

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

SISBI/UFU



1000221438

mon
591.151
Q3pl
TOS/MBM

**POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO
LIBERADOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E
SEU EFEITO NOS ÍNDICES PRODUTIVOS E
REPRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA
GIROLANDO**

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Uberlândia – MG
2003

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO
LIBERADOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E
SEU EFEITO NOS ÍNDICES PRODUTIVOS E
REPRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA
GIROLANDO**

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área Genética)

Uberlândia – MG
2003

Universidade Federal de Uberlândia
Instituto de Genética e Bioquímica
Pós-Graduação em Genética e Bioquímica

**POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO LIBERADOR
DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E SEU EFEITO NOS
ÍNDICES PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS EM BOVINOS
DA RAÇA GIROLANDO**

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores: Prof. Dr. Edmundo Benedetti
Dr. Maurício Machaim Franco

Data de Defesa: ___ / ___ / ____

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da
Dissertação foram contempladas

Uberlândia, ___ / ____ / ____

**“Tudo isso foi dito para que possamos compreender
plenamente o mistério de Deus, Cristo,
em quem todos os tesouros da sabedoria
e do conhecimento estão ocultos”.**

Carta do Apóstolo Paulo aos Colossenses 2: 2 e 3

Ao meu marido, aos meus pais, à minha irmã

Por serem as pessoas mais importantes da minha vida

A vocês

Dedico

AGRADECIMENTOS

Um dia, na eternidade passada, Alguém idealizou a minha vida, Alguém desejou minha existência, Alguém se alegrou com a possibilidade de me trazer a este mundo e, no Seu tempo, moveu Seus recursos e me fez nascer. Esta Pessoa maravilhosa é Deus, meu criador, a Quem eu devo tudo que sou como ser humano: corpo, alma e espírito – vida natural, psicológica e espiritual. A Ele eu pertença por direito de criação e de redenção e, por causa dos dons naturais com que me presenteou, é que cheguei a este momento de minha vida: a realização deste Projeto.

Aceita, Senhor, minha gratidão a Ti.

As pessoas abaixo relacionadas são especiais para mim. Todas elas tiveram participação importante neste Projeto. Cada uma contribuiu com o que possuía, e doou, com liberalidade, aquilo de que eu precisava: orientação, conhecimento, sabedoria, correção, talento, técnica, sugestões... amor, compreensão, paciência...

São elas:

Meu marido, meus pais e minha irmã: especialíssimos!

Prof. Dr. Luiz Ricardo: meu paciente e sábio orientador.

Prof. Dr. Edmundo Benedetti: meu dedicado e otimista coorientador.

Dr. Maurício Machaim: meu amigo e conselheiro.

Prof. Dr. Heyder Diniz: análise estatística.

Rossana: amiga e companheira de trabalho.

Grupo Girolando, Fausto, Paula, Júlio, Marcelo e Tatiane: convivência e ajuda no desenvolvimento deste Projeto.

Prof. Dr. José Antônio Galo: cooperação dedicada e inteligente.

Prof^a. Janice Torquette: correção do texto.

Produtores da Associação dos Criadores do Girolando: disponibilidade dos animais.

Se eu fosse citar tudo que fizeram por mim, a lista seria enorme. Eu sei, e vocês também sabem. Isto basta para a nossa alegria!

As Instituições abaixo foram essenciais:

Associação Brasileira dos Criadores do Girolando: da qual me veio o apoio financeiro.

Laboratório de Genética Molecular: que me forneceu o conteúdo científico, indispensável a este Projeto.

Hemocentro Regional de Uberlândia: que me cedeu o espaço físico para a Defesa do Mestrado.

Muito obrigada a todos que me abriram estas portas. Que elas nunca se fechem para outros que, como eu, precisem de sua ajuda.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS	xii
RESUMO	1
ABSTRACT	2
INTRODUÇÃO	3
1. Atividade Leiteira no Brasil	4
2. Fatores que Afetam a Produção de Leite	6
2.1 Fatores Referentes ao Animal	7
3. Interações Hipotálamo-Hipófise envolvidas na Via do Hormônio do Crescimento	8
4. Melhoramento Genético de Bovinos de Leite	19
4.1 Seleção de Gado de Leite	19
4.2 Desenvolvimento da Genética Molecular	26
5. Raça Girolando	37
OBJETIVO	39
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40

CAPÍTULO 1

RESUMO	49
ABSTRACT	50
INTRODUÇÃO	51
OBJETIVO	54
MATERIAL E MÉTODOS	55
1. Material Biológico e Dados Referentes aos Índices Produtivos e Reprodutivos	55
2. Extração de DNA	56
3. Técnica de PCR-RFLP – Genotipagem dos Animais	57
4. Análise Estatística	59

RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
1. Genotipagem dos Animais	62
2. Freqüências Genotípicas e Alélicas	63
3. Análise Estatística	64
CONSIDERAÇÕES	74
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
CONCLUSÃO	78
ANEXOS	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Representação esquemática mostrando a regulação neuroendócrina da produção, secreção do GH e seus locais alvos de ação	18
Figura 2 –	Estratégias de cruzamento para a obtenção do Puro Sintético da raça Girolando	38
Figura 3 –	Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos, após a restrição enzimática, com as respectivas bandas e pesos moleculares	59
Figura 4 –	Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação de 455 pb do gene do GHRH	62
Figura 5 –	Resultado da eletroforese em gel de agarose 2,5% do produto amplificado pela reação de PCR, após digestão enzimática	63
Figura 6 –	Produção de leite, em kg e os respectivos genótipos para o gene do GHRH	66
Figura 7 –	Média diária de produção de leite, em kg e os respectivos genótipos para o gene do GHRH	67
Figura 8 –	Intervalo entre partos médio, em dias e os respectivos genótipos para o gene do GHRH	68
Figura 9 –	Duração da lactação, em dias e os respectivos genótipos para o gene do GHRH	69
Figura 10 –	Efeito médio de uma substituição alélica, em relação à duração da lactação	70

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo dos valores médios de herdabilidade de diferentes características e suas correlações com a produção de leite	25
Tabela 2 – Relação de fêmeas da raça Girolando 5/8 utilizadas para a realização do experimento, de acordo com cada Estado brasileiro	55
Tabela 3 – Freqüências genótípicas encontradas para o gene do GHRH, após a genotipagem dos 453 animais	63
Tabela 4 – Análise de variância para número de ordenhas diárias, regime alimentar, idade ao parto, duração da lactação e o gene GHRH, considerando o efeito na produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio	65
Tabela 5 – Médias ajustadas para a produção de leite, referentes a cada genótipo do gene do GHRH	66
Tabela 6 – Médias ajustadas para a média diária de produção de leite, referentes a cada genótipo do gene do GHRH	67
Tabela 7 – Médias ajustadas para o intervalo entre partos médio, referentes a cada genótipo do gene do GHRH	68
Tabela 8 – Médias ajustadas para a duração da lactação, referentes a cada genótipo do gene do GHRH	69

LISTA DE ABREVIATURAS

%	-	Percentagem
°C	-	Graus Celsius
µg	-	Micrograma
µl	-	Microlitro
µM	-	Micromolar
A	-	Adenina
AFLP	-	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMP	-	Adenosina Monofosfato
C	-	Citosina
cDNA	-	DNA complementar
DNA	-	Ácido Desoxiribonucléico
dNTP	-	Desoxinucleotídeo Trifosfato
EDTA	-	Ácido Etilenodiaminotetraacético
G	-	Guanina
GH	-	Hormônio do Crescimento
GHR	-	Receptor do Hormônio do Crescimento
GHBP	-	Proteína de Ligação ao GH
GHRH	-	Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
GHRHR	-	Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento
<i>HaeIII</i>	-	<i>Haemophilus aegyptius</i> (Enzima de Restrição)
HCl	-	Ácido Clorídrico
IGF-1	-	Fator semelhante à Insulina
IGFBP	-	Proteína de Ligação ao IGF
IGF-1R	-	Receptor do Fator semelhante à Insulina
kb	-	Kilobase
kDa	-	KiloDálton
kg	-	Kilograma
Leu	-	Leucina
M	-	Molar
mg	-	Miligrama

MgCl ₂	- Cloreto de Magnésio
ml	- Mililitro
mM	- Milimolar
mRNA	- RNA mensageiro
ng	- Nanograma
nm	- Nanômetro
OD	- Densidade Óptica
pb	- Pares de base
PCR	- <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em Cadeia da Polimerase
pH	- Potencial de Hidrogênio
PIT-1	- Fator de Transcrição da Pituitária 1
pmol	- Picomol
QTL	- <i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPD	- <i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	- <i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	- Ácido Ribonucléico
rpm	- Rotação por Minuto
SSCP	- <i>Single Stranded Conformation Polymorphism</i>
T	- Timina
<i>Taq</i>	- <i>Thermus aquaticus</i> (enzima DNA Polimerase)
TE	- Tampão Tris-EDTA
U	- Unidade de Enzima
Val	- Valina
χ^2	- Teste do Qui-Quadrado

RESUMO

A investigação de polimorfismos no genoma pode contribuir para aumentar as informações sobre a variabilidade das características quantitativas. Considerando as importantes funções fisiológicas desempenhadas pelos genes que participam da via de expressão do Hormônio do Crescimento em várias características fenotípicas de interesse econômico em bovinos de leite; este trabalho teve como objetivo investigar a associação entre um polimorfismo no gene do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) e os índices produtivos e reprodutivos: produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, em bovinos da raça Girolando. Para a genotipagem das 453 fêmeas, utilizou-se a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). A digestão do fragmento amplificado de 455 pb, com a enzima *HaeIII*, revelou um polimorfismo com dois alelos: alelo A, apresentando os fragmentos de 317, 83 e 55 pb e alelo B, com os fragmentos de 196, 121, 83 e 55 pb. As freqüências genotípicas obtidas foram 2,87%, 36,64% e 60,49% para os genótipos AA, AB e BB, respectivamente, sendo a freqüência do alelo A, 21,19% e do alelo B, 78,81%. Para a análise estatística foram utilizados 299 animais e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os genótipos quanto à produção de leite, média diária de produção de leite e intervalo entre partos médio. Em relação à duração da lactação, o genótipo AB mostrou-se superior ao genótipo BB ($p < 0,01$) e o efeito médio de uma substituição alélica foi de dois dias, sendo favorável ao alelo A. Com este resultado, pode-se sugerir a utilização de touros AA ou AB nos cruzamentos visando aumentar a freqüência do alelo A e, conseqüentemente, a média do rebanho quanto à duração da lactação em dois dias.

ABSTRACT

Genomic polymorphism investigations can contribute to increase available information about the variability of the quantitative characteristics. Considering the important physiological functions carried out by the genes which participate in the Growth Hormone expression in several phenotypic characteristics of economic interest in milk cattle, this study purposed to investigate the association between a polymorphism in the Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) gene and the productive and reproductive indexes: milk production, daily average milk production, lactation duration and delivery interval average, in Girolando breed cattle. In order to genotype the 453 females, the PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) was used. The restriction of the 455 bp amplicon, with the *HaeIII* enzyme, revealed a polymorphism with two alleles: A allele, presenting the fragments 317, 83 and 55 bp and B allele, with the fragments 196, 121, 83 and 55 bp. Genotypic frequencies obtained were 2.87%, 36.64% and 60.49% for the AA, AB and BB genotypes, respectively, being the A allele frequency, 21.19% and the B allele frequency, 78.81%. 299 animals were used for the statistical analysis and there was no significant difference ($p > 0.05$) among genotypes with regards to milk production, daily average milk production and delivery interval average. Regarding the lactation duration, the AB genotype showed itself superior to the BB genotype ($p < 0.01$) and the mean effect of an allelic substitution was of 2 days, being the A allele the favorable one. With this result, it can be suggested the use of AA or AB bulls in the crosses aiming to increase the frequency of the A allele and, consequently, the lactation duration average by two days in the cattle.

INTRODUÇÃO

A dimensão continental do Brasil associada aos seus recursos naturais, humanos e econômicos, faz do agronegócio um dos mais importantes segmentos da economia do país, sendo responsável por 35% do Produto Interno Bruto, 40% das exportações e 45% dos empregos. Atualmente, o leite é um dos maiores agronegócios brasileiros, movimentando 10 bilhões de dólares ao ano (ÁLVARES, 2001) e, entre os produtos animais, é o mais completo dos alimentos (MAIJALA, 2001), composto por proteína, gordura, água, minerais e lactose (MADALENA, 2001), sendo, assim, importante tanto para as crianças quanto para os adultos.

De acordo com dados revelados pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, a produção mundial de leite, em 2000, foi de 391.375 milhões de toneladas, obtida de 127.323 milhões de vacas leiteiras. No mesmo ano, o Brasil foi o 6º maior produtor mundial de leite, logo abaixo dos Estados Unidos, Índia, Rússia, Alemanha e França, produzindo 22.134 milhões de toneladas, obtidas de 16.040 milhões de vacas leiteiras (ANUALPEC, 2001).

No entanto, os níveis de produtividade brasileira são baixos, sendo a média de produção de leite/vaca/ano de apenas 1380 kg, contrastando com a média mundial superior a 2000 kg e, segundo FNP Consultoria, com uma média diária de 4,93 kg/vaca (ANUALPEC, 2001). A baixa produtividade dos rebanhos leiteiros brasileiros deve-se essencialmente a dois fatores: mau desempenho reprodutivo, traduzido pela idade avançada ao primeiro parto e longo intervalo entre partos, consequência do manejo nutricional e sanitário a que os animais são submetidos; e inferior qualidade genética dos animais, indicada pela produção da vaca na lactação, duração da lactação e persistência na produção (FARIA, 2001).

Minas Gerais e Goiás são, atualmente, os Estados de maior produção, seguidos pelo Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (MADALENA, 2001). No Estado de Minas, o maior crescimento da produção ocorre nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (GOMES, 2001b).

A disponibilidade mundial de leite é de 83,1 kg *per capita*. Os países desenvolvidos têm disponibilidade de 273 kg, enquanto que os países pobres têm 26 kg *per capita*, portanto, 10,5 vezes menor. No Mercosul, o Brasil é o grande

mercado consumidor, em função da população (79,09% do Mercosul), maior crescimento vegetativo da população (2,08% ao ano) e menor disponibilidade *per capita* (99,7 kg). Sendo a recomendação mínima *per capita* da Organização Mundial de Saúde de 146 kg, o país tem um déficit *per capita* de 45,5 kg, ou seja, 7 bilhões de kg anuais (BENEDETTI, 2002).

Estima-se que cerca de 60% do total de leite produzido no país são controlados pelos serviços oficiais de inspeção. Desta parcela, aproximadamente 50% são comercializados na forma fluída (leite pasteurizado, longa vida e esterilizado), 20% são transformados em pó, 20% em queijo, 5% em iogurtes e sobremesas lácteas e 5% em outros produtos (cremes, doce de leite, manteiga, etc). Os outros 40% são consumidos pelo mercado informal, sem qualquer fiscalização higiênico-física ou sanitária (BENEDETTI, 2002).

1. Atividade Leiteira no Brasil

O leite, no Brasil, é produzido por 83% dos produtores rurais que não entregam mais do que 250 kg de leite/dia. Mais de 80% da produção nacional de leite é a pasto, em sistemas extensivos, com baixo nível tecnológico, e mais de 50% das pastagens estão degradadas, ou em algum estágio de degradação, não conseguindo, desta forma, fornecer os nutrientes necessários aos animais. Além disso, há exploração de animais não-especializados, ou seja, utilização de rebanho de dupla aptidão para leite e carne. Isto visa flexibilidade para regular a produção de leite ou de carne segundo as flutuações dos preços relativos de ambos os produtos, o que acarreta elevada idade ao primeiro parto, longos intervalos entre partos e curto período de lactação (BENEDETTI, 2002).

Pode-se citar, ainda, segundo este mesmo autor, que parte expressiva da produção leiteira (33,5%) se dá em estabelecimentos cuja principal atividade não é a produção de leite. Esta, em número grande de estabelecimentos, é parte do sistema de produção de subsistência; produz-se leite e carne, mas também se produz leite e lavouras e ainda os três produtos conjuntamente. Outro aspecto importante diz respeito à instabilidade da renda do produtor, provocada pela sazonalidade da produção, ou seja, a maioria dos produtores brasileiros tem, entre a produção de leite da época das águas e a da seca, uma diferença

significativa. Além disso, os índices reprodutivos e produtivos são extremamente afetados pelo período seco do ano, uma vez que muitos produtores não reservam alimentos para enfrentar a estiagem. A falta de planejamento e a objetividade das ações são praticamente inexistentes.

As condições de clima e solo do Brasil comportam a existência de três sistemas para produção de leite: sistemas que utilizam gado Zebu (azebuado ou mestiços com predominância de sangue Zebu); sistemas que utilizam o gado Europeu – animais acima de 7/8 de sangue Europeu; sistemas que utilizam gado mestiço, resultante do cruzamento de uma raça zebuína e outra européia – animais de 1/2 sangue Europeu-Zebu até 7/8 Europeu-Zebu (GOMES, 2001a).

O gado Zebu, segundo este mesmo autor, é adaptado ao clima tropical e é um animal rústico que suporta, sem maiores problemas, elevadas temperaturas e umidade, além de ser mais resistente a ectoparasitos. Por outro lado, tem baixa produtividade de leite. Entre as raças européias, o gado Holandês é o predominante no Brasil e, por não ser natural das regiões tropicais, é muito sensível ao calor e às zoonoses. Em contrapartida, a produtividade do rebanho é elevada.

Aquele mesmo autor relata que o gado mestiço predomina no Brasil, tanto em número de criadores quanto em volume de produção. Em razão de serem resultado do cruzamento de animais Zebu com Europeu, os mestiços ficam numa posição intermediária entre seus pais, quanto à rusticidade e produção de leite. Os mestiços herdaram a rusticidade do Zebu, porém são menos rústicos do que este, e a produção de leite do gado Europeu, mas são menos produtivos que este.

A grande justificativa para o uso de cruzamento é a superioridade do animal cruzado em relação aos seus pais puros, como resultado do efeito que se conhece como heterose ou vigor híbrido. Entretanto, na prática, o que importa é a superioridade dos cruzados em relação ao melhor de seus pais. Considerando as raças zebuína, européia e o produto meio-sangue, os animais cruzados de Europeu com Zebu são superiores ao melhor dos puros apenas em condições intermediárias (as quais representam a grande parte das condições de criação encontradas no Brasil), em que os estresses ambientais são suficientes para limitar a produção do pai Europeu, mas são moderados, de forma a permitirem

que o animal cruzado expresse o seu potencial de produção superior (TORRES JR. *et al.*, 2003).

De acordo com Benedetti (2002), os sistemas de produção de leite podem ser divididos em pastejo extensivo, em que, como fonte de alimentação, são usadas gramíneas tropicais; pastejo intensivo, em que se utilizam gramíneas tropicais adubadas, silagem/cana e nível moderado de concentrados; e confinamento, com o uso de silagem de milho, feno, além de nível alto de concentrado.

Atualmente, tem-se dado ênfase à utilização intensiva das forrageiras tropicais como as principais fontes de alimento para o rebanho leiteiro. Além de reduzir muito os custos de produção e ter um menor impacto negativo sobre o meio ambiente (MATOS, 2001), o uso das forrageiras tropicais, principalmente no período chuvoso, torna a atividade leiteira competitiva. Nesta época, a exploração racional das pastagens eleva a eficiência da disponibilidade de matéria seca e de sua utilização pelo rebanho leiteiro. Um modelo de produção com forrageiras tropicais, somado à interação genótipo-ambiente do rebanho leiteiro, poderia atingir uma média nacional de produção de leite de 10 kg/vaca/dia, com qualidade e competitividade, gerando excedente para exportação, superior a qualquer país do mundo (BENEDETTI, 2002).

2. Fatores que Afetam a Produção de Leite

A produção de leite é a soma dos efeitos do meio ambiente, da genética da vaca e da possível interação do meio com a genética. Assim, a genética propicia ao animal a capacidade de produzir leite, enquanto o ambiente fornece as condições para que ele o produza (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001). Pode-se medir a proporção de origem genética e a proporção da influência do ambiente pelo coeficiente de herdabilidade que, para produção de leite é, aproximadamente, 0,25 ou 25%. Isto significa que apenas 25% das variações individuais que ocorrem na produção de leite são de origem genética, o restante são variações devido ao ambiente (FREITAS, 2001).

Tanto o genótipo como o ambiente têm um papel decisivo na manifestação fenotípica, assim, de nada vale um genótipo superior quando o ambiente é

desfavorável, como também não adianta muito melhorar o ambiente se o genótipo não é o adequado (RAMALHO, SANTOS e PINTO, 2000).

2.1 Fatores Referentes ao Animal

O efeito de meio ambiente que tem maior influência sobre a produção de leite é o manejo e a alimentação. Entretanto, a produtividade de uma fazenda leiteira depende, entre outros fatores, da composição ou estrutura do rebanho. Altas taxas de lotação animal em pastagens intensivas não significam produtividade (AGUIAR, 2001) se o rebanho apresentar, por exemplo, curto período de lactação e extenso intervalo entre partos (BENEDETTI, 2002).

Durações diferentes das lactações são responsáveis por diferenças na quantidade de leite produzido. A produção de leite em 305 dias de lactação tem sido considerada o ideal, pois o que se deseja é uma alta produção por ano e todos os anos, ou seja, um parto por ano. Dentro deste raciocínio, o animal teria um período de descanso entre uma lactação e outra de, aproximadamente, dois meses. Durante determinada lactação, a produção geralmente aumenta por algum tempo após o parto e depois decresce, existindo variação na forma da curva de lactação entre vacas e entre lactações da mesma vaca. A produção na lactação pode ser descrita, de certa forma, conhecendo-se o ponto da produção máxima e a taxa de decréscimo a partir deste. Esta taxa ou declividade fornece indicação sobre persistência da lactação (TEIXEIRA, 2001a).

O intervalo entre partos é determinado, principalmente, pelos dias transcorridos desde o parto até o início da próxima gestação, pois a duração da gestação é pouco variável dentro de cada raça. Um período de 60 a 90 dias parece ser ideal, em termos de uma eficiente vida produtiva (MARTINEZ, 1989), uma vez que acima de 90 dias a produção de leite decresce (TEIXEIRA, 2001a). Diferenças de intervalos entre partos podem resultar em diferença de produção da ordem de 5 a 10% e maiores intervalos resultam em uma menor produção anual por vaca. Do ponto de vista econômico, o intervalo ótimo entre partos é de, aproximadamente, 13 meses entre o primeiro e o segundo parto e 12 meses entre os partos subseqüentes, o que tende a maximizar a vida produtiva da vaca (MARTINEZ, 1989).

Vacas de leite geralmente são ordenhadas duas vezes ao dia, tendo indicação de aumento de 30% na produção de leite quando se passa de uma para duas ordenhas (TEIXEIRA, 2001a). Em revisão literária, Martinez (1989) afirma que a prática de ordenhar uma vaca três vezes ao dia provoca um aumento na produção de 15 a 25%, em relação a ordenhá-la duas vezes, dependendo da idade e do aumento da quantidade de alimento fornecido. Aproximadamente 5 a 10% deste aumento é por uma diminuição na pressão interna do úbere, devido à maior frequência de ordenhas, e o restante, 10 a 15%, é causado por melhor manejo e alimentação que as vacas recebem. Assim, a maior porção do aumento obtido com três ordenhas pode ser conseguida no regime de duas ordenhas, simplesmente, com um melhor manejo e alimentação.

A produção de leite varia, também, com a idade da vaca (TEIXEIRA, 2001a). As vacas aumentam gradualmente a produção por lactação até atingirem a idade adulta. Uma das causas principais do aumento da produção com a idade é o aumento em tamanho, juntamente com o desenvolvimento e crescimento do úbere que ocorrem com os partos sucessivos. Com a idade adulta, que, de um modo geral, está entre 5 e 8 anos, inicia-se a senilidade e a quantidade de leite por lactação começa a decrescer. A produção pode variar de 20 a 50% para os animais que pariram com 2 anos, em relação aos que pariram a idade adulta (MARTINEZ, 1989).

3. Interações Hipotálamo-Hipófise envolvidas na Via do Hormônio do Crescimento

A via do Hormônio do Crescimento (GH) é composta de uma série de genes dependentes, gene do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH), Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRHR), Fator de Transcrição da Pituitária 1 (PIT-1), Hormônio do Crescimento (GH), Receptor do Hormônio do Crescimento (GHR), Fator semelhante à Insulina (IGF-1) e do Receptor do Fator semelhante à Insulina (IGF-1R), os quais têm efeitos fisiológicos no crescimento e na lactação (ETHERTON e BAUMAN, 1998).

Hormônios do hipotálamo mediam interações entre os sistemas nervoso e endócrino, controlando a atividade de células específicas na glândula pituitária

anterior. O peptídeo hipotalâmico GHRH atua na célula somatotrófica pituitária, estimulando a sua proliferação durante o desenvolvimento e regulando a sua habilidade na produção e secreção do GH. A somatostatina é o principal peptídeo hipotalâmico que inibe a liberação do GH pituitário (MAYO *et al.*, 2000). Segundo Tuggle e Trenkle (1996) a influência destes dois hormônios é modulada por outros fatores hipotalâmicos, por neurotransmissores e por hormônios da circulação que agem diretamente na pituitária.

Formas precursoras do GHRH e da somatostatina foram encontradas na glândula pituitária. Isto indica que a síntese destes hormônios ocorre na pituitária, existindo a possibilidade de um controle neuroendócrino local da secreção de GH e proliferação de somatotrofos da pituitária anterior (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

O GHRH, localizado no cromossomo 13 do bovino (MOODY, POMP e BARENDSE, 1995a), é um peptídeo de 42-44 aminoácidos, dependendo da espécie (em bovino, tem 44 aminoácidos), sendo processado a partir de uma proteína precursora com 103-108 aminoácidos (MAYO *et al.*, 2000). A seqüência de aminoácidos do GHRH, em mamíferos, não é altamente conservada, entretanto, a estrutura entre os resíduos de 1 a 27, que constitui o núcleo ativo do peptídeo, é conservada (TUGGLE e TRENKLE, 1996). As seqüências em bovino e ovino diferem da seqüência humana em apenas cinco e seis resíduos, respectivamente (SOLIMAN *et al.*, 1997).

Foi desenvolvido um trabalho cujo resultado demonstrou que os GHRHs humano, bovino e seus análogos (obtidos por deleção ou substituição de aminoácidos), como, também, o GHRH do rato podem atuar na liberação do GH bovino em células adenohipofisárias *in vitro* (SOLIMAN *et al.*, 1997).

Além de estimular a liberação do GH, o GHRH está envolvido no controle do apetite e do sono, sendo encontrado, também, na placenta, onde deve participar na regulação da secreção do GH fetal durante o período embrionário e nas gônadas, possivelmente agindo como um fator regulatório intragonadal. Tem sido detectado em linfócitos, no pâncreas e no trato gastrointestinal (PETERSENN e SCHULTE, 2000).

A somatostatina, tendo seqüência altamente conservada em mamíferos, é sintetizada como um precursor contendo 116 aminoácidos, o qual é, posteriormente, clivado por endopeptidases, resultando em duas formas

secretadas do hipotálamo, com 28 e 14 aminoácidos. Este hormônio é um potente inibidor da secreção do GH e suas ações são mediadas por receptores de membrana com alta afinidade, sendo que, em mamíferos, já foram encontrados cinco subtipos de receptores para a somatostatina (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

Na pituitária, o GHRH atua através de sua ligação a um receptor específico nas células somatotróficas. O GHRHR, pertencente à família B-III da superfamília de receptor acoplado à proteína G, é expresso predominantemente na glândula pituitária, com menor expressão em alguns outros tecidos (MAYO *et al.*, 2000). Há evidência da síntese deste ligante no hipotálamo, ovário, pâncreas, trato gastrintestinal, placenta e testículo, mas as funções do GHRHR em tecidos extrapituitários não têm sido determinadas. O receptor, em bovino, é uma proteína com 423 aminoácidos e seu gene foi recentemente mapeado no cromossomo 4 (CONNOR, ASHWELL e DAHL, 2002).

O GHRHR apresenta, estruturalmente, um domínio extracelular amino-terminal, com seis resíduos conservados de cisteína, os quais formam uma estrutura importante para a interação hormonal. Apesar de essencial, o domínio amino-terminal não é suficiente para conferir uma ligação de alta afinidade, ou seja, resíduos em domínios transmembrânicos e *loops* extracelulares são determinantes na interação específica com o GHRH (MAYO *et al.*, 2000).

Analisando o GHRHR em diferentes espécies, incluindo humano, suíno, camundongo e rato, observa-se alta homologia entre as proteínas, em relação à seqüência de aminoácidos, com similaridades variando de 70 a 94% (PETERSENN e SCHULTE, 2000). A seqüência de aminoácidos, em bovino, apresenta 93, 90, 89, 87 e 85% de homologia com as seqüências em ovino, suíno, humano, rato e camundongo, respectivamente (CONNOR, ASHWELL e DAHL, 2002).

No entanto, com a ocorrência de *splicing* alternativo, variantes do GHRHR são geradas e já caracterizadas em muitas espécies, as quais devem diferir em suas propriedades sinalizantes (PETERSENN e SCHULTE, 2000). O *splicing* alternativo é um mecanismo pelo qual, a partir de um mesmo gene, é possível a produção de proteínas com diferenças que possibilitam a realização de funções distintas.

O processamento alternativo no transcrito do GHRHR humano resulta na inclusão de um *intron* no mRNA e gera um códon de parada prematuro, tendo, como consequência, uma proteína truncada, a qual exerce efeito inibitório na transdução de sinal estimulado pelo GHRH (MAYO *et al.*, 2000).

O GHRHR exerce um papel fundamental na proliferação e diferenciação da célula somatotrófica pituitária. A expressão do seu gene pode ser controlada pelo próprio GHRH, por glucocorticóides, hormônios tireoidianos e hormônios sexuais (PETERSENN e SCHULTE, 2000). O gene do GHRHR apresenta dois potenciais sítios de ligação ao PIT-1, o que confirma a importância do PIT-1 na regulação da expressão deste gene (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

O PIT-1, localizado no cromossomo 1 do bovino (MOODY, POMP e BARENDSE, 1995b) é uma proteína de 291 aminoácidos e faz parte dos genes da família de domínio POU (genes regulatórios transcricionais PIT-1, Oct-1, Oct-2, unc-86). O domínio POU apresenta 150 a 160 aminoácidos (YU *et al.*, 1995) e tem duas regiões bem conservadas. A região C-terminal, chamada POU-homeodomínio, codifica um domínio de ligação ao DNA de baixa afinidade, enquanto a região N-terminal, denominada POU-domínio específico, confere alta afinidade ao domínio POU e participa de interações proteína-proteína (PARMENTIER *et al.*, 1999).

Em todas as espécies testadas até agora, o PIT-1 tem seis *exons* e cinco *introns*, em um tamanho aproximado de 1,5 a 2,0kb. Nos mamíferos, a proteína PIT-1 é altamente conservada, tendo 90 a 94% de homologia, em relação à proteína total e 97 a 99%, quanto à região de domínio POU (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

Há uma forte evidência genética do requerimento por PIT-1 na expressão do GH, prolactina e subunidade β da tireotropina (TUGGLE e TRENKLE, 1996), mas, também, tem efeito na proliferação e diferenciação das células pituitárias (RENAVILLE *et al.*, 1997). O PIT-1 parece ativar o próprio gene PIT-1, o que significa a existência de uma autoregulação. As regiões regulatórias reconhecidas por PIT-1 nos promotores destes genes são necessárias para uma apropriada expressão dos mesmos (PARMENTIER *et al.*, 1999).

A proteína PIT-1 só é encontrada em somatotrofos, lactotrofos e tireotrofos (células da glândula pituitária anterior), mas em gonadotrofos e corticotrofos é

encontrado o mRNA do PIT-1, o que pode ser explicado por uma regulação pós-transcricional como uma função do tipo celular. Mas, a proteína PIT-1 foi recentemente detectada, apesar de níveis baixos, em tecido não-pituitário, além de células linfóides e hematopoiéticas (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

O GH se localiza, no bovino, no cromossomo 19 (ZHANG *et al.*, 1993). O seu gene faz parte de uma família de genes que inclui o GH, prolactina e lactogênios placentários, contendo cinco *exons* e quatro *introns*, em um tamanho aproximado de 2,6 a 3,0kb na maioria das espécies de mamíferos (TUGGLE e TRENKLE, 1996). O GH é sintetizado, estocado e secretado, de forma pulsátil, pelos somatotrofos da pituitária anterior (PETERSENN e SCHULTE, 2000). Parece ser sintetizado como uma proteína precursora com um peptídeo sinal na região amino-terminal (N-terminal), o qual é removido com a secreção hormonal (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

São encontradas quatro variantes do GH em bovino, que surgem da combinação de dois possíveis aminoácidos na região N-terminal (alanina ou fenilalanina) e dois possíveis aminoácidos na posição 127 do GH (leucina ou valina). A variação na região N-terminal se deve a diferenças na clivagem do peptídeo sinal e resulta em moléculas com 191 aminoácidos, quando a alanina está presente na região N-terminal ou 190 aminoácidos, em presença da fenilalanina (ETHERTON e BAUMAN, 1998). A variação na posição 127 do GH, que corresponde ao *exon* 5, ocorre por uma mudança nucleotídica, CTG para GTG, ou seja, códon de leucina para códon de valina (RODRIGUES, GUIMARÃES e PINHEIRO, 1997).

A homologia na seqüência nucleotídica do gene do GH entre algumas espécies é variável. Os GHs bovino e suíno apresentam, aproximadamente, 90% de similaridade em relação à seqüência de aminoácidos (ETHERTON e BAUMAN, 1998). Esta homologia entre os GHs humano e bovino é de 75%, sendo de 99% quando se compara os GHs ovino e bovino (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

A regulação do GH pode ser dividida em três níveis: basal, específica do tipo celular e expressão induzida por hormônios. A expressão em níveis baixos ou basal ocorre em células não-pituitárias. A expressão do GH, em níveis altos, específica no somatotrofo é, principalmente, controlada pelo PIT-1. O controle da

expressão do GH por hormônios envolve o hormônio da tireóide; glucocorticóides, que aumentam a expressão do gene; ácido retinóico, o qual estimula a transcrição e síntese protéica; activina, regulando negativamente a expressão, pois age diminuindo os níveis de PIT-1, impedindo, assim, a transcrição do gene e, como consequência, a síntese protéica; e insulina, que também causa supressão da atividade no promotor do GH. O maior mecanismo limitante da expressão do GH em tecidos não-pituitários é a falta de expressão do PIT-1 (TUGGLE e TRENKLE, 1996).

Genes tecido-específicos podem ser controlados por metilação, sendo esta responsável pelo silenciamento do gene. Desta forma, padrões específicos de metilação em regiões regulatórias dos genes do GH e da prolactina estão, também, implicados na expressão gênica (SHIOTA e YANAGIMACHI, 2002).

Os níveis de GH possuem um padrão característico que tem sido observado em várias espécies: são particularmente altos no feto e no recém-nascido, declinando durante a infância. Posteriormente, aumentam na puberdade, caindo, novamente, durante a senescência (PETERSENN e SCHULTE, 2000).

O GH está envolvido no crescimento ósseo, muscular, na lactação e reprodução (FRANCO, 2002). O principal efeito do GH é promover o crescimento longitudinal pós-natal, atuando na proliferação e diferenciação celular, além de regular o metabolismo de lipídeos, carboidratos, proteínas e minerais (KOPCHICK e ANDRY, 2000). As mudanças coordenadas no metabolismo tecidual alteram a distribuição de nutrientes, exercendo um papel fundamental por favorecerem o crescimento e produção de leite (ETHERTON e BAUMAN, 1998).

O GH está envolvido na manutenção do sistema imune, sendo importante para a função dos linfócitos e requerido no período de desenvolvimento do sistema imune no feto bovino. Recentes estudos mostram que, através de ações diretas no cérebro, o GH deve modular a emoção, a resposta ao estresse e o comportamento. Este hormônio também tem sido importante na função cardíaca e está envolvido no desenvolvimento do coração e hipertrofia (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

A habilidade do GH em promover seus vários efeitos depende de uma interação hormonal com proteínas de ligação específicas. Destas, a mais importante é o GHR, localizado no cromossomo 20 do bovino (MOODY *et al.*,

1995), que faz parte de uma superfamília de receptor citocina-hematopoiética (ARGETSINGER e CARTER-SU, 1996).

O GHR é uma proteína de 620 aminoácidos, apresentando um domínio extracelular de 246 aminoácidos para a ligação hormonal, uma região transmembrânica de 24 aminoácidos e um longo domínio citoplasmático (PARMENTIER *et al.*, 1999), sendo, este último, codificado pelo *exon* 10 do gene do GHR (GE *et al.*, 2000). Segundo Argetsinger e Carter-Su (1996) cinco potenciais sítios de glicosilação são observados no domínio extracelular, o qual contém seis cisteínas ligadas e uma cisteína livre.

A massa molecular calculada do GHR baseada na seqüência de aminoácidos é 70kDa; entretanto, experimentalmente, a massa está entre 100 e 130kDa. Modificações pós-traducionais, como glicosilação, são, provavelmente, responsáveis pelas diferenças observadas (KOPCHICK e ANDRY, 2000). Argetsinger e Carter-Su (1996) afirmam que, entre as espécies, incluindo humano, bovino, ovino, suíno, camundongo e rato, a homologia na seqüência de aminoácidos é de, aproximadamente, 70%.

O GHR pode ser encontrado no fígado, músculo, tecido adiposo, glândula mamária, tecido ósseo, rim, células embrionárias e tecidos imunes, sendo que numerosos fatores, incluindo desenvolvimento, presença hormonal, estado nutricional e controle específico tecidual/celular regulam a sua expressão (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

A proteína de ligação ao GH (GHBP) pode ser encontrada no soro humano, de camundongo, rato, coelho, ovino, bovino, eqüino, suíno, canino, felino e outros. A GHBP é uma glicoproteína de 255-273 aminoácidos, tem um peso molecular de, aproximadamente, 55kDa e corresponde à forma solúvel do domínio extracelular do GHR, resultante da proteólise ocorrida nos receptores de GH ligados à membrana. Estudos têm mostrado que um membro da família de metaloproteases é capaz de clivar o GHR para formar a GHBP no soro. Sugere-se que mais de 60% do GH circulante no soro esteja ligado a GHBP; na verdade, quando o GH é liberado da pituitária, a GHBP atua como um reservatório, mantendo o GH disponível no soro todo o tempo. A GHBP aumenta a meia-vida do GH no soro, pois diminui a taxa de degradação do mesmo (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

A produção e liberação de hormônios da pituitária estão sob um controle hormonal complexo (BARINAGA *et al.*, 1983).

A interação do GHRH com o GHRHR no somatotrofo ativa a proteína G, estimulando a adenilato ciclase e resultando na produção de AMP cíclico, o qual parece ser um mensageiro secundário para a síntese e secreção do GH induzido pelo GHRH e proliferação somatotrófica. O aumento de AMP cíclico intracelular ativa os canais de íon na membrana, ocasionando um influxo de íons cálcio no somatotrofo. O aumento de cálcio citosólico livre leva à liberação do GH de grânulos secretórios. O aumento de AMP cíclico intracelular também estimula a proteína kinase A, a qual fosforila numerosos substratos citoplasmáticos e nucleares, destacando o fator de transcrição CREB (substrato nuclear) (PETERSENN e SCHULTE, 2000), que, por sua vez, estimula a transcrição do gene do fator de transcrição PIT-1. Como consequência, o PIT-1 aumenta a transcrição do gene do GH (MAYO *et al.*, 2000), já que sítios funcionais de ligação para o PIT-1 têm sido encontrados no promotor do GH. O fator de transcrição CREB, fosforilado pela proteína kinase A, pode, também, atuar no promotor do GH, favorecendo a sua transcrição (PETERSENN e SCHULTE, 2000).

O GH se liga ao GHR causando a dimerização do receptor, um complexo consistindo de dois GHRs e uma molécula de GH. Além disto, em resposta ao GH, a tirosina kinase JAK2, com 121kDa, é ativada e forma um complexo com o GHR; a JAK2 pertence à família Janus de tirosinas kinases citoplasmáticas. Ambos JAK2 e GHR são fosforilados, ativando moléculas sinalizantes, por exemplo, os fatores de transcrição Stat e levando à liberação de mensageiros secundários (diacilglicerol, cálcio, óxido nítrico), assim como ativação de enzimas, entre elas, proteína kinase C, fosfolipase A2. Estes eventos regulam a função celular, resultando nos efeitos do GH (ARGETSINGER e CARTER-SU, 1996).

O GH pode agir diretamente nos tecidos ou suas ações podem ser mediadas pelo IGF-1 produzido no fígado. A ação do IGF-1, o qual apresenta 70 aminoácidos (BISHOP *et al.*, 1991) e se localiza no cromossomo 5 (MILLER *et al.*, 1992), se faz pela sua ligação ao seu receptor, IGF-1R, localizado no cromossomo 21 do bovino (MOODY, POMP e BARENDSE, 1996).

O GH e o IGF-1 são importantes na repressão da atividade do sistema, ou seja, em altos níveis, inibem a liberação do GHRH e do GH (MAYO *et al.*, 2000).

A **Figura 1** esquematiza a regulação neuroendócrina da produção, secreção do GH e seus locais alvos de ação.

Em relação à lactação, uma maior concentração de GH favorece a síntese do leite com composição normal, aumenta a disponibilidade de nutrientes necessários para a produção láctea, além da atividade por célula secretória, manutenção de células secretórias e maior aporte sanguíneo para a glândula mamária (ETHERTON e BAUMAN, 1998). Pode-se dizer que a ação do GH é indireta, ou seja, estimula a secreção do IGF-1 no fígado, o qual age como intermediário em muitos dos seus efeitos galactopoiéticos (HURLEY, 2003).

O número de células secretórias na glândula mamária declina, paralelamente, com a redução na produção de leite, sendo esta perda proveniente de apoptose celular. Há evidência que, em alguns tecidos, incluindo a glândula mamária, o IGF-1 possa atuar como um fator de sobrevivência celular ou, também, fator anti-apoptótico. Então, existe uma hipótese de que ações do GH na glândula são mediadas pela sobrevivência celular induzida através do IGF-1. Entretanto, proteínas de ligação ao IGF (IGFBPs) modulam as ações do IGF-1. Assim, surge a hipótese que as células mamárias produzem uma proteína de ligação inibitória (IGFBP5) que bloqueia a função do IGF-1 na sobrevivência celular. Por outro lado, a prolactina é altamente responsável pela repressão na produção da IGFBP5 durante a lactação. Desta forma, observa-se uma relação positiva entre produção de leite e concentração de GH, em que GH, IGF-1 e prolactina interagem para manter a sobrevivência celular (SORENSEN e KNIGHT, 2002).

Em relação ao seu efeito mamogênico, o GH pode estimular o crescimento mamário em todos os estágios de desenvolvimento: período fetal, do nascimento até a puberdade, período até a concepção, durante a gestação e durante a lactação. Para uma ação direta no tecido mamário, faz-se necessário a presença do GHR nas células mamárias (HURLEY, 2003). Segundo Feldman *et al.* (1993) o mRNA do GHR tem sido encontrado em glândula mamária de bovino, ovino, suíno. No entanto, Hurley (2003) apresenta evidências sugerindo que o hormônio tem um efeito indireto e deve atuar no tecido mamário, estimulando a produção do IGF-1, o qual é mitogênico para as células epiteliais mamárias.

Observa-se uma relação entre taxa de crescimento, desenvolvimento mamário e produção de leite: uma taxa de crescimento aumentada devido alto nível alimentar antes da puberdade pode levar a um desenvolvimento mamário reduzido e, como consequência, reduzir o potencial de produção de leite; uma taxa de crescimento aumentada depois da puberdade e durante a gestação não tem efeito no desenvolvimento mamário e produção de leite; um elevado ganho de peso corporal devido à um alto potencial genético para crescimento tem correlação positiva com produção de leite (SEJRSEN *et al.*, 2000).

O GH é importante no desenvolvimento da glândula mamária e, possivelmente, atua neste tecido via IGF-1, então, a explicação para o crescimento mamário reduzido devido alto nível alimentar se baseia na sensibilidade reduzida do tecido mamário ao IGF-1, por ação de proteínas de ligação produzidas localmente (IGFBP3), que inibem o efeito do IGF-1, e/ou fatores de crescimento. Um alto nível alimentar antes da puberdade pode causar uma redução permanente no potencial de produção de leite subsequente. Na verdade, este efeito negativo existe e é similar em todas as raças leiteiras, mas o nível alimentar que causa a redução no potencial de produção láctea difere entre as raças (SEJRSEN *et al.*, 2000).

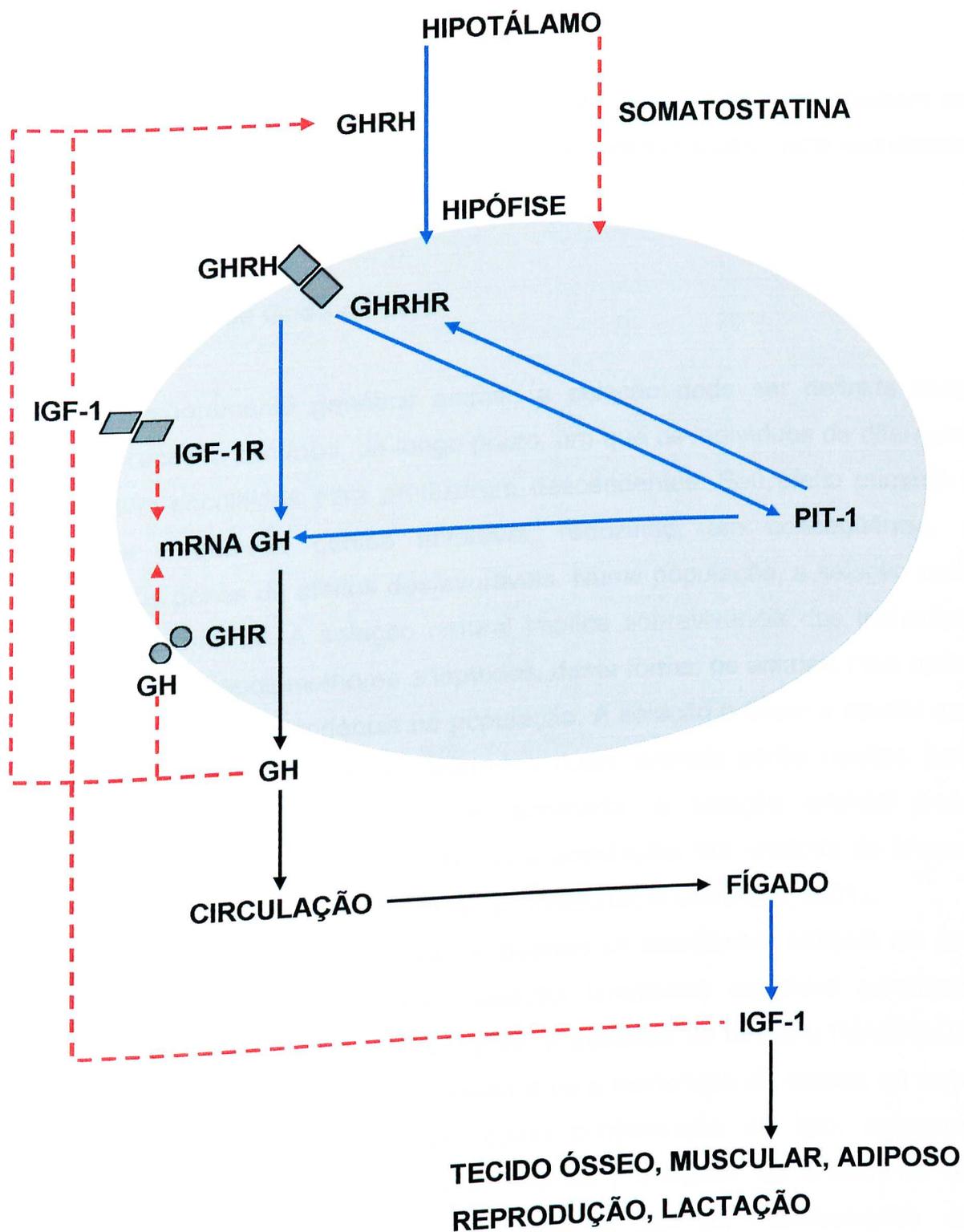


Figura 1 – Representação esquemática mostrando a regulação neuroendócrina da produção, secreção do GH e seus locais alvos de ação. O círculo em cinza representa um somatotrofo; as setas azuis representam estímulos positivos e as vermelhas estímulos negativos; \blacklozenge , \blacktriangle e \bullet representam interações proteína-receptor (adaptado de FRANCO, 2002)

4. Melhoramento Genético de Bovinos de Leite

O Brasil precisa buscar, de forma objetiva, alternativas que resultem em animais adequados ao seu ambiente e às suas características sócio-econômicas (FERREIRA, LOPES e FERREIRA, 2001).

4.1 Seleção de Gado de Leite

Em melhoramento genético animal, a seleção pode ser definida como sendo um processo contínuo, de longo prazo, em que os indivíduos de diferentes genótipos são escolhidos para produzirem descendentes. Seu efeito primário é aumentar a frequência gênica favorável, reduzindo, em consequência, a frequência dos genes de efeitos desfavoráveis. Numa população, a seleção pode ser natural ou artificial. A seleção natural implica sobrevivência dos indivíduos portadores de genótipos melhores adaptados, desta forma, os animais mais aptos vão deixando maior descendência na população. A seleção artificial é aquela que é praticada pelo homem, o qual determina quais animais serão usados para produzir a próxima geração. Por ser orientada, a seleção artificial pode proporcionar um maior progresso genético à população, por unidade de tempo, comparada à seleção natural (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001).

Dois critérios podem ser utilizados quando se selecionam animais em um rebanho: os de melhores fenótipos (seleção fenotípica) ou pelos genótipos (seleção genotípica). A seleção, usualmente, é baseada no fenótipo (MACHADO e MARTINEZ, 2001) e, neste caso, considera-se a morfologia do animal, ou seja, suas características de exterior, tais como conformação ou tipo, pelagem, características de úbere etc., ou medem-se as produções ou avaliam-se os desempenhos dos indivíduos, que, em síntese, são as manifestações de atividades fisiológicas, como por exemplo, a produção de leite, de gordura, de proteína, taxas de crescimento, pesos e ganhos de pesos a várias idades etc. (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001).

Avaliação genética é um processo pelo qual se procura prever o valor genético dos animais, ou seja, o que o animal transmite à progênie, baseando-se em uma ou mais características. O objetivo da avaliação é ordenar os indivíduos

existentes na população ou na amostra. Com isto, pode-se identificar os piores indivíduos que devem ser descartados ou os melhores a serem mantidos (VERNEQUE e VALENTE, 2001).

Os programas de melhoramento delineados para melhorar o desempenho dos animais em diferentes ambientes não devem ignorar a possibilidade da interação genótipo-ambiente. A presença da interação genótipo-ambiente assume importância se existem diferenças entre os ambientes de seleção e produção, o que pode implicar desempenho diferenciado e, portanto, em resposta realizada pela seleção significativamente inferior àquela potencialmente esperada. Desta forma, os animais devem ser avaliados nas condições ambientais nas quais sua progênie expressará seu desempenho para garantir que elas serão efetivas no aumento da eficiência da produção (COSTA, 2001).

Os métodos de seleção para uma determinada característica podem ser classificados em seleção individual, seleção pelo *pedigree*, seleção pela família e seleção pela progênie (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001).

O teste de progênie é essencial para um programa de melhoramento de gado de leite, uma vez que a produção de leite é uma característica de baixa a moderada herdabilidade e não se expressa nos machos (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001), os quais, por deixarem grande número de descendentes, especialmente se forem usados em inseminação artificial, são os principais responsáveis pelo melhoramento dos rebanhos. Daí a grande importância da identificação dos touros que são geneticamente superiores, estimando o valor genético destes, para características leiteiras, com base na produção de suas filhas (PENNA *et al.*, 2001).

O objetivo geral de um teste de progênie é identificar, avaliar, selecionar e difundir os reprodutores de alto valor genético com vistas ao aumento da produção e produtividade dos rebanhos (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001). Este processo leva, no mínimo, cinco anos para se obter um touro geneticamente testado e o ganho genético para produção de leite está em torno de 1% ao ano (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

As raças leiteiras européias já vêm sofrendo, há tempos, um intenso processo de seleção, principalmente pelo teste de progênie em países desenvolvidos e de clima temperado, havendo uma grande disponibilidade de

material genético provado e com níveis altamente satisfatórios em termos de produção. Nas raças zebuínas, apenas mais recentemente, iniciaram-se programas de melhoramento das raças Gir e Guzerá para leite, pelo teste de progênie de touros jovens (TEODORO *et al.*, 2001a). O Gir Leiteiro foi a raça zebuína pioneira no Brasil e no mundo a estabelecer programa delineado de melhoramento, com avaliação genética de touros para leite baseando-se no desempenho produtivo de suas progênies (PENNA *et al.*, 2001). Na busca de animais mestiços com elevada produtividade de leite, há necessidade de seleção de matrizes e reprodutores zebuínos com características leiteiras (GOMES, 2001a).

A resposta à seleção é medida pelo ganho genético que, por sua vez, é uma função do diferencial de seleção (diferença entre a média dos pais selecionados e a média da população de onde os pais provêm) e da herdabilidade da característica (VALENTE, VERNEQUE e DURÃES, 2001). Em geral, quanto maior a herdabilidade de uma característica, ou seja, proporção da variância do fenótipo de um animal que tem origem genética, maior a confiabilidade da seleção e, portanto, maior a resposta à seleção. Esta pode variar de 0,0 a 1,0, sendo que herdabilidade abaixo de 0,1 é considerada baixa; de 0,1 a 0,3, intermediária e acima de 0,3, alta (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001).

Os elementos que compõem o ganho genético em uma característica podem ser classificados em precisão na seleção; intensidade de seleção; variabilidade genética; e intervalo entre gerações (MARTINEZ, 1989).

• Precisão na Seleção

A precisão na seleção para uma característica é diretamente dependente de sua herdabilidade. Se a herdabilidade é alta, a seleção baseada no desempenho individual do animal permitirá uma seleção precisa dos valores genéticos. Se a herdabilidade é baixa, erros poderão ocorrer quando a seleção dos melhores genótipos é baseada apenas em seus desempenhos individuais. Neste caso, a precisão pode ser melhorada, medindo-se a mesma característica mais de uma vez no mesmo animal, considerando a repetibilidade da característica em estudo; medindo-se características correlacionadas,

considerando a correlação genética entre estas; medindo-se a mesma característica nos parentes, considerando o grau de relacionamento entre o indivíduo a ser avaliado e seus parentes (MARTINEZ, 1989).

• Intensidade de Seleção

A intensidade de seleção a ser aplicada é determinada pela proporção da população que deve ser mantida, estabelecendo-se, assim, a magnitude do diferencial de seleção. Quando poucos animais são mantidos para serem pais da próxima geração, a intensidade de seleção aumenta e, conseqüentemente, há um aumento do diferencial de seleção. De um modo geral, não é possível praticar uma alta intensidade de seleção de fêmeas, simplesmente porque se necessita de 50 a 60% delas para manter o rebanho estabilizado. No caso dos machos, necessita-se manter, em média, 4 a 5%, se o rebanho está estabilizado (MARTINEZ, 1989).

Há uma importância da taxa de fertilidade sobre a intensidade de seleção e, conseqüentemente, sobre o ganho genético (MARTINEZ, 1989). Nos rebanhos bem manejados ou estabilizados, pode-se aplicar uma certa pressão de seleção, eliminando as piores produtoras do rebanho a cada ano. Entretanto, quando o rebanho ainda está em expansão, ou quando é manejado de forma inadequada e com problemas reprodutivos, não haverá animais suficientes para reposição, não tendo, assim, chance de melhorar o rebanho por meio da seleção de suas vacas. Deste modo, todas as vacas e quase todas as novilhas serão necessárias para manter ou aumentar o rebanho (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001).

• Variabilidade Genética / Intervalo entre Gerações

A variabilidade genética está associada a cada característica e não é fácil de mudar. Trabalhos conduzidos com gado de leite têm demonstrado que a variabilidade vem permanecendo constante dentro das populações de animais puros e que não deve ser ainda um ponto de preocupação. Em relação ao intervalo entre gerações, de modo geral, em gado de leite, este é de 5 a 6 anos

para fêmeas e, sempre que for possível, deve-se procurar diminuí-lo, visando aumentar o ganho genético por ano (MARTINEZ, 1989).

Os criadores devem dar ênfase à seleção para maior produção de leite, com uma qualidade (teor de gordura, proteína) aceitável em nível de mercado. No entanto, um dos maiores problemas em aumentar a média de produção de leite através da seleção é que há um número muito pequeno de vacas submetidas a um sistema rotineiro de controle leiteiro e, precisa-se deste para avaliar o fenótipo da produção de leite. Além disto, para uma seleção precisa, é importante que os registros de produção expressem o potencial genético da vaca, que só será possível se os fatores de meio, os quais, influenciam a capacidade produtiva, forem levados em consideração, como duração do período de lactação, intervalo entre partos, números de ordenhas, idade da vaca ao parto, ano e época de parição, duração do período seco e manejo/alimentação (MARTINEZ, 1989).

Quando a seleção é praticada para produção de leite, que é, em geral, a característica mais importante em um programa de melhoramento, outras características podem ser alteradas.

A correlação genética entre duas características mostra a extensão em que os mesmos genes afetam a expressão das mesmas. Pode-se citar que, correlações genéticas entre produção de leite e características de tipo geralmente são baixas e pesquisas recentes mostram a existência de correlação genética negativa entre produção de leite e algumas características de tipo (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001). Neiva (1996) salientou que, embora o tamanho seja necessário para a alta produção de leite, não significa que úberes avantajados sejam necessariamente grandes produtores; isto porque, muitas vezes, o tamanho e o peso são devidos à presença de grandes quantidades de tecido conjuntivo e adiposo, e não de tecido secretor.

Por outro lado, fertilidade e produção estão altamente relacionadas e um aumento na produção de leite significa um aumento no intervalo entre partos. Se o objetivo é diminuir o intervalo entre partos, enquanto se aumenta a produção de leite, torna-se necessário que a ênfase seja negativa para intervalo entre partos e positiva para produção de leite. Como a variação de intervalo entre partos é 95% devida a fatores não-genéticos, pode-se obter melhores resultados através da

melhoria das condições gerais de manejo e alimentação das vacas do que da seleção para esta característica (MARTINEZ, 1989).

A vaca ideal é aquela que tem alta produtividade e longa vida útil. Felizmente, uma longa permanência no rebanho está positivamente correlacionada com alta produção. O criador pode ignorar vida útil e obter maior progresso por ano, para esta característica, se selecionar para produção, ao invés de basear-se diretamente na vida útil (MARTINEZ, 1989). Na verdade, a pesquisa tem demonstrado que as informações de produção são superiores às de tipo para determinar a longevidade dos animais (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001).

Em relação à produção e constituintes do leite (gordura, proteína, sólidos totais), pode-se dizer que a seleção para quantidade de leite provoca um pequeno decréscimo nos teores (%) dos constituintes, mas estas perdas são insignificantes, no entanto, os aumentos nas quantidades dos constituintes podem ser consideráveis (MARTINEZ, 1989).

As herdabilidades e as correlações genéticas das características são fatores que devem ser considerados em um programa de seleção visando o melhoramento genético do rebanho. Na **Tabela 1** estão resumidos os valores médios de herdabilidade das características mais importantes em gado de leite e as correlações com a produção de leite.

Tabela 1 – Resumo dos valores médios de herdabilidade de diferentes características e suas correlações com a produção de leite

Característica	Herdabilidade	Correlação Genética
Produção de Leite ²	0,20 a 0,30	–
Produção de Gordura ²	0,20 a 0,30	0,85 a 0,95
Produção de Proteína ²	0,20 a 0,30	0,85 a 0,95
Produção de Sólidos Totais ²	0,20 a 0,30	0,85 a 0,95
Produção de Proteína, Lactose e Minerais ²	0,20 a 0,30	0,85 a 0,95
Percentagem de Gordura ²	0,50 a 0,60	-0,20 a -0,50
Percentagem de Proteína ²	0,45 a 0,55	-0,20 a -0,45
Percentagem de Sólidos Totais ²	0,60	-0,20
Percentagem de Proteína, Lactose e Minerais ²	0,45 a 0,55	-0,20 a -0,45
Eficiência de Conversão Alimentar ²	0,30 a 0,40	0,50 a 0,60
Idade à Primeira Cria ¹	0,18 a 0,56	NI
Persistência da Lactação ³	0,40	NI
Duração da Vida Produtiva ²	0,00 a 0,10	0,80
Período de Serviço ³	0,01 a 0,10	NI
Serviços por Concepção ³	0,03 a 0,07	NI
Intervalo entre Partos ²	0,00 a 0,10	0,35 a 0,60
Tamanho a Idade Adulta ²	0,30 a 0,50	-0,20 a 0,10
Velocidade de Ordenha ³	0,10 a 0,20	NI
Mastite ²	0,10 a 0,30	0,10
Tipo ²	0,15 a 0,30	0,00 a 0,20

Fonte: 1- Albuquerque (2003)

2- Martinez (1989)

3- Pereira (1996)

Obs.: NI: Não Informado

4.2 Desenvolvimento da Genética Molecular

A necessidade de produção de alimento cada vez mais crescente, em um mundo cada vez mais populoso, exige que se trabalhe com tecnologia que possa ser aplicada diretamente no campo, maximizando a produção por área. Na bovinocultura de leite, visando maior produção, são necessários modelos de seleção genética para garantir a utilização de animais geneticamente superiores para características desejadas (GARGALHONE, 1999).

É importante prever a produção de um animal, em termos de seleção, no início da vida do mesmo, diminuindo, assim, o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, tendo maior ganho genético anual e menores custos operacionais (KENNEDY, QUINTON e VAN ARENDONK, 1992).

A seleção clássica é baseada no fenótipo e, em muitas situações, este não se expressa no indivíduo (ex. produção de leite em machos) ou é de difícil mensuração (ex. resistência a doenças) (MARTINEZ e MACHADO, 2001). Além disto, para a maioria dos caracteres de interesse econômico, o fenótipo não retrata fielmente o genótipo de um indivíduo, pois a variação genética é poligênica e a expressão gênica é altamente influenciada pelo meio ambiente. Estes caracteres são denominados quantitativos e os locos que controlam a sua expressão são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTLs) (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

Na última década, várias tecnologias foram desenvolvidas para análise de genes e da variação genética em nível molecular que, aliadas à grande capacidade computacional para análise de dados, trazem uma nova perspectiva em relação ao progresso genético em programas de melhoramento animal. As técnicas de genética molecular são hoje uma forte ferramenta que vieram para auxiliar com grande potencial as técnicas clássicas de melhoramento, permitindo, com isto, a identificação mais rápida e eficiente de animais superiores (FRANCO, 2002).

O marcador genético de DNA é uma técnica que permite detectar diferenças na seqüência do DNA, possibilitando a seleção indireta para genes de interesse no melhoramento (MACHADO e MARTINEZ, 2001). Atualmente, foram

identificados mais de 2000 marcadores genéticos (THALER NETO, 2000) associados aos 60 cromossomos bovinos (FREITAS, 2001).

O uso de marcadores moleculares têm grande importância na implementação de esquemas de acasalamento, auxílio na seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração (BISHOP, HAWKINS e KEEFER, 1995). Permite, ainda, que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes da expressão do seu fenótipo, ou seja, pode-se determinar o potencial genético de um embrião sem que seja necessário avaliar a sua produção ou de sua progênie (COUTINHO e REGITANO, 2001).

As modernas técnicas da genética molecular permitem a identificação de marcadores para genes controlando locos de caracteres quantitativos (QTLs). Existem duas maneiras para associar polimorfismos de DNA com variação em QTLs. O procedimento do gene candidato se baseia na associação de uma variação fenotípica, para uma determinada característica, com uma variação na seqüência de DNA de genes conhecidamente envolvidos na fisiologia e desenvolvimento da característica em questão. Quando uma associação é encontrada, a seleção para a variação da seqüência do gene vai indiretamente ter um efeito na característica (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

O outro procedimento, citado pelos mesmos autores, utilizado para mapear QTLs, realiza uma varredura no genoma com marcadores moleculares, utilizando informações oriundas do mapa genético. Para a detecção de associações, é necessário possuir uma população de animais apresentando variabilidade para a característica a ser mapeada. Cada animal da população é genotipado com marcadores, cobrindo toda a extensão do genoma bovino e avaliado fenotipicamente para o caracter de interesse econômico. Os dados moleculares são comparados aos dados fenotípicos visando encontrar polimorfismos de DNA que expliquem a variabilidade para a característica em questão. Os marcadores com efeito significativo vão possibilitar determinar a posição do QTL no mapa genético. A região do mapa contendo o QTL pode ser saturada com mais marcadores, diminuindo o intervalo entre dois marcadores adjacentes, visando localizar possíveis genes candidatos que possam estar controlando a característica mapeada. Desta forma, os procedimentos de gene candidato e

varredura com marcadores se integram, possibilitando um ajuste fino no mapeamento do QTL.

A principal expectativa da aplicação dos QTLs identificados é a seleção assistida por marcadores. Com a identificação de marcadores ligados a características de interesse econômico, animais jovens, de ambos os sexos, podem ser selecionados, logo após o nascimento, com base no genótipo que eles carregam para os marcadores determinados. Desta maneira, animais com alto potencial genético podem ser mantidos no programa, enquanto os com baixo potencial genético podem ser descartados, evitando os custos necessários para a manutenção do animal por vários anos (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

A seleção assistida por marcadores 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).

Inúmeras técnicas dentro da biologia molecular estão disponíveis hoje para a detecção da variabilidade genética em nível do DNA, destacando-se a técnica de RFLP, PCR-RFLP, Microssatélites, SSCP, RAPD, AFLP, dentre outros.

• RFLP

Por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), entende-se, o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição. Tal polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA através do uso de enzimas de restrição e observado por hibridização destes fragmentos com sondas marcadas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). Como os fragmentos digeridos não podem ser visualizados no gel de agarose porque formam um rastro contínuo, para a detecção, tem que ser usada uma sonda que deve ser hibridizada ao DNA, após este ter sido transferido do gel para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, através de um método denominado *Southern Blot* (SOUTHERN, 1975).

O que possibilitou a utilização da técnica de RFLP foi a descoberta das enzimas de restrição, principais ferramentas usadas pelos biólogos moleculares na manipulação do DNA. Estas se ligam ao DNA e clivam a dupla fita do mesmo em sítios específicos dentro ou ao lado de seqüências particulares reconhecidas por cada enzima (SAMBROOK, FRITSCH e MANIATIS, 1989).

Para que o polimorfismo seja detectado, é necessário que as seqüências de nucleotídeos nas fitas de DNA de dois ou mais indivíduos comparados sejam distintas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998). O polimorfismo obtido é devido a inserções, deleções e mutações de ponto. Esta técnica tem a vantagem de ser codominante, pois permite distinguir os animais heterozigotos dos homozigotos (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

• PCR

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction* ou Reação em Cadeia da Polimerase) (REGITANO, 2001a). Esta foi inventada por Kary Mullis, em meados da década de 80, sendo um método para amplificação da molécula de DNA, em que poucas moléculas podem ser amplificadas com conseqüente produção de várias cópias (HOY, 1994).

A primeira etapa, realizada antes da reação de PCR, consiste em uma eficiente extração do DNA de células através de métodos que mantenham a sua integridade. A PCR envolve interações dinâmicas e complexas entre o DNA molde (DNA extraído), *primers* (oligonucleotídeos), dNTPs (desoxinucleotídeos), *Taq* DNA Polimerase (enzima) e tampão da enzima acrescido de magnésio, envolvendo três estágios conhecidos por etapa de desnaturação do DNA molde, anelamento do *primer* a uma determinada seqüência do ácido nucléico e extensão da nova fita para originar um novo DNA de dupla fita (INNIS e GELFAND, 1990).

Para a implantação da técnica de PCR, é importante ter como referência inicial a seqüência conhecida do DNA para o delineamento de *primers*. O *primer* é um pequeno polímero de oligonucleotídeos e se anela ao DNA molde extraído e já desnaturado fornecendo, assim, um sítio de iniciação para a enzima polimerase, que inicia a síntese de DNA, catalisando a incorporação de nucleotídeos e, desta forma, o alongamento da cadeia de DNA (HOY, 1994).

O processo de desnaturação, anelamento do *primer* ao alvo e a síntese do novo DNA é conhecido por ciclo. A quantidade de ciclos varia de 25 a 45, em média, com variação dependente, entre outros fatores, da concentração inicial de

DNA que será utilizada como molde. Em relação às temperaturas distintas que caracterizam a reação de PCR, a primeira etapa necessita de alta temperatura, 92°C a 97°C, para romper as pontes de hidrogênio que mantém hibridizadas as duas fitas de DNA. O próximo estágio, que é o pareamento e a ligação dos *primers* ao DNA a ele complementar, requer temperatura estabelecida na faixa de 55°C, em média. Após estes passos, a temperatura da reação é modificada para 72°C para ocorrer, então, a síntese do DNA (HOY, 1994).

Toda reação é executada *in vitro*, em pequenos volumes e automaticamente, em aparelho termociclador, programado para atingir corretamente cada uma das temperaturas previstas a cada etapa, executando o número de ciclos programados. Terminada a reação, uma alíquota é removida e pode ser analisada por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida. O gel é corado com brometo de etídio e visualizado sob luz ultravioleta para verificar se o DNA amplificado corresponde ao tamanho esperado e se há amplificação inespecífica indicada pela presença de outros fragmentos de DNA (BRENTANO, 1997).

No teste de PCR, um único protocolo não se adequa a todas as situações, assim, parâmetros envolvidos na reação são modificados a cada nova aplicação da PCR visando sua 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).

• PCR-RFLP

Após a descoberta e otimização da PCR, juntamente com o domínio da técnica de RFLP e a facilidade de se sequenciar o DNA, surgiu a alternativa de se converter marcadores RFLP em marcadores baseados em PCR (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

Para a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) se utiliza a informação da seqüência do DNA de um gene candidato ou de uma outra seqüência qualquer, para desenhar *primers* que serão utilizados na amplificação do DNA pela PCR. Uma vez sintetizados os *primers* específicos, a seqüência-alvo é amplificada pela reação de PCR,

seguido-se, posteriormente, a digestão do produto amplificado com enzima de restrição, visando detectar possíveis mutações de ponto na seqüência do DNA (MACHADO e MARTINEZ, 2001).

A reação de clivagem ou digestão do DNA com enzima de restrição depende de alguns parâmetros, entre os quais, a pureza do DNA a ser digerido; a temperatura ótima de reação, que pode variar de 37°C a 65°C, dependendo da enzima; e a composição do tampão de reação. A observação das condições ideais para a reação de cada enzima é importante, não apenas para a obtenção da máxima atividade, mas também para garantir a especificidade da reação. O tempo de clivagem depende da quantidade de enzima e de substrato. Após a digestão, os produtos são carregados em gel de agarose e visualizados sob luz ultravioleta (REGITANO, 2001b).

A técnica de PCR-RFLP é rápida, não envolvendo hibridizações, que são muito trabalhosas e demoradas, no entanto, requer o conhecimento da seqüência do DNA para sintetizar os *primers* (MACHADO e MARTINEZ, 2001). A principal vantagem desta técnica, quando comparada à técnica de RFLP, se baseia no fato de que apenas o segmento de DNA que abriga o sítio polimórfico de restrição é amplificado para posterior análise. Como resultado, após a clivagem com a enzima de restrição apropriada, um número limitado de fragmentos é obtido, os quais podem ser facilmente discriminados de acordo com o tamanho (REGITANO, 2001b).

QTLs afetando características importantes economicamente, como produção de leite, saúde e tipo têm sido identificados em gado de leite.

Em uma pesquisa, dez marcadores microssatélites de DNA foram utilizados para procurar associações com QTL afetando características de produção de leite em sete famílias de bovinos holandeses. Encontrou-se um marcador no cromossomo 21 com efeito significativo nas quantidades de leite e proteína (RON *et al.*, 1994).

Foi realizado um estudo em bovinos holandeses dos Estados Unidos, distribuídos em sete famílias, com o objetivo de identificar QTL para determinados caracteres quantitativos. As famílias foram genotipadas para vinte marcadores microssatélites localizados em 15 cromossomos e foram analisadas 28 características, dentre estas, características de tipo, produção/composição de

leite, quantidade de células somáticas (um indicador de resistência à mastite) e longevidade. Marcadores nos cromossomos 6 e 14 foram associados a um aumento na percentagem de proteína. O marcador no cromossomo 14 teve, também, uma certa probabilidade de estar associado com mudanças na produção de leite e percentagem de gordura. Além disto, a longevidade foi associada a um marcador no cromossomo 16 (ASHWELL *et al.*, 1998).

Um outro trabalho foi conduzido com touros holandeses frísios, pertencentes a oito famílias. Marcadores com associações altamente significativas para características de produção de leite foram observados nos cromossomos 3 e 14. Marcadores associados à quantidade de células somáticas foram detectados nos cromossomos 5, 7, 22 e 23, sendo, também encontrado um QTL para longevidade no cromossomo 21. Entretanto, estudos confirmando a localização destes QTLs são necessários (HEYEN *et al.*, 2003).

Uma pesquisa também foi realizada com uma população holandesa frísia da América do Norte, em que foram utilizados 174 marcadores, sendo cada marcador testado para efeitos na produção de leite, gordura, proteína, percentagem de gordura, proteína, quantidade de células somáticas e longevidade. Foram encontrados marcadores com efeitos significativos na percentagem de gordura nos cromossomos 3 e 14 (HEYEN *et al.*, 1999).

Investigações de associações entre polimorfismos e características quantitativas, requerem, antes de tudo, o estudo da frequência alélica para determinados locos em uma população (FARIA *et al.*, 1997). Os polimorfismos devem afetar diretamente a expressão do gene por mudanças no *splicing* do RNA, estabilidade do RNA, taxa e regulação da transcrição do gene ou seqüência de aminoácidos do produto gênico (PARMENTIER *et al.*, 1999).

As pesquisas que envolvem marcadores para a produção leiteira estão direcionadas a alguns genes como o grupo das caseínas, lactoglobulinas e aos genes da via do GH (BIASE, 2003).

Um RFLP foi descrito no gene do GHRH em bovino com a utilização da enzima de restrição *HaeIII*, identificando-se dois alelos, A e B (MOODY, POMP e BARENDSE, 1995a). Em um estudo envolvendo 89 touros holandeses frísios, observou-se que o genótipo AA, obtido pela técnica de PCR-RFLP, com a enzima de restrição *HaeIII*, foi raro (7,7%), mas significativamente favorável para a

produção e percentagem de gordura. Entretanto, esta observação deve ser confirmada com um maior número de animais (PARMENTIER *et al.*, 1999).

Utilizando-se, também, o polimorfismo *HaeIII*-GHRH, outra pesquisa foi desenvolvida com animais frísios da Itália, observando-se uma baixa frequência do genótipo AA (6%) e nenhuma associação deste polimorfismo com produção de leite (MESSINA *et al.*, 1999).

Um polimorfismo no gene do GHRHR em bovino foi, também, identificado usando a endonuclease de restrição *Eco57I* (CONNOR *et al.*, 1999).

Em bovino, foi determinado um RFLP no *exon* 6 do gene do PIT-1 com a utilização da enzima de restrição *HinfI* (WOOLLARD *et al.*, 1994). Realizou-se um estudo com 89 touros holandeses frísios da Itália, para verificar uma associação entre o polimorfismo no gene do PIT-1, usando a enzima *HinfI* e características de produção de leite. A digestão dos produtos da PCR com a enzima revelou dois alelos: A (*HinfI*[-]) e B (*HinfI*[+]), cujas frequências foram 18,8 e 81,2%, respectivamente. Estes alelos geraram três genótipos e as frequências foram 2,2; 31,5 e 66,3% para AA, AB e BB, nesta ordem. O alelo A demonstrou um efeito superior para as produções de leite e proteína, mas inferior para percentagem de gordura (RENAVILLE *et al.*, 1997).

Outra pesquisa foi conduzida com 59 touros holandeses e, trabalhando com o polimorfismo no gene PIT-1, em que os produtos da PCR foram digeridos com a *HinfI*, observou-se uma frequência 13,5% para o genótipo AA, 37,3% para AB e 49,2% para BB. Também foi verificada uma superioridade significativa do alelo A para produção de leite, produção de proteína e uma inferioridade para produção de gordura. Estas investigações preliminares indicam que o PIT-1, ou melhor, o alelo A do PIT-1, é uma nova possibilidade de seleção para maiores produções de leite e proteína. Entretanto, tornam-se necessários estudos com um maior número de animais e com outras raças para estas conclusões terem maior confiabilidade (PARMENTIER *et al.*, 1999).

Considerando a sua importância no processo de lactação, o gene do GH é um alvo para estudos de variação molecular em associação com mérito genético em raças de bovino de leite. Usando diferentes enzimas de restrição, vários polimorfismos têm sido encontrados na espécie bovina (PARMENTIER *et al.*, 1999).

Com a técnica de PCR-RFLP, usando a enzima de restrição *AluI*, foram revelados dois alelos responsáveis pelas formas alternativas do GH em bovino, apresentando um resíduo de leucina (Leu) ou valina (Val) na posição 127. Esta pesquisa teve como objetivo determinar a frequência das formas alélicas do GH em 302 vacas das maiores raças leiteiras (Holandês, Pardo-suíço, Guernsey, Jersey, Ayrshire) e 70 touros holandeses, além de correlacionar o genótipo com o potencial genético dos animais para produção de leite. As frequências dos alelos leucina127 e valina127 foram 1 e 0 para as vacas da raça Pardo-suíço, 0,93 e 0,07 para Holandês, 0,92 e 0,08 para Guernsey, 0,79 e 0,21 para Ayrshire, 0,56 e 0,44 para Jersey, respectivamente. Em relação aos touros holandeses, as frequências dos alelos leucina127 e valina127 foram 0,96 e 0,04, na mesma ordem. As vacas holandesas homozigotas para o alelo leucina127 parecem apresentar maior potencial genético para produção de leite, em comparação com as vacas holandesas heterozigotas, já os touros holandeses com diferentes genótipos tiveram um potencial genético similar. As vacas da raça Jersey homozigotas para o alelo valina127 apresentaram maior potencial genético para produção leiteira, quando comparadas com as vacas, da mesma raça, heterozigotas ou homozigotas para o alelo leucina127. Pode-se concluir que as frequências dos alelos para o gene do GH não são similares nas diferentes raças (LUCY *et al.*, 1993) e esta variabilidade pode ser útil se utilizada em cruzamentos dirigidos no futuro (FARIA *et al.*, 1997).

A forma leucina127 pode, também, estar relacionada ao desenvolvimento ponderal dos animais, já que em animais de grande porte (Holandês e Pardo-suíço) predominou este alelo (LUCY *et al.*, 1993).

Novamente foi realizada uma pesquisa com 150 vacas holandesas para analisar a presença das variantes associadas com os aminoácidos leucina (*AluI*[+]) ou valina (*AluI*[-]) na posição 127 do GH e uma possível associação com produção leiteira. As frequências dos alelos leucina127 (*AluI*[+]) e valina127 (*AluI*[-]) foram 0,863 e 0,137, respectivamente. As vacas homozigotas para o alelo leucina127 (*AluI*[+/+]) tiveram maior frequência (73,3%), enquanto que as vacas homozigotas para o alelo valina127 (*AluI*[-/-]) foram mais raras (0,7%). E ainda, o mérito genético para produção de leite foi negativamente correlacionado com a presença do alelo valina127 (*AluI*[-]) do GH (LEE *et al.*, 1996).

Existe diferença na atividade das duas formas do GH (leucina ou valina na posição 127) que pode estar ligada à interação entre o hormônio e seu receptor. O aminoácido na posição 127 está próximo a resíduos envolvidos na ligação do GH ao GHR, assim, mudanças neste local da molécula (leucina ou valina) podem modificar a interação do GH com seu receptor e afetar o crescimento ou a produção de leite. Baseando-se em outra explicação, aspectos da fisiologia animal (número de receptores, afinidade de ligação) e/ou a química da molécula do GH (incluindo, solubilidade) parecem ser importantes para a relação entre genótipo e produção leiteira. O nível de expressão dos genes com leucina127 ou valina127 não devem ser equivalentes, levando a concentrações diferentes do GH no sangue, alterando, desta forma, o crescimento e a lactação (LUCY *et al.*, 1993).

Um polimorfismo foi detectado no gene do GH do bovino, com a enzima de restrição *HaeIII*. O fragmento amplificado continha o *exon* 5 e a região que flanqueia a extremidade 3' do gene (UNANIAN *et al.*, 1994).

Outro polimorfismo, utilizando a enzima de restrição *MspI*, está presente no terceiro *intron* do gene do GH em bovino (ZHANG *et al.*, 1993). O sinergismo entre o polimorfismo GH-*MspI* e características de produção de leite foi analisado em 128 touros holandeses, sendo que não houve qualquer associação significativa com as características estudadas (AGGREY *et al.*, 1998). Segundo Furu *et al.* (1988), em uma outra pesquisa, este polimorfismo, também não resultou em diferenças de indicadores para mérito genético em 100 touros holandeses.

O polimorfismo GH-*MspI* e seu efeito sobre características quantitativas, tais como produção total de leite, dias de lactação, produção total de gordura e percentagem de gordura, foram pesquisados em 116 animais, sendo 63 cruzados de Gir com Holandês e 53 puros da raça Holandesa. Com a técnica de PCR-RFLP, identificaram-se dois alelos, C e D. A frequência do alelo C, nos animais puros, foi 0,5755 contra 0,4444, nos animais cruzados e a frequência do genótipo CC, nos animais puros, também foi maior quando comparado aos animais cruzados, sendo de 0,3396 e 0,2063, respectivamente. Os animais CC apresentaram maior valor de produção total de leite e para cada alelo D observou-se uma diminuição de 386,5 kg de leite no final da lactação. Os animais puros

foram superiores aos cruzados em suas médias para dias de lactação, produções totais de leite e gordura (GARGALHONE, 1999).

Um quarto polimorfismo, com a utilização da enzima de restrição *TaqI*, foi descrito no gene do GH em bovino (ROCHA *et al.*, 1992), o qual se deve a uma inserção/deleção de, aproximadamente, 1000 pb na região 3' do gene. Realizou-se um experimento cujo objetivo foi investigar uma eventual associação entre polimorfismos no gene do GH (usando as enzimas de restrição *TaqI* e *MspI*), no gene do GHR (usando a enzima de restrição *TaqI*) e potencial genético para características de produção de leite em 91 touros holandeses frisios da Itália. Os polimorfismos GH-*TaqI* e GH-*MspI* não afetaram as características de produção de leite estudadas, mas em relação ao polimorfismo GHR-*TaqI*, houve um efeito negativo quanto à produção de leite e positivo quanto à percentagem de proteína (FALAKI *et al.*, 1996).

A relação entre o polimorfismo GHR-*AluI* e características de produção de leite foi analisada em 128 touros holandeses. Este polimorfismo, localizado na região 5' do gene do receptor do GH, a qual contém seqüências regulatórias que, interagindo com outros fatores, controlam a sua expressão, foi associado com produção de leite (AGGREY *et al.*, 1998).

O gene do IGF-1 revelou um polimorfismo, com a utilização da enzima *SnaBI*, localizado na região que flanqueia a extremidade 5' do gene, identificando-se dois alelos, A1 e A2. Vacas com genótipo A1A1 produziram mais leite do que vacas A1A2 ou A2A2 (MARSHALL e KIM, 2002).

A digestão dos produtos amplificados por PCR do gene do IGF-1R em bovino, com a enzima de restrição *TaqI*, revelou um polimorfismo com dois alelos (A e B). Entretanto, a utilização deste polimorfismo para identificar QTLs importantes economicamente, em bovino, deve ser limitada devido à baixa freqüência do alelo B e porque este alelo está apenas presente em *Bos indicus* (MOODY, POMP e BARENDSE, 1996).

5. Raça Girolando

O cruzamento *Bos taurus* (Europeu) e *Bos indicus* (Zebu), principalmente o cruzamento Holandês (H) x Gir (G), é uma prática muito utilizada no Brasil, obtendo-se os animais denominados Girolandos (TEODORO *et al.*, 2001b).

Na verdade, a raça Girolando se refere ao Gado Leiteiro Tropical com 5/8 de sangue Holandês e 3/8 de sangue Gir, entretanto, tem-se verificado a tendência de se chamar de Girolando qualquer animal que seja mestiço Holandês-Gir, independentemente da sua composição (TEIXEIRA, 2001b).

De acordo com Menezes (2002), o registro PS – Puro Sintético da “Raça Bovina Girolando”, se refere ao animal Bimestiço 5/8, ou seja, produto do cruzamento de animais com composição racial entre 9/16 de sangue Holandês e 7/16 de sangue Gir e 11/16 de sangue Holandês e 5/16 de sangue Gir, ou seja, aproximadamente 5/8 de sangue Holandês e 3/8 de sangue Gir (**Figura 2**).

Este mesmo autor cita que a origem do primeiro Girolando, no Brasil, não dista muito no tempo. A primeira notícia do surgimento destes animais data-se da década de 40, com a cobertura por acaso, de vacas Holandesas por um touro Gir no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. Como resultado, nasceram crias vigorosas que, precocemente, chegaram à idade de produção e se tornaram vacas de alta produção com grande rusticidade. Devido ao excelente resultado obtido, a multiplicação destes animais foi acelerada, pois se podia obter a rusticidade do Gir e a produção do Holandês em um único tipo animal, fenotipicamente soberano, com qualidades imprescindíveis para produção leiteira econômica nos trópicos. Em qualquer sistema de manejo, seja estritamente no pasto ou extremamente confinado, a eficiência econômica do Girolando é comprovada.

O animais da raça Girolando são os responsáveis pela maior parcela do leite produzido no Brasil, cerca de 80%, segundo aquele mesmo autor. Ele ressalta que algumas metas precisam ser melhoradas para consolidar o Girolando como o principal gado leiteiro do mundo tropical: teste de progênie dos reprodutores Girolando, o qual é responsável pela fixação da raça; incremento do controle leiteiro como subsídio essencial à seleção; precocidade econômica (idade à primeira cria, etc.); melhoramento da persistência da lactação e

habilidade materna; melhoramento do sistema mamário; fertilidade; e diminuição do intervalo entre partos.

Diagrama 1



Diagrama 2



Figura 2 – Estratégias de cruzamento para a obtenção do Puro Sintético da raça Girolando

OBJETIVO

Identificar uma possível associação entre um polimorfismo no gene do GHRH e os índices produtivos e reprodutivos: produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, em bovinos da raça Girolando.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- AGGREY, S.E. et al. Synergism between genetic markers in the growth hormone and growth hormone receptor genes in influencing milk related traits in Holsteins. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 6, 1998, Armidale, Austrália. **Anais...** v. 26, 1998. p. 281-283.
- AGUIAR, A.P.A. Fundamentos técnicos da exploração de leite a pasto. In: **SIMPÓSIO INTERNACIONAL SOBRE PRODUÇÃO INTENSIVA DE LEITE**, 5, 2001, Belo Horizonte. **Anais...** São Paulo: Instituto Fernando Costa, 2001. p. 44-58.
- ALBUQUERQUE, L.G. Sumário de touros gado de leite: quais os rumos e estratégias a serem definidas? In: **ENCONTRO DE RECICLAGEM DE JUÍZES E TÉCNICOS DA ABCZ**, 2003, Uberaba. **1 CD**.
- ALMEIDA, J.F. **Análise do polimorfismo Hinfl do gene obese por PCR-RFLP sobre diferentes características de desempenho em suínos Landrace**. 2002. Monografia (Biologia) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG).
- ÁLVARES, J.A.S. Tendências do agronegócio do leite e oportunidades para produção de leite estacional a pasto no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 209-241.
- ANUALPEC. Pecuária de leite. In: _____. **Anuário da pecuária brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2001. p. 195-235.
- ARGETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 76, n. 4, p. 1089-1107, Oct. 1996.
- ASHWELL, M.S. et al. Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 81, n. 12, p. 3309-3314, Dec. 1998.
- BARINAGA, M. et al. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. **Nature**, London, v. 306, n. 5938, p. 84-85, Nov. 1983.
- BENEDETTI, E. Produção de leite a pasto: bases práticas. In: _____. **Produção de leite a pasto: bases práticas**. Salvador: Copyright, 2002. p. 15-133.

* De acordo com a NBR 6023 de agosto de 2002.

- BIASE, F.H. **Associação de marcadores moleculares a características de produção na raça Nelore**. 2003. 52f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (SP).
- BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, Los Altos (Calif.), v. 43, p. 61-70, 1995.
- BISHOP, M.D. et al. Somatic cell mapping and restriction fragment length polymorphism analysis of bovine insulin-like growth factor. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 69, n. 11, p. 4306-4311, Nov. 1991.
- BRENTANO, L. Técnicas de biologia molecular no diagnóstico de doenças de aves. In: SIMPÓSIO SOBRE AMBIÊNCIA, SANIDADE E QUALIDADE DA CARÇA DE FRANGOS DE CORTE, 1997, Concórdia. **Anais...** Concórdia: Embrapa Suínos e Aves, 1997. p. 40-59.
- CONNOR, E.E.; ASHWELL, M.S.; DAHL, G.E. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 22, n. 4, p. 189-200, June 2002.
- CONNOR, E.E. et al. Mapping of the bovine growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) gene to chromosome 4 by linkage analysis using a novel PCR-RFLP. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 77, n. 3, p. 793-794, Mar. 1999.
- COSTA, C.N. Interação genótipo/ambiente. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 151-179.
- COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 12-24.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. 745-761, July 1998.
- FALAKI, M. et al. Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 79, n. 8, p. 1446-1453, Aug. 1996.

- FARIA, V.P. Avanços e desafios em P & D no segmento da produção da cadeia agroalimentar do leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 165-213.
- FARIA, F.J.C. et al. Análise do exon III ao V do gene do hormônio do crescimento bovino. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 188-189, 1997.
- FELDMAN, M. et al. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinology**, Baltimore, v. 133, n. 4, p. 1602-1608, Oct. 1993.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: _____. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 13-68.
- FERREIRA, M.B.D.; LOPES, B.C.; FERREIRA, J.J. Sustentabilidade do sistema de produção de leite com animais F1: perspectivas e pesquisa. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 383-404.
- FRANCO, M.M. **Genes da via do hormônio do crescimento e desempenho de suínos**. 2002. 87f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (MG).
- FREITAS, A.F. Genética e estatística: princípios. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 9-32.
- FURU, L.M. et al. Somatotropin Mspl and Alul polymorphisms relative to indicators of the genetic merit of Holstein AI sires. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 76 (supl. 1), p. 75, 1988.
- GARGALHONE, A.G. **Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite**. 1999. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, (MG).
- GE, W. et al. Rapid communication: single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, n. 8, p. 2229-2230, Aug. 2000.
- GOMES, S.T. Avanços sócio-econômicos em sistemas de produção de leite. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001a. p. 141-156.

- GOMES, S.T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001b. p. 21-37.
- HEYEN, D.W. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 1, n. 3, p. 165-175, Nov. 1999.
- HEYEN, D.W. et al. **The identification of quantitative trait loci influencing milk production and health traits in dairy cattle**. Disponível: <<http://traill.outreach.uiuc.edu/uploads/dairynet/papers/Theidentification.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2003.
- HOY, M.A. DNA amplification by the polymerase chain reaction: molecular biology made accessible. In: _____. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 203-244.
- HURLEY, W.L. Mammary gland growth and development. In: _____. **Lactation biology**. Disponível: <<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mamgrowth.html>>. Acesso em: 10 mar. 2003.
- INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCRs. In: INNIS, M.A. et al. **PCR protocols: a guide to methods and applications**. San Diego: Academic Press, 1990. p. 3-12.
- KENNEDY, B.W.; QUINTON, M.; VAN ARENDONK, J.A.M. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 7, p. 2000-2012, July 1992.
- KOPCHICK, J.J.; ANDRY, J.M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 71, n. 1/2, p. 293-314, Sept./Oct. 2000. Review.
- LEE, B.K. et al. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 13, n. 4, p. 373-381, July 1996.
- LUCY, M.C. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 10, n. 4, p. 325-333, Oct. 1993.
- MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. Marcadores moleculares: fundamentos e aplicações. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 215-230.

- MADALENA, F.E. A cadeia do leite no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 1-26.
- MAIJALA, K. Leite de vaca e desenvolvimento e bem estar humano. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 27-59.
- MARSHALL, D.M.; KIM, J. **Associations of beef production traits with polymorphisms in the growth hormone gene and insulin-like growth factor-1 gene**. Disponível: <http://www.ars.sdstate.edu/BeefExt/BeefReports/2000/associations_of_beef_production_.htm>. Acesso em: 26 ago. 2002.
- MARTINEZ, M.L. Fatores auxiliares na seleção de gado de leite. **Gado Holandês**, v. 54, n. 158, p. 13-29, 1989.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Identificação de locos de características quantitativas (QTL). In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 231-255.
- MATOS, L.L. Sistemas de produção de leite a pasto no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 159-177.
- MAYO, K.E. et al. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 55, p. 237-267, 2000.
- MENEZES, C.R.A. O programa Girolando. In: CURSO INTENSIVO DE JULGAMENTO DA RAÇA GIROLANDO, 6, 2002, Uberaba. **Anais...** Uberaba: FAZU, 2002.
- MESSINA, M. et al. Marcatori genetici associati all'asse somatotropico e polimorfismo delle proteine del latte. **La Razza Bruna Italiana**, n. 3, p. 27-29, 1999.
- MILLER, J.R. et al. Synteny mapping of the bovine IGHG2, CRC and IGF-1 genes. **Animal Genetics**, Oxford, v. 23, n. 1, p. 51-58, 1992.
- MOODY, D.E.; POMP, P.; BARENDSE, W. Rapid communication: restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine growth hormone-releasing hormone gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3789, Dec. 1995a.

- MOODY, D.E.; POMP, D.; BARENDSE, W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine PIT-1 gene and assignment of PIT-1 to bovine chromosome. **Animal Genetics**, Oxford, v. 26, n. 1, p. 45-47, Feb. 1995b.
- MOODY, D.E. et al. Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. **Animal Genetics**, Oxford, v. 26, n. 5, p. 341-343, Oct. 1995.
- MOODY, D.E.; POMP, D.; BARENDSE, W. Linkage mapping of the bovine insulin-like growth factor-1 receptor gene. **Mammalian Genome**, New York, v. 7, n. 2, p. 168-169, Feb. 1996.
- NEIVA, R.S. A glândula mamária. In: _____. **Fisiologia da lactação**. Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. p. 1-19.
- PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 17, n. 2/3, p. 139-148, Oct. 1999.
- PENNA, V.M. et al. Avaliações genéticas de características leiteiras em touros Zebus no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPVZ, 2001. p. 413-416.
- PEREIRA, J.C.C. Herança e meio. In: _____. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte, 1996. p. 38-48.
- PETERSENN, S.; SCHULTE, H. M. Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. **Vitamins and Hormones**, v. 59, p. 35-69, 2000.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. Efeitos do ambiente na expressão gênica. In: _____. **Genética na agropecuária**. 7.ed. São Paulo: Globo, 2000. p. 173-184.
- REGITANO, L.C.A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001a. p. 26-39.
- REGITANO, L.C.A. Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP). In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001b. p. 188-194.
- RENAVILLE, R. et al. PIT-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **Journal of Dairy Science**, Lancaster, v. 80, n. 12, p. 3431-3438, Dec. 1997.

- ROCHA, J.L. et al. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, n. 11, p. 3360-3370, Nov. 1992.
- RODRIGUES, C.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; PINHEIRO, L.E.L. Frequências alélicas das variantes do hormônio de crescimento bovino por análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) em raças de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 21, n. 2, p. 189-192, 1997.
- RON, M. et al. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. **Animal Genetics**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 259-264, Aug. 1994.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 1:5.2-5.3 2nd. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SEJRSEN, K. et al. High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 19, n. 2, p. 93-104, Aug. 2000. Review.
- SHIOTA, K.; YANAGIMACHI, R. Epigenetics by DNA methylation for development of normal and cloned animals. **Differentiation**, London, v. 69, n. 4/5, p. 162-166, Jan. 2002.
- SOLIMAN, E.B. et al. Effects of growth hormone (GH)-releasing hormone and its analogs on GH secretion from cultured adenohypophysial cells in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 14, n. 1, p. 39-46, Jan. 1997.
- SORENSEN, A.; KNIGHT, C.H. Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 23, n. 1/2, p. 111-123, July 2002.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 1975.
- TEIXEIRA, N.M. Fatores não-genéticos que afetam a produção de leite. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001a. p. 105-111.
- TEIXEIRA, N.M. Raças e tipos. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001b. p. 71-87.
- TEODORO, R.L. et al. Cruzamentos. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001a. p. 89-104.

- TEODORO, R.L. et al. Cruzamento tríplice de raças leiteiras: avaliação de cruzamentos de Jersey e Pardo-suíço com vacas Girolando. I. Produção e reprodução. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001b. p. 405-412.
- THALER NETO, A. Situação atual e perspectivas da utilização da genética molecular no melhoramento de bovinos leiteiros. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3, 2000, Belo Horizonte. **Anais...** p. 232-235.
- TORRES JR., R.A.A. et al. **Seção técnica**: considerações sobre o uso de animais cruzados e compostos em condições tropicais. Disponível: <http://www.aospeplan.com.br/corte/artigos/animais_cruzados.htm> Acesso em: 28 abr. 2003.
- TUGGLE, C.K.; TRENKLE, A. Control of growth hormone synthesis. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 13, n. 1, p. 1-33, Jan. 1996. Review.
- UNANIAN, M.M. et al. Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism in the bovine growth hormone gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 8, p. 2203, Aug. 1994.
- VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L. Seleção: resposta correlacionada. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 57-70.
- VALENTE, J.; VERNEQUE, R.S.; DURÃES, M.C. Seleção: métodos e auxílios. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 33-56.
- VERNEQUE, R.S.; VALENTE, J. Avaliação genética de vacas e touros. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 129-150.
- YU, T.P. et al. Association of PIT-1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 5, p. 1282-1288, May 1995.
- WOOLLARD, J. et al. HinfI polymorphism at the bovine PIT-1 locus. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 12, p. 3267, Dec. 1994.
- ZHANG, H.M. et al. Rapid communication: polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 71, n. 8, p. 2276, Aug. 1993.

CAPÍTULO 1

POLIMORFISMO NO GENE DO HORMÔNIO LIBERADOR DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E SEU EFEITO NOS ÍNDICES PRODUTIVOS E REPRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO

RESUMO

O Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) é um peptídeo hipotalâmico responsável pela produção e liberação do Hormônio do Crescimento da glândula pituitária anterior, o qual tem efeitos fisiológicos na lactação. As mais recentes tecnologias da Biologia Molecular tornaram possível o estudo do polimorfismo de DNA e sua relação com características quantitativas de interesse econômico, o que permitiu o desenvolvimento deste estudo, cujo objetivo foi associar um polimorfismo no gene do GHRH aos índices produtivos e reprodutivos: produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, em bovinos da raça Girolando. Para a genotipagem das 453 fêmeas, utilizou-se a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*). A digestão do fragmento amplificado de 455 pb, com a enzima *HaeIII*, revelou um polimorfismo com dois alelos: alelo A, apresentando os fragmentos de 317, 83 e 55 pb e alelo B, com os fragmentos de 196, 121, 83 e 55 pb. As freqüências genotípicas encontradas foram 2,87% para o genótipo AA, 36,64% para o AB e 60,49% para o BB; sendo a freqüência do alelo A, 21,19% e do alelo B, 78,81%. Para a análise estatística foram utilizados 299 animais e não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os genótipos AA, AB e BB quanto à produção de leite, média diária de produção de leite e intervalo entre partos médio. No entanto, foi determinada uma associação do polimorfismo *HaeIII*-GHRH com a duração da lactação, em que o genótipo AB foi superior ao BB ($p < 0,01$) e, pelo efeito médio de uma substituição alélica, observou-se que cada alelo B diminui, em dois dias, a duração da lactação na média do rebanho. Com este resultado, pode-se sugerir a utilização de touros AA ou AB nos cruzamentos visando aumentar a freqüência do alelo A e, conseqüentemente, a média do rebanho quanto à duração da lactação em dois dias.

PALAVRAS-CHAVE: GHRH, polimorfismo, bovino de leite.

POLYMORPHISM IN THE GROWTH HORMONE RELEASING HORMONE GENE AND ITS EFFECT IN THE PRODUCTIVE AND REPRODUCTIVE INDEXES IN GIROLANDO BREED CATTLE

ABSTRACT

The Growth Hormone Releasing Hormone (GHRH) is a hypothalamic peptide responsible for the production and release of the Growth Hormone in the anterior pituitary gland, which has physiological effects in lactation. The most recent technologies in Molecular Biology made possible the study of the polymorphism of DNA and its relation to quantitative characteristics of economic interest, which allowed the development of this study, whose objective was to associate a polymorphism in the GHRH gene to the productive and reproductive indexes: milk production, daily average milk production, lactation duration and delivery interval average, in Girolando breed cattle. In order to genotype the 453 females, the PCR-RFLP technique (Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism) was used. The restriction of the 455 bp amplicon, with the *HaeIII* enzyme, revealed a polymorphism with two alleles: A allele, presenting the fragments 317, 83 and 55 bp and B allele, with the fragments 196, 121, 83 and 55 bp. Genotypic frequencies found were 2.87% for the AA genotype, 36.64% for the AB genotype and 60.49% for the BB genotype, being the A allele frequency, 21.19%, and the B allele frequency, 78.81%. 299 animals were used for the statistical analysis and there was no significant difference ($p > 0.05$) among genotypes AA, AB and BB with regards to milk production, daily average milk production and delivery interval average. However, an association between the *HaeIII*-GHRH polymorphism and the lactation duration was determined, in which the AB genotype was superior to the BB genotype ($p < 0.01$) and, through the mean effect of an allelic substitution, it was noticed that each B allele reduces in two days the cattle's lactation duration average. With this result, it can be suggested the use of AA or AB bulls in the crosses aiming to increase the frequency of the A allele and, consequently, the lactation duration average by two days in the cattle.

KEYWORDS: GHRH, polymorphism, dairy cattle.

INTRODUÇÃO

O leite é um dos maiores agronegócios brasileiros (ÁLVARES, 2001) e, entre os produtos animais, é o mais completo dos alimentos (MAIJALA, 2001), composto por proteína, gordura, água, minerais e lactose (MADALENA, 2001).

Em 2000, o Brasil foi o 6º maior produtor mundial de leite, logo abaixo dos Estados Unidos, Índia, Rússia, Alemanha e França (ANUALPEC, 2001). Minas Gerais e Goiás são atualmente os Estados de maior produção, seguidos pelo Rio Grande do Sul, São Paulo e Paraná (MADALENA, 2001). No Estado de Minas, o maior crescimento da produção ocorre nas regiões do Triângulo Mineiro e Alto Paranaíba (GOMES, 2001).

Pode-se dizer que a produção de leite é a soma dos efeitos do meio ambiente, da genética da vaca e da possível interação do meio com a genética, assim, a genética propicia ao animal a capacidade de produzir leite, enquanto o ambiente fornece as condições para que ele o produza (VALENTE, DURÃES e MARTINEZ, 2001). Assim, de acordo com Ramalho, Santos e Pinto (2000), de nada vale um genótipo superior quando o ambiente é desfavorável, como também não adianta muito melhorar o ambiente se o genótipo não é o adequado.

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), fazendo-se necessário, então, modelos de seleção genética para garantir a utilização de animais superiores para características desejadas (GARGALHONE, 1999).

As técnicas de Biologia Molecular são poderosas ferramentas para auxiliar os métodos clássicos de melhoramento, sendo o estudo de genes candidatos uma importante via para a identificação de marcadores moleculares para assistir a seleção de animais (FRANCO, 2002).

A seleção assistida por marcadores permite que o potencial genético de um animal seja determinado com maior precisão e antes da expressão do seu fenótipo (COUTINHO e REGITANO, 2001), pois os animais podem ser avaliados

em qualquer idade, diminuindo, assim, o intervalo entre gerações. Também auxilia na seleção de características que não se expressam no indivíduo ou de difícil mensuração (MARSHALL e KIM, 2002).

As pesquisas que envolvem marcadores para a produção leiteira estão direcionadas, entre outros, aos genes da via do Hormônio do Crescimento (GH) (BIASE, 2003).

O GH tem efeitos fisiológicos na lactação, pois favorece a síntese do leite com composição normal, aumenta a disponibilidade de nutrientes necessários para a produção láctea, além da atividade por célula secretória, manutenção de células secretórias e maior aporte sanguíneo para a glândula mamária (ETHERTON e BAUMAN, 1998). Este hormônio apresenta, também, efeito mamogênico e pode estimular o crescimento mamário em todos os estágios de desenvolvimento: período fetal, do nascimento até a puberdade, período até a concepção, durante a gestação e durante a lactação (HURLEY, 2003).

O hormônio hipotalâmico, Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRH) e o Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento (GHRHR), são os principais reguladores da síntese e secreção do GH das células somatotróficas da glândula pituitária anterior (CONNOR, ASHWELL e DAHL, 2002).

O GHRH, na espécie bovina, está localizado no cromossomo 13 (MOODY, POMP e BARENDSE, 1995) e é um peptídeo de 44 aminoácidos, sendo processado a partir de uma proteína precursora com 103-108 aminoácidos (MAYO *et al.*, 2000). Segundo Soliman *et al.* (1997), as seqüências de aminoácidos em bovino e ovino diferem da seqüência humana em apenas cinco e seis resíduos, respectivamente.

Sabendo-se que os hormônios da via do GH atuam na lactação, estudos, ainda limitados, analisando a variabilidade no gene responsável pela codificação do GHRH, em nível de DNA e uma possível associação com características produtivas e reprodutivas em bovinos, têm sido desenvolvidos.

Um polimorfismo foi descrito no gene do GHRH em bovino com a utilização da enzima de restrição *HaeIII*, identificando-se dois alelos, A e B (MOODY, POMP e BARENDSE, 1995). Em um estudo envolvendo 89 touros holandeses frísios, observou-se que o genótipo AA, obtido pela técnica de PCR-RFLP (*Polymerase*

Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism), com a enzima de restrição *HaeIII*, foi raro (7,7%), mas significativamente favorável para a produção e percentagem de gordura. Entretanto, esta observação deve ser confirmada com um maior número de animais (PARMENTIER *et al.*, 1999).

Utilizando-se, também, o polimorfismo *HaeIII*-GHRH, outra pesquisa foi desenvolvida com animais frisios da Itália, observando-se uma baixa frequência do genótipo AA (6,0%) e nenhuma associação deste polimorfismo com produção de leite (MESSINA *et al.*, 1999).

OBJETIVO

Identificar uma possível associação de um polimorfismo no gene do GHRH com os índices produtivos e reprodutivos: produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, em bovinos da raça Girolando.

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.

1. Material Biológico e Dados Referentes aos Índices Produtivos e Reprodutivos

Para a realização deste experimento, foram coletadas amostras de sangue de 453 fêmeas da raça Girolando 5/8, provenientes de diversas fazendas dos Estados de Minas Gerais, Goiás, São Paulo, Rio de Janeiro e Bahia (Tabela 2).

Tabela 2 – Relação de fêmeas da raça Girolando 5/8 utilizadas para a realização do experimento, de acordo com cada Estado brasileiro

Estado	Número de fêmeas
Minas Gerais	337
Goiás	43
São Paulo	38
Rio de Janeiro	23
Bahia	12
Total	453

As amostras de sangue foram colhidas na veia mamária do animal, em tubos contendo vácuo e solução anticoagulante, sendo utilizada uma agulha para cada indivíduo. Este material foi, então, colocado em caixas de isopor com gelo reciclável e, posteriormente, enviado ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foi mantido sob refrigeração de 4°C a 8°C, em posição vertical, durante 24 a 48 horas, para ocorrer a sedimentação dos

eritrócitos e leucócitos, permitindo, assim, iniciar o experimento através da extração de DNA das amostras.

Em todas as etapas, ou seja, obtenção das amostras de sangue, transporte e manipulação das mesmas, foram tomados cuidados de modo a evitar qualquer tipo de contaminação que pudesse inviabilizar a utilização do material para a pesquisa.

Os 453 animais eram registrados junto à Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, mas apenas 299 fêmeas possuíam controle leiteiro oficial feito pelo Serviço de Controle Leiteiro da Associação, o que se justifica pela demora dos produtores em relação ao envio das pesagens do leite à Associação.

O Serviço de Controle Leiteiro atende a várias normas e procedimentos presentes na portaria nº 45 de Normas Técnicas de 10/10/86, da Secretaria Nacional de Produção Agropecuária do Ministério da Agricultura.

Os dados referentes aos índices produtivos e reprodutivos utilizados neste estudo foram: produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, descritos no Certificado Oficial de Desempenho Individual dos Animais, disponibilizado pelo Serviço de Controle Leiteiro.

2. Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue foi extraído segundo o método descrito em "A Workshop on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources" (A WORKSHOP ..., 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 *ependorf* (microtubo) de 2ml. Adicionou-se, então, 1ml de tampão de lise não diluído (20mM de Tris-HCl pH 7,5; 5mM de EDTA; 640mM de sacarose; 10mM de MgCl₂; 4% de Triton X-100), realizando-se, posteriormente, uma homogeneização e incubação em gelo por 5 a 10 minutos. Após este período, o material foi centrifugado a 4000g (aproximadamente 8000rpm) durante 3 minutos, descartando-se, em seguida, o sobrenadante. Mais duas lavagens foram necessárias com tampão de lise diluído (1:1) para se obter um *pellet* totalmente

limpo. Na última lavagem, o sobrenadante foi descartado, adicionando-se, posteriormente, 100µl de TE (10mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA) + sarcosyl 1% e 10µl de Proteinase K (10mg/ml). O material foi incubado *overnight* a 65°C, acrescentando-se, em seguida, 300µl de 8M guanidina-HCl / 0,49M de acetato de amônia e sendo submetido à agitação, a temperatura ambiente, por 1 hora até solubilizar todo o *pellet*. Foram adicionados 800µl de isopropanol absoluto gelado para precipitação dos ácidos nucléicos. A amostra foi centrifugada a 4000g durante 10 minutos, com posterior descarte do sobrenadante e permanência apenas do *pellet* (DNA), procedendo-se mais duas lavagens (4000g por 2 minutos) com 800µl de isopropanol 60% gelado. O *pellet* secou a temperatura ambiente ou em estufa e foi ressuscendido em 500µl de tampão de diluição TE (10mM de Tris-HCl pH 7,5; 1mM de EDTA). Normalmente, necessitou-se de 1 a 4 horas de incubação a 65°C para completa dissolução do *pellet*. As amostras de DNA foram estocadas a 4°C.

3. Técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) – Genotipagem dos Animais

A reação de PCR-RFLP foi desenvolvida tendo como referência o trabalho de Moody, Pomp e Barendse (1995), com modificações.

Regiões homólogas às seqüências do cDNA do GHRH em humano e camundongo foram utilizadas para desenhar os *primers* necessários na amplificação do GHRH em bovino. O produto resultante da amplificação pela PCR foi seqüenciado, demonstrando 91 e 77% de homologia à região do *exon 3* referente às seqüências do cDNA do GHRH em humano e camundongo, respectivamente.

A seqüência dos *primers* utilizados para a amplificação do gene do GHRH em bovino foi a seguinte: 5'GTAAGGATGC(C/T)(A/G)CTCTGGGT3' e 5'TGCCTGCTCATGATGTCCTGGA3', gerando um fragmento de 455 pb.

As reações de PCR foram realizadas em um termociclador (PTC-100 MJ Research, Inc) com o programa descrito a seguir: temperatura inicial de 95°C por 5 minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos para a desnaturação do DNA, 58°C

por 40 segundos para o anelamento dos *primers* e 72°C por 40 segundos para a extensão das novas fitas, terminando com 72°C por 5 minutos para a extensão final.

As condições usadas nas reações de PCR podem ser assim descritas, após otimização: 1,5µl de DNA genômico extraído; 3,5pmoles de cada *primer*; 100µM de cada dNTP; 1U de *Taq* DNA Polimerase; 1mM de MgCl₂; Tampão da enzima 1x e água, completando o volume para 25µl.

Durante a otimização da reação de PCR, diferentes volumes de DNA genômico extraído foram testados para padronizar a utilização de 1,5µl em todas as reações, não necessitando, assim, de uma quantificação de DNA para cada uma das amostras utilizadas. No entanto, para se obter uma estimativa da concentração de DNA, o DNA genômico de algumas amostras foi quantificado por espectrofotometria em uma densidade óptica (*optical density* – sigla em inglês, OD) de 260nm (OD260), resultando em uma concentração média de 294ng/µl, ou seja, 441ng de DNA, se considerar a utilização de 1,5µl nas reações. A concentração de DNA, em ng/µl, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$C = (OD260 \times F \times 50), \text{ sendo:}$$

C – concentração de DNA (ng/µl);

OD260 – leitura obtida pelo espectrofotômetro, com densidade óptica de 260nm;

F – fator de diluição (quando F for igual a 200, multiplicar o valor da OD260 por 10.000 para se obter o valor da concentração de DNA em ng/µl).

Após a reação de PCR, 5µl das amostras foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 120 volts durante 30 minutos, brometo de etídio (10µg/ml) para a coloração e visualização sob luz ultravioleta pelo sistema VDS® (Pharmacia Biosciences), para confirmar se houve a amplificação desejada (455 pb).

O produto da amplificação pela PCR foi, posteriormente, submetido à digestão enzimática, a 37°C durante 2 horas, com a enzima *HaeIII*, utilizando 1U da enzima; tampão da enzima 1x; 20µl do produto e água, completando o volume

para 22,5 μ l. A enzima *HaeIII* é isolada de *Haemophilus aegyptius* e os sítios de restrição enzimática podem ser identificados: 5'GG \downarrow CC3'; 3'CC \uparrow GG5'.

Um volume de 20 μ l da restrição foi submetido a eletroforese em gel de agarose 2,5%, utilizando 120 volts durante 1 hora, brometo de etídio (10 μ g/ml) para a coloração e visualização sob luz ultravioleta pelo sistema VDS[®] (Pharmacia Biosciences).

A digestão do produto de 455 pb, usando a enzima *HaeIII*, revelou um polimorfismo com dois alelos, caracterizados pelas seguintes bandas: alelo A \rightarrow 317, 83 e 55 pb e alelo B \rightarrow 196, 121, 83 e 55 pb, permitindo a identificação de três diferentes genótipos para os animais analisados: AA, AB e BB, cujo esquema está representado na **Figura 3**.

	AA	AB	BB
317 pb	—	—	
196 pb		—	—
121 pb		—	—
83 pb	—	—	—
55 pb	—	—	—

Figura 3 – Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos, após a restrição enzimática, com as respectivas bandas e pesos moleculares

4. Análise Estatística

Para verificar se a população estudada estava em equilíbrio de “Hardy-Weinberg”, realizou-se o teste do χ^2 , utilizando $p^2 + 2pq + q^2$ para calcular as freqüências genotípicas esperadas, partindo-se das freqüências alélicas observadas.

Foram genotipadas 453 fêmeas, no entanto, 299 animais, no total, foram utilizados na análise estatística, pois apenas estes possuíam controle leiteiro oficial feito pelo Serviço de Controle Leiteiro da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando e, conseqüentemente, tinham à disposição o Certificado

Oficial de Desempenho Individual dos Animais.

Para a análise da associação de um polimorfismo no gene do GHRH com os índices produtivos e reprodutivos (produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio), foram utilizados os testes:

- Análise de variância, considerando o modelo inteiramente casualizado:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}, \text{ em que:}$$

- y_{ij} é o valor fenotípico observado no indivíduo na repetição j do genótipo i ;
- μ é uma constante inerente a todas as observações;
- g_i é o efeito do genótipo i (AA, AB ou BB);
- e_{ij} é o erro aleatório associado a observação y_{ij} . $e_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$.

Utilizou-se o programa SAS.

- Nos casos em que houve efeito gênico, calculou-se o efeito médio de uma substituição alélica para estimar os valores médios acrescidos para cada alelo incorporado, por meio do seguinte modelo:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i, \text{ em que:}$$

- y_i é o valor fenotípico médio dos indivíduos com genótipo i ;
- β_0 é o intercepto do modelo;
- β_1 é o efeito médio de uma substituição alélica;
- x_i é uma variável "Dummy" assumindo os valores 0 para o genótipo AA, 1 para AB e 2 para BB;
- e_i é o erro aleatório associado a observação y_i . $e_i \sim N(0, \sigma^2)$.

Para a variável produção de leite, foram utilizados 251 animais (511 observações), adotando-se como covariáveis, no modelo acima, número de ordenhas diárias, regime alimentar, idade ao parto e duração da lactação.

Para as variáveis média diária de produção de leite e duração da lactação, adotou-se como covariáveis, no modelo acima, número de ordenhas diárias, regime alimentar e idade ao parto. Para a variável média diária de produção, foram utilizados 299 animais (572 observações) e para a duração da lactação

foram utilizados 251 animais (511 observações).

O teste t de *Student* foi utilizado para a comparação dos genótipos AA, AB e BB, dois a dois, quanto à duração da lactação.

Para a variável intervalo entre partos médio, foram utilizados 130 animais, adotando-se como covariáveis, no modelo acima, número de ordenhas diárias, regime alimentar e duração da lactação.

Em um total de 299 animais, 251 possuíam lactação encerrada, e, dentre estes, alguns apresentavam dados referentes a mais de uma lactação, o que explica o maior número de observações, em comparação ao número de animais. Os 48 animais restantes não tinham encerrado a lactação, portanto o único dado disponível era a média diária de produção de leite.

Para a classificação dos animais em relação às covariáveis, foram adotados os seguintes critérios:

- Número de ordenhas diárias:

- 2 → duas ordenhas diárias;

- 3 → três ordenhas diárias.

- Regime alimentar:

- 1 → extensivo: pasto + sal mineralizado;

- 2 → semi-intensivo: pasto + suplemento no cocho + sal mineralizado;

- 3 → intensivo: estabulado (confinado).

- Idade ao parto:

- Valores em meses.

- Duração da lactação:

- Valores em dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. Genotipagem dos Animais

Após a extração de DNA das 453 amostras de sangue coletadas de fêmeas da raça Girolando 5/8, o material foi submetido à reação de PCR, observando-se, através da eletroforese em gel de agarose 1,5%, a amplificação esperada do fragmento de 455 pb do gene do GHRH, como mostrado na **Figura 4**.

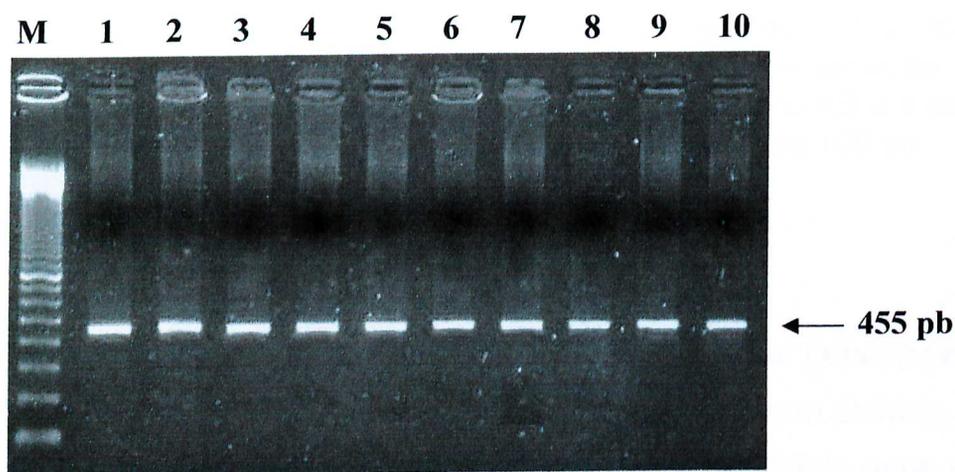


Figura 4 – Resultado da eletroforese em gel de agarose 1,5% da amplificação de 455 pb do gene do GHRH. A coluna “M” contém um marcador de 100 pb

O produto da amplificação pela PCR foi submetido à digestão enzimática, com a enzima *HaeIII*, gerando os fragmentos de 317, 83 e 55 pb, os quais identificaram os indivíduos de genótipo AA; 317, 196, 121, 83 e 55 pb para indivíduos de genótipo AB; 196, 121, 83 e 55 pb para indivíduos de genótipo BB, observados pela eletroforese em gel de agarose 2,5%, como mostrado na **Figura 5**.

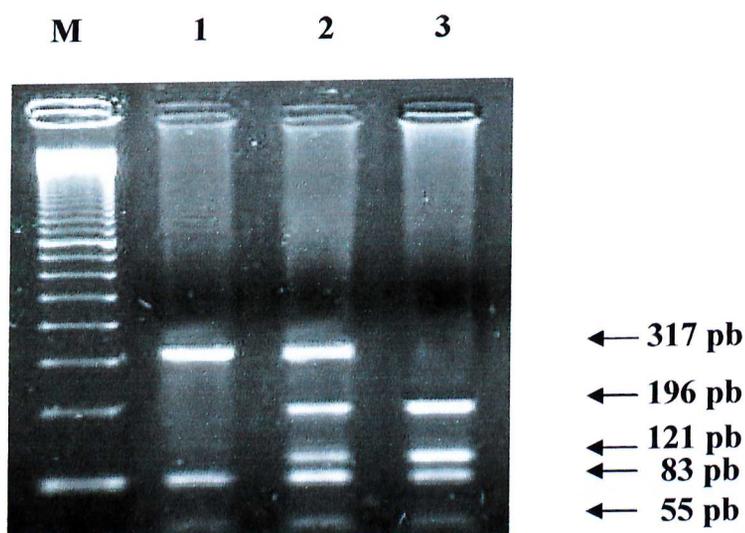


Figura 5 – Resultado da eletroforese em gel de agarose 2,5% do produto amplificado pela reação de PCR, após digestão enzimática. A coluna 1 representa o genótipo AA, a coluna 2, o genótipo AB e a coluna 3, o genótipo BB. A coluna “M” contém um marcador de 100 pb

2. Frequências Genotípicas e Alélicas

Após a genotipagem dos 453 animais, as frequências genotípicas para o gene do GHRH foram determinadas, conforme **Tabela 3**. Foram obtidas, também, as seguintes frequências alélicas: 21,19% para o alelo A e 78,81% para o alelo B.

Tabela 3 – Frequências genotípicas encontradas para o gene do GHRH, após a genotipagem dos 453 animais

Genótipos	Número de Animais	Frequência Genotípica (%)
AA	13	2,87
AB	166	36,64
BB	274	60,49
Total	453	100

Os resultados do teste do χ^2 demonstraram que a população estudada está em equilíbrio de “Hardy-Weinberg” ($p > 0,05$), indicando que tanto as frequências alélicas como as genotípicas se mantêm constantes de geração a geração.

A baixa frequência do genótipo AA encontrada no presente estudo (2,87%), apresentou similaridade a outros trabalhos descritos anteriormente com o polimorfismo *HaeIII*-GHRH: o genótipo AA foi raro, comparado aos outros genótipos, apresentando frequência de 6%, em um estudo com animais frísios da Itália (MESSINA *et al.*, 1999) e de 7,7%, em outra pesquisa envolvendo touros holandeses frísios (PARMENTIER *et al.*, 1999).

3. Análise Estatística

A análise de variância para número de ordenhas diárias, regime alimentar, idade ao parto, duração da lactação e o gene GHRH, considerando a utilização de um total de 299 animais, se encontra na **Tabela 4**.

Número de ordenhas diárias, regime alimentar, idade ao parto e duração da lactação, conforme **Tabela 4**, tiveram efeito significativo ($p < 0,05$) na produção de leite, média diária de produção de leite, duração da lactação e intervalo entre partos médio, justificando a utilização destes fatores como covariáveis, para que todos os dados das variáveis analisadas pudessem ser ajustados. Em relação ao gene do GHRH, houve efeito significativo ($p < 0,05$) apenas quanto à duração da lactação.

Tabela 4 – Análise de variância para número de ordenhas diárias, regime alimentar, idade ao parto, duração da lactação e o gene GHRH, considerando o efeito na produção de leite, média diária de produção de leite, média diária de produção de leite e duração da lactação e intervalo entre partos médio

Fontes de Variação	Produção de Leite ¹		Média Diária de Produção Leite ²		Duração da Lactação ²		Intervalo entre Partos Médio ³	
	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Grau de Liberdade	Quadrado Médio	Grau de Liberdade	Quadrado Médio
Número de ord. diárias	1	49219921,00*	1	934,02*	1	2404,79	1	18925,26*
Regime Alimentar	1	3268632,00	1	169,81*	1	15078,17	1	21156,86*
Idade ao Parto	1	18942388,15*	1	136,67*	1	7515,15	-	-
Duração da Lactação	1	433477213,95*	-	-	-	-	1	100624,47*
GHRH	2	492930,53	2	2,40	2	21173,68*	2	3825,05
Erro		504		566		505		376
Total		510		571		510		381

¹ Número de Ordenhas Diárias, Regime Alimentar, Idade ao Parto e Duração da Lactação foram usados como covariáveis para Produção de Leite.

² Número de Ordenhas Diárias, Regime Alimentar e Idade ao Parto foram usados como covariáveis para Média Diária de Produção de Leite e Duração da Lactação.

³ Número de Ordenhas Diárias, Regime Alimentar e Duração da Lactação foram usados como covariáveis para Intervalo entre Partos Médio.

* Significativo em nível de 5% de probabilidade.

As médias ajustadas para a produção de leite, média diária de produção de leite, intervalo entre partos médio e duração da lactação, referentes a cada genótipo do gene do GHRH, se encontram na **Figura 6**, **Figura 7**, **Figura 8** e **Figura 9**, respectivamente. A análise da associação do polimorfismo *HaeIII*-GHRH no gene do GHRH com a produção de leite, média diária de produção de leite, intervalo entre partos médio e duração da lactação, se encontram na **Tabela 5**, **Tabela 6**, **Tabela 7** e **Tabela 8**, respectivamente.

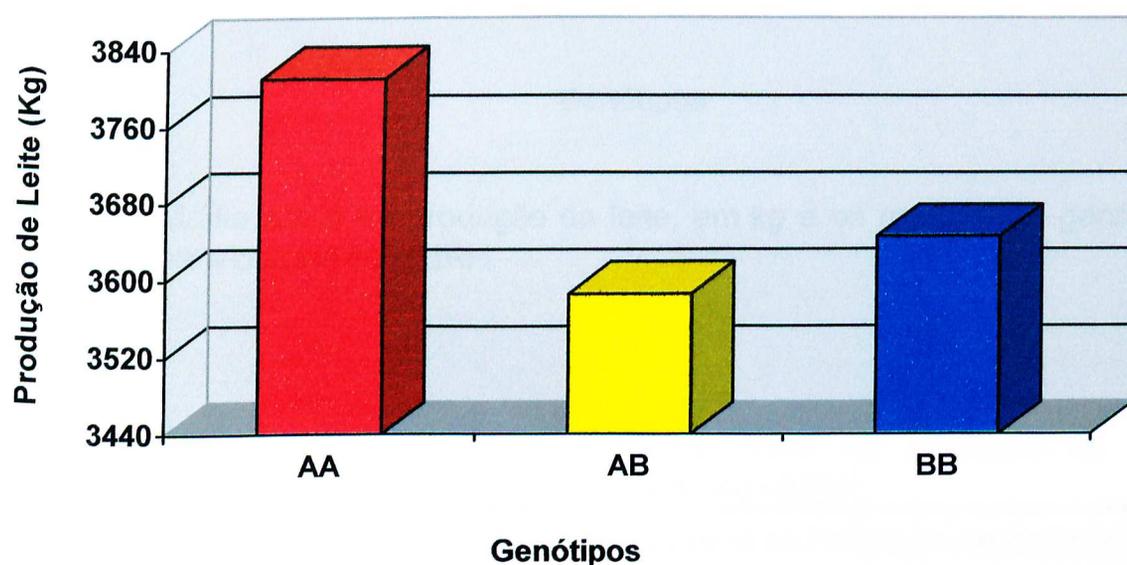


Figura 6 – Produção de leite, em kg e os respectivos genótipos para o gene do GHRH

Tabela 5 – Médias ajustadas para a produção de leite, referentes a cada genótipo do gene do GHRH

Genótipos	Produção de Leite (kg)
AA	3811,07738 ^a
AB	3587,41824 ^a
BB	3646,66095 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5%.

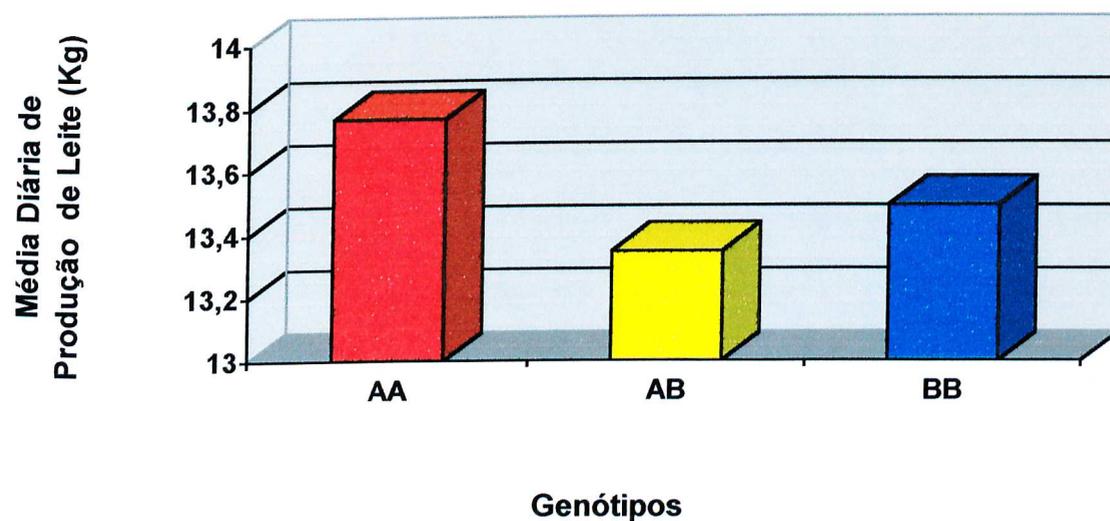


Figura 7 – Média diária de produção de leite, em kg e os respectivos genótipos para o gene do GHRH

Tabela 6 – Médias ajustadas para a média diária de produção de leite, referentes a cada genótipo do gene do GHRH

Genótipos	Média Diária de Produção de Leite (kg)
AA	13,7689468 ^a
AB	13,3470755 ^a
BB	13,4932678 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5%.

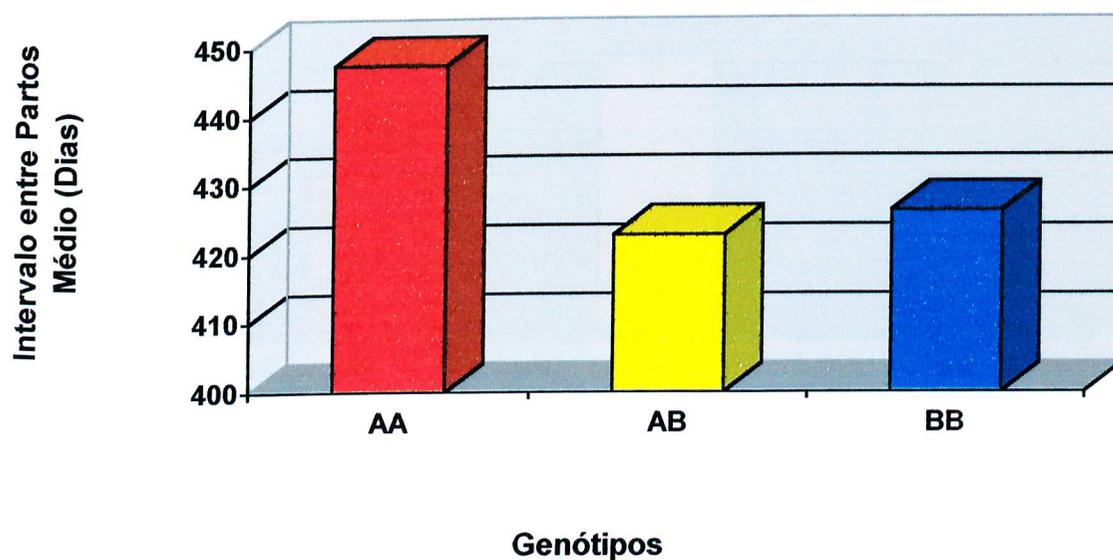


Figura 8 – Intervalo entre partos médio, em dias e os respectivos genótipos para o gene do GHRH

Tabela 7 – Médias ajustadas para o intervalo entre partos médio, referentes a cada genótipo do gene do GHRH

Genótipos	Intervalo entre Partos Médio (Dias)
AA	447,546212 ^a
AB	422,759572 ^a
BB	426,254211 ^a

Médias seguidas pela mesma letra não diferem estatisticamente em nível de 5%.

Pode-se verificar que não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os genótipos AA, AB e BB quanto à produção de leite, média diária de produção de leite e intervalo entre partos médio. Em relação ao intervalo entre partos médio, justificando o resultado encontrado, sabe-se que a sua variação é 95% devido a fatores não-genéticos (MARTINEZ, 1989).

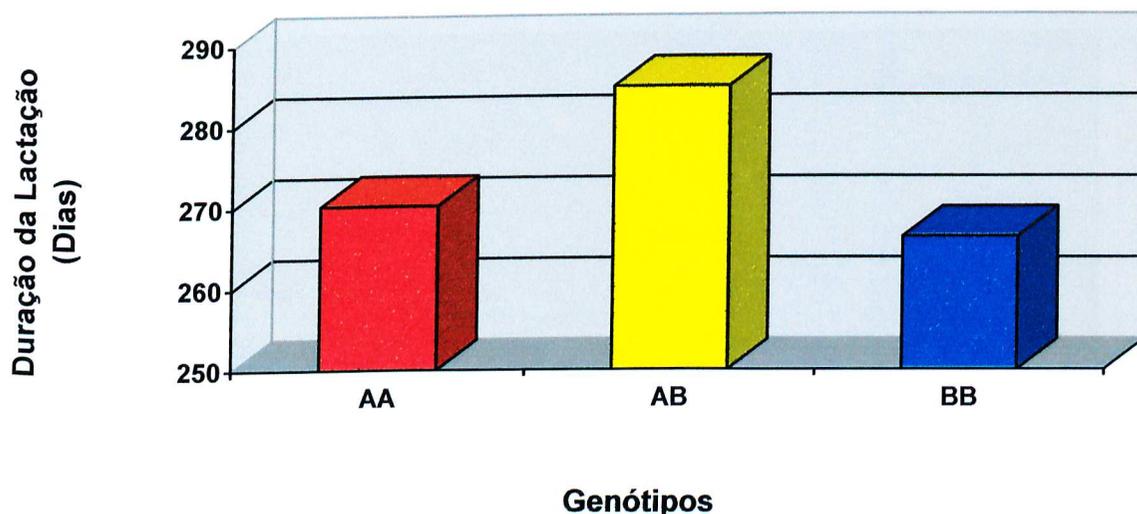


Figura 9 – Duração da lactação, em dias e os respectivos genótipos para o gene do GHRH

Tabela 8 – Médias ajustadas para a duração da lactação, referentes a cada genótipo do gene do GHRH

Genótipos	Duração da Lactação (Dias)
AA	270,281526 ^{ab}
AB	284,957039 ^a
BB	266,294787 ^b

Médias seguidas de letras diferentes diferem estatisticamente em nível de 1%.

Verificou-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) entre os genótipos AB e BB quanto à duração da lactação, sendo o genótipo AB superior ao homocigoto BB.

No caso da duração da lactação, em que houve efeito gênico, estimou-se o efeito médio de uma substituição alélica, como mostrado na **Figura 10**. Observa-se, através da fórmula $y = -1,9934x + 275,84$, que cada alelo B diminui a duração da lactação em, aproximadamente, dois dias na média do rebanho.

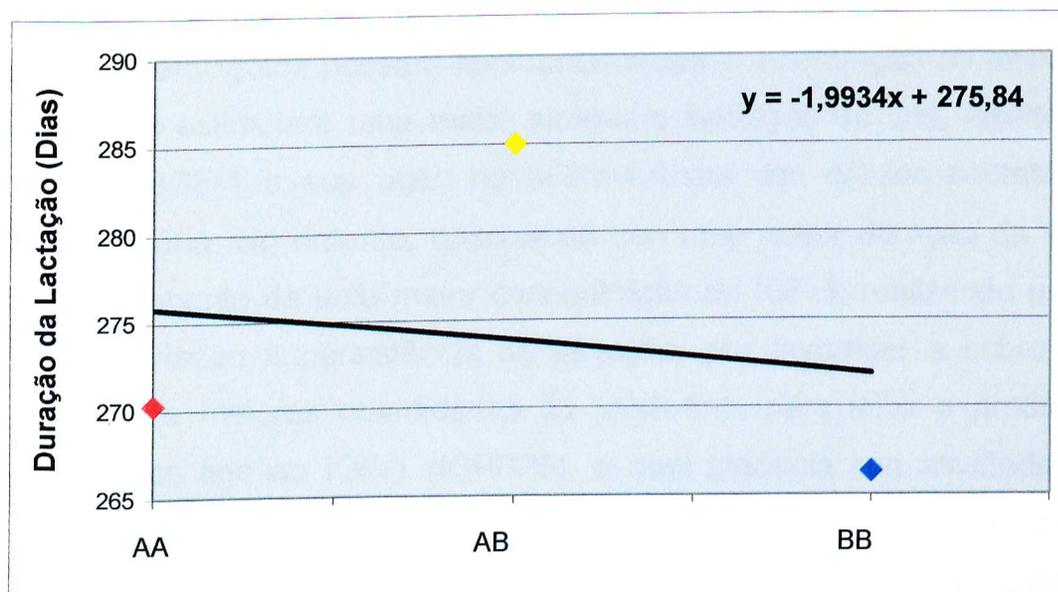


Figura 10 – Efeito médio de uma substituição alélica, em relação à duração da lactação

A persistência ou duração da lactação depende do número de células epiteliais glandulares, além da atividade secretora destas células (NEIVA, 1996) sendo uma característica de alta herdabilidade. Baseando-se nos dados da literatura, sugere-se a existência de uma interação entre o GH, o IGF-1 e a prolactina para manter a sobrevivência celular, aumentando, desta forma, a duração da lactação e, conseqüentemente, a produção de leite (SORENSEN e KNIGHT, 2002).

O número de células secretórias na glândula mamária declina, paralelamente, com a redução na produção de leite, sendo esta perda proveniente de apoptose celular. Há evidência que, em alguns tecidos, incluindo a glândula mamária, o IGF-1 possa atuar como um fator de sobrevivência celular ou, também, fator anti-apoptótico. Então, existe uma hipótese de que ações do GH na glândula são mediadas pela sobrevivência celular induzida através do IGF-1. Entretanto, proteínas de ligação a IGF (IGFBPs) modulam as ações do IGF-1, assim, sugere-se que as células mamárias produzam uma proteína de ligação inibitória (IGFBP5) que bloqueia a função do IGF-1 na sobrevivência celular. Por outro lado, a prolactina é altamente responsável pela repressão na produção da IGFBP5 durante a lactação (SORENSEN e KNIGHT, 2002).

Analisando o polimorfismo *Haelll*-GHRH, observou-se que o genótipo AB foi superior ao genótipo BB quanto à duração da lactação. Isto sugere que os indivíduos heterozigotos possam apresentar maior concentração ou atividade de GHRH, o qual estimulará uma maior síntese e secreção do GH, resultando na produção do IGF-1 e sua ação na sobrevivência das células secretórias da glândula mamária. No entanto, observa-se que uma maior duração da lactação resulta não somente de uma maior concentração do IGF-1, realizando um efeito positivo em relação à persistência da lactação, por favorecer a sobrevivência celular, mas de maiores quantidades da prolactina, para inibir a produção da proteína que se liga ao IGF-1 (IGFBP5), a qual bloqueia sua atividade. Desta forma, uma pesquisa poderia ser realizada visando analisar um polimorfismo no gene da prolactina e sua interação com os genes que participam da via do GH, a fim de determinar uma combinação genotípica favorável a uma maior duração da lactação e, conseqüentemente, maior produção de leite.

A produção de leite em 305 dias de lactação tem sido considerada o ideal, pois o que se deseja é uma alta produção por ano e todos os anos, ou seja, um parto por ano (TEIXEIRA, 2001).

Observou-se que o efeito médio de substituição alélica foi de dois dias, sendo o alelo A favorável para a duração da lactação (**Figura 10**). Pode-se, então, sugerir a utilização de touros AA ou AB nos cruzamentos, de modo a aumentar a freqüência do alelo A na população, favorecendo, assim, um aumento de dois dias na média do rebanho quanto à duração da lactação. Os machos, por deixarem grande número de descendentes, especialmente se forem usados em inseminação artificial, são os principais responsáveis pelo melhoramento dos rebanhos, daí a grande importância da utilização de touros geneticamente superiores (PENNA *et al.*, 2001).

Na verdade, o aumento de dois dias na média do rebanho quanto à duração da lactação, representa 26,88 kg de leite a mais para cada alelo A, o que resultou da multiplicação de dois dias pela média diária de produção de leite do rebanho, ou seja, 13,44 kg de leite. Se um produtor direcionar os cruzamentos, a fim de aumentar a freqüência do alelo A na população, haverá um ganho de R\$ 12,10 (26,88 x R\$ 0,45) para cada alelo A incorporado, considerando o preço médio do kg de leite R\$ 0,45.

Neste trabalho, utilizando animais da raça Girolando 5/8, não houve uma associação do polimorfismo *Haelll*-GHRH com a produção de leite e este resultado foi similar ao encontrado em outro trabalho com animais frísios da Itália, no qual nenhuma associação deste polimorfismo com produção de leite também foi observada (MESSINA *et al.*, 1999). Já em outra pesquisa, envolvendo touros holandeses frísios, observou-se que o genótipo AA foi significativamente favorável para a produção e percentagem de gordura (PARMENTIER *et al.*, 1999). Infelizmente, o Certificado Oficial de Desempenho Individual dos Animais, nesta pesquisa, não apresentava os valores de percentagem e quantidade dos constituintes do leite, como gordura, assim, não foi possível associar o polimorfismo *Haelll*-GHRH com estas características. No entanto, analisando a característica gordura, sabe-se que existe uma correlação positiva entre produção de gordura e produção de leite e uma correlação negativa entre teor (%) de gordura e produção de leite (Tabela 1). A correlação positiva entre produção de gordura e produção de leite é maior que a correlação negativa entre teor (%) de gordura e produção de leite (MARTINEZ, 1989), assim, selecionando-se o genótipo AA, o qual foi favorável para produção e percentagem de gordura, no trabalho acima, poder-se-ia esperar uma maior produção de leite.

Os estudos analisando um polimorfismo no gene do GHRH e uma possível associação com características produtivas e reprodutivas em bovinos, têm sido, ainda, limitados, o que impede uma maior comparação entre o presente trabalho e outras pesquisas.

A realização deste estudo demonstrou, que, apesar de não significativo estatisticamente, o genótipo AA apresentou maior produção de leite (Figura 6 e Tabela 5) e maior média diária de produção de leite (Figura 7 e Tabela 6). Sabendo-se que a produção de leite é obtida multiplicando-se a média diária pela duração da lactação, poder-se-ia pensar que uma maior média diária resultaria em uma maior produção de leite, já que a duração da lactação foi utilizada como covariável, assim, o genótipo favorável à média diária teria que ser o mesmo para produção de leite, o que confirma o resultado encontrado.

A baixa frequência do genótipo AA no rebanho (2,87%) pode ter interferido nos resultados, mascarando possíveis associações do polimorfismo *Haelll*-GHRH com produção de leite e média diária de produção de leite, ou, talvez, até

impedindo a identificação do genótipo AA como o favorável para a duração da lactação e não o AB, como demonstrado (**Figura 9 e Tabela 8**). O pequeno número de vacas com o genótipo AA, e ainda, de origens diversas apenas aumentam o erro experimental, pois há grande influência ambiental mascarando os possíveis efeitos benéficos do alelo A.

CONSIDERAÇÕES

Os animais Girolando 5/8 foram escolhidos para se trabalhar porque a raça Girolando se refere ao Gado Leiteiro Tropical com 5/8 de sangue Holandês e 3/8 de sangue Gir, entretanto, tem-se verificado a tendência de se chamar de Girolando qualquer animal que seja mestiço Holandês-Gir, independentemente da sua composição. Desta forma, para a fixação da raça e consolidar o Girolando como o principal gado leiteiro do mundo tropical, já que é responsável por, aproximadamente, 80% da produção de leite no Brasil e apresenta qualidades imprescindíveis para produção leiteira econômica nos trópicos, busca-se melhorar alguns fatores, destacando-se, precocidade econômica (idade à primeira cria, etc.); persistência da lactação e habilidade materna; fertilidade; e diminuição do intervalo entre partos. Neste sentido, o polimorfismo *Haelll-GHRH* parece ser importante no que se refere à maior duração da lactação.

Uma situação importante a ser considerada em um delineamento experimental é que qualquer alteração em um dos genes da via do GH que cause uma falha na transdução de sinal, como mutação, impedirá as ações do hormônio, afetando, assim, as características relacionadas à produção de leite. Estudos serão realizados, após os 453 Certificados Oficiais de Desempenho Individual dos Animais serem disponibilizados pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, analisando os polimorfismos dos genes da via do GH, em conjunto, para se verificar a interação entre estes e os índices produtivos e reprodutivos.

As técnicas de genética molecular são hoje uma forte ferramenta que vieram para auxiliar com grande potencial as técnicas clássicas de melhoramento, permitindo, com isto, a identificação mais rápida e eficiente de animais superiores (FRANCO, 2002). A seleção assistida por marcadores 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).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ALMEIDA, J.F. **Análise do polimorfismo *HinfI* do gene obese por PCR-RFLP sobre diferentes características de desempenho em suínos Landrace.** 2002. Monografia (Biologia) – Universidade Federal de Uberlândia (MG).

ÁLVARES, J.A.S. Tendências do agronegócio do leite e oportunidades para produção de leite estacional a pasto no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 209-241.

ANUALPEC. Pecuária de leite. In: _____. **Anuário da pecuária brasileira.** São Paulo: FNP Consultoria & Comércio, 2001. p. 195-235.

A WORKSHOP on DNA Technologies and Selection of Animal Genetic Resources, 1992, Brisbane (Austrália), June. In: CSIRO Molecular Animal Genetics Centre and Centre for Molecular Biology and Biotechnology at the University of Queensland. **Practical Manual.** 1992. p. 70-71.

BIASE, F.H. **Associação de marcadores moleculares a características de produção na raça Nelore.** 2003. 52f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (SP).

BORGES, M. **Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovinos de corte.** 1997. 119f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (MG).

CONNOR, E.E.; ASHWELL, M.S.; DAHL, G.E. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 22, n. 4, p. 189-200, June 2002.

COUTINHO, L.L.; REGITANO, L.C.A. Uso de marcadores moleculares na indústria animal. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 12-24.

ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 78, n. 3, p. 745-761, July 1998.

FRANCO, M.M. **Genes da via do hormônio do crescimento e desempenho de suínos.** 2002. 87f. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (MG).

* De acordo com a NBR 6023 de agosto de 2002.

GARGALHONE, A.G. **Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite.** 1999. 58f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia (MG).

GOMES, S.T. Diagnóstico e perspectivas da produção de leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento.** Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 21-37.

HURLEY, W.L. Mammary gland growth and development. In: _____. **Lactation biology.** Disponível: <<http://classes.aces.uiuc.edu/AnSci308/mamgrowth.html>>. Acesso em: 10 mar. 2003.

MADALENA, F.E. A cadeia do leite no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 1-26.

MAIJALA, K. Leite de vaca e desenvolvimento e bem estar humano. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade.** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 27-59.

MARSHALL, D.M.; KIM, J. **Associations of beef production traits with polymorphisms in the growth hormone gene and insulin-like growth factor-1 gene.** Disponível em: <http://www.ars.sdstate.edu/BeefExt/BeefReports/2000/associations_of_beef_production_.htm>. Acesso em: 26 ago. 2002.

MARTINEZ, M.L. Fatores auxiliares na seleção de gado de leite. **Gado Holandês**, v. 54, n. 158, p. 13-29, 1989.

MAYO, K.E. et al. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 55, p. 237-267, 2000.

MESSINA, M.; VRECH, E.; PEZZI, P. *et al.* Marcatori genetici associati all'asse somatotropico e polimorfismo delle proteine del latte. **La Razza Bruna Italiana**, n. 3, p. 27-29, 1999.

MOODY, D.E.; POMP, P.; BARENDSE, W. Rapid communication: restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine growth hormone-releasing hormone gene. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 73, n. 12, p. 3789, Dec. 1995.

NEIVA, R.S. A glândula mamária. In: _____. **Fisiologia da lactação.** Lavras: UFLA/FAEPE, 1996. p. 1-19.

PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 17, n. 2/3, p. 139-148, Oct. 1999.

PENNA, V.M. et al. Avaliações genéticas de características leiteiras em touros zebus no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA JR., E.V. **Produção de leite e sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p. 413-416.

RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. Efeitos do ambiente na expressão gênica. In: _____. **Genética na agropecuária**. 7.ed. São Paulo: Globo, 2000. p. 173-184.

RODRIGUES, C.V. et al. Genotipagem do gene do hormônio do crescimento nas raças Nelore, Holandês e Chianina usando a técnica da PCR-RFLP. In: CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15, 1996, Campo Grande. **Anais...**

SOLIMAN, E.B. et al. Effects of growth hormone (GH)-releasing hormone and its analogs on GH secretion from cultured adenohypophysial cells in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 14, n. 1, p. 39-46, Jan. 1997.

SORENSEN, A.; KNIGHT, C.H. Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 23, n. 1/2, p. 111-123, July 2002.

TEIXEIRA, N.M. Fatores não-genéticos que afetam a produção de leite. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 105-111.

VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L. Seleção: resposta correlacionada. In: VALENTE, J. et al. **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 57-70.

CONCLUSÃO

Com a utilização de marcadores na seleção para produção de leite, será possível determinar os animais geneticamente superiores no início da vida, não sendo necessário esperar a idade adulta para conhecer a eficiência produtiva dos mesmos, possibilitando, assim, a tomada de decisões quanto à finalidade do animal, ou seja, a sua permanência ou não no rebanho, o que propiciará uma redução de custos ao produtor. Além disto, os cruzamentos poderão ser direcionados a fim de se obter maior ganho genético.

A análise dos marcadores moleculares pode ser aplicada a todos os animais, independente do sexo, sendo de suma importância em touros, pois são estes os responsáveis pela disseminação genética, influenciando diretamente no aperfeiçoamento do rebanho. Como a produção de leite é uma herança limitada ao sexo, apesar de não expressarem fenotipicamente o carácter, os touros são portadores de genes para esta característica, o que explica a avaliação do comportamento de suas progênes para determinar o real potencial dos mesmos. A genética molecular possibilitará a identificação direta do mérito genético dos touros, sem ter que aguardar a produção leiteira de suas respectivas progênes.

ANEXOS

Extração de DNA de sangue fresco e congelado

- Pegar 500 μ l de sangue fresco (tomado na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação) em tubos de 2ml;
- Adicionar 1ml de tampão de lise não diluído, agitar lentamente e incubar em gelo por 5 a 10 minutos;
- Centrifugar a 4000g (8000rpm) por 3 minutos;
- Descartar o sobrenadante cuidadosamente;
- Adicionar 1ml de tampão de lise diluído 1:1;
- Incubar em gelo por 5 a 10 minutos;
- Centrifugar novamente;
- Repetir lavagem até o *pellet* ficar opaco (mais 1 vez sangue fresco);
- Descartar sobrenadante e acrescentar 100 μ l de TE + sarcosyl 1% e 10 μ l de proteinase K (10mg/ml);
- Incubar *overnight* a 65°C;
- Adicionar 300 μ l de 8M guanidina-HCl / 0,49M de acetato de amônia;
- Agitar à temperatura ambiente por 1 hora até solubilizar todo o *pellet*;
- Adicionar 800 μ l de isopropanol e aguardar a precipitação do DNA;
- Centrifugar a 4000g por 10 minutos;
- Descartar o sobrenadante e proceder mais duas lavagens com isopropanol 60% (4000g por 2 minutos);
- Secar o *pellet* e diluir em 0,5ml de TE;
- Normalmente é necessário de 1 a 4 horas de incubação a 65°C para completa diluição do *pellet*.

Reagentes

- Tampão de lise:
 - 20mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 5 mM EDTA
 - 640mM sacarose
 - 10mM MgCl₂
 - 4% Triton X-100

- TE (Tris-EDTA) + Sarcosyl:
 - 10mM Tris-HCl (pH 7,5)
 - 1mM EDTA
 - sarcosyl 1%