadas, o conhecimento sobre o controle genético de características economicamente viáveis (ex. produção leiteira) irá aumentar drasticamente, possibilitando a complementação dos métodos tradicionais de melhoramento, visando ganhos genéticos adicionais. Para tal, há a necessidade de otimizar a integração entre a genética molecular e quantitativa no melhoramento animal.

As técnicas em biologia molecular propiciarão uma redução de custos ao produtor, pois a seleção poderá ser feita no início da vida, o que possibilitará a tomada de decisões quanto à finalidade do animal, ou seja, a sua permanência ou não no rebanho, bem como determinar o possível cruzamento que levará ao ganho genético, não sendo necessário esperar este animal atingir a idade adulta para conhecer sua eficiência produtiva. Esta ferramenta para o melhoramento genético poderá ser aplicada a todos os animais, independente do sexo, sendo de suma importância sua utilização em touros, pois são estes os responsáveis pela disseminação genética, influenciando diretamente no aperfeiçoamento do rebanho.

Há uma elevada variação da produção de leite entre vacas mestiças (mesmo entre vacas com graus de sangue, manejo e alimentação igual) e, isto acaba por reduzir a média do rebanho, causando ineficiência do sistema de produção. Uma ação contra isto seria realização de pesquisas, como a utilização de marcadores moleculares da cascata do hormônio do crescimento (GH), que objetivem reduzir a variância da produção, bem como estimular a terceirização para a criação e comercialização de F1.

2-Objetivo

Correlacionar o polimorfismo do gene PIT-1 com a produção média leiteira e com a duração da lactação em bovinos $5/8$ da raça Girolando.

3- Revisão Bibliográfica

3.1-Produção Leiteira

O Brasil é um dos maiores produtores de leite do mundo, ocupando o sexto lugar. A produção nacional (21 bilhões L/ano) é praticamente o dobro da produção da Nova Zelândia e mais do que o dobro da produção da Argentina, que são países considerados referências na produção mundial (Gomes, 2001).

A produção de leite no Brasil vem crescendo a taxas significativas, superiores às taxas de crescimento da demanda, embora o abastecimento interno ainda não seja atendido pela produção doméstica. Isto faz prever a possibilidade de o País alcançar, em breve, sua auto-suficiência (Gomes, 2001).

Tanto sob a ótica social quanto econômica, a cadeia agro-industrial do leite caracteriza-se como uma das mais importantes no agronegócio brasileiro e está presente em todo território nacional, desempenhando um papel relevante no suprimento de alimentos, na geração de emprego e de renda para a população, considerando as suas características de ocupação e de uso de extensas áreas de terra e empregadora de grandes contingentes de mão de obra (Gomes, 2001).

De todas as cadeias produtivas do setor agropecuário, a que mais se transformou, nos últimos anos, foi a do leite. Após meio século de poucas

mudanças, em grande parte explicadas pela forte intervenção do governo no mercado de lácteos, a cadeia produtiva do leite começa, no início dos anos 90, a experimentar profundas transformações em todos os seus segmentos, da produção ao consumo (Gomes, 2001).

Os traços econômicos mais importantes de gado leiteiro são determinados por efeitos da nutrição, meio ambiente, além de fatores genéticos (Parmentier, 1999).

A atual situação econômica da produção de leite exige que os produtores operem com máxima eficiência, para manter a rentabilidade da atividade. Assim sendo, elevado nível de produção de leite e alta eficiência reprodutiva devem ser sempre metas dos criadores para alcançarem alta produtividade e retorno econômico. Assim, otimizar a eficiência reprodutiva seria um dos principais fatores que contribuem para melhorar a performance e lucratividade dos rebanhos (Vasconcelos, 2001).

A união das técnicas de melhoramento clássico com a Genética Molecular surge com o intuito final de produzir não somente em maior quantidade para suprir as necessidades desta crescente população, mas também como forma de melhoria na qualidade desses produtos no mercado (Franco, 2002).

Vacas geneticamente melhoradas, inerentemente são capazes de produzir maiores quantidades de leite com maior eficiência que vacas sem uma melhora genética. Os atuais níveis de produção leiteira são obviamente influenciados fortemente pela alimentação e diversos fatores do ambiente. Mas, se todas as vacas pastarem juntas, as vacas melhoradas geneticamente vão normalmente produzir mais leite que as não melhoradas, não importando se forem melhor ou pior alimentadas (Holmes, 1984).

Independente do ganho genético obtido ao longo dos anos nas populações de gado de leite, o uso da genética molecular pode acelerar este processo. As características que mais serão beneficiadas são aquelas de baixa herdabilidade, como as características reprodutivas e também, aquelas nas quais não exista

nenhum programa bem estabelecido de coleta de informações (por ex. qualidade dos produtos, eficiência alimentar.) (Faria, 2001).

Atualmente, o desenvolvimento tecnológico de computadores e programas estatísticos, aliados a técnicas de biologia molecular, permite aumentar, com mais eficiência, ganhos genéticos em rebanhos (Biase, 2003).

Apesar da genética molecular ser considerada um campo restrito as pesquisas quantitativas, estudos estatísticos já consideram a possibilidade de adicionar *loci* nucleares ou mitocondriais na avaliação genética de rebanhos. Paralelamente, pesquisas são destinadas a identificar *loci* polimórficos e a representatividade de alguns alelos no desenvolvimento de características desejáveis em um programa de seleção (Biase, 2003).

As técnicas da Genética Molecular auxiliam com grande potencial as técnicas clássicas de melhoramento (seleção assistida por marcadores), permitindo com isso a identificação mais rápida e eficiente de animais superiores (Franco, 2002).

Existem basicamente 3 estágios para o uso do DNA no melhoramento animal: 1) localizar polimorfismos no DNA (marcadores) e mapeá-los nos 30 pares de cromossomos bovinos; 2) associar esses marcadores com *loci* de característica quantitativa (QTL); 3) usar esses QTLs em programas de melhoramento genético (Faria, 2001).

Os marcadores são pequenos segmentos polimórficos de DNA que estão no mesmo cromossomo e ligados aos QTLs. Quanto mais próximo o marcador estiver do QTL, mais efetiva será a seleção com o auxílio de marcadores (Faria, 2001).

Existem estudos para selecionar genes candidatos para as características de interesse econômico em gado leiteiro. Uma estratégia consiste no uso da aproximação de genes candidatos. Essa aproximação consiste no estudo de diferentes genes potencialmente envolvidos em processos fisiológicos (ex. síntese de proteína do leite) e na determinação, para cada gene, do alelo que

resulta no fenótipo de interesse. Baseado no conhecimento do controle genético, do já estudado processo fisiológico, a identificação de sítios polimórficos e a avaliação das diferenças alélicas dos genes candidatos, entre animais de diferentes méritos fenotípicos, oferece potencial para identificação de marcadores associados com esse mérito. Os polimorfismos podem afetar diretamente a expressão do gene mudando o “splicing” do RNA, estabilidade do RNA, proporção e regulação de transcrição do gene, ou seqüência do aminoácido do produto do gene (Parmentier, 1999).

Vários estudos têm revelado que um número de genes únicos associados com o crescimento, desenvolvimento e função da mama esteja bastante relacionado com traços de importância econômica (Parmentier, 1999).

3.2- O Girolando

No Brasil, gado mestiço predominantemente é formado pelo cruzamento do Holandês com o Gir. O animal resultante é conhecido como Girolando (Gomes, 2001).

O relato do primeiro Girolando no Brasil, não dista muito tempo. As primeiras notícias do surgimento desses animais datam-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 não poderia ser outro: crias vigorosas nasceram e precocemente chegavam à idade de produção (vacas de alta produção e muito rústicas). Tudo que ansiavam os produtores de leite para ampliação de suas atividades (Menezes, 2002).

Devido ao excelente resultado obtido, a multiplicação destes animais foi acelerada, procurando que o cruzamento do Gir com o Holandês se complementasse com rusticidade e produtividade, 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 pelo País (Menezes, 2002).

Para ser registrado como PS – Puro Sintético da Raça Bovina Girolando, como primeiro requisito, o animal deverá ser Bi-mestiço $5/8$, ou seja, produto do cruzamento de animais com composição racial entre $4,5/8$ de Holandês + $3,5/8$ de Gir ($9/16$) e de $5,5/8$ Holandês + $2,5/8$ de Gir ($11/16$) (Menezes, 2002) (Figura1)

Diagrama I

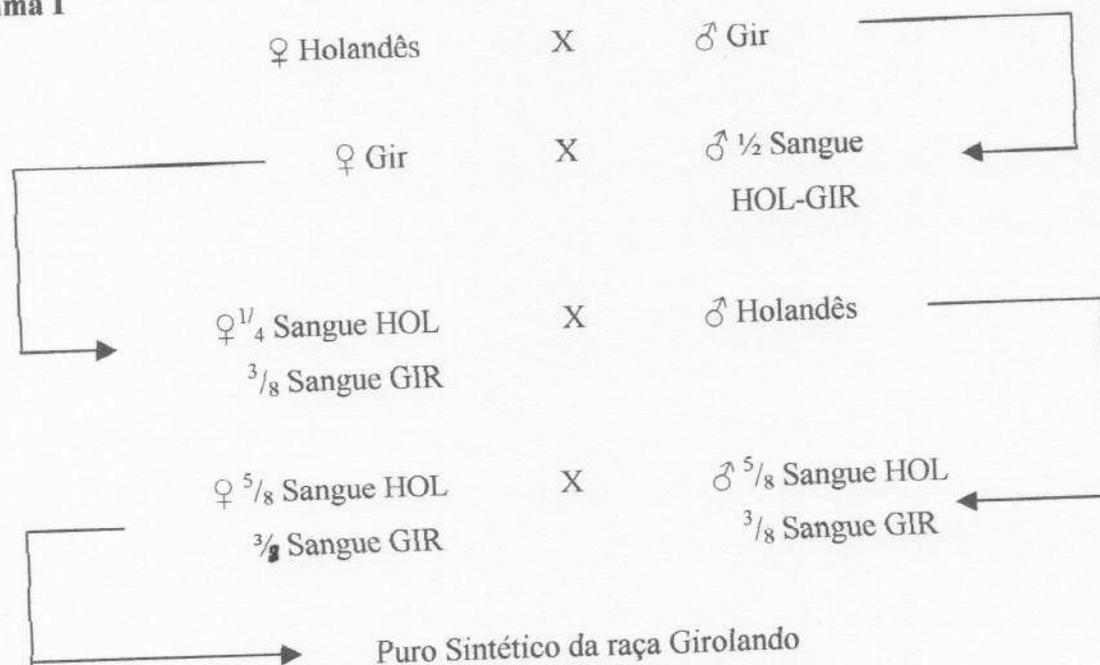


Diagrama II

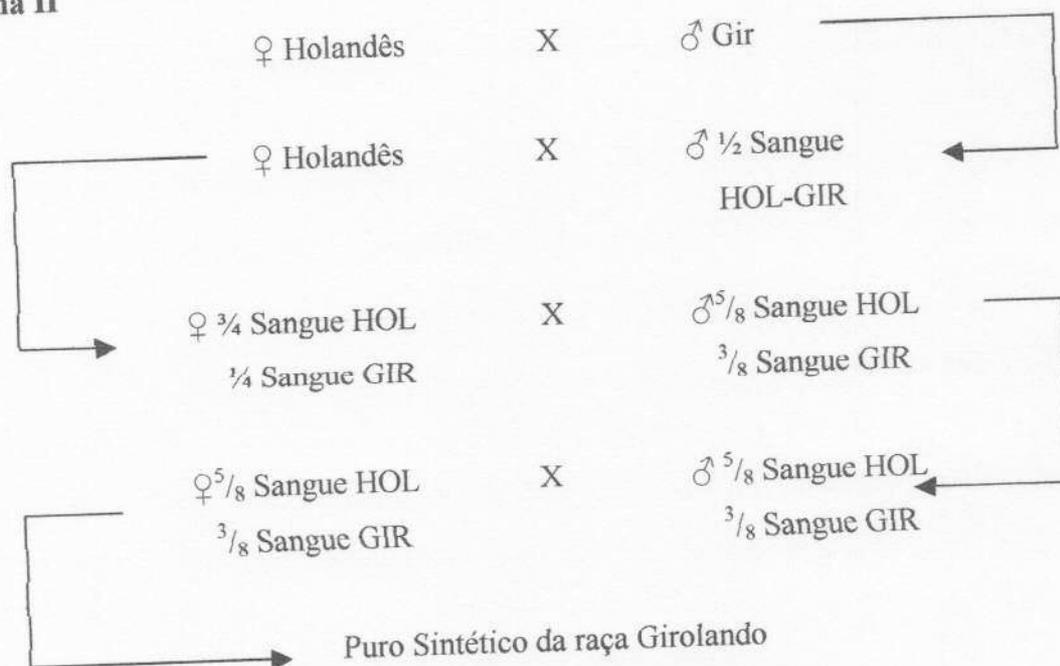


Figura 1: Estratégias de cruzamento para obtenção do Puro Sintético da raça Girolando (Menezes, 2002).

3.3-PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) é uma técnica extremamente sensível e que envolve uma minuciosa e criteriosa otimização. Nenhum protocolo único é apropriado para todas as situações. Toda nova reação requer uma otimização. Os principais e possíveis problemas encontrados em uma reação não otimizada são a não amplificação, a presença de bandas inespecíficas e formação de dímeros de *primers* (Innis e Gelfand, 1990). Esses autores recomendam uma concentração para a Taq DNA Polimerase variando entre 1-2.5 unidades por 100 μ l de reação (Perkin-Elmer). Se usar quantidades muito altas é provável a obtenção de produtos inespecíficos e se a quantidade for muito baixa pode-se obter pequena quantidade de produto. Com relação aos dNTPs uma quantidade variando entre 20-200 μ M de cada um resulta em um rendimento, especificidade e fidelidade ótimas. Quanto menor a quantidade usada maior especificidade e fidelidade são obtidas. A concentração de magnésio é de extrema importância, na medida em que este aumenta a eficiência da Taq DNA polimerase, por ser um co-fator da mesma. A presença de EDTA e outros quelantes presentes no estoque de *primers* e/ou no de DNA molde podem interferir no conteúdo de magnésio, prejudicando a reação. Uma reação de PCR deverá conter de 0,5-2,5mM de magnésio. O tampão recomendado para a reação contém 10-50mM de Tris-HCl (pH 8,3-8,8) (Innis *et al.*, 1988 *apud* Innis e Gelfand, 1990).

3.4-RFLP (Polimorfismo de Comprimento de Fragmentos de Restrição)

A caracterização do polimorfismo de DNA tornou-se possível com a descoberta das endonucleases de restrição da Classe II, capazes de cortar a molécula de DNA em sítios específicos, denominados sítios de restrição. O número de cortes efetuados por determinada enzima de restrição, ocorre em função do número de sítios de restrição presentes ao longo da molécula de DNA. A ocorrência de variação individual no número e no tamanho dos fragmentos formados pela digestão do DNA foi demonstrada por Grodzicker *et. al.* (1974 apud Regitano 2001) em adenovírus. Essa variação é o resultado de mutações de ponto, que eliminam ou criam sítios de restrição para determinada enzima, podendo também resultar de eventos de inserção ou de deleção entre dois sítios de restrição adjacentes. Essa variação foi denominada polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP, sigla derivada do termo inglês *restriction fragment length polymorphism*.

O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita. A presença ou ausência de seqüências específicas de 4 a 8 pares de bases, reconhecidas e clivadas, pelas enzimas de restrição, pode variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo (Ferreira, 1998).

A presença de variações nas seqüências de DNA que criam ou eliminam sítios de reconhecimento para endonucleases de restrição, foi dito que resulta nos polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição ou RFLP. Nos eucariotos superiores, esses polimorfismos foram originalmente descritos utilizando a técnica de *Southern Blot*, descoberta por Southern (1975), seguida de hibridização com uma sonda para revelar apenas os fragmentos complementares (Regitano, 2001).

Com o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), novos procedimentos para a análise de RFLPs passaram a ser utilizados. A principal vantagem da análise de polimorfismos de restrição utilizando a PCR (PCR-RFLP), quando comparada à técnica original, é o fato de que apenas o segmento de DNA que abriga o sítio polimórfico de restrição é amplificado para posterior análise; outras vantagens seriam o baixo custo desta técnica e a quantidade de DNA genômico, a qual pode ser utilizado em pequenas quantidades. Como resultado, após a clivagem com a enzima de restrição apropriada, um número limitado de fragmentos é obtido, que podem ser facilmente discriminados de acordo com o tamanho (Regitano, 2001).

3.5-Marcadores Moleculares

Marcadores genéticos são variações herdáveis que podem ser usados para entender eventos genéticos, tendo varias aplicações. Para ser útil como marcador, as variações herdáveis devem ser polimórficas, necessitando haver duas ou mais variações comuns na população em estudo. O autor ressalta que um marcador pode ser um gene funcional, no entanto não é a função que é de total interesse, mas sim as variações da estrutura do DNA, que são refletidas em diferenças funcionais entre alelos. Este mesmo autor observou que um marcador genético pode também ser um segmento do DNA sem função conhecida ou que é conhecido por não ter uma função (Gargalhoni, 1999).

Os 29 pares de cromossomos autossomais e os cromossomos sexuais do bovino são constituídos por no mínimo 50% de seqüências repetitivas de DNA, sendo metade destas de seqüências altamente repetitivas. Estas regiões são especialmente apropriadas para o desenvolvimento de marcadores moleculares anônimos (TIPO II), os quais marcam uma determinada posição em um

cromossomo, sem serem genes funcionais, em contraste com os marcadores tipo I ou genes funcionais. Atualmente foram identificados mais de 200 marcadores genéticos em bovinos (tipos I e II) (Thaler Neto, 2000).

A tecnologia de marcadores moleculares ou genes são vistas como as de maior promessa para uso no melhoramento genético. A seleção assistida por marcadores (MAS), está sendo considerada como um dos melhores métodos para a incorporação da genética molecular em programas de melhoramento para aumentar a eficiência da seleção (Almeida, 2002).

Qualquer segmento de DNA ou RNA que esteja acompanhado por uma característica fenotípica é considerado um marcador molecular (Franco, 2002).

3.6-QTLs (*Quantitative Trait Loci*)

Por definição, QTLs – “*Quantitative Trait Loci*” – são regiões cromossômicas relacionadas com a variação fenotípica das características quantitativas. Como poucos *loci* economicamente importantes são conhecidos, os QTLs não têm suas bases moleculares definidas, estes atualmente têm sido referidos mais como uma associação estatística do que propriamente como uma entidade biológica, sendo a herança acompanhada pelos marcadores. Portanto, os QTLs têm sido identificados como associações estatísticas entre os dados relativos a uma região genômica e a variabilidade fenotípica existente entre populações segregantes. Por ser caracterizado por análises estatísticas, os QTLs podem ter a magnitude de seus efeitos mensurada e avaliada em diferentes circunstâncias (Guimarães, 1999).

A localização de um dado QTL pode ser inferida pela identificação de marcadores mais fortemente associados com o surgimento de um determinado fenótipo. Para análise de QTLs, únicos, o ponto que obter valor máximo no teste

estatístico, é uma estimativa razoável para a localização do QTL (Guimarães, 1999).

A principal expectativa da aplicação dos QTLs identificados é a seleção auxiliada por marcadores (MAS). A fim de possibilitar a implementação desta metodologia torna-se necessário um mapeamento genômico dos QTLs identificados e o aprimoramento de técnicas estatísticas que permitam um balanceamento adequado entre as informações moleculares e do fenótipo, visando um ganho genético tanto em termos de genes de efeito maior como de poligenes (Thaler Neto, 2000).

3.7-GH (Hormônio do crescimento)

O esquema abaixo (Figura2) ilustra as principais interações gênicas envolvidas na expressão do GH.

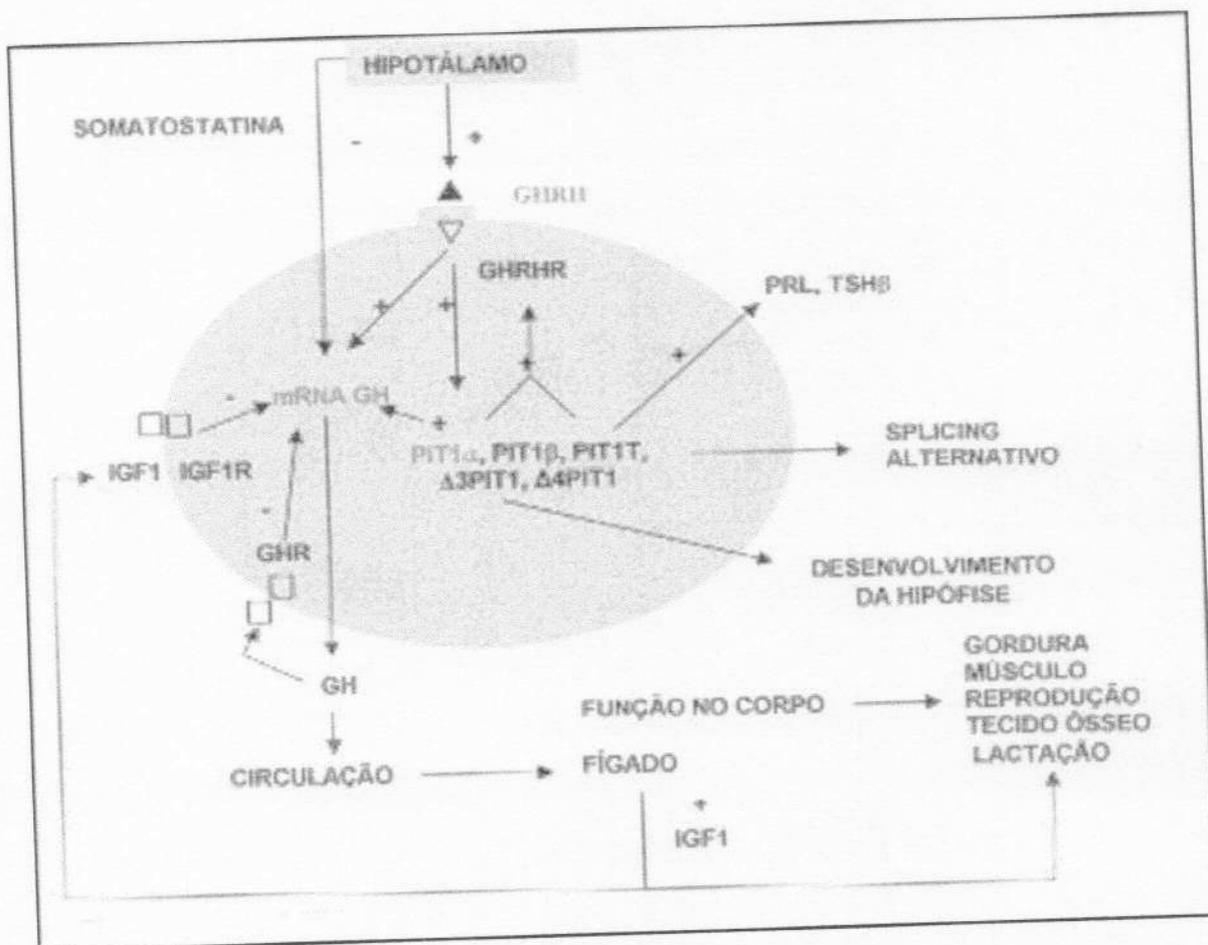


Figura 2: Representação esquemática mostrando interações entre alguns genes que participam da via metabólica de regulação da expressão do hormônio do crescimento, na Glândula Hipófise. O sinal - representa um estímulo negativo para a expressão de um determinado gene e o sinal + um estímulo positivo; □□ e ▽▲ representam interações proteína-receptor.

O gene GH pertence a uma grande família que inclui GH, prolactina (PRL) e os lactógenos concentrados, os quais acreditava-se terem surgido como resultado de uma duplicação do gene (Tuggle, 1996).

Na maioria dos mamíferos, GH é um gene único, no entanto, em primatas, houve uma duplicação extra para gerar um cluster de genes tipo GH, em uma localização genômica única. Estes incluem dois genes GH, GH-N e GH-V, e três lactógenos placentários menos relatados. Estes últimos juntamente com o gene GH-V são expressos em tecidos placentários, ao passo que, somente o gene GH-N é expresso em somatotrofos e pituitários. O gene GH tem 5 éxons e 4 íntrons, cobrindo aproximadamente 2,6 a 3 Kbps, na maioria de espécies de mamíferos (Borges, 1997).

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 liberação 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 é primariamente controlada por dois peptídeos hipotalâmicos neurosecretórios; o estimulatório GHRH (fator de liberação do GH) e o inibitório SS (somatostatina) (Burton, 1994).

Stress, sono, e exercício podem acentuar a produção de GHRH, aumentando os níveis de GH no soro. GH é liberado dentro da circulação em pontos secretores que são mais pronunciados em machos que em fêmeas. GH do soro pode ainda se ligar a receptores de superfície (GHRs) em tecido alvo como muscular, adiposo, ósseo e fígado. Isso causa um aumento de IGF-1 (*Insulin-like Growth Factor 1*) na concentração do soro. IGF-1 tem efeito promotor do crescimento e pode gerar um feedback nos tecidos para desencadear respostas. Além disso, altos níveis de IGF-1 no soro, inibem liberação de GHRH e GH (Kopchick, 2000).

Essencialmente sobre controle do GHRH (fator liberador de GH hipotalâmico) e de somatostatina, o GH tem uma ação tecido-específica que

pode ser direta, através do receptor de GH (GHR) ou indireta através de IGF-1. Os efeitos dessa ação são modulados por diversos outros hormônios. Alguns parâmetros da secreção de GH (por exemplo, frequência de picos de GH, secreção total diária de GH, ou resposta do GH à estimulação por GHRH) estavam associados com altos valores genéticos em estudos comparando secreção de GH de linhagens de gado mais altamente selecionadas (Parmentier, 1999).

O GH é responsável pela regulação dos vários aspectos metabólicos relacionados aos processos de crescimento e da lactação em bovinos (Dukes, 1990).

Devido à sua diversidade de ações, o GH tornou-se um candidato em potencial como marcador do desempenho dos animais para estas características fenotípicas (Gargalhane, 1999).

Dois tipos de receptores de GH são descritos, segundo Rodrigues *et al.*, (1998). Estes autores citam que no fígado, o GH estimula a produção dos mediadores de sua ação, ou seja, as somatomedinas ou fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFBP), as quais entram na circulação sanguínea e são transportadas aos tecidos alvos, onde exercem múltiplas ações. Os efeitos do GH podem ser divididos em ações metabólicas (catabolismo de gorduras e glicose) e ação hipertrófica (anabólica ou de crescimento), possuindo atividade lipolítica, atuando no metabolismo de carboidratos e minerais, regeneração tecidual e ação lactogênica. Ele tem uma ação crônica sobre o metabolismo, por redirecionar a divisão e o uso de nutrientes absorvidos em favor da produção de leite em bovinos. Na lactação, o GH age aumentando o fluxo sanguíneo do úbere (aumento da perfusão), para maior captação de precursores do leite. Propuseram que, provavelmente ocorra uma diminuição na resistência vascular mamária, pela produção de vasodilatadores locais.

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

3.8-PIT-1(Fator de transcrição pituitário-específico)

PIT-1 tem sido identificado como um fator transcricional pituitário-específico que regula a expressão dos genes do hormônio do crescimento (GH) e da prolactina (PRL) na adeno-hipófise (Bodner *et al.*, 1988; Ingrahan *et al.*, 1988; Nelson *et al.*, 1988 apud Moody, 1995).

PIT-1 é um membro descoberto dos genes da família do domínio POU, definido em 1988 quando diversos genes reguladores da transcrição (dentre eles o PIT-1), foram clonados e um segmento comum entre eles foi descoberto de acordo com Tuggle (1996). O mesmo autor mostrou que uma forte evidência genética a respeito do requerimento por PIT-1 na expressão do GH, PRL e TSH β foi obtida em análises de varias linhagens de Dwarf mouse (ratos anões). Recentes análises envolvendo o fator de transcrição PIT-1 mostraram que o PIT-1 não ativa diretamente o gene GH e que outros fatores adicionais não conhecidos existem, os quais sua identificação é necessária para o total entendimento da ativação do gene GH.

A proteína codificada pelo PIT-1 tem participação na síntese de hormônios secretados na adenohipófise de mamíferos. A expressão dos hormônios do crescimento, adenocorticotrópico, tireóideo estimulante, luteinizante, folículo estimulante e prolactina, é regulada tanto pela proliferação de suas células secretoras com via receptor de membrana para liberação de sinais que induzem a liberação dos hormônios (Biase, 2003).

O polimorfismo de DNA no PIT-1 está envolvido na expressão do RNA do GH, e isto reforça a possibilidade deste polimorfismo vir a ser um marcador para características de produção que estão ligadas às funções fisiológicas do GH (Franco, 2002). Este mesmo autor sugeriu que o gene PIT-1 é que esteja, através do GH, determinando os efeitos, nas características de desempenho e carcaça em suínos Landrace. Considerou ainda que outros genes estão envolvidos na expressão destas características e que podem estar nessa região.

4- Material e Métodos

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular, do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia – MG.

4.1-Material Biológico

O material biológico utilizado neste trabalho foi amostras de sangue coletadas de 216 fêmeas de bovinos $5/8$ da raça Girolando, provenientes de diversas fazendas dos Estados de Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Bahia e Rio de Janeiro. Optou-se por um animal $5/8$ para que não apresentar um grau de sangue nem mais próximo ao Holandês e nem mais próximo também ao Gir. Foi retirada amostra de sangue de cada animal, colhido na veia mamária, em *vacutainers* com solução anticoagulante e usando uma agulha para cada indivíduo. Este material era então colocado sob resfriamento em caixas de isopor, contendo gelo reciclável, até sua chegada ao Laboratório de Genética Molecular, onde era estocado em uma Câmara Fria à 4°C por dois dias, em posição vertical, de forma a permitir a sedimentação dos eritrócitos e leucócitos, sendo estes últimos utilizados na posterior extração de DNA.

4.2-Extração de DNA

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

Foram retirados 500 µl de sangue fresco, tomado na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação (camada de leucócitos) e colocados em tubos de 2ml. Posteriormente, 1ml de tampão de lise não-diluído (20mM TrisHCl PH 7,5, 640mM sucrose, 10mM MgCl₂, 5mM EDTA, 4%TRITON X100) era adicionado para uma leve agitação e incubação em gelo por 5 – 10 minutos. O material era centrifugado a 4000g (~8000rpm) por 3 minutos, do qual se descartava o sobrenadante e adicionava 1ml de tampão de lise diluído para que pudesse ser incubado em gelo por 5 – 10 minutos.

O material era então centrifugado novamente a 4000g por 3 minutos e a lavagem com o tampão de lise era repetido até que o “pellet” ficasse opaco para então se descartar o sobrenadante e acrescentar 100µl de TE (tampão de extração) + sarcosyl 1% e 10ml de proteinase K (10mg/ml). Após esses procedimentos, a amostra era incubada overnight.

No outro dia, 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”. Adicionavam-se então 800µl de isopropanol e aguardava-se a precipitação do DNA para que pudesse ser centrifugado novamente a 4000g, mas por 5 – 10 minutos. O sobrenadante era descartado e a operação de lavagem do “pellet” era repetida por mais 2 vezes com isopropanol 60% ou etanol 70%.

Os tubos eram 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).

4.3- PCR-RFLP- Restrição enzimática

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 otimização da reação de PCR-RFLP foi realizada sob as seguintes condições: 1U Taq DNA polimerase, 10 pmoles de cada *primer*, 8nM de dNTPs, 3,0 µl de tampão (10X) contendo 1,5 mM de MgCl₂, 1,5µl de DNA e completar o volume para 30µl com água em tubos de 50µl submetidos a 30 ciclos com a seguinte programação:

- Passo 1: 95°C/5 minutos
- Passo 2: 95°C/30 segundos (desnaturação)
- Passo 3: 56°C/1 minuto (anelamento)
- Passo 4: 72°C/1 minuto (extensão)
- Passo 5: voltar ao passo 2 por 29 vezes
- Passo 6: 72°C/5 minutos
- Passo 7: 4°C/1 hora

Nestas reações, foi utilizado um par de primers descrito por Wollard *et al* (1994): 5'-AAACCATCATCTCCCTTCTT-3'

5'-AATGTACAATGTGCCTTCTGAG-3'.

A amplificação pode ser observada através da aplicação de 10(L da amostra em gel de agarose de 1,5%, corados com Brometo de Etídio (10µg/ml) sob corrente elétrica de 120V por 30 minutos e visualizados através de raios ultravioleta pelo sistema VDS® (Pharmacia Biosciences), sendo que, depois de verificado resultados satisfatórios, o restante dos produtos amplificado na PCR foi submetidos a uma digestão enzimática com a enzima *HinfI* (2 U da enzima; 2,0µl do tampão da enzima (10X); 20µl de

5-Resultados e Discussões:

Na extração de DNA genômico, do sangue dos animais analisados, obteve-se amostras de ótima qualidade como pode ser visto na Figura 3.

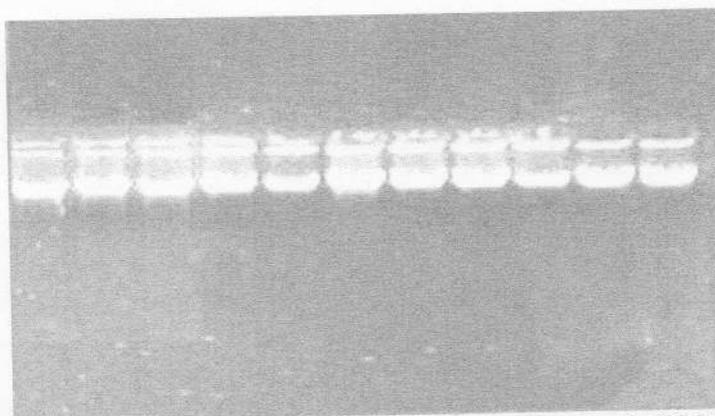


Figura 3: Gel de Agarose 0,8% com amostras de DNA genômico extraído segundo o método descrito em *A Workshop on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources* (1992), modificado por Borges (1997).

O fragmento esperado, de 451pb, como produto amplificado por PCR, foi obtido em todas amostras testadas, como observado na Figura 4.

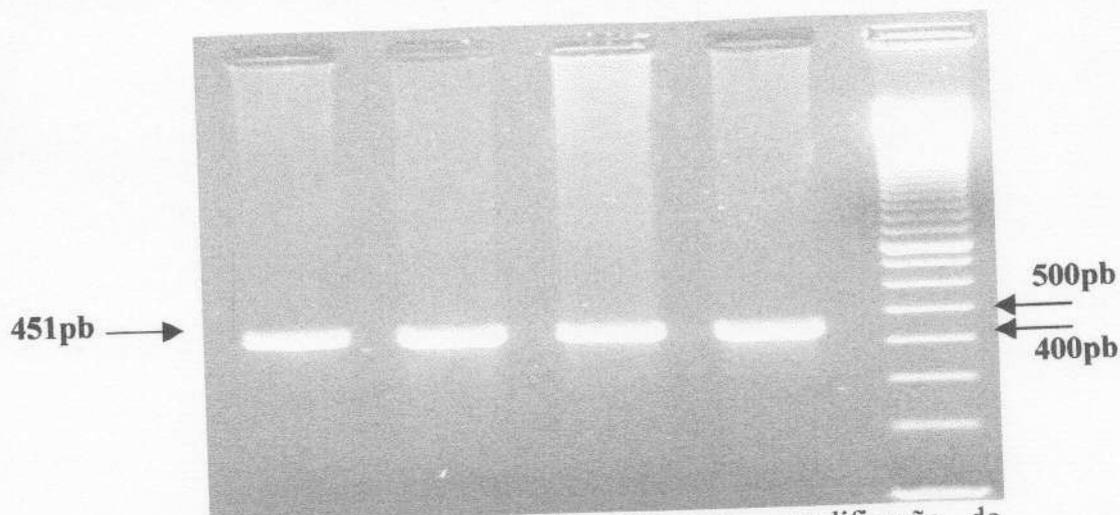


Figura 4: Otimização da PCR para amplificação do fragmento de 451pb do gene (PIT-1), mostrado por eletroforese em gel de agarose 1,5%.

A digestão do produto amplificado com a enzima *HinfI* revelou fragmentos de 451pb para indivíduos de genótipo AA, mostrando que este alelo não era digerido pela enzima; foram observados ainda fragmentos de 244 e 207 pb para os indivíduos BB, o que permitiu afirmar a presença de um sítio único de restrição para a enzima no alelo B. Por fim, o genótipo heterozigoto AB é representado pelos fragmentos de 451, 244 e 207 pb, como mostra a Figura 5.

Os padrões das bandas gerados com *HinfI* foram mostrados por Renaville(1997).

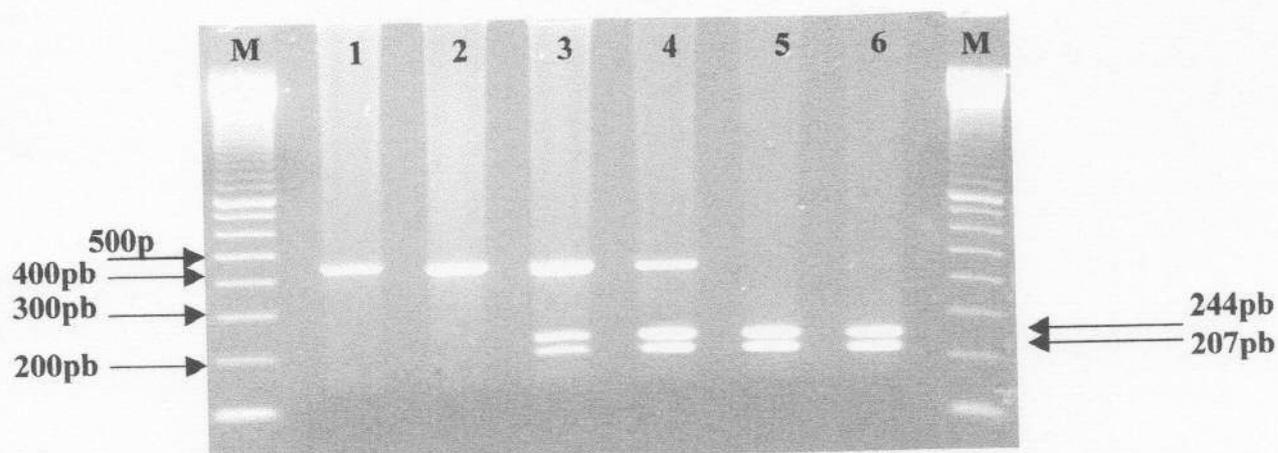


Figura 5 - Padrão dos genótipos *HinfI* PIT-1. M-Marcador de peso molecular de 100pb; as canaletas 1 e 2 mostram o genótipo AA; as canaletas 3 e 4 mostram o genótipo AB; as canaletas 5 e 6 mostram os genótipos BB, para PIT-1; visualizados em gel de agarose 2% após digestão enzimática.

A frequência alélica foi estimada em 21,23% e 78,78% para A e B, respectivamente e, uma frequência genotípica de 7,55% para o genótipo AA, 27,36% para AB e 65,10% para BB.

Renaville, *et al.* (1997), analisando 89 animais da raça Holstein-Friesian, verificou através do uso de *HinfI*, que o genótipo AA foi menos freqüente (2,2%) que os genótipos AB (31,5%) e BB (66,3%), assemelhando com o presente trabalho, o que pode ser observado no parágrafo anterior e ilustrado na Tabela 1.

Tabela 1: Comparação de frequências genotípicas dos estudos de Renaville *et al.*(1997) em animais da raça Holstein-Friesian e, presente estudo (2003) com animais da raça Girolando (trabalho atual).

GENÓTIPOS	AUTORES	
	Renaville <i>et al</i>	Presente estudo
AA	2.2%	7.55%
AB	31,5%	27.36%
BB	66,3%	65.10%

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
PIT-1	2	1238.70	0.11	0.89
LACTACAO	1	9895.17	0.87	0.35
Erro	465	11350.00		
Total	468			

$$R^2 = 0.002339; CV = 38.47551$$

GL:Grau de Liberdade; F: teste F (Snedecor); P: probabilidade de erro; R^2 : quadrado da soma dos desvios; CV: Coeficiente de Variação

Duração média: 276.91

A Tabela 2 mostra que não houve diferenças significativas entre as classes genotípicas (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.

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

Origem da Variação	GL	Quadrados Médios	Valor de F	Pr>F
PIT-1	2	71.19	0,22	0.80
LACTACAO	1	0.19	0,00	0.98
Erro	465	316.00		
Total	468			

$R^2 = 0.000966$; $CV = 125.7746$

GL: Grau de Liberdade; F: teste F (Snedecor); P: probabilidade de erro; R^2 : quadrado da soma dos desvios; CV: Coeficiente de Variação

Média de produção: 14.15569296

Verifica-se na Tabela 3 que o efeito da covariável (ordem de lactação) não foi significativo ($P < 0,9806$). Teste F para igualdade das médias das classes genotípicas não foi significativo, indicando que nenhuma delas diferem-se estatisticamente entre si.

TABELA 4: Comparação de médias para duração da lactação e produções médias de leite ajustadas em função da ordem de lactação

Genótipos	Duração da Lactação	Produção Média	Produção Total
	(Nº de Dias)	Diária (kg)	Média (kg)
AA	270.30	13.26	3.584,18
AB	279.68	13.46	3.764,50
BB	276.31	14.57	4.025,83

Analisando a Tabela 4, é possível perceber que a diferença entre as classes genotípicas não foi estatisticamente significativa quanto à duração média, em dias, da lactação, o que não nos permite afirmar a associação do polimorfismo

do gene (PIT-1) com a duração da lactação. O mesmo pode ser observado em relação às produções médias leiteiras ajustadas, mostrando uma não correlação genotípica (PIT-1) com este dado. Mas ao analisar a produção média total, podemos perceber que os animais com genótipo BB em relação aos de genótipo AA, tiveram uma produção de 441,65kg a mais de leite e uma produção de 261,33kg superior à produção de animais AB, nos permitindo sugerir uma correlação ou influência positiva do alelo B nas características analisadas, ou até mesmo uma influência negativa do alelo A nestas características.

Yu *et al.* (1994), estudando o mapeamento de genes ligados a características de carcaça e qualidade de carne (suína), detectaram maior relação de polimorfismos PIT-1 e microssatélites flanqueando este gene com características fenotípicas nas fases iniciais de vida dos animais, sugerindo uma provável expressão dependente da idade para o PIT-1, onde este seria mais expresso nas fases iniciais da vida do animal.

Um trabalho que reforça essa hipótese da expressão de PIT-1 estar relacionada com a idade é o de Matteri e Carroll (1997) que, trabalhando com animais jovens, observaram diferenças nas relações de expressão de vários genes estudados de acordo com a idade dos animais.

Franco (2002), analisando suínos, cita que pelo fato deste gene, talvez ser mais importante nas fases iniciais do desenvolvimento fetal e fases iniciais da vida do animal e não ser tão expresso ou importante na fase adulta dos mesmos, talvez seu uso seria um tanto quanto limitado como marcador. Isso não descartaria o seu uso como marcador, pois pelo fato do PIT-1 estar relacionado com a quantidade de GH expresso em animais adultos, um animal crescendo e se desenvolvendo mais rápido até por volta da puberdade, pode-se esperar que este animal alcançará peso para o abate mais precocemente.

De acordo com os autores citados anteriormente e, analisando os resultados deste trabalho, poderia ser sugerido uma seleção de animais com

idade menos avançada, a fim de correlacionar, da mesma forma como foi feito, seus genótipos com a produção média leiteira e com a duração da lactação.

Renaville *et al.*(1997) argumentou que seus resultados indicavam que o alelo A (PIT-1) influenciou significativamente em diversas características de produção de seus animais, inclusive na produção leiteira. Apesar de seu resultado, este autor afirmou a necessidade de aumento do número de animais analisados para uma melhor confiabilidade do seu trabalho (89 animais). Tal medida é importante, na medida em que quando se analisava estatisticamente, por regressão linear, apenas 138 animais, dos 212 analisados, havia correlação significativa entre o genótipo dos animais com a duração da lactação e produção média de leite.

Talvez um novo aumento no número de animais a serem analisados e uma maior variedade de regiões a serem coletadas amostras de sangue, a título de verificar o efeito do ambiente, possa acabar por modificar os resultados deste trabalho.

Uma sugestão seria também, empregar uma análise por “imprinting gamético”, onde poderia se verificar a influência do gene em relação ao sexo dos progenitores dos animais analisados.

Uma análise das influências do meio ambiente também é válida, principalmente em termos de clima das regiões de onde provém os animais. Apesar do manejo dos animais ter sido praticamente o mesmo (silagem de milho e ração) em todas fazendas, uma análise de sua influência também seria importante.

6-Conclusões

Nenhum genótipo analisado, dentro do polimorfismo *HinfI*-PIT-1 apresentou correlação significativa com a duração da lactação ou produção média leiteira dos animais $5/8$ da raça Girolando, não podendo descartar a hipótese de sua correlação com estas características devido à possibilidade existente do aumento do número de animais a serem analisados. A comparação das produções leiteiras totais de cada genótipo também reforça a idéia de que possa haver uma correlação do polimorfismo do PIT-1 com as características citadas anteriormente, para uma possível confirmação deste fato, deve ser feita uma substituição alélica por regressão linear a fim de perceber uma influência ou não dos alelos, independentemente. Outra idéia seria aplicar análise de variância nas produções totais de leite como forma de verificar se o fato de animais com genótipo BB estarem produzindo mais leite em relação à animais com os genótipos AB e AA, seja estatisticamente significativo, o que poderia gerar a idéia de que o alelo A estaria agindo negativamente ou o alelo B estaria agindo positivamente na produção leiteira.

7- Referências Bibliográficas

- ALMEIDA, J. F. **Análise do polimorfismo HINF I do gene Obese por PCR-RFLP sobre diferentes características de desempenho em suínos Landrace.** Monografia, 2002.
- BIASE, F. H. **Associação de Marcadores Moleculares a Características de Produção na Raça Nelore.** Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. 51 p., 2003.
- 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.. and KENNELLY, J. J. **A review of bovine growth hormone.** Can. J. Anim. Sci., v.74, p.167-201, 1994.

DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 10 ed. São Paulo. [S.I.S.n] 780p., 1990.

FARIA, V. P. **Avanços e desafios em P&D no segmento da produção da cadeia agroalimentar do leite no Brasil**. In: Cadeia de Lácteos no Brasil: Restrição ao seu desenvolvimento. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite. p. 166-213, 2001.

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

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

FRANCO, M. M. **Genes da Via do Hormônio do Crescimento e Desempenho de Suínos**. Tese 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.

GOMES, A. T., LEITE, J. L. B., CARNEIRO, A. V. **O agronegócio do leite no Brasil**. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite, 262 p., 2001.

GOMES, S. T. **Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil**. In: Cadeia de Lácteos no Brasil: Restrição ao seu desenvolvimento. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite. p. 21-37, 2001.

- GOMES, S. T. **Avanços sócio-econômicos em sistemas de produção de leite.**
In: Cadeia de Lácteos no Brasil: Restrição ao seu desenvolvimento. Juiz de Fora: EMBRAPA Gado de Leite. p. 141-156, 2001.
- GODZICKER, T., WILLIAMS, J., SHARP, P., SAMBROOK, J. **Physical mapping of temperature – sensitive, mutations of adenoviruses.** Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology, v.39, p.439-446, 1974
apud REGITANO, L. C. A. **Introdução à análise de marcadores moleculares.** In: *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.* p. 25-39, 2001.
- GUIMARÃES, S. E. F. **Análise de marcadores genômicos e detecção de QTLs e genes candidatos em melhoramento animal.** In: *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal.* p.382-418, 1999.
- HOLMES, C. W. and WILSON, G. F. **Milk Production from Pasture.** Butterworths of New Zeland. 319p., 1984.
- INNIS, M. A. and GELFAND, D. H. **Optimization of PCRs.** 3-12. In: INNIS, M. A.; GELFAND, D. H.; SNINSKY, J. J. and WHITE, T. J. (Ed.). *PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press, Inc., San Diego, California 92101. Academic Press Limited, 24-28 Oval Road, London. 492 p., 1990.
- INNIS, M. A.; MYAMBO, K. B.; GELFAND, D. H. and BROWN, M. A. D. **DNA sequencing with *Thermus aquaticus* DNA polymerase and direct sequencing of polymerase chain reaction-amplified DNA.** Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85 p., 1988.

- KOPCHICK, J. J., and ANDRY, J. M. **Growth hormone (GH), GH receptor and signal transduction.** In: Molecular Genetics and Metabolism 71, 293-314, 2000.
- MADALENA, F. E., MATOS, L. L., HOLANDA JÚNIOR, E. V. **Produção de leite e sociedade: Uma análise crítica da cadeia do leite no Brasil.** Belo Horizonte: FEPMVZ. 538p., 2001.
- MATTERI, R. L. and CARROLL, J. A. **Somatotroph function in the neonatal pig.** Domestic Animal Endocrinology, Jul. 14(4):241-249, 1997.
- MENEZES, C. **O programa girolando.** In: Curso Intensivo de Julgamento da Raça Girolando, 6., 2002.
- MOODY, D. E., POMP, D., BARENDSE, W. **Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT1 gene and assignment of PIT1 to bovine chromosome.** Animal genetics, v.26. p.45-47, 1995.
- PARMENTIER, I., PORTETELLE, D., GENGLER, N., PRANDI, A., BERTOZZI, C., VLEURICK, L., RENAVILLE, R. **Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection.** Domestic Animal Endocrinology, 17. P. 139-148, 1999.
- REGITANO, L. C. A. **Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP).** In: Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal. p. 187-194, 2001.

- REGITANO, L. C. A. **Introdução à análise de marcadores moleculares.** In: *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.* p. 25-39, 2001.
- RENAVILLE, R., GENGLER, N., VRECH, E., PRANDI, A., MASSART, S., CORRADINI, C., BERTOZZI, C., MORTIAUX, F., BURNY, A. and PORTETELLE, D. **Pit-1 Polymorphism, Milk Yield and Conformation Traits for Italian Holstein-Friesian Bulls.** *J Dairy Sci* 80:3431-3438, 1997.
- RODRIGUES, C. V., PINHEIRO, L. E. L., GUIMARÃES, S. E. F. **Mecanismos genéticos de crescimento e lactação em bovinos relacionados ao hormônio do crescimento (GH) e aos fatores envolvidos na sua ação.** *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.22, n.1, p.27-35, 1998.
- SOUTHERN, E. M. **Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis.** *J. Mol. Biol.* 98:503-517, 1975.
- THALER NETO, A. **Situação Atual e Perspectivas da Utilização da Genética Molecular no Melhoramento de Bovinos Leiteiros.** III Simpósio Nacional de Melhoramento Animal
- TUGGLE, C. K. and TRENKLE, A. **Control of growth hormone synthesis.** *Domestic animal endocrinology.* V.13(1). P.1-33, 1996.
- VASCONCELOS, J. L. M., SANTOS, R. M. **Novos conceitos em reprodução de vacas leiteiras.** Simpósio internacional sobre produção intensiva de leite, 5. p.59-80, 2001.

YU, T. P., SCHMITZ, C. B., ROTHSCHILD, M. F. and TUGGLE, C. K.
**Expression pattern, genomic cloning and RFLP analyses of the swine
PIT-1 gene.** *Animal Genetics* 25:229-233, 1994.

WOOLARD, J., SCHMITZ, C. B., FREEMAN, A. E. and TUGGLE, C. K.
Rapid communication: *HinfI* polymorphism at the bovine PIT-1 locus. *J.
Anim. Sci.* 72:3267, 1994.