

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

MON
575.113
F 825 P
TES/mon

**POLIMORFISMO DO GENE GH (HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO) NA PRODUÇÃO DE LEITE EM
BOVINOS DA RAÇA SINTÉTICA GIROLANDO**

Aluna: **Rossana Vilela Rezende Franco**

Orientador: **Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

Co-Orientador: **Dr. Edmundo Benedetti**

UBERLÂNDIA – MG

2003

SISBI/UFU



1000210957

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**POLIMORFISMO DO GENE GH (HORMÔNIO DO
CRESCIMENTO) NA PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS
DA RAÇA SINTÉTICA GIROLANDO**

Aluno: **Rossana Vilela Rezende Franco**

Orientador: **Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho**

Co-Orientador: **Dr. Edmundo Benedetti**

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
BIBLIOTECA

SISBI/UFU

210957

D

FU000277931

FICHA CATALOGRÁFICA

F825p Franco, Rossana Vilela Rezende, 1977-
Polimorfismo do gene GH (hormônio do crescimento) na produção
de leite em bovinos da raça sintética Girolando / Rossana Vilela Rezen-
de Franco. - Uberlândia, 2003.
86f. : il.
Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pro-
grama de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.
1. Polimorfismo - Genética - Teses. 2. Bovino - Crescimento - Teses.
3. Somatotropina bovina - Teses. 4. Leite - Produção - Teses. I. Goulart
Filho, Luiz Ricardo. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa
de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU: 575.113 (043.3)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**POLIMORFISMO DO GENE GH (HORMÔNIO DO CRESCIMENTO)
NA PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS DA RAÇA SINTÉTICA
GIROLANDO**

Aluna: **Rossana Vilela Rezende Franco**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

Examinadores: Dr. Edmundo Benedetti

Dr. Maurício Machaim Franco

*Este Trabalho é dedicado aos meus pais,
**Jonas Ferreira Franco e Helena Rezende
Franco, pois sem eles nada seria possível.***

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a **Deus** pela força e por ter posto todas estas pessoas em meu caminho.

Aos meus pais, **Jonas e Helena**, aos quais devo a vida, a educação e a formação pessoal e profissional.

Ao meu orientador, **Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho** pela confiança e otimismo nos momentos difíceis.

Ao meu co-orientador **Dr. Edmundo Benedetti**, pois sem ele este trabalho não teria saído do papel, e pelo otimismo extremo.

Ao membro da banca **Dr. Maurício Machaim Franco** pelo incentivo: "Vai dar certo", por ter aceitado participar da banca e principalmente pelos ensinamentos quando ainda estava no laboratório.

Ao meu amigo e irmão **Juliano** pela amizade e ajuda na realização deste trabalho.

Ao meu namorado **César**, pela ajuda, sempre que necessário e incentivo.

À **Luciana** pela companhia e amizade nas nossas tentativas de "realizar uma tese de Mestrado" e que por fim deu tudo certo.

Aos companheiros e amigos do grupo "Girolando", **Fausto, Paula, Tatiane, Marcelo e Júlio** pela grande ajuda e confiança depositada em mim.

Aos amigos "animalóides", **Guilherme, Carlos, Rone, Juliana Machado, Katiana e Elaine** por tornar o ambiente de trabalho tão agradável.

À **Renata**, uma grande amiga que encontrei no laboratório.

Aos outros colegas do laboratório, **Waldesse, Jaqueline, Andréia, Alexandra, Elizangela, Karina, Paula Cristina, Juliana Meola, Juliana Franco, Frederico, Tatiane, Cícero, Mércia, Walter** e a todos, que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos professores **Galo e Vitória** por aceitarem ser suplentes da banca.

Ao professor **Heyder**, pelo auxílio nas análises estatísticas.

À **Marlene** pela ajuda sempre que foi necessário.

À **Joaninha** pela companhia e apoio.

Ao pessoal da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando, **Dr. Renato Cunha de Oliveira, Celso Menezes, Djalma Tiveron, Igor, Giovanni, José Mauade** e todos os outros pelo apoio de fundamental importância.

Aos **produtores** que contribuíram, cedendo gentilmente os animais para a colheita de sangue: **Paulo Marcos Nesralla, José Helias dos Santos, Carlos Hanke, Marcos de Oliveira, Nelson Arisa, Maria Inês Cruvinel, João Francisco de Oliveira Nunes, José Henrique Guimarães, José Gino Borges, Marcos Amaral, Alfredo Fonseca Marquez Junior, José Donato Dias Filho, Valério Machado, Carlos Eduardo Ferreira, Olavo de Rezende Barros Junior, José João Salgado Rodrigues dos Reis, Antônio Ferreira de Brito, Escola Agrotécnica F. Uberaba, Rubens de Oliveira, Sociedade dos Padres Oblatos Maria Imaculada, Celmi Miranda.**

Sumário

Lista de Abreviaturas	iii
Lista de Tabelas	vi
Lista de Figuras	vii
Resumo	viii
Abstract	ix
1- Introdução	1
1.1 – A Raça Girolando	3
1.1.1 – Adaptação aos Trópicos.....	6
1.2 – Produção de Leite no Brasil	6
1.3 – Melhoramento Animal	8
1.4 – Marcador Genético e QTL (<i>Quantitative Trait Loci</i>)	12
1.5 – RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)	15
1.6 – Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	16
1.7 – PCR-RFLP	18
1.8 – Polimorfismo Gênico do Eixo Somatotrópico	18
1.9 – Regulação do Eixo Somatotrópico	25
1.9.1 – Efeito do GH na Mamogênese	36
2 – Referências Bibliográficas	39
Capítulo I - Polimorfismo do Gene GH (Hormônio do Crescimento) na Produção de Leite em Bovinos da Raça Sintética Girolando	50
Resumo	51
Abstract	52
1 – Introdução	53
2 - Material e Métodos	56
2.1 – População e obtenção de dados de Produção de Leite.....	56
2.2 – Material Biológico	58
2.3 – Extração de DNA	59
2.4 – Genotipagem dos animais	60
2.5 – Eletroforese e detecção de produtos amplificados	61
2.6 – Análise Estatística	62
3 - Resultados e Discussão	65

3.1 – Otimização da PCR	65
3.2 – Genotipagem dos animais	67
3.3 – Frequências genóticas e alélicas	67
3.4 – Análise das características de Produção de Leite	70
4 – Referências Bibliográficas	81
5 – Conclusão Geral	85
Anexo	86

Lista de Abreviaturas

χ^2 – Teste de significância Qui-Quadrado

μl - microlitro

ACC – Animais com controle

Ach – Acetilcolina

AG – Animais Genotipados

Ala - Alanina

Alu I – *Arthrobacter Luteus* (enzima de restrição)

AMPc – AMP cíclico

bGH - Hormônio do Crescimento bovino

bGRF – Fator Liberador do Hormônio do Crescimento bovino

BI – Bi-Mestiço

bST – Somatotropina bovina

Ca – Cálcio

cDNA – DNA complementar

DL – Duração da lactação

dNTP – deoxiribonucleotídeo trifosfato

EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético

GABA – ácido aminobutírico

GH – Hormônio do Crescimento

GHR – Receptor de GH

GHRH - Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento

GHRH-R – Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento

GHRP – Peptídeo Liberador do Hormônio do Crescimento

GIROLANDO – Associação Brasileira dos Criadores de Girolando

GL – Grau de Liberdade

Gli - Glicina

hGH - Hormônio do Crescimento humano

hGRF – Fator Liberador do Hormônio do Crescimento humano

IEPm – Intervalo entre partos médio

IGFBP – Proteínas de Ligação de IGF-I

IGF-I – Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IGF-IR – Receptor de Fator de Crescimento Semelhante a Insulina
IP – Idade ao Parto
Kg - Quilograma
L – Leucina
LEP – Leptina
MAS – Seleção Assistida por Marcadores
MgCl₂ – Cloreto de Magnésio
mM – milimolar
mRNA – RNA mensageiro
Msp I – *Moraxella species* (enzima de restrição)
NEFA – Ácidos Graxos não esterificados
g – nanogramas
NMDA – n-methyl-d,l-asparto
NPY – Neuropeptídeo Y
OD – Número de ordenhas diárias
pb – pares de bases
PBV – Valor Genético
PC – Puro por cruza
PCR – Polimerase Chain Reaction
PIT-1 – Fator Transcricional Pituitário
PMD – Produção média diária de leite
PO – Puro de origem
PRL – Prolactina
PS – Puro Sintético
pST – Somatotropina suína
PT – Produção total de leite
QTL – Quantitative Trait Loci
RA – Regime Alimentar
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
Ser - Serotonina
SNP – Single Nucleotide Polymorphism

SRIF – Somatostatina

SS – Somatostatina

SSCP – Single Strand Conformation Polymorphism

Taq – *Thermus aquaticus*

Tre - Treonina

TRH – Hormônio Liberador de Tireotropina

TSH – Hormônio estimulante da Tireóide

U – Unidade de enzima

V – Valina

Lista de Tabelas

Tabela- 1 Estimativas de herdabilidade para diferentes características econômicas de bovinos de leite.	11
Tabela - 2 Correlação genética entre características econômicas em bovinos de leite.....	11
Tabela - 3 Relação de animais utilizados para a realização do trabalho.....	58
Tabela - 4 Frequências alélicas e genotípicas do gene GH em animais da raça Girolando 5/8	68
Tabela - 5 Frequências genotípicas observadas, esperadas e o teste de χ^2 para verificar equilíbrio de Hardy-Weinberg.....	68
Tabela - 6 Frequências alélicas encontradas, em diferentes raças de bovinos para o polimorfismo GH-Mspl	70
Tabela - 7 Análise de variância para as características PT, PMD, DL, IEPm	72
Tabela - 8 Médias ajustadas das características de produção de leite.....	73

Lista de Figuras

Figura - 1 Alternativas de acasalamento de animais Girolando.	4
Figura - 2 Estratégias de Cruzamento para a obtenção de animais puro sintético da raça Girolando.	5
Figura - 3 Esquema mostrando a interação de alguns genes que participam da via metabólica da regulação da expressão do GH.....	28
Figura - 4 Esquema das propriedades lipolíticas e diabetogênicas do bGH e sua influência no aumento da produção de leite	31
Figura - 5 Sequência da região amplificada por PCR	60
Figura - 6 Otimização da reação de amplificação do GH.....	66
Figura - 7 Fragmento amplificado de 891 pb do gene GH bovino	66
Figura - 8 Padrão dos genótipos para o gene GH bovino, utilizando a enzima <i>Msp</i> I.....	67
Figura - 9 Produção Total de leite em Kg em relação aos respectivos genótipos do gene GH	73
Figura - 10 Produção média diária em Kg em relação aos respectivos genótipos do gene GH	74
Figura -11 Efeito de substituição alélica para PT em kg.....	75
Figura - 12 Efeito de substituição alélica para PMD em Kg.....	76

RESUMO

O hormônio do crescimento bovino (GH) é um hormônio galactopoiético muito importante em bovinos leiteiros, regula a produção de leite, além de estimular o desenvolvimento da glândula mamária. Recentemente vários estudos estão sendo realizados com o intuito de encontrar Marcadores Moleculares associados a características econômicas importantes nos animais domésticos. Este estudo foi realizado com 452 vacas da raça sintética Girolando pertencentes a cinco estados brasileiros com o objetivo de analisar os efeitos do polimorfismo do gene GH na produção de leite. O fragmento amplificado da PCR constituiu-se de 891pb e foi digerido com a endonuclease *Msp* I. O alelo C apresenta quatro fragmentos, de 526, 193, 109 e 63 pb, e o alelo D é representado por três fragmentos, 635, 193 e 63 pb. As frequências genótípicas encontradas foram, 0,3849; 0,4248 e 0,1903 para os genótipos CC, CD e DD, respectivamente, e as frequências alélicas foram de 0,5973 para o alelo C e 0,4027 para o alelo D. Para a análise estatística foram utilizados dados produtivos de 299 animais, ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) para a produção média diária de leite e produção total de leite. Não houve diferença significativa para as características, duração da lactação e intervalo entre partos médio. A análise do efeito médio de uma substituição alélica demonstrou que cada alelo C aumenta em 390 g de leite por dia e 68,61 Kg de leite por lactação na média da população estudada, as fórmulas encontradas foram $y = 0,39x + 12,869$ e $y = 68,61 + 3514,8$, para produção média diária e produção total, respectivamente, sendo x os genótipos DD = 0, CD = 1 e CC = 2. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de usar este polimorfismo em programas de seleção assistida por marcadores em bovinos da raça Girolando.

ABSTRACT

The bovine growth hormone is a very important galactopoietic for dairy cattle, because it regulates milk production and stimulates the mammary gland development. Recently a research focus has been done forwards the use of molecular markers associated to important economics characters in domestic animals. This research used 452 cows of the Brazilian breed "Girolando 5/8" from five Brazilian states aiming the analysis of the effects of the growth hormone gene polymorphism of the on milk yield. PCR reaction generated a 891 bp amplicon, which were submitted to restriction through the *Msp* I endonuclease. Genotyping was based on restriction fragment sizes. The allele C presented 4 fragments; 526, 193, 109 and 63 bp, the allele D presented 3 fragments; 635, 193 and 63 bp. The genotypic frequencies were 0,3849; 0,4248 and 0,1903 for CC, CD and DD, respectively, and allelic frequencies were 0,5973 for the allele C and 0,4027 for the allele D. Statistical analysis considering 299 animals, has shown significant differences for mean daily milk yield and total milk yield. Logistic regression has calculated the allelic substitution effects, which demonstrated an increase in milk production by an average of 376 g/day/cow and 68,61 Kg/lactation/cow for each allele C incorporated. The results suggest that this polymorphism may be useful for marker assisted selection in Brazilian breed "Girolando".

1 - Introdução

O aumento da produtividade dos animais domésticos é um desafio técnico e político dos dias atuais, devido a crescente demanda de proteínas de origem animal pelas populações humanas, tornando necessário a utilização de tecnologias que possibilitem este avanço.

O Brasil é o sexto país produtor de leite do mundo e possui o segundo maior rebanho leiteiro mundial, perdendo apenas para a Índia. No entanto a sua produtividade é relativamente baixa, apresentando média de apenas 1.451 Kg/vaca/ano, bem inferior a vários países (ANUALPEC, 2003).

A maioria das fazendas brasileiras registra uma média inferior a 100 (cem) kg de leite nas ordenhas diárias (ALMEIDA, 2001), o que mostra a necessidade de modelos de seleção genética para garantir a utilização de animais geneticamente superiores com o intuito de aumentar a produção.

A produção animal resulta da ação conjunta das forças de origem genética e ambiente. Níveis altos de produção só podem ser alcançados pelo melhoramento simultâneo da composição genética dos animais e das condições ambientes da criação. As duas forças são igualmente importantes. A parte genética é a base para o estabelecimento de programas de melhoramento e é o fator que limita a capacidade de resposta dos animais aos processos seletivos. A busca de genótipos mais produtivos e compatíveis com as condições de ambiente do Brasil é de fundamental importância. Recursos genéticos o nosso país possui em abundância, sendo necessário a intensificação de processos de identificação dos genótipos superiores e multiplicação dos mesmos para todos os rebanhos brasileiros (PEREIRA, 1999).

As técnicas de Genética Molecular são ferramentas para auxiliar o melhoramento clássico permitindo a identificação mais rápida e eficiente de animais superiores. Desta forma, possibilita prever a produção de um animal no início da vida, diminuindo o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, tendo maior ganho genético e menor custo operacional. A Genética Molecular surge com o objetivo de auxiliar a seleção de gado de leite de forma rápida e eficiente, pois um dos obstáculos para a melhoria destes animais é que a produção de leite

apenas é expressa após a primeira parição e o progresso genético é essencialmente baseado no uso de touros geneticamente superiores, cuja identificação requer tempo (5 a 6 anos) e dinheiro (1.000.000 US\$) (PARMENTIER et al., 1999).

Sabe-se que vários genes são responsáveis pelas diferenças genéticas observadas entre os indivíduos para as características quantitativas. O estudo de genes ligados à produção de leite (genes candidatos) é muito importante para a busca de marcadores moleculares, podendo ser usado em programas de Seleção Assistida por Marcadores (MAS).

Sabendo-se que a proteína GH e outras de sua via estão envolvidas na produção de leite, desenvolvimento e constituição corporal, estudo da variabilidade do gene, que a codifica é de grande importância. Os polimorfismos podem tornar a proteína mais ou menos eficiente afetando diretamente a expressão gênica através de "splicing" alternativo do RNA, estabilidade do RNA, taxa e regulação da transcrição gênica, ou alterar a seqüência de aminoácidos do produto (PARMENTIER, 1999), sendo, portanto, o gene do GH um candidato em potencial a marcador molecular para características de interesse econômico.

Objetivo

Investigar possíveis associações de um polimorfismo do gene GH com características de interesse para a produção de leite em animais da raça sintética Girolando.

1.1 - A Raça Girolando

As primeiras notícias do surgimento de animais Girolando no Brasil data da década de 40, com a cobertura por acaso, de um touro Gir (*Bos indicus*) em vacas Holandesas (*Bos taurus*), no Vale do Paraíba, Estado de São Paulo. O resultado disso foram crias vigorosas e que chegavam precocemente à idade de produção (MENEZES, 2002).

A herança do *Bos indicus* impõe um limite à produção nos ambientes melhorados, no entanto, apresentam maior resistência a parasitas e tolerância ao calor que animais *Bos taurus* (MADALENA; MATOS; HOLANDA, 2001).

Durante anos, o cruzamento de bovinos da raça Gir com o Holandês se destacou e foi o mais praticado pelos criadores brasileiros, pois resultava em animais altamente adaptados e com boa capacidade de produção (MENEZES, 2002). Devido ao excelente resultado obtido, a multiplicação desses animais foi acelerada, pois a raça Holandesa sofria com a adaptação ao sistema tropical, mas já mostrava seu grande potencial de produção de leite, e o Gir, por sua adaptabilidade, proliferou rapidamente, produzindo um animal que, além de ter conjugado a rusticidade do Gir e a produção do Holandês, adicionou características desejáveis das duas raças em um único animal, com qualidades imprescindíveis para a produção leiteira econômica nos trópicos. Em qualquer sistema de manejo, seja estritamente a pasto ou confinado, a eficiência econômica do Girolando é comprovada (MENEZES, 2002).

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

As fêmeas Girolando, produtoras de leite por excelência, possuem características fisiológicas e morfológicas perfeitas para a produção nos trópicos (capacidade e suporte de úbere, tamanho de tetas, fatores intrínsecos à lactação, pigmentação, capacidade termo-reguladora, aprumos e pés fortes, conversão

alimentar, eficiência reprodutiva, etc.) atribuindo um desempenho muito satisfatório economicamente.

Segundo Menezes (2002) a raça passa por variados graus de sangue, visando a fixação do padrão racial, no grau 5/8 Hol + 3/8 Gir (Puro Sintético) (Figuras 1 e 2), objetivando um gado produtivo e padronizado. A vaca 5/8 Holandês e 3/8 Gir (Girolando 5/8), é hoje a vaca leiteira comprovadamente mais eficiente no mundo tropical.

Verifica-se na Figura 1 as alternativas de acasalamentos para a formação do Girolando.

	Mãe Hol	7/8	3/4	5/8	1/2	3/8	1/4	Mãe Gir
Pai Hol	Hol	15/16	7/8	13/16	3/4	11/16	5/8	1/2
7/8	15/16	7/8	13/16	3/4	11/16	5/8	9/16	7/16
3/4	7/8	13/16	3/4 BI	11/16	5/8	9/16	1/2	3/8
5/8	13/16	3/4	11/16	5/8 BI	9/16	1/2	7/16	5/16
1/2	3/4	11/16	5/8	9/16	1/2 BI	7/16	3/8	1/4
3/8	11/16	5/8	9/16	1/2	7/16	3/8 BI	5/16	3/16
1/4	5/8	9/16	1/2	7/16	3/8	5/16	1/4 BI	1/8
Pai Gir	1/2	7/16	3/8	5/16	1/4	3/16	1/8	Gir

Figura 1 - Alternativas de acasalamento de animais Girolando. Graus de sangue em destaque são registrados como animais 5/8 (MENEZES, 2002).

Lê-se sempre em primeiro lugar a fração de sangue Holandês

Diagrama I

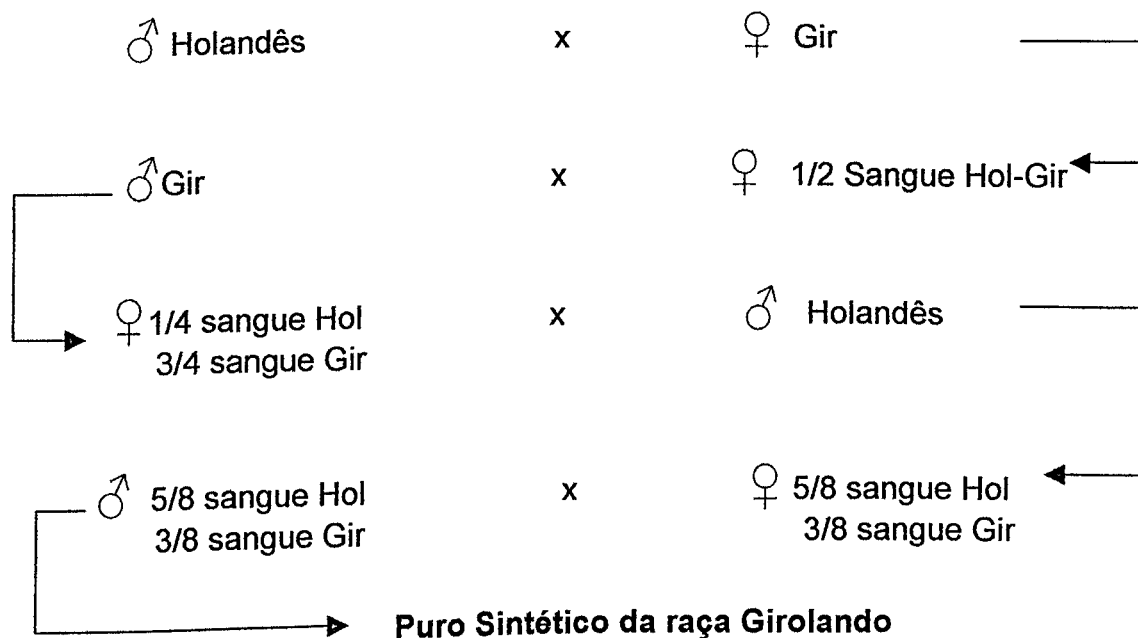


Diagrama II

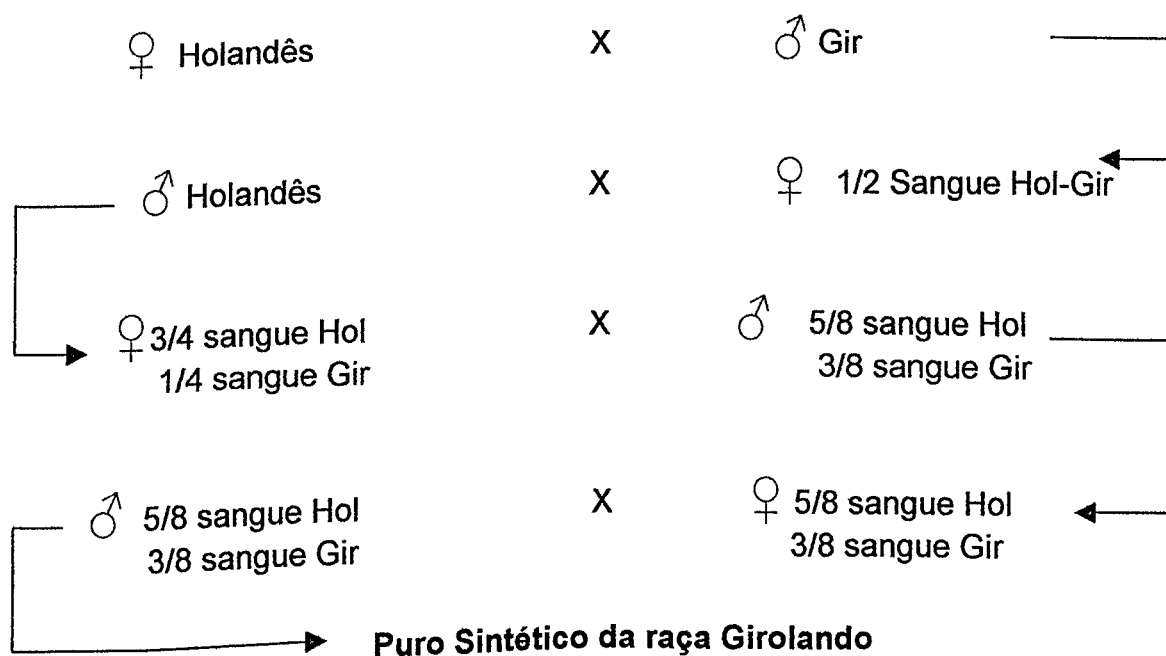


Figura 2 - Estratégias de Cruzamento para a obtenção de animais puros sintéticos da raça Girolando.

1.1.1 - Adaptação aos Trópicos

O Brasil dispõe em abundância de energia solar, que faz as plantas crescerem, desta forma é possível produzir altas quantidades de forragens por hectare. Porém, na região tropical estas forrageiras não são de qualidade e não suportam altas produções por vaca. Portanto, para aproveitar as forragens de menor qualidade, é necessário um animal, que possa consumi-las e colher por si próprio o alimento nas pastagens. Ainda, tolerar o calor e resistir aos parasitas, porém mantendo produção satisfatória. Este é o gado mestiço, destacando o cruzamento de Holandês X Gir (MADALENA; MATOS; HOLANDA, 2001).

Os autores salientam que do ponto de vista biológico, os ruminantes podem utilizar alimentos baratos, como pastagens e sub produtos, de forma que sistemas baseados nesses alimentos, utilizando pouco concentrado, e de forma estratégica, competirão com vantagem com sistemas que utilizem em alto consumo de concentrados. Assim pode-se concluir que a raça Girolando é sem dúvida a economicamente mais viável para a produção de leite nas condições brasileiras.

1.2 – Produção de Leite no Brasil

A exploração da bovinocultura de leite no Brasil constitui uma importante atividade do setor agropecuário e desempenha função de vital relevância no processo de desenvolvimento econômico e social do País. Destaca-se por suas características de ocupação e uso de extensas áreas de terra, empregadora de grandes contingentes de mão de obra, apresenta significativa participação na formação da renda nacional, fornece alimentos de alto valor nutritivo para a população e matéria prima para as indústrias de laticínios (GOMES; LEITE; CARNEIRO, 2001).

O rebanho bovino do Brasil é estimado em 160 milhões de cabeças e o faturamento da cadeia produtiva alcança a respectiva cifra de 11.9 bilhões de dólares. Estes números atraem pelas suas dimensões e mostram a importância do setor leiteiro no agronegócio. Dados do IBGE (1996) apontam um contingente

de seis milhões de pessoas envolvidas diretamente na cadeia produtiva do leite (ALMEIDA, 2001). Hoje a cadeia do leite apresenta segmentos como de produção, da indústria, da distribuição, da comercialização, dos supermercados, do consumidor e do governo. De todos estes segmentos, o mais frágil e desorganizado é o da produção, os demais estão preparados para competir em conformidade com os padrões internacionais.

O Brasil transformou sua antiga pecuária de leite em uma moderna cadeia do leite. Estabeleceu regras e normas para direcionar seu desenvolvimento, implantou grande parte da coleta a granel e preparou o país para conhecer a exportação de produtos lácteos (CAMARGOS, 2003).

No entanto, o Brasil é o sexto país produtor de leite mundial, com produção estimada de 23.000.000 toneladas no ano de 2003, possui o segundo maior rebanho leiteiro mundial, com 15.600.000 vacas leiteiras em 2002, perdendo apenas para a Índia. No entanto, encontra-se no 30º lugar em produtividade, com média de 1.451 litros/vaca/ano e média de 4,89 litros/cabeça/dia. Alguns países possuem uma produtividade bem superior, como exemplo, Estados Unidos, Nova Zelândia e Argentina, com 8615, 3695 e 3581 litros/vaca/ano respectivamente (ANUALPEC, 2003).

O Censo agropecuário de 1995/96 mostrou que em todo o Brasil, 50% dos produtores fornecem até 100 litros/dia aos laticínios. (ALMEIDA, 2001). O rebanho leiteiro nacional é constituído, em sua maioria por animais mestiços, que se prestam à dupla afinidade (leite/carne) e são reconhecidos como de baixo potencial genético para produção de leite (GOMES; LEITE; CARNEIRO, 2001). Com isso pode-se observar, que a má qualidade genética do rebanho brasileiro é um dos fatores contribuinte para a baixa produtividade leiteira do Brasil.

O Brasil é dotado de vários aspectos que o torna capaz de aumentar substancialmente a produção de leite, possui clima tropical, dispondo em abundância de energia solar, sendo possível produzir altas quantidades de forragens por hectare, apresenta área territorial invejável, é capaz de produzir leite de qualidade, detém o maior efetivo de bovinos comercial do mundo. No entanto, vários fatores contribuem para a sua baixa produtividade, como, ambientais, econômicos, políticos e genéticos. A maior parte do rebanho leiteiro

apresenta baixa qualidade genética (GOMES; LEITE; CARNEIRO, 2001), o que torna necessário encontrar caminhos para o melhoramento genético de forma rápida e eficiente.

1.3 - Melhoramento Animal

Desde o início da domesticação animal o melhoramento era utilizado, sendo os animais mais produtivos selecionados para reprodutores (FRANCO, 2002). O melhoramento animal teve origem nos trabalhos iniciais de um fazendeiro Inglês, Robert Bakewell (1725-1795), responsável pela formação e evolução de raças dentro das espécies bovina, ovina e eqüina (PEREIRA, 1999).

Na natureza, os animais melhores adaptados ao seu meio ambiente são os que sobrevivem e produzem maior número de descendentes. Esta seleção natural daqueles que melhor se adaptam ao meio, atuando sobre a variação produzida por mutações e recombinações de fatores genéticos, elimina as combinações genéticas desfavoráveis e permite que as mais favoráveis se multipliquem. A seleção artificial pelo homem representa a adição de novos padrões à habilidade natural dos animais de sobreviverem e reproduzirem, com o objetivo de atenderem as necessidades humanas (MARTINEZ, 1989).

Várias observações feitas por Pereira (1999) revelam que como Ciência pode-se dizer que o melhoramento animal surgiu em 1865 com a descoberta das leis da herança pelo monge austríaco Gregor Mendel. Posteriormente surgiu a genética de populações constituída com base nas leis de Mendel, mas, aplicada às características quantitativas e econômicas dos animais. Na década de 1950, com o advento dos computadores, ocorreram as primeiras aplicações práticas dos princípios da genética quantitativa no melhoramento da genética animal.

No início da década de 70, surgiu uma nova área da genética possibilitando estudar o material genético em nível molecular (Genética Molecular). A partir daí foi possível conhecer a estrutura e função dos genes, envolvendo conceitos de fisiologia e bioquímica, identificando polimorfismos entre os animais e associar polimorfismos bioquímicos (proteínas) e moleculares (DNA) com características de produção.

O autor cita que a produção animal nos países tropicais é extremamente baixa quando comparadas aos países de clima temperado. Os trópicos com 65% da população bovina mundial produzem dez vezes menos leite e quatro vezes menos carne que os países temperados. Obviamente as causas destas acentuadas diferenças não são somente climáticas, mas múltiplas e de várias origens. O baixo valor genético das populações animais, além de deficiências de condições ambiente, são os argumentos casuais mais aceitos. Evidencia-se assim, a importância do melhoramento genético das nossas populações animais.

Nos países do primeiro mundo, segundo Pereira (1999), as perspectivas de alavancagem dos programas de melhoramento genético estão vinculadas à utilização potencial de novas biotecnologias capazes de promover novos ganhos genéticos pela seleção. Entre essas podem ser destacadas as seguintes: a transferência de embriões, a sexagem de sêmen, a utilização de seleção assistida por marcadores genéticos moleculares (MAS), a clonagem e o mapeamento genômico dos animais.

Ainda dentro das observações do autor, verifica-se que, em relação a contribuição potencial dos marcadores moleculares no melhoramento animal, alguns exemplos de aplicação comercial já podem ser mencionados: a) Kappa-caseína e beta-lactoglobulina, vinculadas a composição do leite; b) genes fecundidade de ovinos (ex: FEC_b – Borola), associado à taxa de ovulação; c) receptor de estrogênio em suínos (gene ESR), que relaciona com tamanho de leitegada; d) receptor de rianodina, associada a hipertermia maligna (PSS), cujo gene mutante causa prejuízos econômicos consideráveis em suinocultura; e) marcadores moleculares ligados à doenças dos animais como BLAD (deficiência de adesão dos leucócitos), que afeta a raça Holandesa, a Weaver, doença hereditária observada na raça Pardo-Suíço e que provoca paralisia progressiva dos membros pélvicos e ataxia e, a CVM (Complexo de má formação Vertebral) que atinge bezerras da raça Holandesa provocando múltiplas má formações e queda dos índices reprodutivos (NIELSEN et al., 2003); f) marcadores associados ao desenvolvimento dos chifres em gado de leite; g) quantidade e qualidade de carne em bovinos de corte suínos e ovinos; h) cor do pêlo e características de crescimento e de carcaça em suínos.

As características econômicas dos animais domésticos, de acordo com o autor, são de natureza poligênica, isto é, são controladas por um grande número de genes. O fenótipo não é resultado somente da constituição genética do indivíduo, mas também da interação dos seus genes com os vários efeitos não genéticos ou de ambiente. Para que os genes possam provocar o desenvolvimento de uma característica é preciso que disponham de ambiente adequado. Por outro lado, as modificações que o ambiente pode causar no desenvolvimento de uma característica são limitados pelo genótipo do indivíduo. É preciso reconhecer que a variabilidade observada em algumas características pode ser causada pelas diferenças gênicas entre os diversos indivíduos. Quanto mais o ambiente influencia as ações dos genes, menos exata será a estimativa do genótipo do indivíduo.

O autor ressalta que, a produção de leite sofre variações devido a diferenças genéticas entre raças e entre indivíduos dentro de uma mesma raça. Isso evidencia as diferenças de frequência dos genes relacionados com a produção de leite, que ocorre entre as raças, como também as diferenças de critérios seletivos adotados em cada uma delas, ao longo de várias décadas.

Finalmente ele argumenta que o conhecimento de alguns conceitos é de fundamental importância para a definição e entendimento dos métodos de melhoramento genético. A herdabilidade é uma característica que representa a fração das diferenças fenotípicas que é transmitida aos filhos, ou seja, a herdabilidade corresponde à proporção da variação total que é de natureza genética. Pode variar de 0,0 a 1,0, ou de 0 a 100 %. Em geral, quando a herdabilidade varia de 0,0 a 0,1 é considerada baixa; de 0,1 a 0,3 média e acima de 0,3 é alta. Quando a herdabilidade é baixa, significa que grande parte da variação da característica é devida às variações ambiente entre os indivíduos; quando é alta, significa que diferenças genéticas entre os indivíduos são responsáveis em grande parte, pela variação da característica. Herdabilidade alta significa, também, que é alta a correlação entre o genótipo e o fenótipo do indivíduo, e, portanto a observação do fenótipo constitui indicação segura do valor genético do indivíduo. A mesma característica em condições ambientes mais estáveis pode apresentar valores de herdabilidade mais elevados. Portanto a

herdabilidade é um conceito estatístico que varia de uma população para outra, de característica para característica e de uma época para outra.

Nas tabelas 1 e 2 verificam-se os valores de herdabilidade e correlações genéticas entre as características econômicas da atividade leiteira, segundo Pereira (1999).

Tabela 1 - Estimativas de herdabilidade para diferentes características econômicas de bovinos de leite.

Característica	Herdabilidade
Produção de leite	0,20 – 0,40
Produção de gordura, proteína e sólidos não gordurosos	0,40 – 0,70
Intervalo entre partos	0,00 – 0,10
Período de serviço	0,01 – 0,10
Serviços por concepção	0,03 – 0,07
Tamanho à maturidade	0,35 – 0,50
Eficiência alimentar	0,20 – 0,45
Longevidade	0,05 – 0,10
Resistência à mamite	0,03 – 0,35
Velocidade de ordenha	0,10 – 0,20
Persistência de lactação	0,40

Fonte: Pereira (1999)

A correlação genética entre duas características mostra a extensão em que os mesmos genes afetam a expressão das mesmas. Portanto se duas características economicamente importantes mostram uma correlação altamente positiva, a ênfase na seleção deverá ser apenas numa, para o melhoramento em ambas, reduzindo deste modo, o número de características a serem selecionadas.

Tabela 2 – Correlação genética entre características econômicas em bovinos de leite.

Característica	Correlação Genética
Produção de Leite/ % de gordura	-0,07 a -0,67
Produção de Leite/ % de sólidos não gordurosos	-0,02 a 0,20
Produção de Leite/ produção de gordura	0,70 a 0,80
Produção de gordura/ produção de sólidos não gordurosos	0,30 a 0,70
Produção de gordura/ proteína total	0,40 a 0,70

Fonte: Pereira (1999)

Segundo Ramalho; Santos; Pinto (1997) o termo "grau de sangue" é comumente utilizado para indicar a porcentagem média de alelos de uma determinada raça que o rebanho possui. Quando se realiza cruzamento entre duas raças diferentes o produto é denominado de cruzado ou mestiço. Um animal "puro-sangue" (PO ou PC) é aquele que apresenta expressão fenotípica dentro dos padrões raciais e são obtidos por acasalamentos, por tantas gerações quantas são exigidas pelas normas de registro de cada raça. O autor salienta que ao contrário do que se possa pensar, os animais "puro-sangue" são altamente heterozigotos, apresentando homozigose principalmente nos locos que controlam características morfológicas marcantes.

1.4 - Marcador Genético e QTL (*Quantitative Trait Loci*)

O estudo do DNA, citação de Pereira (1999), vem se popularizando e tornando a opção de escolha para pesquisas que envolvem caracterização genética, pois ao contrário das proteínas, apresenta grande estabilidade, podendo ser analisado anos depois de coletado a partir de qualquer tecido orgânico que apresenta células nucleadas. Além disso, devido a sua grande plasticidade, reflete diretamente as relações filogenéticas entre diferentes indivíduos, pois mesmo seqüências não transcritas são utilizadas para análise.

Marcador Molecular pode ser definido como um segmento cromossômico ligado ou associado a alguma característica importante. O que indica que o marcador é ou não informativo é o polimorfismo, ou seja, diversas formas, que no caso de um marcador é o número de alelos existente na população. Um marcador altamente polimórfico possui vários alelos e isto dita a sua importância em estudos de ligação genética, pois maior será a informação dos mesmos (maior a probabilidade de se encontrar indivíduos heterozigotos para o locus marcador). O primeiro passo é a descoberta de marcadores polimórficos, em seguida é a associação estatística de tais marcadores com características importantes (cor de pelo, presença ou ausência de chifres, alterações genéticas, produção de leite e carne, resistência a doenças e outras de ordem qualitativa ou quantitativa) e

posteriormente a localização dos genes, sendo tal procedimento denominado de genética reversa (BISHOP; HAWKIN; KEEFER, 1995).

Marcadores moleculares ligados a genes funcionais, são denominados de tipo I, e, marcadores moleculares anônimos, os quais marcam uma determinada posição em um cromossomo, sem serem genes funcionais, são conhecidos como tipo II. Mais de 2000 marcadores genéticos em bovinos (tipo I e II) já foram identificados. Atualmente, o desenvolvimento de marcadores baseados em alterações em um único par de bases ("single nucleotide polymorphism" – SNP) oferecem novas perspectivas para a identificação de QTLs. Os procedimentos para identificar genes relacionados a características de interesse econômico podem substancialmente ser divididas em análise de ligação gênica com marcadores tipo I e II (THALER NETO, 2000).

Este mesmo autor comenta que genes candidatos são eleitos para a identificação de QTL, baseado em evidências de que determinado peptídeo codificado pelo gene influencia a característica de interesse. O passo mais difícil é a escolha de genes candidatos adequados, visto que a maioria das características de natureza quantitativas são influenciadas por vários genes e não há garantia de que no locus que codifica o peptídeo venha a ser encontrado polimorfismo passível de ser explorado.

Com a inovação surgida a partir dos métodos de análise dos marcadores genéticos, tem sido possível avanços no estudo de *loci* de características quantitativas (QTL). Por definição QTLs são regiões cromossômicas relacionadas com variações fenotípicas das características quantitativas (PEREIRA, 1999).

Várias pesquisas têm sido feitas com intuito de encontrar marcadores moleculares e QTL para características importantes de bovinos, como exemplo, resistência a doenças, helmintos, carrapatos, tripanossomíase e também para características produtivas, como a produção de leite (THALER NETO, 2000).

Heyen et al. (1999), encontraram marcadores associados a contagem de células somáticas, nos cromossomos 5 e 22, ligados à longevidade produtiva no cromossomo 3, a porcentagem de proteína no cromossomo 2 e a produção de leite no cromossomo 29.

Ashwell et al. (1998), trabalharam com marcador microsatélite em famílias de gado holandês e sugeriram que talvez os cromossomos 6 e 14 possuam QTLs afetando a produção de leite.

Heyen et al. (2003), encontraram QTL no cromossomo 14, afetando a produção de gordura e no cromossomo 3 interferindo na produção de leite e gordura no leite. Marcadores associados à contagem de células somáticas, indicador de resistência a mastite foram encontrados nos cromossomos, 5, 7, 22, e 23. Marcador para longevidade foi encontrado no cromossomo 21.

Ron et al. (1994), trabalharam com microsatélite em uma população de vacas de leite comercial e encontraram um alelo no cromossomo 21 relacionado com a maior produção de leite e proteína. O efeito de substituição alélica foi de 283 Kg de leite e 5,7 Kg de proteínas.

A principal expectativa da aplicação dos QTLs identificados é a seleção auxiliada por marcadores (MAS). A fim de possibilitar a implementação desta metodologia torna-se necessário o mapeamento genômico dos QTLs identificados e aprimoramento das técnicas estatísticas que permitam um balanceamento adequado entre as informações moleculares e do fenótipo, visando, assim, um ganho genético (THALER NETO, 2000).

A análise dos marcadores moleculares possibilita a determinação dos alelos favoráveis e desfavoráveis à produção de leite, permitindo, assim, uma seleção eficiente e rápida. Através da MAS será possível selecionar os animais geneticamente superiores e direcionar os cruzamentos, objetivando progênie com prevalência dos alelos favoráveis à produção de leite. Além de proporcionar uma redução de custos ao produtor, pois a seleção poderá ser feita no início da vida, o que possibilitará a tomada de decisões quanto à finalidade do animal, ou seja, a sua permanência ou não no rebanho, bem como determinar o possível cruzamento que levará ao ganho genético. Não sendo necessário esperar este animal atingir a idade adulta para conhecer sua eficiência produtiva. Outra vantagem da análise molecular será identificar diretamente o mérito genético dos touros, sem ter que aguardar a produção leiteira de suas respectivas progênies.

Inúmeras técnicas dentro da biologia molecular estão disponíveis hoje para a detecção da variabilidade genética ao nível do DNA e RNA, dentre elas RAPD, RFLP, SSCP, AFLP, DDRT, dentre outros.

1.5- RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*)

A técnica de RFLP ou, polimorfismo no fragmento de restrição, consiste no corte do DNA genômico por endonucleases, as quais reconhecem sequências específicas do DNA e clivam a dupla fita em sítios específicos dentro ou ao lado das seqüências reconhecidas (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). Existem usualmente centenas ou milhares de sítios de reconhecimento ao longo do genoma para cada endonuclease.

Os marcadores RFLP foram estudados pela primeira vez em meados da década de 70 em um experimento destinado a detecção de mutações de DNA de vírus (GRODZICKER et al., 1974 citado por FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996). O uso de marcadores RFLP se expandiu e hoje é uma técnica extremamente útil na área de biologia molecular.

Os polimorfismos no comprimento de fragmentos encontrados são resultantes de troca de bases, inserção ou deleção nos sítios de reconhecimento da enzima, causando perda ou criação de sítios. O corte do DNA produz muitos fragmentos de vários tamanhos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1996).

Os fragmentos digeridos não podem ser visualizados no gel de agarose, pois formam um rastro contínuo, sendo necessário, o uso de uma sonda que deve ser hibridada ao DNA pelo método de *Southern Blot* (SOUTHERN, 1975 citado por FRANCO, 2002). Se um indivíduo tiver um sítio de restrição na região complementar a sonda, essa marcará dois fragmentos, enquanto que se o outro indivíduo não tiver o sítio de restrição, a sonda marcará apenas um fragmento.

Variações polimórficas no tamanho de um fragmento de restrição de DNA (RFLPs) podem ser úteis como marcadores genéticos nos trabalhos de seleção. Polimorfismos observados ocorrem porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na seqüência de nucleotídeos ao longo da fita.

1.6 - Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica que possibilita a amplificação de sequências definidas de DNA ou RNA *in vitro*. A reação usa dois *primers* que hibridizam às fitas opostas que flanqueiam as seqüências de DNA alvo a ser amplificado. A extensão dos *primers* é catalisada pela Taq DNA polimerase, uma polimerase de DNA termo-estável, isolada de uma eubactéria termofílica, denominada de *Thermus aquaticus*. Uma série repetitiva de ciclos envolvendo desnaturação do DNA molde, anelamento de *primers* e extensão pela taq DNA polimerase, resulta em um acúmulo exponencial de um fragmento específico de DNA. Os produtos amplificados de cada ciclo são usados como molde para o próximo ciclo, e o número de cópias alvo dobra aproximadamente a cada ciclo.

A PCR apresenta várias aplicações, como exemplo: amplificação de fragmentos específicos ou aleatórios, clonagem de cDNA, auxilia no sequenciamento, diagnóstico de doenças, quantificação de patógenos, quantificação de expressão gênica e detecção de mutações.

A PCR possui um grande poder de amplificação, teoricamente, uma única molécula pode ser amplificada e produzir grande quantidade de cópias.

A PCR foi criada em 1985 por Kary Mullis (K. Mullis, U.S. patent 4.683.195, July 1987; U.S. patente 4,683,202, July 1987). Kary Mullis recebeu o prêmio Nobel em química em 1993, pelo seu trabalho sobre o PCR (HOY, 1994).

A PCR envolve uma complexa interação cinética entre o molde de DNA, os *primer*, dNTPs, tampão, MgCl₂ e enzima (DNA *Polymerase*). É uma técnica extremamente sensível e que envolve uma minuciosa e criteriosa otimização, que inclui alterações nos reagentes e no programa. Sendo necessário modificações no tempo e temperatura de desnaturação, anelamento, extensão (HOY, 1994). Os principais problemas encontrados em reações não otimizadas são, a não amplificação, a presença de produtos inespecíficos e a formação de dímeros de *primer* (INNIS e GELFAND, 1990).

Estes autores recomendam a utilização de 1 - 2,5 unidades de Taq DNA polimerase para cada 100 µl de reação. Se a concentração da enzima for muito

alta, ocorrerá a presença de produtos inespecíficos, se for muito baixa, pode-se obter pequenas quantidades de produtos. Quanto ao dNTP, recomenda-se a utilização de 20 – 200 μM de cada um. A concentração de MgCl_2 é extremamente importante, interferindo em toda a reação e recomenda-se a utilização de 0,5 – 2,5 mM. A presença de EDTA e outros quelantes presentes no estoque de *primer* ou na amostra de DNA, podem interferir no conteúdo de magnésio, e prejudicar a reação. O tampão recomendado para a reação contém de 10 a 50 mM Tris – HCL.

Ainda citam que o tamanho dos *primers* geralmente varia de 10 a 30 pares de base e contém por volta de 50 – 60% de G + C, devendo-se evitar desenhar *primers* com seqüências que podem formar estruturas secundárias, principalmente na extremidade 3' (HOY, 1994). A concentração de *primer* ideal varia de 0,1 a 0,5 μM . Altas concentrações de *primers* podem levar a formação de dímeros, pareamento inadequado e conseqüentemente acúmulo de produtos inespecíficos. A temperatura e o tempo para o anelamento do *primer* dependem da composição das bases, e do tamanho do mesmo. A temperatura de anelamento que variam entre 55 – 72°C, produzem resultados melhores. O tempo de extensão depende da seqüência de bases, comprimento, e concentração dos *primers*, sendo maior para fragmentos grandes. A temperatura de extensão geralmente é de 72°C. Tempo de extensão de 1 minuto, a 72°C é considerado suficiente para fragmentos de até 2 Kb.

Os autores ressaltam que as condições de desnaturação típica são 95 °C por 30 segundos ou 97 °C por 15 segundos. Desnaturação incompleta permite o reanelamento do DNA reduzindo o rendimento da PCR. Por outro lado, usando passos de desnaturação com temperatura muito alta ou com tempo prolongado leva a perda da atividade da enzima. O número de ciclos depende da concentração inicial de DNA molde existente; quanto mais moléculas menos ciclos são necessários.

1.7 - 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, 1996).

Neste procedimento o DNA é amplificado por PCR, produzindo sequências específicas e o produto amplificado é submetido à digestão por uma enzima de restrição apropriada. Como os fragmentos específicos obtidos foram exponencialmente amplificados por PCR, isso é suficiente para a sua visualização no gel sem a necessidade de hibridização com sondas marcadas radioativamente (HOY, 1994).

1.8 - Polimorfismo Gênico do Eixo Somatotrópico

A associação do gene que codifica para vários hormônios e fatores de crescimento do eixo somatotrópico com características quantitativas também tem sido estudada por vários autores.

Devido a grande importância da proteína GH para características produtivas, os polimorfismos do gene que a codifica são bastante pesquisados na tentativa de encontrar marcadores moleculares.

Vários autores estudaram o efeito do polimorfismo do gene GH onde a troca de um nucleotídeo (CTG para GTG) no *exon* 5 ocasiona a mudança de aminoácidos, leucina para valina na posição 127 da somatotropina bovina. Para realizar a genotipagem é utilizada a enzima *Alu* I. Suspeita-se que a substituição do aminoácido leucina por valina pode mudar a atividade metabólica da molécula de GH e afetar a performance produtiva dos animais.

Geralmente a frequência do alelo L (leucina) é superior ao alelo V (valina) em animais *Bos Taurus* (LUCY et al., 1993; ZWIERZCHOWSKI et al., 2002; ZHANG et al., 1993 (b); RODRIGUES; GUIMARÃES; PINHEIRO, 1997; SABOUR; LIN; SMITH, 1997) e quando estes animais são de raças com aptidão leiteira a frequência do alelo L é ainda maior. O contrário ocorre com bovinos *Bos Indicus*,

onde a frequência do alelo V é maior (FARIA et al., 1997; RODRIGUES; GUIMARÃES; PINHEIRO, 1997; UNANIAN et al., 2000).

Vários autores estudaram a relação deste polimorfismo com características produtivas.

De acordo com Lucy et al. (1993), vacas Holandesas homozigotas para o alelo leucina apresentaram maior estimativa para a transmissão da habilidade para a produção de leite comparada com vacas heterozigotas. No entanto para vacas Jersey, os melhores resultados foram quando as vacas eram homozigotas para o alelo valina.

Lee et al. (1996) trabalharam com dois grupos distintos de animais. Um grupo era constituído de 101 vacas Holandesas selecionadas para a produção de leite e outro grupo continha 49 vacas controle. A presença do alelo L foi correlacionada positivamente com valores estimados para a produção de leite.

Zwierzchowski et al. (2002) genotiparam 102 vacas Polish branco e preto para os genes PIT-I, GH e LEP, no entanto, encontraram que o genótipo VV para o gene do GH foi favorável para a produção de leite e produção diária de alguns componentes do leite.

Sabour; Lin; Smith (1997) sugerem que o alelo V é favorável a transmissão de características para produção de leite, gordura e proteína.

Grochowska et al. (2001) pesquisaram a variação genética do GH e IGF-I em resposta ao estímulo de liberação por TRH (Hormônio liberador de Tirotrópina) em bovinos da raça Polish Friesian. Animais com o genótipo VV apresentaram maior liberação de GH, enquanto que animais LL apresentaram maior liberação de IGF-I. Animais portadores do genótipo VL foram superiores para a produção de leite e proteína. Concluíram que a liberação de GH e IGF-I são características hereditárias em bovinos de leite e são afetadas pelo polimorfismo LV do gene do GH.

Sorensen et al. (2002) trabalharam com bezerros portadores de diferentes genótipos (LV) pertencentes às raças Holandês Dinamarquês (286), Vermelho Dinamarquês (68) e Jersey Dinamarquês (61) com o objetivo de analisar as concentrações de GH após a administração de GHRH nos diferentes genótipos. Concluíram que bezerros Jersey com o genótipo LL apresentaram maior liberação

de GH em resposta ao estímulo de GHRH. No entanto para as outras raças não houve diferença para a liberação de GH.

Marshall e Kim (2000) analisaram os efeitos dos genótipos do gene do GH e IGF-I, em vacas e bezerros de corte em características produtivas. Encontraram que a cada adição do alelo L no genótipo aumentava o peso a desmama dos bezerros.

Moody et al. (1996) observaram que o alelo V está associado a um aumento significativo no ganho de peso do nascimento à desmama de bovinos da raça Hereford.

Unanian et al. (1994) genotiparam animais para o polimorfismo no gene do GH, localizado no exon 5, utilizando a enzima de restrição *Hae* III. As frequências dos genótipos para os 184 touros de 8 raças distintas foram, 0,03 para o genótipo FF; 0,08 para o genótipo EF, e 0,89 para o genótipo EE. O alelo F foi detectado apenas nas raças Brahma, Holandês e Wagyu.

Outro polimorfismo bastante estudado do gene do GH está localizado no *intron* 3, na posição 1547, onde ocorreu uma troca de C por T, a enzima utilizada é a *Msp*1 (C' CGG). A denominação para os alelos encontrados para esta mutação do gene GH varia de acordo com o autor. Geralmente o alelo normal é denominado de + ou C e o alelo que perdeu um sítio da enzima é reconhecido como - ou D.

Jorge e Lama (1998) trabalharam com 120 novilhas da raça Girolando 3/4 e encontraram as frequências alélicas de 0,67 para o alelo + e 0,33 para o alelo -.

Dybus (2002) trabalhou com o polimorfismo no gene do GH e PRL. O polimorfismo do gene do GH é o descrito acima. Um total de 1086 vacas Polish Friesian branco e preto foram genotipadas. As frequências alélicas encontradas foram, 0,873 para o alelo + e 0,127 para o alelo -. Vacas com o genótipo +/-, apresentaram maior produção de leite, gordura e proteína.

Zhang et al. (1993, a) genotiparam animais para o polimorfismo *Msp* I, e encontrou a frequência para o alelo D de 0,26 para os 35 touros Holandeses genotipados e todos os trinta bovinos Hereford foram homozigotos para o alelo C.

Faria et al. (1997) também trabalharam com o polimorfismo do *intron* 3 do gene GH, com 80 bovinos da raça Nelore. Encontrou 60 animais -/- e 20 +/-,

sendo as frequências alélicas de 0,875 e 0,125 para os alelos – e +, respectivamente.

Rodriguez (1996) citado por Faria et al. (1997) trabalharam com animais Gir selecionados e não selecionados e encontrou a frequência de 0,967 e 0,948 para o alelo – nas respectivas populações.

Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997) trabalharam com animais da raça Nelore, os quais apresentaram maior frequência para o genótipo -/-, enquanto que em Chianina o genótipo predominante é o heterozigoto +/- . As frequências alélicas encontradas foram de 0,22 e 0,63 para o alelo + nas raças Nelore e Chianina respectivamente.

Observações de Sabour; Lin; Smith (1997) mostraram que as frequências encontradas para o alelo D foram de 0,13; 0,10; 0,00 e 0,30 para touros Holandeses, vacas doadoras de embrião, touros Ayrshire e touros Jersey respectivamente. O polimorfismo no locus CD foi associado com a características estimativa da habilidade de transmissão de leite (ETA), sendo o alelo C menos frequente em touros com baixa habilidade.

Hoj et al. (1993) encontraram maior frequência do alelo D em bezerros Red Danish selecionados para alta produção de gordura no leite (0,28) em relação a bezerros selecionados para baixa produção de gordura no leite (0,05). O autor sugere que a seleção para o aumento da quantidade de gordura no leite pode ser feita com o aumento da frequência do alelo D na população

Gargalhoni (1999) trabalhou com 116 vacas da raça Holandesa e cruzadas (Holandês x Gir), encontrando frequências de 0,2063; 0,4762; 0,3175 e 0,3396; 0,4717; 0,1887 para os genótipos CC, CD e DD para animais cruzados e puros respectivamente. Os efeitos de substituição alélica demonstram que para cada alelo D, ocorre uma diminuição de 386,5 quilogramas de leite no final da lactação. Os valores para duração da lactação, produção total de leite e produção total de gordura foram maiores em animais CC.

Borges (1997) trabalhou com bovinos Nelore e cruzados e verificou o polimorfismo do gene GH presente no *intron* 3. Encontrou frequências altas do alelo C em raças européias, enquanto que a frequência do alelo D é maior na raça Nelore. Quando é feito o cruzamento entre as duas raças a frequência de

heterozigoto na progênie é alto. Ocorreu diferença significativa no ganho de peso do nascimento a desmama favorecendo bezerros portadores do genótipo CD comparado com bezerros com o genótipo DD.

Aggrey et al. (1998) utilizaram amostras de sêmen de 128 touros Holandeses e pesquisaram o polimorfismo *Msp I* do gene GH, (fragmento de 345 pb), e o polimorfismo *Alu I* do gene do receptor de GH com características importantes para a produção de leite. O polimorfismo do gene do GH estudado, não apresentou correlação com produção de leite, gordura ou proteína. O polimorfismo *Alu I* do GHR foi associado com a produção de leite. A combinação dos genótipos GHR (-/-) e GH (+/-) proporcionou um aumento na produção de proteína no leite, demonstrando a importância da interação entre alelos de genes diferentes.

Unanian et al. (2000) realizaram um estudo com 211 machos da raça Nelore. Trabalharam com três polimorfismos existente no gene GH, *Msp I*, *Hae III* e *Alu I*, já descritos anteriormente. Os resultados indicam que os polimorfismos *Msp I* e *Alu I* estão relacionados com ganho de peso a partir dos 12 meses de idade. Os animais portadores dos genótipos DD e AA para os polimorfismos *Msp I* e *Alu I* ganharam mais peso que os outros animais. As frequências alélicas encontradas foram de 0,85 e 0,15 para os alelos D e C (*Msp I*); 0,92 e 0,08 para os alelos A e B (*Alu I*) e 0,98 e 0,02 para os alelos F e E (*Hae III*) respectivamente.

Variações na seqüência do gene do GH foram investigadas por Yao et al. (1996) usando a técnica de SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples). Um total de 6 polimorfismos foram encontrados em amostras de 128 touros Holandeses. Dois polimorfismos mostraram-se associados com a produção de leite. O primeiro, ocorre no intron 3 (T→C), denominado de GH4.1 e o segundo no exon 5 (A→C), denominado de GH6.2. Os alelos GH4.1c e GH6.2a mostraram-se favoráveis à produção de leite gordura e proteína. Os efeitos de substituição alélica para os dois alelos favoráveis foram similares, com mais ou menos 300 Kg para a produção de leite, 8Kg para quantidade de gordura e 7 Kg para proteína por lactação.

Hallerman; Nave; Kashi (1987) trabalharam com RFLP com os genes do GH e prolactina em duas populações de bovinos, uma leiteira, Holandês-Friesian e uma raça sintética de corte (Baladi x Simental x Hereford x Charolais). A maioria dos RFLPs encontrados são aparentemente consequência de uma inserção ou deleção localizados na região *downstream* do gene estrutural.

Falaki et al. (1996) estudaram os efeitos do RFLP para os genes do GH e GHR e correlacionaram com mérito genético para produção de leite em touros Italianos Holandeses Friesian, utilizando as enzimas TaqI e Msp I. Não encontraram resultados significativos.

O receptor de GH apresenta um papel importante na regulação da ação do GH e por isso o gene do GHR é considerado um gene candidato associado com a produção de leite em bovinos.

Moisio et al. (1998) identificaram polimorfismos na região flanqueadora 3' do gene GHR. Comparou a seqüência encontrada com seqüências previamente publicadas. Encontrou uma inserção de 8 pb (GHR₃₂₀), um segundo sítio com ausência de 5 pb (GHR₃₁₁) e um terceiro sítio com inserção de 14 pb (GHR₃₂₅). As freqüências alélicas variaram entre raças nativas e raças de leite comerciais.

Ge et al. (2000) encontraram 4 SNP (Single Nucleotides Polimorphisms), através do alinhamento de seqüências. As posições dos SNPs são: 76 (T → C), 200 (G → A), 229 (T → C), 257 (A → G). Os SNPs, da posição 200 e 257 altera a codificação dos aminoácidos de Ala (GCC) para Tre (ACC) e de Ser (AGC) para Gli (GGC). Os outros SNPs não causam mudanças nos aminoácidos.

Hale et al. (2000) trabalharam com microssatélite, e encontrou dois alelos, um menor com 11 repetições consecutivas de TG, comum em *Bos Indicus* e um alelo maior com 16 a 20 repetições consecutivas de TG, predominante em *Bos Taurus*. Constatou que o alelo menor estava relacionado com maior peso a desmama e ao abate.

Muitas ações do GH são mediadas via IGF-I (Fator de crescimento semelhante a insulina), portanto o estudo dos polimorfismos que codificam a proteína IGF-I e IGF-IR também são muito importantes.

Ge et al. (2001) avaliaram o polimorfismo na região promotora do gene IGF-I, e associou com concentração sérica de IGF-I, e características de

crescimento em bovinos da raça Angus. Foram genotipados 760 bezerros, encontrando uma frequência de 63,9% para o alelo A e 36,1% para o alelo B. Bezerros com o genótipo BB apresentaram menor concentração sérica de IGF-I e com maior ganho de peso durante os primeiros 20 dias após a desmama que bezerros com o genótipo AA. Portanto foi observada uma correlação genética negativa entre a concentração sérica de IGF-I e peso corporal. Santos (2003), encontrou relação positiva do alelo A com a produção de leite em bovinos da raça Girolando.

Marshall e Kim (2000) analisaram os efeitos dos genótipos do gene do GH e IGF-I, em vacas e bezerros de corte em características produtivas. Para o polimorfismo do gene IGF-I, localizado na região 5', observou que vacas com o genótipo A_1A_1 , produziram mais leite e progênes mais pesadas que vacas com o genótipo A_1A_2 ou A_2A_2 .

Moody; Pomp; Barendse (1995, a) pesquisaram o polimorfismo do gene IGF-IR bovino utilizando a enzima *Taq I*. Encontraram que o alelo A parece estar fixado em bovinos *Bos Taurus* e o alelo B é encontrado apenas em bovinos *Bos Indicus*.

O GHRH e seu receptor também são fatores importantes na regulação de vários processos metabólicos dos animais domésticos. Sendo assim, o estudo dos polimorfismos dos genes que os codificam, de extrema importância.

Moody; Pomp; Barendse (1995, b) usando a técnica de PCR-RFLP, amplificaram um fragmento de 455 pb no gene do hormônio liberador do hormônio do crescimento, e utilizando a enzima de restrição *Hae III*, encontrou dois alelos, denominados de A e B. O gene do GHRH está localizado no cromossomo 13.

Connor et al. (1999) trabalharam com um polimorfismo do receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH-R), o qual está localizado no cromossomo 4. A frequência do alelo A foi de 100% em *Bos Indicus* e *Gelbieh*, e 0% para *Hereford* e *Angus*.

Outro fator importante para a regulação do eixo somatotrópico é o PIT-1. Renaville et al. (1997) estudaram o polimorfismo no gene PIT-1, e encontraram que o alelo A está relacionado à maior produção de leite e proteínas em bovinos

da raça Holandesa. Capparelli (2003) não encontrou correlação entre este polimorfismo e a produção de leite em bovinos da raça Girolando.

1.9 – Regulação do Eixo Somatotrópico

O hormônio do crescimento é sintetizado no lóbulo anterior da glândula hipófise, mais precisamente na hipófise anterior ou adeno-hipófise. Esta porção da glândula encontra-se em estreita relação com o hipotálamo, possui uma vascularização especializada – o sistema porta-hipotalâmico-hipofisário – e atua através de fatores liberadores (“releasing hormones”). A partir de determinados grupos de células nervosas do hipotálamo, são formados peptídeos específicos, que estimulam ou inibem a secreção de determinados hormônios em células do lóbulo anterior da glândula hipófise. As células que formam os fatores estimuladores e bloqueadores no hipotálamo contêm receptores que detectam variações nas concentrações hormonais, e reagem de acordo com o aumento ou queda da secreção destes fatores. A secreção do GH é estimulada por um fator liberador de GH do hipotálamo (GHRH), e bloqueado por um fator bloqueador de secreção, a somatostatina (SS) (KLOB, 1984 citado por FRANCO, 1999).

O GHRH é predominantemente secretado como um peptídeo de 44 aminoácidos. A SS é secretada predominantemente como um peptídeo de 14 aminoácidos (MC MAHON et al., 2001).

Soliman et al. (1997) trabalharam com cultura de células da glândula adenohipófise de bovinos da raça Holandesa e demonstraram que hGRF, bGRF (hormônio liberador do hormônio de crescimento humano, bovino) e seus análogos, são potentes estimuladores da secreção de GH bovino.

Farmer; Pommier; Brazeau (1993) trabalharam com cultura de células da glândula hipófise de suínos de várias idades, constatou que GRF estimula e SRIF inibe a liberação de GH de forma dose dependente.

A concentração de GH endógeno no sangue e outros tecidos é regulada por um sistema de retornos, “feedback”, que opera através de uma cascata de secreção hormonal que regula a secreção do GH. O GH possui dois prováveis mecanismos de “feedback”, o primeiro através do IGF-I que inibe a secreção de

GH nos somatotrofos, e o segundo é via secreção de SS sendo a Galanina e o NPY, os mediadores de GH até o hipotálamo (MC MAHON et al.,2001).

Um exemplo do mecanismo de "feedback" por IGF-I, ocorre em animais com deficiência no receptor de GH, as concentrações plasmáticas de GH estão elevadas, e as concentrações de IGF-I estão baixas. Em geral as concentrações de GH e IGF são correlacionadas, pois o GH, estimula a liberação de IGF, e IGF em concentrações elevadas inibe a liberação de GH (CHASE et al.,1998).

Além do GHRH, SS e IGF-I existem outros componentes que influenciam na secreção de GH, denominados de Peptídeos Liberadores de Hormônio de Crescimento (GHRPs). Os GHRP -1, -2 , -6 estimulam a secreção de GH em bovinos, suínos e ovinos. O GHRP-6 atua elevando a secreção de GH diretamente nos somatotrófos e indiretamente via estimulação da secreção de GHRH (MC MAHON et al.,2001).

Estes mesmos autores citam que a Dopamina, Neuroepinefrina, Serotonina, Hormônio liberador de Tireotropina (TRH), Acetilcolina (ACh), Neuropeptídeo Y (NPY), Galanina e Leptina, são também alguns exemplos de GHRPs, que atuam estimulando ou inibindo a liberação de GH. A Dopamina inibe a secreção de GH através do estímulo à liberação de SS via receptor D1, e bloqueia a secreção de GH nos somatotrofos via receptor D2. A neuroepinefrina inibe a secreção de GH através do estímulo à liberação de SS via receptores adrenérgicos α_1 e β adrenérgicos e estimula a secreção de GH via receptores adrenérgicos α_2 . A serotonina, ACh e a Galanina atuam elevando a secreção de GH mediante o estímulo ao GHRH. O TRH é um tripeptídeo que também eleva a secreção de GH. O NPY estimula a secreção de GHRH e SS, provavelmente isso ocorre devido a um "feedback" do GH. A leptina estimula a secreção de GH, provavelmente através do aumento da secreção de GHRH. Alguns aminoácidos neurotransmissores, aspartato, glutamato, n-methyl-d,l-aspartato (NMDA), ácido aminobutírico γ (GABA), também estimulam a secreção de GH.

O GHRH age através da ligação ao seu receptor (GHRHR), o qual está presente principalmente em células da hipófise anterior. Connor; Ashwell; Dahl (2002) trabalharam com expressão gênica do receptor de GHRH em tecidos do

líum, ovário, hipófise, hipotálamo, testículo, pâncreas e fígado, e encontrou expressão apenas na hipófise e muito pouco no hipotálamo.

Aumento da concentração de AMPc ou Ca^{+2} estimula a secreção de GH. Quando o GHRH se acopla ao seu receptor ocorre o aumento dos níveis celulares de AMPc, com isso ocorre o aumento do fator de transcrição pituitário específico PIT-1. O PIT-1 possui um sítio específico de ligação para o gene que codifica o GH, estimulando a transcrição do gene do GH (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

Sequências de cDNA do receptor de GHRH de bovinos alinhadas com seqüências de ovino, suíno, humano, rato e camundongo apresentaram 93, 90, 89, 87, e 85 % de homologia respectivamente, indicando que a estrutura e função destes receptores é altamente conservada entre estas espécies (CONNOR; ASHWELL; DAHL, 2002).

O GH bovino é uma proteína de 191 aminoácidos, segundo Secchi et al. (1997) pertencente à família dos hormônios somatolactogênicos que incluem a Prolactina e o hormônio Lactagênico Placentário (BURTON et al., 1994).

A proteína do GH exerce uma ação direta ou mediada via produção de somatomedina (IGF-I), no tecido alvo após a ativação do sistema de transdução de sinal dentro da célula pelo hormônio. Os resultados obtidos de estudos fisiológicos *in vivo* com a administração de GH recombinante mostraram que em bovinos, o hormônio é capaz de exercer uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tecidos levando a maior disponibilidade de metabólitos (proteínas, ácidos graxos, glicose) e minerais circulantes (BURTON et al., 1994). O GH é armazenado em grânulos secretórios nos de somatotrofos.

O GH estimula o crescimento ósseo, a produção de leite, é importante para o sistema imune, auxilia o desenvolvimento do sistema imune fetal bovino, modula emoções e comportamento, sendo também importante para as funções cardíacas (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

A Figura 3 mostra o controle da produção e secreção do GH, suas moléculas ativadoras e inibidoras e os principais locais de ação. O hipotálamo, libera GHRH e SS, que atuam nos somatotrofos estimulando e inibindo a síntese de GH, respectivamente. O GH produzido exerce sua função em vários órgãos e estimula a síntese de IGF-I.

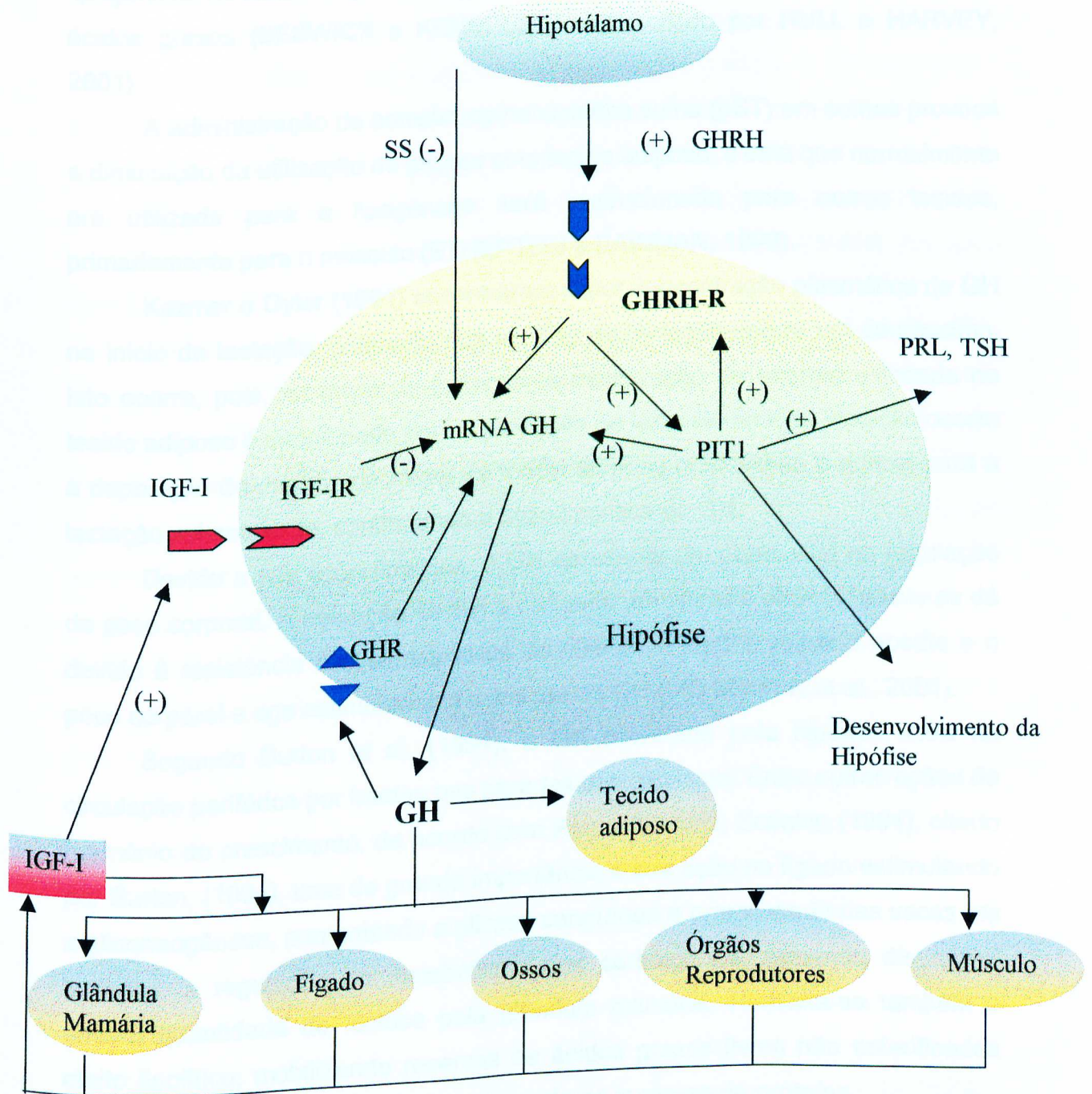


Figura 3 – Esquema mostrando interações entre alguns genes que participam da via metabólica de regulação da expressão do GH, na glândula Hipófise. O círculo grande representa um somatotrofo. O sinal (-), representa um estímulo negativo para a expressão de um determinado gene e o sinal (+), um estímulo positivo; $\square \triangleright$ e $\triangleleft \square$ representam interações proteína receptor (adaptado de FRANCO, 2002)

O GH apresenta importante ação lipolítica, inibindo a síntese de enzimas lipogênicas no tecido adiposo e estimula a transcrição de genes para a síntese de ácidos graxos (BESWICK e KENNELEY, 1998, citado por HULL e HARVEY, 2001).

A administração de somatotropina sintética suína (pST) em suínos provoca a diminuição da utilização de glicose pelo tecido adiposo, e esta que normalmente era utilizada para a lipogênese será redirecionada para outros tecidos, primariamente para o músculo (ETHERTON e BAWMAN, 1998).

Kazmer e Oyler (1991) encontraram maior concentração plasmática de GH no início da lactação, enquanto que no final da lactação ocorre um decréscimo. Isto ocorre, pois, no início da lactação, a mobilização de energia estocada no tecido adiposo é direcionada para a produção de leite. No final da lactação ocorre a deposição de energia na forma de tecido adiposo preparando o animal para a lactação subsequente, confirmando a ação lipolítica do GH.

Devido a sua ação lipolítica, o GH apresenta um papel vital na regulação do peso corporal. A secreção de GH é reduzida em animais obesos, e isso se dá devido à resistência dos somatotrofos ao GHRH. A leptina reduz o apetite e o peso corporal e age estimulando a secreção de GH (MC MAHON et al., 2001).

Segundo Burton et al. (1994), o GH secretado pela hipófise entra na circulação periférica por frestas nas paredes dos capilares. Entre outras ações do hormônio do crescimento, de acordo com Page; Diequez; Scanlon (1994), citado por Burton, (1994), uma de grande importância é sua ação no fígado estimulando a gliconeogênese, aumentando a glicose sanguínea e promovendo nas vacas em lactação, a regulação do metabolismo dos carboidratos, tornando disponível grande quantidade de lactose pela glândula mamária. Ressalta-se também o efeito lipolítico, mobilizando reservas de ácidos graxos livres não esterificados como fonte de energia alternativa, poupando as reservas de proteína.

O aumento na concentração de GH é economicamente importante para a indústria de produtos de origem animal, pois está associado ao crescimento rápido, diminuição de armazenamento de gordura e aumento na produção de leite.

O GH é hormônio galactopoiético mais importante em vacas e comumente utilizado para aumentar a produção de leite (HULL e HARVEY, 2001). As propriedades galactopoiéticas do GH recombinante são explicadas por alterações na sensibilidade dos tecidos alvos devido a ações hormonais. O GH aumenta o fluxo sanguíneo na glândula mamária, o fornecimento de nutrientes e a capacidade sintética do tecido mamário secretor (Figura 4) (BURTON et al., 1994).

O GH atua diretamente na glândula mamária, pois o mRNA e a proteína de seu receptor são encontrados na glândula de ruminantes e em outras espécies (HULL e HARVEY, 2001).

Flint e Gardner (1994) examinaram os efeitos da deficiência de GH e PRL, no tecido mamário de ratos lactentes. Utilizaram a bromocriptina para suprimir a secreção de PRL e um anti-soro de GH para inibir a ação do GH. Tratamento com bromocriptina provocou um decréscimo de 57 %, na produção de leite, 81 % na produção de lactose e 47 % na produção de proteína, contudo, a produção de gordura no leite não decaiu. Isto sugere o importante papel do GH na manutenção da gordura do leite. A deficiência do GH provocou um decréscimo de 24% na produção de leite. Quando ocorria a falta de GH e PRL, o decréscimo na produção de leite foi de 88%, confirmando, assim, a grande importância do GH e PRL na regulação da síntese do leite.

A administração de somatotropina sintética bovina (bST) em vacas de leite provoca aumento de produção de leite em 10 a 15 % . A produção de leite aumenta gradualmente nos primeiros dias de tratamento com bST e atinge o pico máximo durante a primeira semana. Se o tratamento for interrompido a produção retorna gradualmente aos valores iniciais. O tratamento com bST provoca alteração na curva de lactação resultando em aumento do pico e duração da lactação. A composição do leite (gordura, proteína e lactose) não é alterada. O fator que mais afeta a produção de leite em resposta à administração de bST é a qualidade do manejo, sendo os melhores resultados encontrados com animais submetidos a excelente manejo (ETHERTON e BAWMAN, 1998). Além deste, outros fatores como a idade, estágio do ciclo estral e gestação no momento do tratamento pode afetar a produção de leite em resposta ao rbGH (BURTON et al., 1994).

A Figura 4 resume as ações bioquímicas produzidas pelo bGH nos tecidos durante a lactação, observadas a partir de estudos com hormônio de crescimento recombinante bovino.

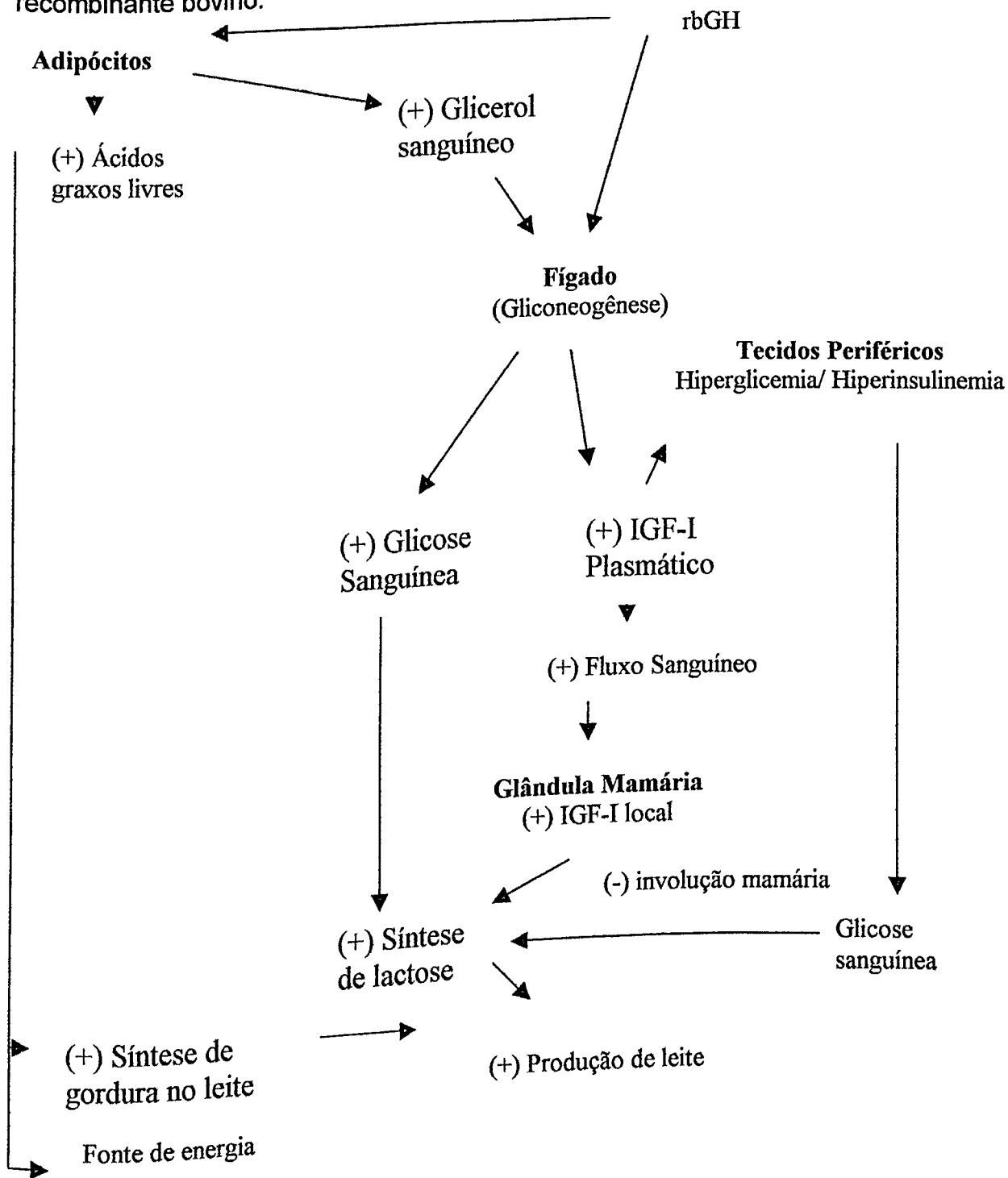


Figura 4 - Esquema das propriedades lipolíticas e diabetogênicas do bGH e sua influência no aumento da produção de leite (adaptado de Burton et al.,1994).

A nutrição apresenta o maior papel na regulação dos níveis circulatórios de GH, IGF-I e suas respectivas proteínas de ligação e receptores de membrana celular. O aumento na frequência de pulsos de GH é observado com maior suplementação de proteína (RENAVILLE; HAMMADI; PORTELE, 2002).

Os efeitos biológicos da ST podem ser classificados como metabólicos ou somatogênicos. Efeito somatogênico é devido ao estímulo à proliferação celular, mediado por IGF-I. O efeito metabólico envolve uma variedade de tecidos e o metabolismo de todas as classes de nutrientes (carboidratos, lipídios, proteínas e minerais) (ETHERTON e BAWMAN, 1998).

A eficiência alimentar é melhorada com a administração de GH, sendo a distribuição dos nutrientes entre os diferentes tecidos profundamente modificada. O GH provoca o aumento da lipólise e da síntese protéica, decréscimo da degradação de proteínas e estimula o crescimento ósseo (RENAVILLE; HAMMADI; PORTELE, 2002).

Connor et al. (2002), trabalharam com administração de bST em novilhas e encontrou a concentração de GH aumentada 15 vezes em relação ao grupo controle. Neste mesmo experimento não houve redução na expressão do mRNA do receptor de GHRH. Sugerindo que tratamentos com bST nas dosagem trabalhadas não induz o "feedback" negativo para a liberação de GHRH.

O mecanismo pelo qual a ST age na glândula mamária é desconhecido, mas parece ser indiretamente via IGF-I. Devido às alterações na curva de lactação sabe-se que o bST aumenta a síntese de componentes do leite por célula e auxilia na manutenção das células secretoras. O IGF-I aumenta drasticamente o fluxo sanguíneo, e este efeito parece ser mediado pela produção local de óxido nítrico (Etherton e Bawman, 1998). Além disso o IGF-I exerce um efeito mitogênico nas células diferenciadas causando a expansão clonal do número de células. É produzido pelo fígado, osso, glândula mamária e outros tecidos em resposta ao GH (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

O IGF-I é descrito como anti-apoptótico ou fator de sobrevivência para muitos tipos celulares, incluindo células epiteliais da glândula mamária. Flint et al. (2001) demonstraram que em camundongos quando ocorre deficiência de GH e prolactina, acontece a involução da glândula mamária via apoptose apesar da

síntese de leite continuar. Observaram aumento na concentração de IGFBP-5 nas células da glândula mamária após induzir a involução através da retirada dos filhotes. Sugeriu que a IGFBP-5 inibe a interação de IGF-I ao seu receptor, culminando na morte celular. Concluindo que o GH age estimulando a síntese de IGF-I e a prolactina suprime a expressão de IGFBP-5.

Sorensen e Knight (2002) trabalharam com vacas de leite com o objetivo de investigar a concentração dos hormônios e sua relação com a duração da lactação, pois ao contrário da produção de leite, fatores que regulam a persistência da lactação são desconhecidos. Sabe-se que a persistência da lactação é melhor em novilhas que em vacas maduras, é deprimida em vacas gestantes e com nutrição de baixa qualidade e é uma característica hereditária. Encontrou correlação positiva entre as concentrações de GH e IGF-I e a persistência da lactação. As observações endócrinas são consistentes com mecanismos previamente explicados em roedores, onde GH, IGF-I e prolactina interagem para a manutenção da sobrevivência celular. A apoptose ocorre devido à ação inibitória de IGFBP à ação de IGF-I, como resultado do afastamento da prolactina.

Jammes et al. (1996) estudaram os efeitos da administração de GH recombinante bovino (bGH) em ovelhas lactentes, observou os níveis de GHBP, receptores de membrana e mRNA do receptor de GH. Não ocorreu modificação em nenhum dos fatores estudados. No entanto ocorreu aumento na produção de leite e nos níveis plasmáticos de IGF-I. O autor sugere que o aumento na ocupação dos receptores de GH devido à administração de bGH é suficiente para induzir a elevação dos níveis de IGF-I.

Bovinos possuem 60 cromossomos, sendo 58 autossômicos e 2 sexuais, e o gene do hormônio do crescimento bovino esta localizado no cromossomo 19q na localização 1-7 q^{ter} (SECCHI e BORROMEO, 1997). O gene do GH bovino é constituído de 5 exons (1 – 5) e 4 introns (A –D) (TUGGLE e TRENKLE, 1996), e possui aproximadamente 1793 pb (GORDON et al., 1983).

Enquanto que em humanos o gene do GH é expresso de maneira diferente em tecidos distintos (gene hGH-N na pituitária, hGH-V e genes somatotrópicos coriônicos CS-A e CS-B na placenta) em bovinos assim como em todos os outros

mamíferos não primatas o gene GH parece ser transcrito em células específicas da hipófise anterior, denominadas de somatotrofos (SECCHI e BORROME, 1997).

Gordon et al. (1983) encontraram uma região conservada entre ratos e humanos com 40 pb, na região 5' que flanqueia o gene. Esta região conservada pode ser uma importante seqüência envolvida na regulação da transcrição do gene do GH.

O bGH (GH bovino) possui 75% de homologia com GH humano, 99% com o GH ovino (KOPCHICK e ANDRY, 2000). Secchi e Borromeo (1997) alinharam seqüências do bGH com varias espécies e encontrou total identidade entre o GH de ovinos e caprinos, e estas diferem do gene do GH bovino em apenas 2 resíduos. Quando alinhado com GH de primatas ocorreu uma diferença em 64 resíduos. As diferenças com peixes e pássaros foram grandes.

Vários estudos demonstram que alguns parâmetros da secreção de GH em bovinos, ovinos e suínos (frequência de picos, secreção total diária, resposta a estímulos de GHRH) apresentam alta correlação genética (PARMENTIER et al. 1999). Woolliams; Angus; Wilson (1993), constataram que bezerros de leite com altos valores genéticos (PBV) para produção de gordura e proteína no leite, apresentavam concentração basal de GH maior e também respondiam melhor à administração GRF (fator de liberação de GH) que bezerros com baixo valor genético. A quantificação de GH e PRL secretados podem ser validos para a predição do valor genético de touros leiteiros (KLINDT, 1988). Kazmer e Oyler (1991) constataram maior concentração de sérica de GH em vacas com alto índice genético para produção de leite do que em vacas com baixo índice.

A habilidade do GH em promover seus vários efeitos depende da interação do hormônio com proteínas de ligação específicas. A mais importante parece ser o receptor do hormônio de crescimento (GHR) (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

Receptores de GH estão sendo encontrados em hepatócitos, adipócitos, linfócitos, macrófagos, fibroblastos, condrócitos e osteoblastos de várias espécies (BURTON et. al., 1994).

A forma solúvel do domínio extracelular do GHR encontrada no soro é a GHBP (proteína ligadora de GH), uma proteína de 255 –273 aminoácidos que resulta da proteólise de uma molécula de GHR. O significado biológico da GHBP

não esta completamente entendido, esta molécula aumenta a meia vida do GH no soro diminuindo a taxa de degradação do GH. Mais de 60% do GH circulante está ligado com a GHBP. O GH é liberado pela hipófise de maneira pulsátil e a GHBP atua como um reservatório, capturando o GH no soro todo o tempo (KOPCHICK e ANDRY, 2000; JAMMES et al., 1996; BAUMANN; AMBURN; SHAW, 1988).

O GH se liga ao seu receptor por um mecanismo que possui dois passos. Primeiro ocorre uma ligação de alta afinidade com o primeiro GHR, então ocorre uma segunda ligação com menor afinidade com o segundo GHR. Com isso ocorre a dimerização dos receptores, formando um complexo constituído de dois receptores e uma molécula de GH, causando a ativação de duas moléculas de JAK2. O maior caminho de sinalização do GH é através das proteínas STAT, em particular STAT 5. Outro mecanismo de sinalização em resposta ao GH inclui as proteínas SOCS, as quais inibem a sinalização do GH (KOPCHICK e ANDRY, 2000). Estas proteínas estimulam a transcrição de alguns genes como o IGF-I em resposta ao GH (ARGETSINGER, 1996).

Stat 5 possui um papel importante na sinalização hormonal nas células da glândula mamária. A produção de IGF-I está diretamente associada à ativação da Stat5. A prolactina e o GH independentemente induzem a ativação da proteína Stat 5 em cultura de células da glândula mamária. A ligação do Stat 5 ao DNA foi reduzida 24 horas após o término da amamentação, chegando a zero, 72 horas após (YANG; KENNELLY; BARACOS, 2000).

Hormônios esteróides regulam a expressão de receptores de GH. Terapia com estrógeno resulta no aumento da ligação do GH à membrana do tecido hepático em vacas, e eleva a expressão de GHR em ratos. Corticoesteróides e Dexametasona promovem o aumento de GHR hepático, enquanto que a testosterona provoca a diminuição. Durante a gestação ocorre aumento no número de GHR e níveis de mRNA no fígado de ratos. A concentração de GHR esta diretamente correlacionada com o estado nutricional, decaindo com a desnutrição (KOPCHICK e ANDRY, 2000).

1.9.1 - Efeitos do GH na Mamogênese

O desenvolvimento da glândula mamária ocorre em fases distintas, fase fetal, puberdade, gestação e lactação. As estruturas básicas da glândula em bovinos são formadas durante a fase fetal. O tecido epitelial é rudimentar até os 2 ou 3 meses de idade. No período pré-puberal, a glândula inicia o crescimento de forma mais rápida, que o resto do corpo. Nesta fase ocorre o crescimento do tecido adiposo e dos ductos, mas nenhum alvéolo é formado. Este crescimento rápido termina no início da puberdade. Durante cada ciclo estral recorrente, a glândula mamária é estimulada pelo estrogênio e progesterona do ovário, e prolactina e somatotropina da adeno-hipófise, envolvendo o alongamento e ramificação dos ductos (DUKES, 1993). Da puberdade à gestação este crescimento é limitado, mas, durante a gestação, o crescimento é acelerado. No início da gestação cresce os ductos mamários contínuos, no meio da gestação desenvolve os lóbulos alveolares, sendo o desenvolvimento mamário completado ao parto (SEJRSEN et al., 2000).

Um considerável número de experimentos em animais estão sendo conduzidos para investigar o efeito da administração de GH e elucidar o papel do GH endógeno na regulação do crescimento mamário.

Existem evidências claras a favor do papel do GH na regulação do crescimento mamário na fase pré-puberal e demonstrações que o crescimento mamário nesta fase pode ser aumentado através da administração de GH exógeno.

Estudos indicam que alto nível alimentar na fase de pré-puberdade reduz o desenvolvimento da glândula mamária, isso ocorre provavelmente porque os níveis circulantes de GH decaem em dietas de alto nível, e este hormônio é positivamente relacionado com o desenvolvimento mamário. Provavelmente o GH age na glândula mamária via IGF-I, no entanto este apresenta aumento em animais submetidos a altos níveis alimentares, mas ocorre redução da sensibilidade do tecido mamário ao IGF-I, devido ao aumento no nível de IGFBP-3 (SEJRSEN et al., 2000). Outra explicação para este fato parece ser devido à redução dos receptores de IGF-I nos tecidos da glândula mamária. Alguns autores observaram que tecidos da glândula mamária de novilhas submetidas a

altos níveis alimentares responderam menos ao estímulo de IGF-I que tecidos de novilhas que receberam baixo nível alimentar (SEJRSEN et al., 1999).

Weber et al. (2000) trabalharam com administração de bST em novilhas na pré-puberdade submetidas a manejo alimentar de alta e baixa qualidade e sugeriram que os efeitos do tratamento são mediados em parte por alterações na síntese local de IGF-I e IGFBP.

Radicliff et al. (2000), trabalhando com novilhas Holandesas na pré-puberdade, constataram que dietas com alto teor de energia e proteína levou a redução na produção de leite na primeira lactação, no entanto quando novilhas submetidas à dieta rica em energia recebiam administração de bST isto não ocorria.

Muitos estudos estão sendo realizados para esclarecer se o crescimento mamário proporcionado pela administração de GH na pré-puberdade resulta no aumento na produção de leite. No entanto, não há evidências concretas se isso ocorre (SEJRSEN et al., 1999).

Vários trabalhos sugerem que o GH estimula o crescimento mamário durante a gestação em todos os ruminantes domésticos. Ao contrário da fase pré-puberal, o aumento do crescimento mamário durante a gestação é expressado como aumento na produção de leite. Os efeitos do GH parecem estar envolvidos com hiperplasia durante a gestação e hipertrofia durante a lactação. Acredita-se que o aumento na produção de leite ocorra pela distribuição de nutrientes a favor da glândula mamária e aumento na capacidade sintética das células produtoras de leite (SEJRSEN et al., 1999).

Hull e Harvey (2001) constataram que tratamento com GH em novilhas gestantes provocou aumento na produção de leite devido ao maior desenvolvimento glandular.

Feldman et al. (1993) constataram que a administração de GH recombinante de humano, bovino e rato, estimularam o desenvolvimento da glândula mamária em ratos.

Walden et al. (1998) observaram que o GH e o IGF-I, podem mediar o desenvolvimento da glândula mamária juntamente com o estrógeno, estabelecendo que elementos do estroma e do epitélio se interagem para

promover o desenvolvimento glandular. Demonstraram que o GH trabalha muito bem em tecidos do estroma mamário, assim como em tecidos glandulares, sugerindo a ação direta do GH no estroma da glândula mamária, induzindo a produção do mRNA de IGF-I e possivelmente a própria proteína IGF-I, a qual causa diferenciação dos ductos epiteliais em brotos terminais.

Acredita-se que o mecanismo de ação do GH exógeno no crescimento mamário envolve IGF-I, apesar do efeito do GH não poder ser excluído. Existem dúvidas sobre a regulação fisiológica do desenvolvimento mamário, sendo necessário o entendimento do papel do eixo GH – IGF-I, intercalado com a produção local de fatores de crescimento, receptores, modulação de enzimas proteolíticas, e a interação de todos esses elementos (SEJRSEN et al., 1999).

2 – 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. **Anais...**v. 26, p. 281-283.
- ALMEIDA, E.F.L. Aspectos sociais da produção de leite no Brasil. In: MADALENA, F.E.; MATOS, L. L.; HOLANDA Jr, E. V. **Produção de leite e sociedade** . Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. p 117-125.
- ANUALPEC 2003:** Anuário da pecuária brasileira. 10.ed. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2003. 400 p.
- ARGETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physiol. Rev.**, v. 76, n.4, p. 1089-1107, 1996.
- ASHWELL et al., Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a US Holstein population. **J. Dairy Sci.**, v. 81, p. 3309-3314, 1998.
- BAUMANN, G.; AMBURN, K.; SHAW, M.A. The circulation growth hormone (GH)-binding protein complex: A major constituent of plasma GH in man. **Endocrinol.**, v. 122, n. 3, 1988.
- BESWICK, N.S.; KENNELLY, J.J. The influence of bovine growth hormone and growth hormone releasing factor on acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase in primiparous Holstein cows. **Comparative Biochemistry and pharmacology**, v. 120, p. 241-249, 1998.
- BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, v. 43, p. 61 – 70, 1995.

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

BURTON, J.L. et al. A review of growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 74, p.167-201, 1994.

CAMARGOS, C.R.M. Novos tempos da produção leiteira nacional. **In: ANUALPEC 2003:** Anuário da pecuária brasileira. 10. ed. São Paulo: FNP Consultoria & Agroinformativos, 2003, p. 213.

CAPPARELLI, F.E., **Análise do polimorfismo no gene PIT-1 sobre a produção de leite em bovinos (*Bos Taurus*) da raça Girolando 5/8.** 2003. Monografia – (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

CHASE, C.C. et al. Patterns of ovarian growth and development in cattle with growth hormone receptor deficiency. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 212 – 219, 1998.

CONNOR, E.E. et al. Rapid Communication: Mapping of the bovine Growth Hormone Releasing Receptor (GHRH-R) gene to chromosome 4 by linkage analysis using a novel PCR-RFLP. **J. Anim. Sci.**, v.77, p. 793-794, 1999.

CONNOR, E.E.; ASHWELL, M.S.; DAHL, G.E. Characterization and expression of the bovine growth hormone-releasing hormone (GHRH) receptor. **Domest. Anim. Endocrinol.** v.22, p. 189-200, 2002.

DUKES **Fisiologia dos animais domésticos.** Editado por SWENSON, M. J. REECE, W.O. 11. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 1993. 856 p.

- DYBUS, A. Association of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphism with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. **Anim. Sci. Papers and Reports**, v.20, n.4, p. 203-212, 2002.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiol. Rev.**, v.78, n.3, p. 745-761, 1998.
- FALAKI, M. et al. Relationships of polymorphism for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. **J. Dairy Sci.**, v.79, p. 1446-1453, 1996.
- FARIA, F.J.C. et al. Análise do exon III ao IV do gene do hormônio do crescimento bovino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p.188-189, 1997.
- FARMER, C.; POMMIER, S.A.; BRAZEAU, P. Validation of culture system of porcine pituitary cells: Effects of growth hormone-releasing factor and (or) somatostatin on growth hormone secretion. **J. Anim. Sci.**, v.71, p. 923-929, 1993.
- FELDMAN, M. et al. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinol.**, v. 133, n. 4, p.1602-1608, 1993.
- FERREIRA, M.E.; GATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEM, 1998. 220 p.
- FLINT, D.J.; GARDNER, M. Evidence that growth hormone stimulates milk synthesis by direct action on the mammary gland and that prolactin exerts effects on milk secretion by maintenance of mammary deoxyribonucleic acid content and tight junction status. **Endocrinol.**, v. 135, p.1119-1124, 1994.

FLINT, D.J. et al. Control of mammary involution by insulin-like growth factor binding proteins: role of prolactin. **Livestok. Prod. Sci.**, v.70, p.115-120, 2001.

FRANCO, M.M. **Estudo da relação do polimorfismo dos genes Hal e GH com características de carcaça e qualidade da carne em 3 raças de suínos.** 1999. 73 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.

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

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

GE, W. et al. Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v.79, p.1757-1762, 2001.

GE, W. et al. Rapid Communication: Single nucleotide polymorphisms detected in exon 10 of the bovine growth hormone receptor gene. **J. Anim. Sci.**, v.80, p. 2229-2230, 2000.

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

GORDON, D.F. et al. Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. **Mol. Cel. Endocrinol**, v.33, p. 81-95, 1983.

GROCHOWSKA, R., et al. Genetic Variation in stimulated GH release and IGF-I of young dairy cattle and their association with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 450-476, 2001.

GRODZICKER, T. et al. Physical mapping of temperature-sensitive mutation of endoviruses. **Cod. Spring Harbor Symp. Quant. Biol.**, v. 39, p.439-446, 1974.

HALE, C.S. et al. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellites allele in the P1 promoter of the growth hormone receptor gene1,2. . **J. Anim. Sci.**, v.78, p. 2209-2104, 2000.

HALLERMAN, E.M.; NAVE, A.; KASHI, Y. Restriction fragment length polymorphism in dairy and beef-cattle at the growth hormone and prolactin loci. **Anim. Genet.**, v.18, p. 213-222, 1987.

HEYEN, D.W. et al., A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiol. Genomics**. p. 165 – 175, 1999. Disponível em: <<http://physiolgenomics.physiology.org>>. Acesso em: 20 de Fev. 2003.

HEYEN, D.W. et al., **The identification of quantitative traits loci influencing milk production and health traits in dairy cattle**. Disponível em: <<http://www.traill.outreach.uiuc.edu/uploads/dairynet/papers/TheIdentification.pdf> - >. Acesso em: 20 de Fev. 2003.

HOJ, S. et al., Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. **Anim. Genet.**, v.24, p.91-96, 1993.

HOY, M.A. **Insect molecular genetics**; An introduction to principles and applications. San Diego: Academic Press. 1994, 546 p.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth Hormone: role in female reproduction. **J. Endocrinol.**, v. 168, p. 1-23, 2001.

INNIS, M.A.; GELFAND, D.H. Optimization of PCR. In: INNIS, M. A. et al. **PCR protocols**. A guide to methods and application. Inc, San Diego, Academic Press, California. Academic Press Limited, 1990. p. 3-12.

JAMMES, H. et al., Growth Hormone-Binding Protein in the Goat: Characterization, evolution under exogenous growth hormone treatment, and correlation with liver growth hormone receptor levels. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 13, n. 6, p. 477-489, 1996.

JORGE, E.C.; LAMA, S.M.D. As frequências gênicas dos alelos (+) e (-) no sítio polimórfico Msp I no gene do hormônio do crescimento bovino na raça Girolando. IN: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 1998, São Carlos. **Anais...**, São Carlos, 1998.

KAZMER, G.W.; OYLER, R.H. Plasma growth hormone and insulin concentration in, and free fatty acid release from tissue cultured in vitro from Holstein cows of differing cow index during early and late lactation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 8, n. 1, p. 81 – 86, 1991.

KLINDT, J. et al. Relationships among Growth Hormone and prolactin secretory parameter estimates in Holstein bulls and their predicted differences for lactational traits. **J. Anim. Sci.**, v. 66, p. 2784-2790, 1988.

KOLB, E. **Fisiologia Veterinária**. 4 ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 1984. p. 35-41.

KOPCHICK, J.J.; ANDRY, J.M. Growth hormone (GH), GH Receptor, and signal transduction. **Molec. Genetics. and Metabolism**. v.71, p. 293- 314, 2000.

- LEE, B.K. et al. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5th exon with selection for milk yield in Holstein cows. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 13, p. 373-381, 1996.
- LUCY, M.C. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 10, p. 325-333, 1993.
- MADALENA, F.E.; MATOS, L.L.; HOLANDA Jr, E.V. **Produção de leite e Sociedade**. Belo Horizonte: FEPMVZ, 2001. 532 p.
- MARSHAL, D.M.; KIM, J. **Association 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_.html. Acesso em: 29 out.2002.
- MARTINEZ, M.L. Fatores auxiliares na seleção de gado de leite. **Gado Holandês**, p. 13 – 27, v.39, 1989.
- McMAHON, C.D. et al. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.20, p. 65-87, 2001.
- MENEZES, C. O programa Girolando. IN: _____ **Curso Intensivo de julgamento da Raça Girolando**, 6, 2002, Uberaba. FAZU, 2002.
- MOISIO, S. et al. Polymorphism within the 3'flanking region of the bovine growth hormone receptor gene. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 55-57, 1998.
- MOODY, D.E. et al. Characterization of DNA polymorphism in three population of Hereford cattle an their association with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

- MOODY, D.E.; POMP, D.; BARENDSE, W. (a). Linkage mapping of the bovine insulin-like growth receptor gene. **Mammalian Genome** v. 7, p. 168-169, 1995.
- MOODY, D.E.; POMP, D.; BARENDSE, W. (b). Rapid Communication: Restriction Fragment Length Polymorphism in amplification products of the bovine Growth Hormone Releasing Hormone gene. **J. Anim. Sci.**, v.73, p. 3789, 1995.
- NIELSEN, U.S. et al. Effects of complex vertebral malformation on fertility traits in Holstein cattle. **Livestock Prod. Sci.**, v.79, p. 233-238, 2003.
- PAGE, M.D.; DIEQUEZ, C.; SCANLON, M.F. Neuroregulation of growth hormone secretion. *Biotechnology in growth regulation*. 47: 1989 citado por BURTON, J. L. et al. A review of growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 74, p.167-201, 1994.
- PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and selection. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.17, p. 139-148, 1999.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal**. Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999, 496p.
- RADCLIFF, R.P. et al. Effects of diet and injection of bovine somatotropin on prepubertal growth and first lactation milk yields of Holstein Cows. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 23-29, 2000.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J.B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária**. 6. ed. São Paulo: Globo, 1997, 359 p.
- RENAVILLE, R. et al. Pit -1 Gene polymorphism, milk yield and conformation traits of Italian Holstein-Friesian Bulls. **J. Dairy Sci**, v.80, p.3431-3438, 1997.

RENAVILLE, R.; HAMMADI, M.; PORTELLE, D. Role of somatotropic axis in the mammalian metabolism. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.23, p. 351-360, 2002.

RODRIGUES, C.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; PINHEIRO, L.E.L. Frequências alélicas das variantes do hormônio do crescimento bovino por análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) em raças de corte. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p.189-192, 1997.

RODRIGUEZ, M.F. **Polimorfismos do gene da somatotropina bovina em duas populações distintas da raça Gir.** 1996. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.

RON, M. et al. Mapping quantitative traits loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. **Anim. Genet.**, v. 25, p. 259 –264, 1994.

SABOUR, M.P.; LIN, C.Y.; SMITH, C. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.114, p.435-442, 1997.

SANTOS, P.S. **Análise do polimorfismo no gene IGF-I sobre a produção de leite em bovinos da raça Girolando 5/8.** 2003. Monografia – (Graduação) – Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2003.

SECCHI, C.; BORROMEO, V. Structure and function of bovine growth hormone. Bovine Growth Hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. **J. Chromatogr.**, v.688, p. 161-177, 1997.

SEJRSEN, K. et al., High body weight gain and reduced bovine mammary growth: physiological basis and implications for milk yield potential. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 19, p. 93 – 104, 2000.

- SEJRSEN, K. et al., Growth Hormone and mammary development. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 117 – 129, 1999.
- SOLIMAN, E.B. et al., Effects of growth hormone (GH)- releasing hormone and its analogs on GH secretion from cultured adenohypophysial cells in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol**, v. 14, n. 1, p.39-46, 1997.
- SORENSEN, A.; KNIGHT, C.H. Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation to the control of lactation persistency. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 23, p.111 – 123, 2002.
- SORENSEN, P. et al. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 1887-93, 2002.
- SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, v.98,p.503-517, 1975.
- THALER NETO, A., Situação atual e perspectivas da utilização da genética molecular no melhoramento de bovinos leiteiros, 2000 IN: SIMPÓSIO NACIONALDE MELHORAMENTO ANIMAL, 3., 2000, Belo Horizonte, 2000. **Anais...** Belo Horizonte, 2000, p.232-235.
- TUGGLE, C.K.; TRENKLE, A., Control of growth hormone synthesis. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.13, n.1, p.1-33, 1996.
- UNANIAN, M.M. et al. Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism in the bovine growth hormone gene. **J. Anim. Sci.**, v.72, p. 2203, 1994.
- UNANIAN, M.M. et al. Associação do polimorfismo do gene do Hormônio do Crescimento com a característica de peso em bovinos da raça Nelore. **Rev. Bras. Zootec.** V.29, n.5, p.1380-1386, 2000.

- WALDEN, P.D. et al. Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. **Endocrinology**, v.139, p. 659-662, 1998.
- WEBER, M.S. et al., Regulation of local synthesis of Insulin-Like Growth Factor-I and binding proteins in mammary tissue. **J. Dairy Sci.**, v.83, p. 30-37, 2000.
- WOOLLIAMS, J.A.; ANGUS, K.D.; WILSON, S.B. Endogenous pulsing and stimulated release of growth hormone in dairy calves of high and low genetic merit. **Anim. Prod.**, v. 56, p. 1-8, 1993.
- YANG, J.; KENNELLY, J.J.; BARACOS, V.E. The activity of transcription factor Stat5 responds to prolactin, growth hormone, and IGF-I in rat and bovine mammary explant culture. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p., 3114-3125, 2000.
- YAO, J. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holstein. **Genetics**, v.144, p. 1809-16, 1996.
- ZHANG, H.M et al. (a). Rapid Communication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the bovine somatotropin Gene. **J. Anim. Sci**, v.71, p.2276, 1993.
- ZHANG, H.M. et al. (b) Bovine growth hormone gene frequencies in sample of AI bulls. **J. Anim. Sci**, v.71, suppl. 1, p.93, 1993.
- ZWIERZCHOWSKY, L. et al., Effects of polymorphism of growth hormone (GH), Pit-1, and Leptin (LEP) genes, cow's age, lactation stage and somatic cell count on milk yield and composition of Polish black-and-white cows. **Anim. Sci. Paper and Report**, v. 20, p. 213 – 227, 2002.

CAPÍTULO I

POLIMORFISMO DO GENE GH (HORMÔNIO DO CRESCIMENTO) NA PRODUÇÃO DE LEITE EM BOVINOS DA RAÇA SINTÉTICA GIROLANDO

RESUMO

O hormônio do crescimento bovino (GH) é um hormônio galactopoiético muito importante em bovinos leiteiros, regula a produção de leite, além de estimular o desenvolvimento da glândula mamária. Recentemente vários estudos estão sendo realizados com o intuito de encontrar Marcadores Moleculares associados a características econômicas importantes nos animais domésticos. Este estudo foi realizado com 452 vacas da raça sintética Girolando pertencentes a cinco estados brasileiros com o objetivo de analisar os efeitos do polimorfismo do gene GH na produção de leite. O fragmento amplificado da PCR constituiu-se de 891pb e foi digerido com a endonuclease *Msp* I. O alelo C apresenta quatro fragmentos, de 526, 193, 109 e 63 pb, e o alelo D é representado por três fragmentos, 635, 193 e 63 pb. As frequências genotípicas encontradas foram, 0,3849; 0,4248 e 0,1903 para os genótipos CC, CD e DD, respectivamente, e as frequências alélicas foram de 0,5973 para o alelo C e 0,4027 para o alelo D. Para a análise estatística foram utilizados dados produtivos de 299 animais, ocorreu diferença significativa ($p < 0,05$) para a produção média diária de leite e produção total de leite. Não houve diferença significativa para as características, duração da lactação e intervalo entre partos médio. A análise do efeito médio de uma substituição alélica demonstrou que cada alelo C aumenta em 390 g de leite por dia e 68,61 Kg de leite por lactação na média da população estudada. Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de usar este polimorfismo em programas de seleção assistida por marcadores em bovinos da raça Girolando.

ABSTRACT

The bovine growth hormone is a very important galactopoietic for dairy cattle, because it regulates milk production and stimulates the mammary gland development. Recently a research focus has been done forwards the use of molecular markers associated to important economics characters in domestic animals. This research used 452 cows of the Brazilian breed "Girolando 5/8" from five Brazilian states aiming the analysis of the effects of the growth hormone gene polymorphism of the on milk yield. PCR reaction generated a 891 bp amplicon, which were submitted to restriction through the *Msp* I endonuclease. Genotyping was based on restriction fragment sizes. The allele C presented 4 fragments; 526, 193, 109 and 63 bp, the allele D presented 3 fragments; 635, 193 and 63 bp. The genotypic frequencies were 0,3849; 0,4248 and 0,1903 for CC, CD and DD, respectively, and allelic frequencies were 0,5973 for the allele C and 0,4027 for the allele D. Statistical analysis considering 299 animals, has shown significant differences for mean daily milk yield and total milk yield. Logistic regression has calculated the allelic substitution effects, which demonstrated an increase in milk production by an average of 376 g/day/cow and 68,61 Kg/lactation/cow for each allele C incorporated. The results suggest that this polymorphism may be useful for marker assisted selection in Brazilian breed "Girolando".

1 - Introdução

A necessidade crescente de produção de alimento, 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 e diminuindo o custo. Na bovinocultura de leite, visando maior produção, são necessários modelos de seleção genética para garantir a utilização de animais geneticamente superiores.

As técnicas de Genética Molecular são ferramentas para auxiliar o melhoramento clássico permitindo a identificação de animais superiores, possibilitando prever a produção de um animal no início da vida, diminuindo o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, tendo maior ganho genético e menor custo operacional. A seleção assistida por marcadores (MAS), é considerada um ótimo método para incorporação de genes economicamente importantes em programas de melhoramento aumentando a eficiência da seleção.

A lactação, por tratar-se de uma característica poligênica, 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.

A proteína do GH exerce uma ação direta ou mediada via produção de somatomedina (IGF-I, fator de crescimento semelhante a insulina), no tecido alvo após a ativação do sistema de transdução de sinal dentro da célula pelo hormônio. Os resultados obtidos de estudos fisiológicos "in vivo" com a administração de GH recombinante mostraram que em bovinos, o hormônio é capaz de exercer uma grande variedade de efeitos sobre diferentes tecidos levando a maior disponibilidade de metabólitos (proteínas, ácidos graxos, glicose) e minerais circulantes (BURTON et al. 1994).

Entre outras ações do hormônio do crescimento, uma de grande importância é sua ação no fígado estimulando a gliconeogênese, aumentando a glicose sanguínea e promovendo nas vacas em lactação, a regulação do metabolismo dos carboidratos, tornando disponível grande quantidade de lactose pela glândula mamária. Ressalta-se também o efeito lipolítico, mobilizando reservas de ácidos graxos livres não esterificados como fonte de energia

alternativa, poupando as reservas de proteína (PAGE; DIEQUEZ; SCANLON 1994, citado por BURTON, 1994)

Sabendo-se que a proteína GH está envolvida na produção de leite, desenvolvimento e constituição corporal. O estudo da variabilidade do gene que a codifica é de grande importância, pois os polimorfismos podem tornar a proteína mais ou menos eficiente afetando diretamente a expressão gênica.

O gene que codifica o hormônio do crescimento bovino possui alguns polimorfismos conhecidos e que estão sendo estudados por vários autores com o intuito de encontrar marcadores moleculares eficientes para características produtivas de bovinos. Um dos polimorfismos mais estudado é o presente no *intron* 3, na posição 1547, onde ocorreu uma troca de C por T, a enzima utilizada é a Msp1 (C' CGG). A denominação para os alelos encontrados para esta mutação do gene GH varia de acordo com cada autor. Geralmente o alelo normal é denominado de + ou C e o alelo que perdeu um sítio da enzima é reconhecido como - ou D.

Dybus (2002) encontraram que vacas com o genótipo +/+, apresentaram maior produção de leite, gordura e proteína. Sabour; Lin; Smith (1997) também encontrou que o alelo C é favorável à produção de leite.

Gargalhone (1999) demonstrou que para cada alelo D, ocorre uma diminuição de 386,5 quilogramas de leite no final da lactação. Os valores para duração da lactação, produção total de leite e produção total de gordura foram maiores em animais CC.

Variações na seqüência do gene do GH foram investigadas por Yao et al. (1996) usando a técnica de SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples). Um total de 6 polimorfismos foram encontrados em amostras de 128 touros Holandeses. Dois polimorfismos mostraram-se associados com a produção de leite. O primeiro, ocorre no *intron* 3 (T→C), denominado de GH4.1 e o segundo no *exon* 5 (A→C), denominado de GH6.2. Os alelos GH4.1c e GH6.2a mostraram-se favoráveis à produção de leite gordura e proteína. Os efeitos de substituição alélica para os dois alelos favoráveis foram similares, com mais ou menos 300 Kg para a produção de leite, 8Kg para quantidade de gordura e 7 Kg para proteína por lactação.

Os animais da raça Girolando são os responsáveis pela maior parcela do leite produzido no Brasil, cerca de 80%. Constituem-se em uma raça promissora para o mundo tropical pela capacidade que têm de produzir leite e carne em condições bastante adversas, quando comparadas às raças especializadas. (MENEZES, 2002).

O Brasil é dotado de vários aspectos que o torna capaz de aumentar substancialmente a produção de leite, possui clima tropical, dispondo em abundância de energia solar, sendo possível produzir altas quantidades de forragens por hectare, apresenta área territorial invejável, detém o maior efetivo de bovinos comercial do mundo. No entanto, vários fatores contribuem para a sua baixa produtividade, como, fatores ambientais, econômicos, políticos e genéticos. A maior parte do rebanho leiteiro apresenta baixa qualidade genética (GOMES; LEITE; CARNEIRO, 2001), o que torna necessário encontrar caminhos para o melhoramento genético de forma rápida e eficiente.

O objetivo do trabalho é investigar possíveis associações de um polimorfismo do gene GH com características de interesse para a produção de leite em animais da raça sintética Girolando.

2 - Material e Métodos

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

2.1- População e Obtenção de Dados de Produção de Leite

Para o desenvolvimento deste trabalho foram utilizadas amostras de sangue de 452 vacas 5/8 Girolando pertencentes a rebanhos de diversos estados brasileiros (Tabela 3). Todos os animais são registrados junto à Associação Brasileira de Criadores de Girolando e alguns animais possuíam controle leiteiro oficial feito pelo Serviço de Controle Leiteiro (SCL) da Associação. Não foi possível obter o controle leiteiro oficial de todos os animais devido à demora dos produtores ao enviar as pesagens de 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.

- ▶ Instruções para execução do serviço de controle leiteiro:
- Todo animal em lactação e em regime de duas ou três ordenhas deve ser controlado obrigatoriamente.
- Não se pesa o leite de animais com menos de cinco dias de parição.
- Informar o RGD (Registro Genealógico Definitivo) indicando o número, letra (se tiver) e grau de sangue; RGN (Registro Genealógico de Nascimento); RF (Rebanho de Fundação) e indicar os animais sem RGD.
- Caso o animal tenha genealogia conhecida, informar o nome do pai e da mãe com seus respectivos RGD's.
- Informar a data do parto com o sexo da cria.
- Os dados da produção devem ser anotados o mais exato possível, não permitindo assim fazer qualquer estimativa da produção.
- Toda e qualquer observação verificada no dia do controle deve ser anotada. (3 tetas, mamite, aborto, cio, traumatismo, etc).

- Descrever e classificar o regime alimentar o mais correto possível:
 - Regime I = Pasto + sal mineralizado
 - Regime II = Pasto + suplemento no cocho + sal mineral
 - Regime III = Estabulado (Confinado)
- Informar os animais que secaram, a data e a causa da secagem.
- Informar os animais inscritos (animais que pariram ou foram adquiridos no intervalo de dois controles).
- É permitido um intervalo mínimo de 15 dias e máximo de 45 dias entre os controles.
- Seguir rigorosamente as normas e procedimentos que regem o Serviço de Controle Leiteiro.

O Serviço de Controle Leiteiro da GIROLANDO enviou o Certificado Oficial de Desempenho para cada um dos animais com controle leiteiro. Neste contém os seguintes dados:

N^o de Registro do animal, nome do animal, composição racial, data de nascimento, região, identificação e endereço do proprietário, ordem de lactação, data do parto, idade ao parto, dias em lactação, intervalo entre partos, produção de leite (Kg), Média diária de leite (kg), título obtido, data de encerramento e média de intervalo entre parto. Além de totais acumulados/ vida produtiva para dias em lactação, leite em Kg.

A tabela 3 apresenta a relação de proprietários, região, município e número de animais que contribuíram para a realização da pesquisa.

Tabela 3 - Relação de animais utilizados para a realização do trabalho.

Estado	Município	Proprietário	AG	ACCL
MG	Uberlândia	José Henrique Guimarães	65	51
	Uberlândia	Alfredo Fonseca Márquez Junor	12	12
	Uberaba	Escola Agrotécnica	16	16
	Uberaba	Maria Inês Cruvinel	10	0
	Araguari	Antônio Ferreira de Brito	15	15
	Araxá	José Gino Borges	10	10
	Araxá	Marcos Amaral	22	15
	Araxá	Paulo Marcos Nesralla	06	0
	Bom Despacho	José Elias dos Santos	22	0
	Pará de Minas	Carlos Hanke	59	0
	Itaúna	Valério Machado	13	13
	Baldim	Carlos Eduardo	52	52
	Oliveira	Olavo de Rezende	10	10
	Carmo do Rio Claro	José João salgado dos Reis	24	19
	Total		336	213
	GO	Quirinópolis	Rubens de Oliveira	26
Gouvelândia		Soc. Padres Oblatos Maria Imaculada	07	07
Itarumã		Celmi Miranda Lima	10	10
Total			43	43
SP	Icem	Antônio de Oliveira	15	0
	Nova Granada	Nelson Arisa	23	20
	Total		38	20
BA	Itapé	João Francisco de Oliveira Nunes	12	0
RJ	Miguel Pereira	José Donato Dias Filho	23	23
Total			452	299

AG, número de animais genotipados, ACCL, número de animais controle leiteiro oficial.

2.2 - Material Biológico

Retirou-se 5 ml de sangue de cada um dos 452 animais. O sangue foi colhido na veia mamária, em *vacutainers* com solução anticoagulante (EDTA) e usando uma agulha para cada indivíduo. Após a colheita, o material foi encaminhado para o Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde foi mantido sob refrigeração a 4-8°C, na posição vertical, para permitir a sedimentação dos eritrócitos e leucócitos, por no mínimo 24 a 48 horas.

2.3- Extração de DNA

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

O DNA foi obtido à partir de 500µl de sangue resfriado, tomado na transição entre o plasma e eritrócitos (camada de leucócitos), após sedimentação e colocados em tubos de 2mL. Posteriormente, foi adicionado 1mL de tampão de lise não-diluído (20mM de Tris-HCl, 5mM de EDTA pH 7,5; 640 mM de sacarose, 10mM de MgCl₂ e 4% de Triton X-100) submetendo a solução à uma leve agitação e incubação em gelo por 5 – 10 minutos. O material foi centrifugado a 4000g (~8000rpm) por 3 minutos descartado-se em seguida o sobrenadante. No mínimo mais duas lavagens foram necessárias com tampão de lise diluído (1:1) até que o *pellet* ficasse limpo. Em seguida foram acrescentados 100µL de TE + sarcosyl 1% (10 mM de Tris-HCl, 1mM de EDTA pH 7,5 e 1% de Sarcosyl) e 10 µL de proteinase K (10mg/mL). As amostras foram incubadas *overnight* a 65°C, para desfazer o precipitado. Em seguida, adicionava-se 300µL de 8M guanidina-HCl / 0,49M acetato de amônia e agitava a temperatura ambiente por 1 –2 horas até solubilizar todo o *pellet*. Adicionava-se então, 800µL de isopropanol e aguardava a precipitação do DNA. Posteriormente, as amostras eram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos. Mais duas lavagens foram realizadas com isopropanol 60% ou etanol 70%. O DNA foi seco à temperatura ambiente posteriormente diluído em 0,5 – 1mL de TE (10mM Tris-HCl e 1mM de EDTA). Foi necessário 1-4 horas de incubação (50 a 60°C) para completa dissolução do precipitado.

2.4- Genotipagem dos animais

Os animais foram genotipados para o polimorfismo existente no *intron 3* do gene do Hormônio do crescimento bovino (Zhang et al., 1993). A sequência da região amplificada e os sítios de restrição enzimática são mostrados na Figura 5.

```
1141 cgagggatgctcctaggggtggggagggcaggaaggggtgaatccacaccccctccacac
1201 agtgggaggaaactgaggagttcagccgtatttatccaagtagggatgtggttagggga
1261 gcagaaacgggggtgtgtgggggtggggaggggtccgaataaggcggggaggggaaccgcg
1321 caccagcttagacctgggtgggtgtgttcttccccaggagcgcacctacatcccggagg
1381 gacagagatactccatccagaacacccagggtgccttctgcttctctgaaacctcccgg
1441 ccccccagggcaagaatgaggcccagcagaaatcagtgagtggcaacctcggaccgagga
1501 gcaggggacctcctcatcctaagtaggctgccccagctcccgcac'cggcctggggcggc
ctgg
1561 cttctccccgaggtggcggaggtgttggatggcagtgaggatgatggtgggcggtggt
1621 ggcaggaggtcctcgggcagaggccgaccttgcagggctgccccagacccgcggcaccca
1681 ccgaccaccacctgccagcaggacttggagctgcttgcctctcactgctcctcatcca
1741 gtcgtggcttgggcccctgcagttcctcagcagagtcttaccacagcttgggttgg
1801 cacctcggaccgtgtctatgagaagctgaaggacctggaggaaggcatcctggccctgat
1861 gcgggtggggatggcggtgtgggtcccttccatgtgggggcatgccgcccctcctgg
1921 cttagccaggagaatgcacgtgggcttggggagacagatccctgctctcctcttct
1981 agcagtcagcctgaccaggggaaaccttttccccctttgaaacctcctcctcggcc
2041 ttccaagcctgtaggggaggggtggaaaatgagcgggcaggagggagctgctcctgag
```

Figura 5 - Sequência da região amplificada por PCR com a localização dos primers (negrito e sublinhado), sítios de restrição da enzima *Msp I* (negrito c'cgg) e sítio que diferencia os alelos C e D na posição 1547 (Genbank Database acesso M57764). Primers e endonuclease segundo Zhang et al. (1993).

O produto da PCR do GH constitui de 891 pares de base (pb), sendo 177 pb no *intron 2*, 117 pb no *exon III*, 227 pb no *intron 3*, 162 pb no *exon IV* e 208 pb no *intron 4* (Zhang et al., 1993). A digestão do produto da PCR pela endonuclease *Msp I* produz 4 fragmentos no alelo C (526, 193, 109 e 63 pb), enquanto que a perda de um sítio de restrição da *Msp I* no *intron 3*, pela substituição de C por T na posição 1547 (Yao et al., 1996), produz 3 fragmentos no alelo D (635, 193 e 63 pb).

A reação de PCR foi realizada no termociclador modelo PTC100 MJ Research sob as seguintes condições: 1,0 U de Taq DNA polimerase, 5,0 pmoles de cada *primer*, 100 μ M de cada dNTPs, 5,0 μ L de tampão (10X), 1mM MgCl₂, 1,5 μ L (100–500 ng) de DNA, em um volume final de 50 μ L. A solução foi submetida a 35 ciclos com a seguinte programação:

- Passo 1: 97°C /1 minutos e 30 segundos (desnaturação)
- Passo 2: 64°C/1 minuto (anelamento)
- Passo 3: 72° C/1 minuto (extensão)
- Passo 4: 94°C/1 minuto (desnaturação)
- Passo 5: 64°C/1 minuto (anelamento)
- Passo 6: 72° C/1 minuto (extensão)
- Passo 7: voltar ao passo 4, 34 vezes
- Passo 8: 72°C/5 minutos (extensão final)

O par de *primer* utilizado foi descrito por Zhang *et al.*, 1993:

5'- ATC CAC ACC CCC TCC ACA CAG T -3'

5'- CAT TTT CCA CCC TCC CCT ACA G -3'

Diferentes volumes de DNA durante a otimização das reações de PCR foram testados para estipular uma quantidade fixa de amostra a ser usada em todas reações, não necessitando, assim, de uma quantificação por espectrofotometria de todas as amostras de DNA a serem utilizadas. No entanto algumas amostras foram quantificadas para obter uma estimativa da quantificação. Para calcular a concentração do DNA foi usada a seguinte fórmula:

Concentração em ng/ μ L = Absorbância 260 x 50 x Fator de diluição.

2.5 - Eletroforese e detecção de produtos amplificados

Após a realização da PCR, 2 μ L de um corante de carreamento (0,125% "bromophenol blue", 0,125% "xylene cyanole" e 50% de glicerol) foram adicionados a 10 μ l do produto amplificado e então submetido a eletroforese em

gel de agarose 1,5%, em TBE 0,5 x, por 40 minutos a 110 V, corado com Brometo de Etídio (10µg/ml) e visualizado através de raios ultravioleta pelo sistema VDS® (Pharmacia Biosciences).

Após verificados resultados satisfatórios, 10 µL do produto amplificado foi submetido à digestão enzimática com a enzima *Msp* I. Para a restrição foi utilizado 5 U da enzima (0,5µL), 1,5µL do tampão da enzima (10X), 3 µL água para 15µL de volume final. A reação foi incubada a 37°C por no mínimo 2 horas. Os produtos da restrição também foram submetidos à eletroforese como descrito anteriormente, porém, o gel utilizado foi de 2,0 %, e tempo gasto, 1 hora.

2.6 - Análise Estatística

Para verificar se as freqüências genótípicas estavam em equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o teste de χ^2 .

Para a análise da associação do polimorfismo do gene do Hormônio do Crescimento (GH) com as seguintes características importantes para a produção de leite: produção total 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:

$$y_{ij} = \mu + g_i + e_{ij}$$

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 (CC, CD ou DD);

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, estimou-se o efeito médio de uma substituição alélica por meio do seguinte modelo:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_i + e_i$$

em que:

y_j é o valor fenotípico médio dos indivíduos com genótipo j ;

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 DD, 1 para

CD e 2 para CC;

e_i é o erro aleatório associado a observação y_i ; $e_i \sim N(0, \sigma^2)$.

Para a variável produção total, 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 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).

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.

Na população estudada, um total de 251 animais possuíam lactação encerrada, e, dentre estes, alguns apresentavam dados referentes à 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.

Para a classificação dos animais em relação às covariáveis, número de ordenhas diárias e regime alimentar, foram adotados os seguintes critérios:

• Número de ordenhas diárias:

2 - duas ordenhas diárias;

3 - três ordenhas diárias.

• Regime alimentar:

1- extensivo;

2 - semi-intensivo;

3 - intensivo.

Para as covariáveis idade ao parto e duração da lactação, foram utilizados os valores em meses, e em dias respectivamente.

As diferenças entre as médias das características analisadas entre os diferentes genótipos foram testadas duas a duas, usando o teste t de *Student*, utilizando-se também o programa SAS.

3 - Resultados e Discussão

3.1 - Otimização da PCR

Durante a otimização da amplificação foram testadas diferentes quantidades de *Taq*, *primer*, DNA e $MgCl_2$, visando a melhor amplificação do fragmento desejado, e diminuir os produtos inespecíficos. O reagente que mais interferiu na otimização foi o $MgCl_2$, sendo que quanto maior a concentração utilizada, mais produtos inespecífico apareciam. A Figura 6 mostra um dos passos da otimização para a amplificação do fragmento de 891 pb, colunas 1, 2, 3 e 4 representam, 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mM de $MgCl_2$ respectivamente. A melhor condição foi com 1,0 mM (coluna 1). O volume final da reação também influenciou bastante, sendo 50 μL o ideal.

Diferentes volumes de DNA durante a otimização das reações de PCR foram testados para estipular uma quantidade fixa de amostra a ser usada em todas reações, não necessitando, assim, de uma quantificação por espectrofotometria de todas as amostras de DNA. No entanto algumas amostras foram quantificadas para obter uma estimativa da quantificação, encontrando a média de 294 ng/ μL . O volume ideal para a amplificação do fragmento estudado foi de 1,5 μL (441ng/ μL). O fragmento de 891 pares de base (pb) foi obtido em todas as amostras testadas (Figura 7). As condições ótimas de amplificação foram: 1,0 U de *Taq* DNA polimerase, 5,0 pmoles de cada *primer*, 100 μM de cada dNTPs, 5,0 μL de tampão (10X), 1mM $MgCl_2$, 1,5 μL de DNA, e água q.s.p. 50 μL .

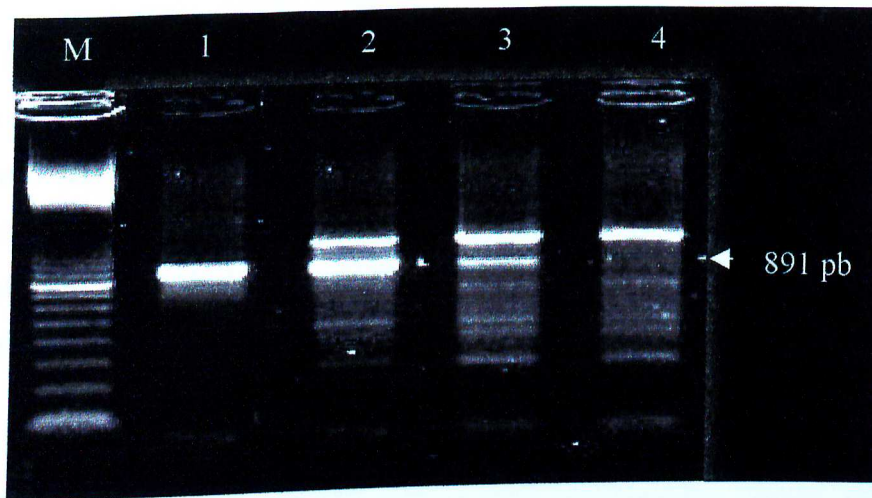


Figura 6 - Gel de agarose 1,5%. Otimização da reação de amplificação do GH, M, marcador molecular de 100pb, colunas 1, 2, 3 e 4 otimizações utilizando, 1,0; 1,5; 2,0 e 2,5 mM de $MgCl_2$ respectivamente.

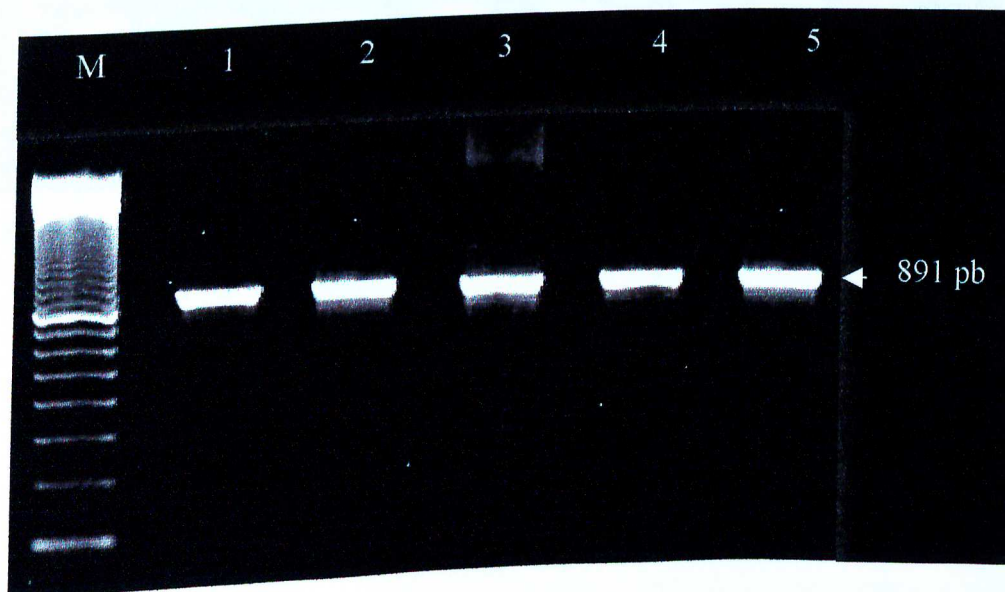


Figura 7 - Gel de agarose 1,5%. Colunas 1 a 5 representam produto amplificado de 891 pb do gene GH. M, marcador molecular de 100 pb.

3.2 - Genotipagem dos Animais

A Figura 8 mostra o padrão dos genótipos produzidos pela digestão do produto da PCR (891 pb). Indivíduos homozigotos para o alelo D (colunas 1 e 2) é caracterizado por 3 fragmentos de 635, 193 e 63 pb, enquanto que indivíduos homozigotos para o alelo C (colunas 5 e 6) apresentam 4 fragmentos de 526, 193, 109 e 63 pb. Os animais heterozigotos CD (colunas 3 e 4) apresentam 5 bandas de 635, 526, 193, 109 e 63 pb.

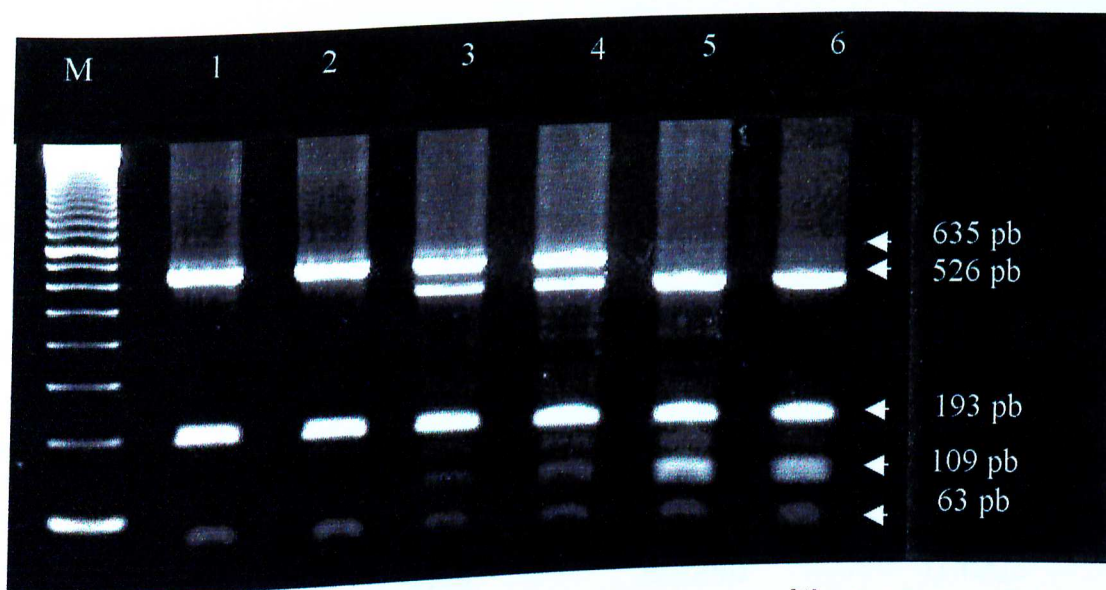


Figura 8 - Gel de agarose 2%, com padrão dos genótipos para o gene GH bovino, utilizando a enzima *Msp* I. M, marcador molecular de 100 pb, colunas 1 e 2, genótipo DD, colunas 3 e 4 genótipo CD e colunas 5 e 6 genótipos CC.

3.3 - Frequências genotípicas e alélicas

Um total de 452 vacas Girolando 5/8 foram genotipadas para o polimorfismo *Msp* I do gene GH. Encontrou-se 174 animais com o genótipo CC, 192 CD e 86 DD. Dentre os 299 animais com controle leiteiro, 103 eram CC, 135 CD e 61 DD. As frequências alélicas e genotípicas encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4 - Frequências alélicas e genotípicas do gene GH em animais da raça sintética Girolando

	Freq. Genotípicas			Freq. Alélicas		
	N	CC	CD	C	D	
ACC	299	0,3445	0,4515	0,2040	0,5703	0,4297
AG	452	0,3849	0,4248	0,1903	0,5973	0,4027

N, número de animais; ACC, animais com controle leiteiro; AG, total de animais genotipados.

Tabela 5, mostra as frequências observadas e esperadas dos genótipos, verificando equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Foi realizado o teste de χ^2 , utilizando $p^2 + 2pq + q^2$ para calcular as frequências genotípicas esperadas, partindo-se das frequências alélicas observadas.

Tabela 5 – Frequências genotípicas observadas, esperadas e o teste de χ^2 para verificar equilíbrio de *Hardy-Weinberg*.

	Genótipos		
	CC	CD	DD
Freq. Observada	0,3849	0,4248	0,1903
Freq. Esperada	0,3568	0,4811	0,1621
χ^2 calculado	0,03209		

GL=1, $p < 0,05$

A análise estatística mostra que a população estudada está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Isso mostra que as frequências alélicas e genotípicas mantiveram-se constante geração após geração, ou seja, não está havendo seleção favorecendo nenhum dos alelos.

Vários trabalhos foram realizados para determinar as frequências dos alelos C e D em varias raças de bovinos. Trabalhos realizados com bovinos *Bos taurus*, a frequência do alelo C sempre foi superior ao alelo D. Zhang et al. (1993) encontraram frequências 0,74 para o alelo C em touros Holandeses e todos os

animais da raça Hereford foram homozigotos para o alelo C. Gargalhoni (1999) encontrou frequência de 0,5755 para o alelo C em vacas Holandesas. Sabour; Lin; Smith (1997), relataram a frequência de 0,87 para o alelo C em touros Holandeses. De acordo com Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997), a frequência do alelo C para bovinos da raça Chianina foi de 0,63.

No entanto, quando o estudo é realizado em bovinos *Bos indicus* as frequências alélicas invertem, sendo o alelo D predominante. Segundo Rodriguez (1996) bovinos selecionados da raça Gir apresentaram a frequência de 0,967 para o alelo D. Vários autores trabalharam com bovinos da raça Nelore e as frequências encontradas para o alelo D foram de 0,875; 0,78; 0,88 e 0,85 segundo Faria et al. (1997), Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997), Borges (1997) e Unanian (2000). Poucas pesquisas foram realizadas com animais cruzados Girolando. Gargalhoni (1999), genotipou 63 animais Girolando de vários graus de sangue, encontrando a frequência de 0,4444 para o alelo C e 0,5556 para o alelo D. Jorge e Lama (1998), trabalharam com 121 novilhas Girolando 3/4 e encontraram as frequências de 0,67 e 0,33 para os alelos C e D, respectivamente.

Neste trabalho as frequências alélicas foram de 0,5973 para o alelo C e 0,4027 para o alelo D. Como animais da raça Girolando 5/8 são oriundos do cruzamento entre animais da raça Gir (*Bos indicus*) e Holandês (*Bos taurus*), e, segundo Ramalho; Santos; Pinto (1997), o termo "grau de sangue", é comumente utilizado para indicar a porcentagem média de alelos de uma determinada raça que o rebanho possui, pode-se dizer, então, que os animais do presente estudo apresentam 5/8 (62,5%) de seus alelos provenientes da raça Holandês e 3/8 (37,5%) derivado da raça Gir.

A Tabela 6 apresenta as frequências alélicas em diferentes raças para o polimorfismo estudado. Estes resultados mostram que existe variação na frequência alélica entre raças.

Tabela 6 – Frequências alélicas encontradas, em diferentes raças de bovinos para o polimorfismo GH-*Msp*I

Autor	Raça	Frequências	
		C	D
Zhang et al. (1993)	Holandês	0,74	0,26
Sabour; Lin; Smith (1997)	Holandês	0,87	0,13
Gargalhone (1999)	Holandês	0,5755	0,4245
Sabour; Lin; Smith (1997)	Ayrshire	1,0	0,0
Sabour; Lin; Smith (1997)	Jersey	0,7	0,3
Zhang et al. (1993)	Hereford	1,0	0,0
Dybus (2002)	Polish Friesian	0,873	0,127
Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997)	Chianina	0,63	0,37
Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997)	Nelore	0,22	0,78
Borges (1997)	Nelore	0,12	0,88
Faria et al. (1997)	Nelore	0,125	0,875
Unanian et al. (2000)	Nelore	0,15	0,85
Rodríguez (1996)	Gir	0,033	0,967
Jorge e Lama (1998)	Girolando 3/4	0,67	0,33
Gargalhone (1999)	Girolando	0,4444	0,5556
Franco (2003)	Girolando 5/8	0,5973	0,4027

Conforme demonstrado, em todos os trabalhos pesquisados para o polimorfismo GH *Msp* I, a frequência do alelo C sempre foi maior que o alelo D em animais *Bos taurus* e a frequência do alelo D foi maior em animais *Bos indicus*. Como os animais trabalhados são oriundos de um cruzamento entre as raças Gir e Holandês houve uma mistura entre os alelos das duas raças e o resultado encontrado foi uma frequência maior do alelo C (0,5973), mas não tão grande em relação ao alelo D (0,4027), comparado com animais das raças puras. Como já descrito, Rodriguez (1996) encontrou em animais Gir, a frequência de 0,967 para o alelo D e 0,033 para o alelo C. Sabour; Lin; Smith (1997) relataram a frequência de 0,87 para o alelo C e 0,13 para o alelo D em touros Holandeses e Zhang et al.

(1993) encontraram frequência de 0,74 e 0,26 para os alelos C e D, respectivamente, em touros Holandeses.

Supõe-se que nos animais do presente estudo a maioria dos alelos D são provenientes dos animais *Bos indicus* (GIR) e o alelo C advém de animais *Bos taurus* (Holandês), e como os animais trabalhados apresentam a maior parte dos genes provenientes da raça Holandesa (5/8 ou 62,5%), pode-se explicar a maior frequência do alelo C na população.

Jorge e Lama (1998) encontraram frequências de 0,67 e 0,33 para os alelos C e D, respectivamente. No entanto os animais trabalhados possuíam 3/4 (75%) de "sangue" Holandês o que explica a maior frequência do alelo C quando comparado com animais do presente trabalho.

Gargalhone (1999) encontrou maior frequência do alelo D em relação ao alelo C para animais cruzados, no entanto trabalhou com animais de diferentes graus de sangue (1/2, 3/4 e 7/8), não especificando as frequências alélicas nos diferentes cruzamentos.

3.4 – Análise das Características de Produção de Leite

As análises de variância para os caracteres, produção total de leite (PT), duração da lactação (DL), produção média diária (PMD), e intervalo entre partos médio (IEPm) em relação ao polimorfismo do GH, foram realizadas utilizando o programa SAS e as covariáveis utilizadas foram: duração da lactação (DL), idade ao parto (IP), número de ordenhas ao dia (OD) e tipo de regime alimentar (RA) (Tabela 7). As médias ajustadas das características quantitativas, PT, DL, PMD e IEPm foram aplicadas na análise de variância para o efeito do polimorfismo gênico do GH e encontram-se na Tabela 8, e Figuras 9 e 10.

Tabela 7 - Análise de variância para as características produção total, duração da lactação, produção média diária e intervalo entre partos médio, em relação ao polimorfismo do GH, utilizando como covariáveis, duração da lactação (DL), idade ao parto (IP), número de ordenhas diárias (OD) e regime alimentar (RA).

Fontes de Variação	Quadrados Médios							
	Prod. Total	PMD		Duração		IEPm		
		GL		GL		GL		GL
DL	433477213,95*	1	-	-	-	-	100624,46*	1
IP	18942388,15*	1	136,66*	1	7515,15	1	-	-
OD	49219920,99*	1	934,02*	1	2404,78	1	18925,25*	1
RA	3268631,99	1	169,80*	1	15078,16	1	21156,85*	1
GH	7477566,34*	2	75,37*	2	17398,21	2	6329,95	2
Erro	1047628,98	504	13,38	566	6185,97	505	3793,64	376
Total		510		571		510		381

*Significativo em nível de 5% de probabilidade

É importante citar que os dados de duração da lactação, idade ao parto, número de ordenhas diárias e regime alimentar foram usados como covariáveis para que todos os dados das características analisadas fossem ajustados quanto a estas covariáveis.

Verifica-se na Tabela 7 que os efeitos das covariáveis foram significativos para PT, PMD e IEP o que justifica a inclusão das mesmas no modelo estatístico.

A Tabela 8 mostra o número de animais, número de observações e as médias ajustadas pela análise de variância.

Tabela 8 – Médias ajustadas das características, produção total (PT), produção média diária (PMD), duração da lactação (DL), e Intervalo entre partos médio (IEPm).

Caract.	Animais	Obs	Genótipos		
			CC	CD	DD
PT (Kg)	251	511	3570,73 ^{ab}	3745,96 ^a	3433,51 ^b
PMD (Kg)	299	572	13,30 ^{ab}	13,90 ^a	12,52 ^b
DL (dias)	251	511	273,35	271,93	287,17
IEPm (dias)	130	130	432,98	420,67	421,61

Médias com letras diferentes na mesma linha são estatisticamente diferentes ($p < 0.05$).

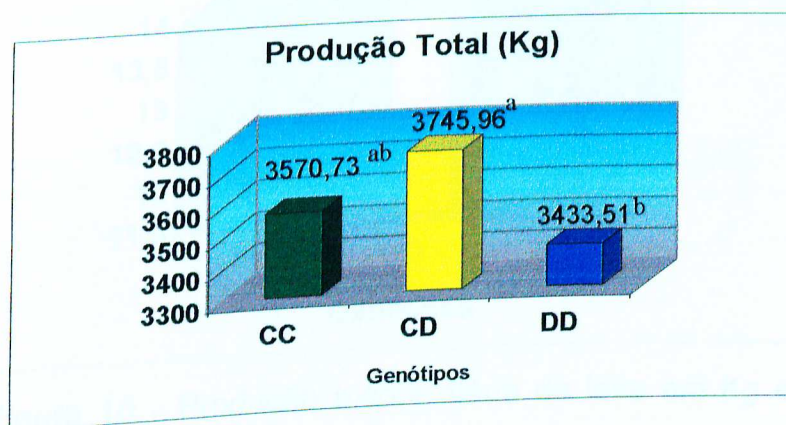


Figura 9 - Produção total de leite em Kg em relação aos respectivos genótipos do gene GH.

O teste de análise de variância foi altamente significativo para a PT ($p=0,0289$) e PMD ($p=0,0038$), indicando que pelo menos uma das médias difere das demais. No intuito de verificar as diferenças entre as classes genotípicas foi realizado o teste t de *Student*.

Os resultados evidenciados na Tabela 8 mostram que os animais heterozigotos apresentam médias para produção total diferente dos animais DD ($p=0,0114$) demonstram que animais com o genótipo CD são superiores aos

animais com o genótipo DD para a produção total de leite. Verificou-se ainda que CD x CC foram diferentes em nível de 8,83% de probabilidade, que embora esteja um pouco acima do nível de significância ($p < 0,05$), pode-se afirmar que houve uma tendência de superioridade do genótipo CD em relação ao CC. Não houve diferença entre as médias dos animais DD e CC.

A partir da Figura 9, pode-se observar que animais com o genótipo CD produzem em média 312,45 e 175,23 Kg de leite por lactação a mais que animais do genótipo DD e CC respectivamente. Nota-se ainda que animais CC produzem em média 137,22 Kg de leite a mais por lactação que animais DD.

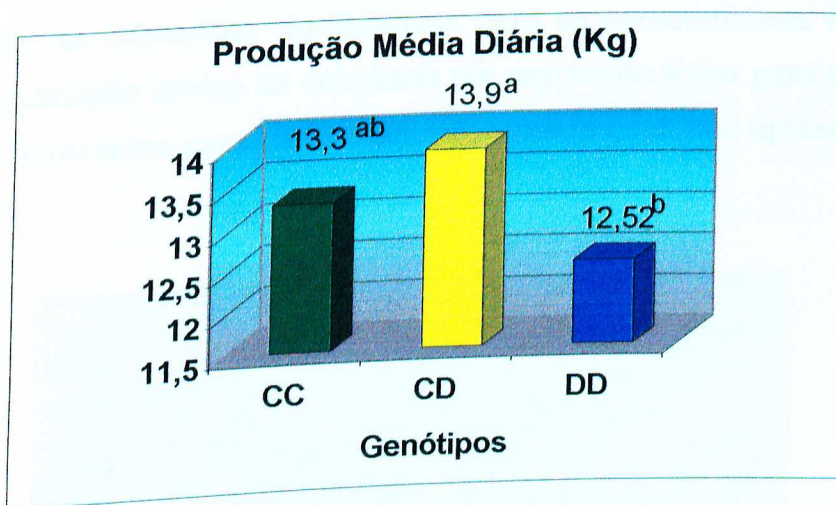


Figura 10 - Produção média diária de leite em Kg em relação aos respectivos genótipos do gene GH.

Quanto à produção média diária os resultados evidenciados na Tabela 8 mostram que os animais heterozigotos apresentam médias diferente dos animais DD ($p=0,0010$) demonstram que o genótipo CD é superior ao genótipo DD. Comparando as médias de CD e CC ($p=0,0823$) podemos dizer que CD tende a ser superior a CC. Verificou-se ainda que CC x DD foram diferentes em nível de 7,56% de probabilidade, que embora esteja um pouco acima do nível de significância ($p < 0,05$), pode-se afirmar que houve uma tendência de superioridade do genótipo CC em relação ao DD.

A Figura 10 representa a produção média diária de leite em Kg e verifica-se que animais com o genótipo CD produzem em média 1.380 e 600 g de leite por dia a mais que animais portadores do genótipo DD e CC respectivamente. Pode-se dizer ainda que animais CC produzem em média 780 g de leite a mais por dia que animais DD.

Esperava-se encontrar resultados semelhantes para as características PT e PMD em relação aos respectivos genótipos, no entanto, para a PT não houve tendência de superioridade do genótipo CC em relação ao DD. Esse fato pode ser explicado pelo maior número de animais que possuíam dados referentes a PMD (Tabela 8) em relação a PT.

Considerando as diferenças significativas para as características PMD e PT, o efeito de substituição alélica foi calculado por regressão linear para estimar os valores médios acrescidos para cada alelo incorporado conforme apresentado nas Figuras 11 e 12.

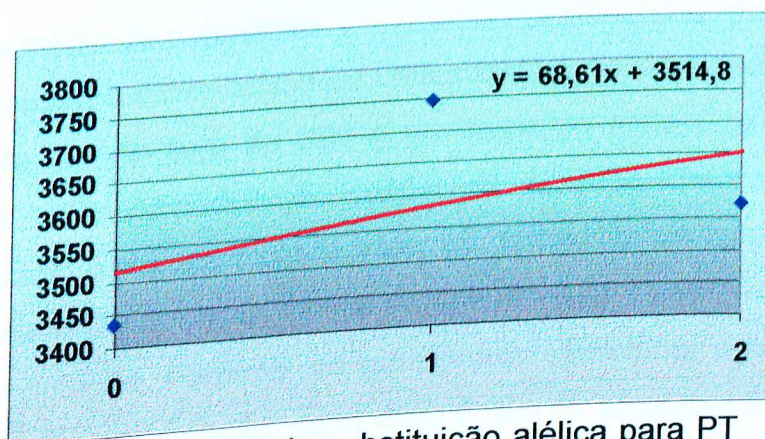


Figura 11 - Efeito de substituição alélica para PT em Kg. Genótipo eixo x, sendo 0=DD, 1=CD e 2=CC.

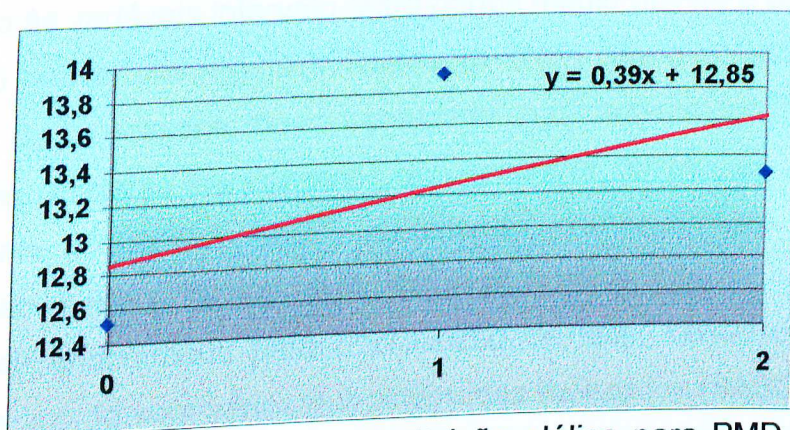


Figura 12 - Efeito de substituição alélica para PMD em kg. Genótipo eixo x, sendo 0=DD, 1=CD e 2=CC.

A Figura 11 mostra o efeito médio de uma substituição alélica na produção total de leite, sendo esta de 68,61 Kg em favor do alelo C. Pode-se dizer então, que a substituição de um alelo D por um C proporciona o aumento de 68,61 Kg de leite por lactação na média da população.

A Figura 12 mostra o efeito médio de uma substituição alélica na produção média diária de leite, sendo esta de 390 g em favor do alelo C. Portanto se multiplicarmos esse valor pela duração média da lactação observada nesta população (275,44 dias) encontraremos o valor de 107,42 kg de leite. Isto é, a substituição de um alelo D por um C implica em um incremento de 107,42 Kg de leite na média da população. Portanto, se um produtor direcionar o cruzamento visando incluir o alelo C na população, cada alelo C que for incorporado implicará em um aumento médio de 107,42 kg de leite por lactação. Considerando o preço médio do litro de leite 0,45 R\$, pode-se dizer que o proprietário ganhará (107,42 x 0,45) 48,34 R\$ com cada alelo C incorporado no rebanho por lactação.

Pela Figura 11, pode-se observar um resultado diferente do analisado acima, pois o incremento de cada alelo C na produção total foi de apenas 68,61 Kg. Este caso pode se explicado pelo fato de que na análise estatística para a produção total foi utilizado um número menor de animais e observações comparando com a produção média diária (Tabela 8), já que, vários animais analisados não haviam encerrado a lactação.

Com relação às variáveis intervalo entre partos médio (IEPm) e duração da lactação (DL), não houve diferença significativa ($p < 0,05$) com o polimorfismo do gene do hormônio do crescimento bovino estudado. A características IEPm é de baixa herdabilidade, portanto era esperado não encontrar correlação. Já a DL é de alta herdabilidade (PEREIRA, 1999), no entanto, o polimorfismo estudado nesta população não interferiu na expressão da característica.

Os resultados encontrados para a produção de leite, sendo o alelo C, favorável, estão de acordo com vários outros estudos realizados (SABOUR; LIN; SMITH, 1997; GARGALHONE, 1999; DYBUS, 2002; YAO et al., 1996).

Yao et al. (1996), trabalharam com animais da raça Holandesa e encontrou que o efeito médio de uma substituição alélica foi de 300Kg de leite por lactação a favor do alelo C. Resultado semelhante foi obtido por Gargalhona (1999) com animais da raça Holandesa e Girolando e o valor encontrado foi de 386,5 Kg de leite por lactação. Os resultados do presente estudo estão de acordo com os autores, no entanto com valores menos expressivos.

Hoj et al. (1993) sugere que o alelo D esteja relacionado com maior produção de gordura no leite. No entanto, Yao et al. (1996) encontrou que cada alelo C aumenta a produção de gordura em 8 kg e proteína em 7 Kg, em bovinos da raça Holandesa. Aggrey et al. (1998) não encontrou nenhuma associação positiva entre o polimorfismo com produção de leite, gordura ou proteína em touros holandeses.

É importante ressaltar que todos os autores citados acima, com exceção de Gargalhona (1999), trabalharam com raça de bovinos onde a frequência do alelo D na população é muito baixa (Tabela 6), o que dificulta a análise do genótipo DD.

Unanian et al. (2000) constatou que bovinos da raça Nelore portadores do genótipo DD ganharam mais peso que os demais animais. No entanto, Borges (1997) encontrou que animais Nelore heterozigotos (CD), foram superiores para ganho de peso.

Conforme os estudos previamente realizados por vários autores principalmente com gado Holandês supõe-se que realmente o alelo C esteja relacionado com maior produção de leite. Quanto à produção de gordura e proteína no leite e ganho de peso os resultados são controversos.

É evidente a maior frequência do alelo C em bovinos da raça Holandesa, o que reforça a idéia que este alelo esteja relacionado com maior produção de leite, pois estes animais são selecionados a mais de 400 anos para esta característica (MENEZES, 2002), ao contrário dos animais da raça Gir que são animais de dupla aptidão (carne e leite). A sugestão para aumentara frequência do alelo C na raça Girolando seria trabalhar com touros homocigotos durante os cruzamentos e principalmente encontrar reprodutores Gir que são portadores deste genótipo, visto ser este de frequência muito baixa na raça.

É importante realizar pesquisas com bovinos da raça Holandesa presentes no Brasil, pois pode haver diferença nas frequências alélicas em comparação com os trabalhos citados, como foi observado por Gargalhoni (1999). Estudos com animais da raça Gir são também de grande importância, pois existem poucos trabalhos disponíveis, além disso, a análise destas duas raças é de grande importância para a formação da raça Girolando.

Outro polimorfismo bastante estudado do gene do hormônio do crescimento bovino está localizado no exon 5, onde ocorre a troca de um nucleotídeo ocasionando mudança de aminoácidos Leucina para Valina. Vários autores correlacionaram este polimorfismo com características produtivas em bovinos. No intuito de descobrir como este polimorfismo age na expressão do GH foram realizadas pesquisas quantificando a proteína GH e correlacionando com os respectivos genótipos com ou sem administração de GHRH (SORENSEN et al., 2002) e TRH (GROCHOWSKA et al, 2001). O mesmo tipo de estudo deve ser realizado com o polimorfismo GH *Msp* I e além de quantificar a proteína poderia ser feito também quantificação de mRNA do GHR em células da glândula mamária.

Vários estudos demonstram que alguns parâmetros da secreção de GH em bovinos, ovinos e suínos (frequência de picos, secreção total diária, resposta a estímulos de GHRH) apresentam alta correlação genética (PARMENTIER et al. 1999). Woolliams; Angus; Wilson (1993) constataram que bezerros de leite com altos valores genéticos (PBV) para produção de gordura e proteína no leite, apresentavam concentração basal de GH maior e também respondiam melhor à administração de GRF (fator de liberação de GH) que bezerros com baixo valor

genético. Kazmer e Oyler (1991) constataram maior concentração sérica de GH em vacas com alto índice genético para produção de leite do que em vacas com baixo índice. Estes estudos demonstram a grande importância de se realizar pesquisas com o gene que codifica a proteína GH, devido à alta correlação genética entre a secreção de GH e características importantes para a produção de leite. Sendo assim, a quantificação do GH endógeno é uma medida que permite prever o valor genético dos animais.

Já está estabelecido que a administração de GH aumenta a produção de leite (ETHERTON e BAUMAN, 1998), devido à sua ação direta e indireta (via IGF-I) na glândula mamária. O GH provoca maior disponibilidade de metabólitos (proteínas, ácidos graxos, glicose) e minerais circulantes, aumenta o fluxo sanguíneo na glândula mamária e a capacidade sintética do tecido mamário (BURTON et al., 1994), além disso, apresenta função lipolítica, inibindo a síntese de enzimas lipogênicas no tecido adiposo e estimulando a transcrição de genes para a síntese de ácidos graxos (BESWICK e KENNELEY, 1998, citado por HULL e HARVEY, 2001). Além de todas estas funções o GH auxilia também na mamogênese (SEJRSEN et al., 1999). Levando em consideração a influência do hormônio do crescimento sobre o desenvolvimento dos tecidos e a síntese de leite é provável que o seu gene esteja relacionado à característica produção de leite, podendo assim, explicar os resultados encontrados, demonstrando a superioridade do alelo C para a esta característica.

Sabe-se que o GH estimula a síntese de IGF-I (JAMMES et al., 1996) e a ação indireta do GH via IGF-I, provoca aumento na síntese de componentes do leite por células e auxilia na manutenção das células secretoras. O IGF-I aumenta drasticamente o fluxo sanguíneo (ETHERTON e BAUMAN, 1998) e também exerce um efeito mitogênico nas células diferenciadas, causando a expansão clonal do número de células (KOPCHICK e ANDRY, 2000). Portanto, devido à ação do GH estimulando a síntese de IGF-I, e a importância do IGF-I na produção de leite, pode ser que ocorra interferência do polimorfismo estudado na síntese de IGF-I, provocando alterações na produção de leite de acordo com os diferentes genótipos estudados. Interação entre o GH produzido e seu receptor (GHR),

também podem afetar a produção de leite, assim como as prováveis interferências do GH no IGF-I, podem afetar a interação do IGF-I ao seu receptor.

Características quantitativas são reguladas por muitos genes e são afetadas pelas interações entre eles, o que mostra a necessidade de realizar estudos fazendo interações entre os polimorfismos existentes em vários genes responsáveis pela produção de leite.

O mais interessante é que o polimorfismo está presente dentro de um *intron* e, portanto não provoca nenhuma alteração na sequência dos aminoácidos da proteína GH, a não ser que ocorra um *splicing* alternativo. Suspeita-se que o polimorfismo provoque alteração na taxa e regulação da transcrição gênica, e não diretamente na estrutura da proteína.

Os resultados encontrados contradizem Rodrigues; Guimarães; Pinheiro (1997), os quais sugerem que o polimorfismo não influencie qualquer característica de produção ou crescimento ponderal de bovinos, por estar localizado em um *intron*.

De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, deve-se analisar a importância do alelo C e seu efeito na seleção de animais em rebanhos leiteiros, com o objetivo de tornar o processo de seleção mais rápido e eficiente, diminuindo assim o intervalo entre gerações e custos aos produtores.

O estudo deve ser realizado com maior número de animais e, principalmente analisar os dados daqueles que estão em período de lactação, quando encerrarem, e todos os outros que foram genotipados, podendo assim confirmar os dados aqui encontrados.

Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de usar este polimorfismo em programas de seleção assistida por marcadores em bovinos da raça sintética Girolando, aumentando a frequência do alelo C na população.

4 - Referências Bibliográficas

- A workshop of DNA technologies and selection of animal genetic resources, 1992. Brisbane, Austrália, june 14th to 26th compiled and presented by CSIRO molecular animal genetics center and center for molecular biology and biotechnology at the University of Queensland. **Practical Manual**: 70-71.
- 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. **Anais...**v. 26, p. 281-283.
- BESWICK, N.S.; KENNELLY, J.J. The influence of bovine growth hormone and growth hormone releasing factor on acetyl-CoA carboxylase and fatty acid synthase in primiparous Holstein cows. **Comparative Biochemistry and pharmacology**, v. 120, p. 241-249, 1998.
- BORGES, M. **Marcadores moleculares e seus efeitos sobre características quantitativas de bovinos de corte**. 1997. 119 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1997.
- BURTON, J.L. et al. A review of growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v. 74, p.167-201, 1994.
- DYBUS, A. Association of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphism with milk production traits in Polish black-and-white cattle. **Anim. Sci. Papers and Reports**, v.20, n.4, p. 203-212, 2002.
- ETHERTON, T.D.; BAUMAN, D.E. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. **Physiol. Rev.**, v.78, n.3, p. 745-761, 1998.

- FARIA, F.J.C. et al. Análise do exon III ao IV do gene do hormônio do crescimento bovino. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p.188-189, 1997.
- GARGALHONE, A.G. **Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite**. 1999. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) - Instituto de Genética e Bioquímica. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 1999.
- GROCHOWSKA, R., et al. Genetic variation in stimulated GH release and IGF-I of young dairy cattle and their association with the leucine/valine polymorphism in the GH gene. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 450-476, 2001.
- HOJ, S. et al., Growth hormone gene polymorphism associated with selection for milk fat production in lines of cattle. **Anim. Genet.**, v.24, p.91-96, 1993.
- HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth Hormone: role in female reproduction. **J. Endocrinol.**, v. 168, p. 1-23, 2001.
- JAMMES, H. et al., Growth Hormone-Binding Protein in the Goat: Characterization, evolution under exogenous growth hormone treatment, and correlation with liver growth hormone receptor levels. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 13, n. 6, p. 477-489, 1996.
- JORGE, E.C.; LAMA, S.M.D. As frequências gênicas dos alelos (+) e (-) no sítio polimórfico Msp I no gene do hormônio do crescimento bovino na raça Girolando. IN: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 6., 1998, São Carlos. **Anais...**, São Carlos, 1998.
- KAZMER, G.W.; OYLER, R.H. Plasma growth hormone and insulin concentration in, and free fatty acid release from tissue cultured in vitro from Holstein cows of differing cow index during early and late lactation. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 8, n. 1, p. 81 – 86, 1991.

- KOPCHICK, J.J.; ANDRY, J.M. Growth hormone (GH), GH Receptor, and signal transduction. **Molec. Genetics. and Metabolism.** v.71, p. 293- 314, 2000.
- MENEZES, C.O programa Girolando. IN: _____ **Curso Intensivo de julgamento da Raça Girolando**, 6, 2002, Uberaba. FAZU, 2002.
- PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and selection. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v.17, p. 139-148, 1999.
- PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento genético aplicado à produção animal.** Belo Horizonte: FEP-MVZ, 1999, 496p.
- RAMALHO, M.; SANTOS, J. B.; PINTO, C.B. **Genética na agropecuária.** 6. ed. São Paulo: Globo, 1997, 359 p.
- RODRIGUES, C.V.; GUIMARÃES, S.E.F.; PINHEIRO, L.E.L. Frequências alélicas das variantes do hormônio do crescimento bovino por análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) em raças de corte. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v.21, n.2, p.189-192, 1997.
- RODRIGUEZ, M.F. **Polimorfismos do gene da somatotropina bovina em duas populações distintas da raça Gir.** 1996. 66 f. Dissertação (Mestrado) - Escola de Veterinária- Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1996.
- SABOUR, M.P.; LIN, C.Y.; SMITH, C. Association of genetic variants of bovine growth hormone with milk production traits in Holstein cattle. **J. Anim. Breed. Genet.**, v.114, p.435-442, 1997.
- SEJRSEN, K. et al., Growth Hormone and mammary development. **Dom. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 117 – 129, 1999.

SORENSEN, P. et al. Polymorphism in the bovine growth hormone gene affects endocrine release in dairy calves. **J. Dairy Sci.**, v.85, p. 1887-93, 2002.

UNANIAN, M.M. et al. Associação do polimorfismo do gene do hormônio do crescimento com a característica de peso em bovinos da raça Nelore. **Rev. Bras. Zootec.** V.29, n.5, p.1380-1386, 2000.

WOOLLIAMS, J.A.; ANGUS, K.D.; WILSON, S.B. Endogenous pulsing and stimulated release of growth hormone in dairy calves of high and low genetic merit. **Anim. Prod.**, v. 56, p. 1-8, 1993.

YAO, J. et al. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holstein. **Genetics**, v.144, p. 1809-16, 1996.

ZHANG, H.M et al. Rapid Comunication: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of the bovine somatotropin Gene. **J. Anim. Sci**, v.71, p.2276, 1993.

Conclusões

- De acordo com os resultados obtidos neste trabalho, deve-se analisar a importância do alelo C e seu efeito na seleção de animais em rebanhos leiteiros, com o objetivo de tornar o processo de seleção mais rápido e eficiente, diminuindo assim o intervalo entre gerações e custos aos produtores.
- O estudo deve ser realizado com maior número de animais e, principalmente analisar os dados daqueles que estão em período de lactação, quando encerrarem, e todos os outros que foram genotipados, podendo assim confirmar os dados aqui encontrados.
- Os resultados encontrados sugerem a possibilidade de usar este polimorfismo em programas de seleção assistida por marcadores em bovinos da raça sintética Girolando, aumentando a frequência do alelo C na população.

Anexo – 1

Protocolo para extração de DNA de Sangue.

- 1 - Adicionar 500µl de sangue fresco e resfriado ou 700 µl de sangue congelado, tomado na transição entre o plasma e eritrócitos (camada de leucócitos), e colocados em tubos de 2mL.
- 2 -Adicionar 1mL de tampão de lise não-diluído.
- 3 – Agitar lentamente e incubar em gelo por 5 – 10 minutos.
- 4 - Centrifugar a 4000g (~8000rpm) por 3 minutos.
- 5 – Descartar o sobrenadante.
- 6 – Repetir as lavagens no mínimo mais duas vezes com tampão de lise diluído (1:1) até que o *pellet* fique limpo.
- 7 - Acrescentar 100µL de TE + sarcosyl 1% e 10 µL de proteinase K (10mg/mL).
- 8 - Incubar *overnight* a 65°C, para desfazer o precipitado.
- 9 - Adicionar 300µL de 8M guanidina-HCl / 0,49M acetato de amônia e agitar a temperatura ambiente por 1 –2 horas até solubilizar todo o *pellet*.
- 10 - Adicionar 800µL de isopropanol gelado e aguardar a precipitação do DNA.
- 11 - Centrifugar em centrifuga refrigerada a 4000 g por 10 minutos.
- 12 - Repetir o passo anterior mais duas vezes com isopropanol 60% ou etanol 70%.
- 13 – Secar o pellet à temperatura ambiente ou a vácuo
- 14 – Após o pellet estar completamente seco, diluído em 0,5 – 1mL de TE.
- 15 – Se o pellet não diluir, incubar (50 - 60°C) até a completa dissolução.

Tampão de lise	TE + sarcosyl 1%	TE
20mM de Tris-HCl	10 mM de Tris-HCl	10mM Tris-HCl
5mM de EDTA pH 7,5	1mM de EDTA pH 7,5	1mM de EDTA
640 mM de sacarose	1% de Sarcosyl	
10mM de MgCl ₂		
4% de Triton X-100		