

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**“Influência do gene do hormônio do crescimento em  
características quantitativas de bovinos de leite”**

Aluno : André Galassi Gargalhoni.  
Orientador : Luís Ricardo Goulart Filho.

Uberlândia - MG  
Novembro/1999

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

II  
MON  
UNIB  
1999  
TES/ACM

**“Influência do gene do hormônio do crescimento em  
características quantitativas de bovinos de leite”**

**DIRBI/UFU**



1000189103

Aluno : André Galassi Gargalhoni

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Uberlândia,  
como parte das exigências do curso de  
pós Graduação em Genética e  
Bioquímica, para a obtenção do título  
de Mestre em Genética e Bioquímica.

Uberlândia – MG

Novembro/1999

Agradeço:

- Aos proprietários dos rebanhos analisados pela possibilidade de coleta de material para os estudos;
- Ao Professor Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, pela amizade e orientação dada durante toda a execução do trabalho;
- Ao Dr. Edmundo Benedetti e ao Dr. José Antônio Galo pelas avaliações e sugestões para o aprimoramento da tese;
- Ao meu grande mestre Dr. Fernando Ferreira, simplesmente pela sua amizade, a qual serviu de incentivo à pesquisa.
- À minha esposa Tacyana, à minha filha Ana Laura e aos meus pais Lione e Regina pelo amor e dedicação.
- Aos amigos do laboratório de genética molecular da UFU, Machaim, Graciele, Bárbara, Cleber, Wânia, Juliana, Waldesse, Walter, Warley e todos que direta ou indiretamente contribuíram para o trabalho e para os bons momentos dentro de nosso laboratório.
- Ao amigo Maurício Borges pela orientação nas análises.

A todos, muito obrigado!

## ÍNDICE

LISTA DE TABELAS	III
LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 Aspectos fisiológicos e bioquímicos do hormônio do crescimento bovino na produção de leite.	4
3.2 O polimorfismo gênico do hormônio do crescimento associado à produção de leite.	11
3.3 RFLP e marcadores genéticos.	18
3.4 Melhoramento genético em gado de leite	22
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 População e obtenção de dados quantitativos	26
4.2 Colheita de sangue	27
4.3 Extração de DNA	28
4.4 Genotipagem dos animais	29
4.5 Análise estatística	32
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1 Otimização da PCR para amplificação do GH	35
5.2 Genotipagem dos animais	37
5.3 Frequências genotípicas e alélicas	38
5.4 Grau de sangue, genótipos e rebanho × características quantitativas analisadas	40
6 CONCLUSÕES	44
RESUMO	45
SUMMARY	47
7 BIBLIOGRAFIAS	49

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1: Herdabilidade ( $h^2$ ) para várias características em gado de leite (TEIXEIRA,1997)..... P.23
- Tabela 2: Correlações genéticas entre características em gado de leite (TEIXEIRA,1997)..... P.23
- Tabela 3: Processo de otimização da reação de PCR para o hormônio do crescimento..... P.31
- Tabela 4: Determinação das frequências genótípicas e alélicas do gene GH nos animais cruzados e puros..... P.38
- Tabela 5: Dados de dias de lactação ( dias ), produção total ( Kgs ) , gordura total ( Kgs ) e porcentagem de gordura ( % ) e sua relação com o grau de sangue..... P.40
- Tabela 6: Dados de dias de lactação (dias), produção total (Kgs), gordura total (Kgs) e porcentagem de gordura (%) e sua relação com o genótipo de todos animais..... P.41
- Tabela 7: Dados de dias de lactação ( dias ), produção total ( Kgs ), gordura total ( Kgs ) e porcentagem de gordura (%) e sua relação com o rebanho analisado..... P.43
-

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Esquema da regulação neuroendócrina da produção do GH e seus locais alvos de ação (BURTON, 1994)..... P.06
- Figura 2: Esquema das propriedades lipolíticas e diabetogênicas do rbGH e sua influência no aumento da produção de leite (BURTON, 1994)..... P.08
- Figura 3: Sequência da região amplificada por PCR do gene GH com a localização dos primers (negrito e sublinhado), sítios de restrição *Msp* I (negrito c'cgg) e sítio que diferencia os alelos C e D na posição 1547 (Genebank Database acesso M57764). Primers e endonucleases segundo ZHANG *et al.* (1993)..... P.29
- Figura 4: Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com as respectivas bandas e pesos moleculares (CC – bandas 526, 193, 109 e 63 pb; CD – bandas 635, 526, 193, 109 e 63; DD – bandas 635, 193 e 63)..... P.31
- Figura 5: Otimização da reação de amplificação do GH. A reação de otimização inclui 1 e 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2 e 3 U de Taq polimerase, 100 e 200 ng de DNA, 8 pmoles de “primers” e 8 nmoles de dNTPs em 30  $\mu$ l, sob um programa que inclui 34 ciclos à 62° C, 72° C e 94° C por 1 minuto. O produto de amplificação (15  $\mu$ l) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídio. Duas U de Taq polimerase e 200 ng de DNA ( colunas 1, 2 e 3)..... P.36
- Figura 6: Genotipagem do GH de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por *Msp* I..... P.37
- Figura 7: Efeito da substituição alélica. Genótipo x, sendo 0 = CC, 1 = CD e 2 = DD..... P.39

Figura 8: Produção total de leite em quilos e seus respectivos genótipos para o gene GH em vários graus de sangue e rebanhos..... P.42

## LISTA DE ABREVIATURAS

- AYD – Desvio médio para produção de leite
- BBB – Raça Belgian Blue (Belgium Blue Breed)
- bGH – Hormônio do crescimento bovino.
- bST – Somatotropina bovina.
- C – Citosina.
- DL – Dias de lactação.
- dNTPs – Dinucleotídeos trifosfatos.
- EBV – Produção de leite.
- GH – Hormônio do crescimento.
- GHRF – Fator de liberação do GH.
- GT – Gordura total.
- IGF – Insulina como fator de crescimento.
- L – Leucina
- MgCl<sub>2</sub> – Cloreto de magnésio.
- mM – mmolar
- ng – nanogramas.
- pb – pares de bases.
- PCR – Poimerase Chain Reaction(Reação em cadeia de polimerase).
- PG – Porcentagem de gordura.
- PT – Produção total de leite.
- QTL – Loci de características quantitativas.
- RFLP – Restriction Fragment Length Polimorphism
- SS – Somatostatina.
- SSCP – Polimorfismo de conformação de fita simples.
- V – Valina.
-

## ***Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite***

---

### RESUMO

As mais recentes tecnologias da biologia molecular tornaram possível o estudo do polimorfismo do DNA e sua relação com características quantitativas de interesse econômico em bovinos de leite. Utilizou-se o hormônio do crescimento (GH) como marcador molecular para estudar seu efeito sobre as características quantitativas, tais como produção total de leite (PT), dias de lactação (DL), produção total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG) em gado leiteiro. Um total de 116 animais, sendo 63 cruzados de Gir com Holandês e 53 puros da raça Holandesa, foram genotipados para o GH e os genótipos utilizados para o estudo de ligação com características quantitativas. Os animais foram escolhidos ao acaso em regiões do Triângulo Mineiro e Norte do estado de São Paulo com condições similares de manejo sanitário e nutricional, e todos com dados oficiais sobre a primeira lactação. As condições ótimas de amplificação do GH incluíram 200 ng de DNA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 nmoles de dNTPs, 8 pmoles de "primers" e 2 unidades de Taq polimerase, sob 94°C de desnaturação inicial por 10 minutos, seguidos de 34 ciclos à 94°C por minuto para desnaturação, 60°C por minuto para anelamento, 72°C por minuto para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 minutos. A frequência do alelo C nos animais puros foi de 0,5755 contra 0,4444 nos animais cruzados. A

frequência do genótipo CC nos animais puros também foi maior quando comparado aos animais cruzados, sendo de 0,3396 e 0,2063, respectivamente. Os indivíduos homozigotos para o alelo C foram caracterizados por 4 fragmentos sendo 526, 193, 109 e 63 pares de bandas (pb), enquanto que os homozigotos para o alelo D perde um sítio de restrição para a enzima *Msp* I dentro do intron 3 do gene, produzindo 3 fragmentos de 635, 193 e 63 pb. Os animais heterozigotos apresentam todos padrões de bandas. A análise estatística mostrou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) na produção total de leite, sendo as maiores para o genótipo CC e as menores para o genótipo DD. Os animais puros foram superiores aos cruzados em suas médias para dias de lactação, produção total de leite e gordura. Na análise do efeito de substituição alélica encontramos a fórmula  $y = -386,5x + 5615,7$  com x representando os genótipos CC = 0, CD = 1 e DD = 2.

---

## 1) INTRODUÇÃO

A necessidade de produção de alimento cada vez mais crescente, em um mundo cada vez mais populoso, exige que se trabalhe com tecnologia, que possa ser aplicada diretamente no campo, maximizando a produção por área e diminuindo o custo. Na bovinocultura de leite, onde busca-se maior produção utilizando menor número de animais, é necessário que modelos de seleção genética no rebanho associado a técnicas de reprodução possam garantir a utilização de animais geneticamente superiores para determinadas características que sejam desejadas.

O fator genético constitui o principal gerador das diferenças de desempenho observadas entre os indivíduos de uma população ou de raças diferentes. A lactação, por tratar-se de uma característica poligênica (condicionada por vários genes), produz diferenças de desempenho, que podem ser devidas às alterações genéticas ocorrendo em um ou mais dos genes que codificam os hormônios e os fatores de crescimento envolvidos na fisiologia deste processo (RODRIGUES *et al.*, 1996).

Até hoje no Brasil, os processos de seleção envolvem a análise das diferenças esperadas nas progênies (DEPs) (PEREIRA, 1983), porém o crescente aumento na utilização de sêmen de touros importados e a grande oferta destes produtos no mercado possibilita a escolha de pais selecionados, com o uso de marcadores moleculares.

A genética molecular é o estudo da estrutura e função dos genes, envolvendo conceitos de fisiologia e bioquímica. Um grande número de genes

únicos, herdáveis de uma maneira mendeliana simples, podem ser examinados e identificados em um animal para serem associados com características quantitativas de interesse econômico (KENNEDY *et al.*, 1992). Estes autores argumentaram que é importante prever a produção de um animal, possibilitando a tomada de decisões, em termos de seleção, no início da vida do mesmo, diminuindo assim o intervalo entre gerações e, conseqüentemente, tendo maior ganho genético anual e menores custos operacionais nos programas de melhoramento animal. É possível que poucos genes sejam responsáveis pelas diferenças genéticas observadas entre os indivíduos para as características quantitativas. Tais loci são denominados como loci de característica quantitativa (QTL).

Os avanços na biologia molecular criaram novas oportunidades para o melhoramento genético nos rebanhos. Como exemplo de técnicas moleculares que potencialmente podem assistir geneticistas no campo, tem-se as aplicações do DNA "Fingerprinting", marcadores RFLP, introgressão de genes principais dentro das populações e métodos de gerar variabilidade genética (KENNEDY *et al.*, 1990).

Neste contexto faz-se necessária a identificação de genes "candidatos", os quais influenciam características quantitativas. Uma boa alternativa é a utilização de marcadores que possuam polimorfismo ao nível do DNA associando-os com as variações das características quantitativas (BORGES, 1997).

## 2) OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi associar o polimorfismo do hormônio do crescimento (GH), com características quantitativas para produção de leite em bovinos leiteiros.

### 3) REVISÃO DE LITERATURA

#### **3.1) Aspectos fisiológicos e bioquímicos do hormônio de crescimento bovino na produção de leite.**

Hormônio de crescimento (GH) é responsável pela regulação dos vários aspectos metabólicos relacionados aos processos do crescimento e da lactação em bovinos (DUKES, 1990). Devido à sua diversidade de ações, o GH tornou-se um candidato em potencial como marcador do desempenho dos animais para estas características fenotípicas.

Tecnicamente é referido como um hormônio somatotrópico, sendo produzido em pequenas quantidades e um dos responsáveis pela regulação da produção de leite (BISARO & BELOWS, 1986).

Este hormônio pertence a família dos hormônios somatolactogênicos. É sabido que o GH exógeno é galactopoiético quando injetado em vacas de leite lactantes. Tem-se observado alguns fatos importantes sobre fisiologia da lactação como resultado direto de experimentos com este hormônio. Fatores como a importância potencial prática para o uso comercial de aplicações de GH recombinante (rbGH) e pesquisas recentes em resistência a doenças e envelhecimento sugerem que o hormônio de crescimento pode estar fundamentalmente envolvido na manutenção da saúde animal (BURTON *et al.*, 1994). Estes autores salientaram que, embora a alta afinidade do receptor de GH é saturada por concentrações sanguíneas normais de GH, a taxa de

movimentação total no receptor durante a ocupação destes pode estar aumentada, quando o GH sanguíneo apresentar-se cronicamente elevado. Este fato pode ser a chave que explica as propriedades galactopoiéticas à injeção de rbGH já bem documentadas. Fatores endócrinos e nutricionais são determinantes para ação somatotrófica .

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

Outros fatores fisiológicos, que regulam a liberação do GH, incluem os níveis sanguíneos de glucagon, insulina, somatomedinas e estrogênio, além do estresse e as fases do sono (GLUCKMAN *et al.*, 1987).

A Figura 1 mostra o controle da produção e secreção do GH, suas moléculas ativadoras e inibidoras e seus principais locais alvo de ação. Neste cenário, o GH liberado pela pituitária liga-se a receptores específicos nas células para acionar uma sequência de eventos bioquímicos que resultam em uma resposta biológica

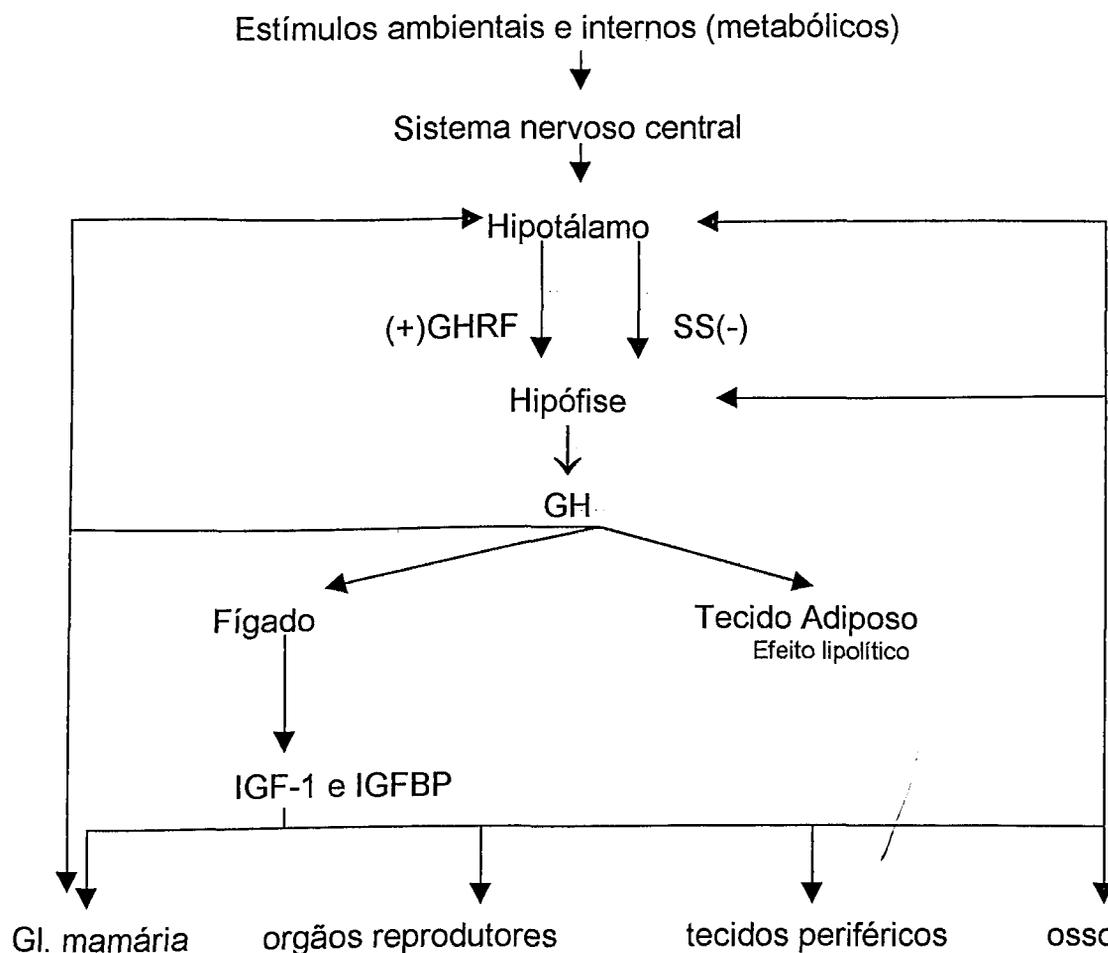


Figura 1. Esquema da regulação neuroendócrina da produção do GH e seus locais alvos de ação (adaptado de BURTON *et al.*, 1994)

Dois tipos de receptores de GH são descritos, sendo um de alta afinidade e outro de baixa afinidade, segundo RODRIGUES *et al.*, (1998). Estes autores citam que no fígado, o GH estimula a produção dos mediadores de sua ação, ou seja as somatomedinas ou fatores de crescimento semelhantes à insulina (IGFs) e suas proteínas de ligação (IGFBP), as quais entram na circulação sanguínea e são transportadas aos tecidos alvos, onde exercem múltiplas ações. Os efeitos do GH podem ser divididos em ações metabólicas (catabolismo de gordura e glicose) e ação hipertrófica (anabólica ou de crescimento), possuindo atividade lipolítica, atuando no metabolismo de

carboidratos e minerais, regeneração tecidual e ação lactogênica. Ele tem uma ação crônica sobre o metabolismo, por redirecionar a divisão e o uso de nutrientes absorvidos em favor da produção de leite em bovinos. Na lactação o GH age aumentando o fluxo sanguíneo do úbere (aumento da perfusão), para maior captação de precursores do leite. Ressaltaram ainda que, provavelmente ocorre uma diminuição na resistência vascular mamária, pela produção de vasodilatadores locais.

O GH também altera a capacidade secretora das células e promove a persistência da lactação por diminuir a taxa de involução mamária (GLUCKMAN & BREIER, 1987).

A Figura 2 resume as ações bioquímicas produzidas pelo bGH nos tecidos durante a lactação, observadas a partir de estudos com hormônio de crescimento recombinante em bovinos.

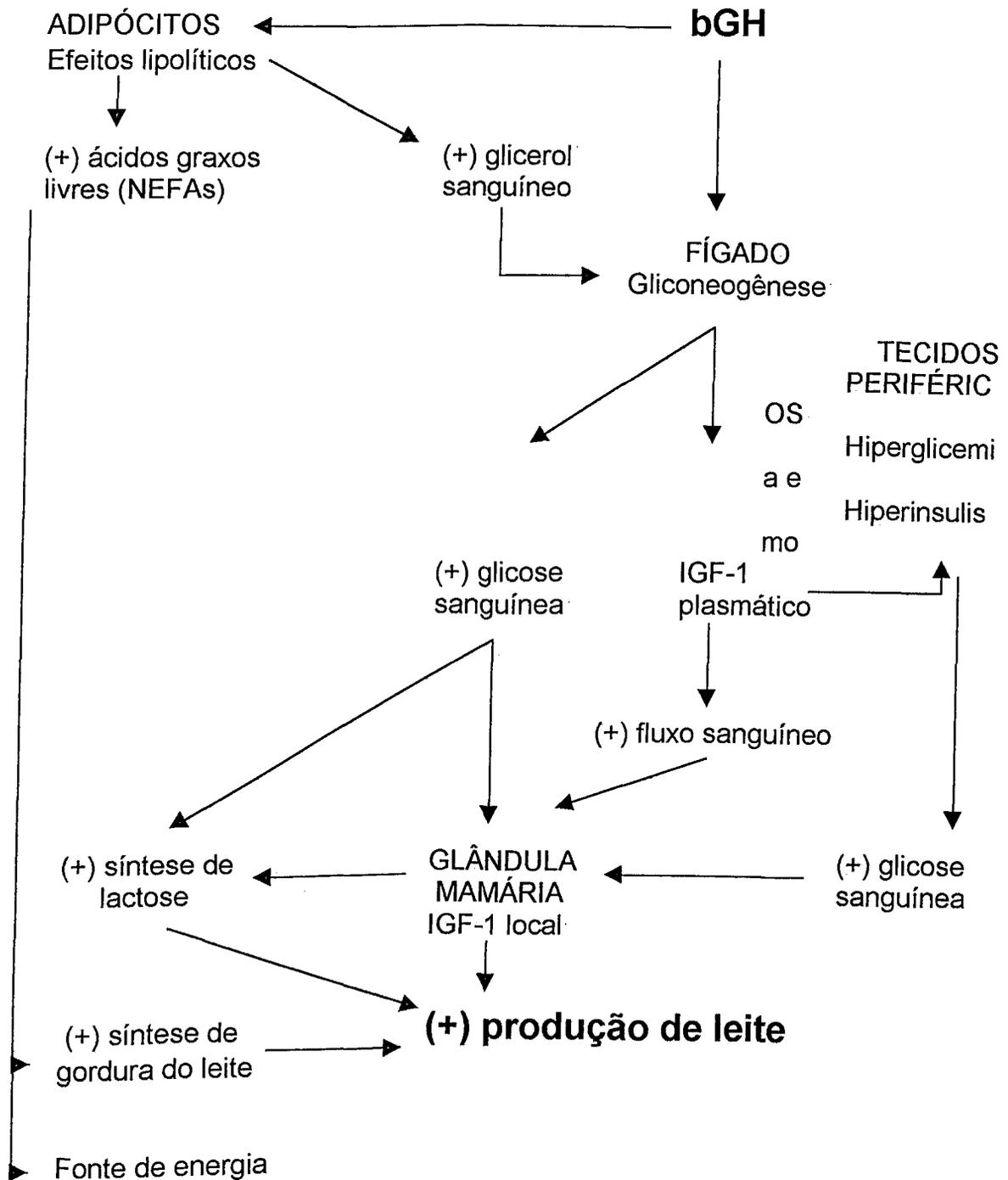


Figura 2 – Esquema das propriedades lipolíticas e diabetogênicas do bGH e sua influência no aumento da produção de leite (adaptado de BURTON *et al.*, 1994).

Entre outras ações do hormônio do crescimento, de acordo com PAGE *et al.* (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 grandes quantidades de lactose pela glândula mamária. Ressaltaram também o efeito lipolítico, mobilizador das reservas de ácidos graxos do tecido adiposo, suprindo os tecidos periféricos de ácidos graxos livres não esterificados como fonte de energia alternativa, poupando as reservas de proteína.

Em ruminantes, os hormônios da família do GH, mostram atividades lactogênica e somatogênica (crescimento, morfogênese e reprodução), diferindo na intensidade de ação (BYATT *et al.*, 1992).

RODRIGUES *et al.* (1998) mencionaram que na vaca, o hormônio lactogênio placentário é detectado na circulação materna durante a quarta semana de gestação, mas ao contrário dos outros ruminantes, sua concentração permanece baixa durante a prenhez.

O GH secretado pela hipófise, segundo BURTON *et al.* (1994), entra na circulação periférica por frestas nas paredes dos capilares. Elevadas concentrações sanguíneas de GH causam um "feedback" negativo a nível de hipotálamo, inibindo a liberação do GHRF (Fator de liberação do GH) e estimulando a SS (Somatostatina). Ressaltam ainda que o princípio geral da ação do GH durante a lactação natural é, em parte, explicada por sua habilidade de alterar o metabolismo do tecido adiposo pela alteração da sensibilidade dos tecidos à ação aguda de hormônios, como a insulina e a epinefrina. A ação do GH tem sido atribuída a respostas imunes inatas, respostas inflamatórias locais, reparo de tecidos e hematopoiese.

WALDEN *et al.* (1998) sugeriram que o GH e o IGF-1 (Insulin-like growth factor) mediavam o desenvolvimento da glândula mamária junto com o estrógeno, estabelecendo que elementos do estroma e do epitélio deveriam se interagir para ocorrer o desenvolvimento da glândula. Estes autores verificaram que o GH bovino trabalha tão bem em tecidos do estroma como nos tecidos glandulares, sugerindo a ação direta do GH no estroma da glândula mamária, induzindo assim, a produção de IGF-1 mRNA e, possivelmente, o próprio IGF-1, a qual causa diferenciação dos ductos epiteliais em brotos terminais, explicando porque o epitélio também é capaz de diferenciar as gorduras não mamárias.

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

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

regulando a ação deste hormônio na glândula mamária em uma dependência nutricional.

### **3.2) O Polimorfismo Gênico do hormônio do crescimento associado à produção de leite.**

O hormônio de crescimento bovino é um polipeptídeo de 190 a 191 aminoácidos, cujo único gene mapeado no cromossomo 19q-26qter, compõe-se de cinco exons intercalados por quatro introns totalizando 2856 pares de bases (pb) (GORDON *et al.*, 1983).

A quantidade de polimorfismo do gene do GH realça o grande número de marcadores moleculares, bioquímicos e imunogenéticos disponíveis em bovinos para análise de linhagens, teste de parentesco e também na distinção entre raças (THEILMANN *et al.*, 1989).

Ainda em 1989, BECKMANN *et al.*, usando a técnica de RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), provaram que populações de touros Holandeses-Friesian eram polimórficas para o locus do GH. Eles utilizaram os resultados para ilustrar o poder da metodologia RLFP em visualizar a variabilidade genética em populações de gado leiteiro. Outros pesquisadores como HILBERT *et al.* (1989) identificaram novas sequências polimórficas de DNA em quatro loci autossômico de bovinos, entre eles estava o GH com frequência de heterozigotos de 0,48 em gado da raça Belgian Blue Breed (BBB).

HOJ *et al.* (1993) detectaram diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nos haplótipos de deleção D-Msp-I (polimorfismo de inserção (I) e deleção (D)) do GH em linhagens de gado Holandês vermelho e branco selecionados para alta e baixa quantidade de gordura no leite.

COWAN *et al.* (1989) revelaram pela análise de "Southern Blot" e digestão com 10 enzimas de restrição, que os descendentes de duas a três famílias de touros Holandeses exibiram polimorfismo em torno do gene do GH e detectaram RFLP's em torno deste gene usando até cinco enzimas. Verificaram que a presença de RFLP's nos genes, que codificam para os hormônios da hipófise em uma linha de família, podem provar as bases para marcadores genéticos associados com lactação e desenvolvimento da glândula mamária.

ZHANG *et al.*, (1993) detectaram uma frequência do alelo D do GH de 0,26 em 35 touros da raça Holandesa e para a raça Hereford todos os 30 touros foram homozigotos para o alelo C.

De acordo com UNANIAN *et al.* (1994), foi possível separar o GH em dois alelos, por PCR (Polimerase Chain Reaction) associada a restrição pela enzima *Hae* III. Observaram que as frequências genóticas para 184 touros de oito raças foram 0,03 para o genótipo FF, 0,08 para o heterozigoto EF e 0,89 para o genótipo EE . O alelo F foi detectado apenas nas raças Brahma, Holandês e cruzados de Wagyu.

FALAKI *et al.* (1997) analisaram fragmentos de restrição do gene GH usando a enzima de restrição *Taq* I para investigar a associação entre este polimorfismo em vacas e touros Simental com a proteína do leite e a produção

total de leite e concluíram que os touros com o genótipo BB tiveram valores maiores para produção de leite, quando comparado aos animais AA.

Segundo LUCY *et al.* (1993) a sequência de aminoácidos da somatotropina bovina (bST) varia na posição 127, onde tanto a valina como a leucina são encontradas. Para determinar a frequência alélica da leucina 127 e valina 127 no gene bST em vacas e touros das maiores raças produtoras de leite (Holandês, Pardo-suíço, Jersey e outras) os autores extraíram o DNA do sangue ou do espermatozóide e amplificaram um fragmento de 428 pares de base do gene bST por PCR e restrição com a enzima *Alu I*. A frequência alélica para a leucina 127 e valina 127 em vacas Holandesas foi de 0,93 e 0,07 respectivamente e em touros da mesma raça foi respectivamente de 0,96 e 0,04. Eles concluíram que as frequências dos alelos para o gene bST não foram similares nas diferentes raças leiteiras e estimativas de produção de leite foram correlacionadas com variações do gene bST em vacas mas não em touros.

RODRIGUES *et al.* (1996) usando a técnica de PCR-RFLP tiparam para o gene do GH, 23 animais da raça Holandesa e 22 da raça Chianina e encontraram 0,65 e 0,69 de frequência alélica respectivamente. Nos 31 animais da raça nelore analisados, todos foram homozigotos para a forma leucina (L).

GROCHOWSKA *et al.* (1999) usando a metodologia de PCR-RFLP, estudaram os efeitos do polimorfismo na posição do aminoácido 127 (substituição da leucina pela valina) do hormônio de crescimento bovino (GH) nas características de produção de leite e carne em populações de gado Holandês-Friesian. O objetivo do estudo foi estimar a frequência alélica do gene do GH nesta população e caracterizar a indução da liberação de GH pelo

hormônio TRH (liberador de tirotropina) com os genótipos para GH. As frequências para leucina e valina foram respectivamente 0,69 e 0,31. Houve diferença significativa ( $P < 0,05$ ) nas características de liberação do GH nos animais relacionados aos diferentes genótipos. Os homozigotos Val/Val mostraram maior pico de liberação de GH em comparação aos outros animais, evidenciando que os resultados mostraram uma diferença na liberação de GH em relação aos diferentes genótipos em gado de leite.

LEE *et al.* (1996) trabalharam com dois grupos distintos para análise de genótipo do gene da somatotropina bovina. O grupo controle (49 animais) e o grupo selecionado (101 animais) foram analisados para a presença de variações com a posição do aminoácido 127 (leucina-*Alu-I*(+); valina-*Alu-I*(-)) da bST. Dos três genótipos encontrados, 110 animais foram *Alu-I* (+/+), 39 com genótipo *Alu-I* (+/-) e apenas um animal *Alu-I* (-/-). As frequências gênicas foram similares para os dois grupos. Os valores estimados para produção de leite (EBV leite) e o desvio médio para a produção de leite (AYD leite) nos animais do grupo controle não estão associados com o genótipo, no entanto a presença do alelo valina foi correlacionada ( $R^2$ ) com o decréscimo de EBV leite ( $P = 0,03$ ) e AYD leite ( $P = 0,16$ ).

SABOUR & SMITH (1997) trabalharam com duas análises de polimorfismo no gene do GH. A primeira foi a variação alélica no aminoácido 127 (L,V) do referido gene e sua implicação na variação da produção de leite, e a segunda com dois alelos conhecidos dentro do intron 3, designados por C e D e relacionados em questão à quantidade de gordura no leite. Em vacas da raça Holandesa, encontraram 0.81, 0.18 e 0.01 de frequência genotípica para CC, CD e DD respectivamente e 0.84, 0.15 e 0.01 para os genótipos LL, LV e

VV, respectivamente. Não houve diferença significativa nos valores estimados para produção de leite para o locus C/D dos 98 touros analisados, os quais possuíam genótipos diferentes.

Variações na sequência do gene do hormônio GH foram investigadas por YAO *et al.* (1996) usando a técnica de análise por SSCP (polimorfismo de conformação de fita simples) em sete fragmentos amplificados cobrindo quase todo o gene (2.7 kb). O SSCP foi detectado em quatro destes fragmentos e um total de seis polimorfismos foram achados em amostras de 128 touros Holandeses. 2 polimorfismos, a transição T→C no terceiro intron (designado GH4.1) e uma transversão no quinto exon (designado GH6.2), mostraram estar associados com a produção de leite. Touros GH4.1c/GH4.1c tiveram valores maiores para produção de leite, quantidade de gordura e proteína do que touros GH4.1c/GH4.1t e maiores em produção de leite, quando comparado com touros GH4.1t/GH4.1t, mostrando uma associação positiva dos genótipos com características de produção de leite. Isto intensifica a importância dos resultados na melhoria do desempenho de produção de leite em gado leiteiro. Os mesmos pesquisadores observaram efeitos similares nas características de produção de leite com o polimorfismo GH6.2, que ocorreu no alelo A, sendo este o favorável. Os efeitos médios da substituição do gene por GH4.1 e GH6.2 são similares, com mais ou menos 300 kg para produção de leite, cerca de oito quilogramas para quantidade de gordura e em torno de sete quilogramas para proteína, por lactação. Eles concluíram que a associação positiva do GH4.1c e Gh6.2a com as características de produção de leite podem ser úteis para melhorar o desempenho da produção de leite em gado leiteiro.

LAGZIEL *et al.* (1996) utilizaram a metodologia SSCP no gene do GH bovino para definir configurações haplótipas deste gene em populações de gado Holandês israelense e em parentes de animais cruzados de *Bos Taurus* e *Bos Indicus*. Os haplótipos do gene bGH dos animais cruzados diferiram qualitativamente, conforme proposta prévia de separação evolucionária destas duas sub-raças. Apenas um pequeno número de haplótipos bGH estiveram presentes na população de gado Holandês de Israel. Um dos haplótipos, aparentemente de origem *Bos indicus*, teve um efeito positivo e significativo ( $p < 0,05$ ) para porcentagem de proteína no leite. Este dado explica a utilidade do uso de haplótipos para encobrir genes candidatos envolvidos em variações genéticas quantitativas de populações de gado bovino.

Análises da genealogia são usadas para investigar a associação dos locus do GH bovino com características de produção de leite em gado Holandês. Touros Holandeses foram tipificados para três locus do GH bovino localizados no exon V, intron C e a região 3' do gene. Dados fenotípicos de produção das filhas desses touros para leite, gordura e proteína total e porcentagem de gordura e proteína no leite foram colhidos e analisados. Os resultados das análises de linhagens entre famílias foram aplicados aos dados usando um ou dois locus como marcadores. Os parâmetros estimados foram frequência alélica, média genotípica, desvio padrão das características quantitativas e fração recombinante entre os marcadores e o locus das características quantitativas, mostrando a associação dos alelos com as características analisadas. (VUKASINOVIC, 1999).

A importância do estudo da progênie de touros heterozigotos para um locus marcador e sua ligação com uma característica quantitativa, através da

análise do desempenho das filhas e netas, os valores de suas produções e a genotipagem para aquele marcador foi mostrada por WELLER *et al.* (1990).

SNEYERS *et al.* (1994) objetivaram em seus estudos revelar RFLPs do gene GH com restrição *Taq-I* em diferentes raças de bovinos e associar com características quantitativas em touros altamente selecionados para crescimento e produção de carne. As raças escolhidas foram Holandês, Italiana, Simental, Normando e BBB (Belgian Blue Breed). A RFLP revelou quatro fragmentos de DNA de 6 (A), 5.2 (B), 4.4 (C) e 4.2 (D) kpb. O genótipo AA mostrou recordes de peso aos sete e 13 meses, quando comparado ao genótipo AB, evidenciando uma correlação entre o GH e o peso nestas idades na raça BBB, que é uma raça exclusivamente de corte, ao contrário das outras raças com maiores aptidões leiteiras, que não mostraram nenhuma relação estatisticamente significativa ( $P > 0,05$ ).

Em gado de corte, ROCHA *et al.* (1992) estudaram três alelos B, C e D do GH usando a endonuclease de restrição *Taq I* em sangue de gado da raça Brahma (*Bos Indicus*), associando com diminuição no peso ao nascimento, como característica materna ( $P < 0.01$ ).

Dentro de uma mesma raça existem diferenças na frequência alélica e variação genética em populações com antecedentes, que possuem características genéticas comuns, mostrando diferenças significativas na frequência dos alelos do gene GH dentro destas populações em gado Hereford (MOODY *et al.*, 1996).

### 3.3) RFLP e marcadores genéticos

Marcadores genéticos são variações herdáveis que podem ser usados para entender eventos genéticos, tendo várias aplicações. Segundo SUTTON (1998), para ser útil como um marcador, as variações herdáveis devem ser polimórficas, deve haver duas ou mais variações comuns na população em estudo. O autor ressalta que um marcador genético pode ser um gene funcional, no entanto não é a função que é de total interesse mas sim as variações da estrutura do DNA, que são refletidas em diferenças funcionais entre alelos. Este mesmo autor observou que um marcador genético pode também ser um segmento do DNA sem função conhecida ou que é conhecido por não ter uma função. Mesmo com as variações do DNA entre cromossomos homólogos, ele pode servir como marcador genético, o qual é transmitido de acordo com as leis mendelianas para alelos codominantes.

De acordo com BISHOP (1995), os marcadores genéticos têm grande importância na diminuição do intervalo entre gerações, aumento da intensidade de seleção, redução dos custos de testes de progênie, auxílio na seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração, identificação de genes candidatos e na implementação de esquemas de acasalamento.

Em 1975, após a descoberta de que uma endonuclease de restrição originada do microorganismo *Haemophilus influenzae* provocava paradas na dupla fita de sequências específicas de DNA, SOUTHERN descreveu um método para transferir fragmentos de DNA de tiras de gel de agarose para tiras

de nitrato de celulose, detectando sequências específicas entre fragmentos de DNA separados por eletroforese.

A primeira possibilidade do uso da genética molecular como acesso ao mapeamento genômico veio em 1980 quando foi sugerido o uso da RFLP, ou seja, a restrição cortando o DNA em fragmentos de diferentes tamanhos (BOTSTEIN *et al.* 1980 apud TRYER *et al.* 1990) dando o nome de RFLP, pois as enzimas de restrição algumas vezes encontram um sítio, o qual elas normalmente clivariam, mas não podem pois uma mutação teria mudado este sítio.

Variações polimórficas no tamanho de um fragmento de restrição de DNA (RFLP's) também podem ser úteis como marcadores genéticos nos trabalhos de seleção. O polimorfismo observado na técnica de RFLP ocorre porque o DNA de indivíduos geneticamente distintos difere na sequência de nucleotídeos ao longo da fita (KENNEDY *et al.*, 1990). Estes mesmos autores verificaram que a presença ou ausência de sequências específicas de quatro a oito pares de bases, reconhecidas e clivadas pelas enzimas de restrição, podem variar entre diferentes indivíduos, gerando polimorfismo. A utilização das sequências específicas nesses trabalhos de seleção dependem, acima de tudo, da identificação de marcadores que estão ligados com o loci influenciando características quantitativas de interesse econômico. Os autores observaram que os RFLP's sustentam algumas esperanças na aplicação prática de marcadores genéticos polimórficos no melhoramento do rebanho. Fragmentos de restrição são produzidos do corte do DNA genômico em fragmentos por endonucleases de restrição, as quais reconhecem sequências específicas do DNA e o clivam neste sítio. Normalmente existem centenas ou

milhares de sítios de reconhecimento através do genoma para cada endonuclease de restrição. Os fragmentos produzidos, segundo os autores, são de tamanhos variados, podendo ser separados usando eletroforese em gel de Agarose.

Existem dois mecanismos para originar os RFLP's, de acordo com SUTTON (1998): um sítio particular de um cromossomo será clivado por uma enzima de restrição, no entanto um outro cromossomo homólogo não será. A sonda de DNA que liga os dois lados do sítio irá indicar fragmentos de restrição de diferentes comprimentos, detectados em "Southern Blots". Segundo o autor o número de nucleotídeos entre sítios de restrição modifica devido a variações no número de repetições de uma sequência de nucleotídeos.

A tecnologia do RFLP também é empregada na construção de mapas genéticos através de um grande número de diferentes marcadores em pequenos intervalos, segundo JEFFREYS *et al.* (1985). Pode também ser baseada nos minisatélites, que são regiões do DNA contendo um número de sequências repetidas uma atrás da outra, sendo o comprimento do fragmento de restrição determinado pelo número de cópias das repetições dentro do minisatélite. Esses autores observaram que existe uma variabilidade considerável entre indivíduos, como o número de repetições em uma sequência de um locus particular, e este alto polimorfismo natural faz dos minisatélites potencialmente úteis como marcadores.

QUELLER *et al.* (1993) verificaram que os microsátélites (segmentos de repetição menores que os minisatélites) e sua alta variabilidade são ferramentas potencialmente importantes para quase todos os problemas que envolvem marcadores mendelianos.

00016/00

HALLERMAN *et al.* (1987) mostraram que a maioria dos RFLPs do gene do GH é, aparentemente, consequência de um evento de inserção ou deleção. Os resultados são discutidos em termos da possibilidade que a menor variabilidade genômica não justifica a variação genética quantitativa.

### 3.4) Melhoramento Genético em gado de leite

Melhoramento genético em populações animais é limitado pelo fato de que a maioria das características de importância econômica são poligênicas e influenciadas por uma variedade de fatores ambientais e de desenvolvimento (BECKMANN *et al.*, 1987).

A seleção é um processo pelo qual indivíduos em uma população são escolhidos para produzir descendentes, sendo indispensável em qualquer programa de melhoramento genético. Dois critérios podem ser empregados na seleção de um animal: a sua "capacidade provável de produção", que permite uma previsão da sua produção em uma próxima lactação baseado em lactações passadas, e o seu "valor genético para produção" estimado usando-se registro do próprio animal e de parentes. No Brasil, o programa de melhoramento genético em gado de leite ainda é baseado na avaliação de características e informações fenotípicas do próprio animal, dos ascendentes, dos colaterais e dos descendentes (DURÃES *et al.*, 1982) com análise dos seguintes parâmetros: herdabilidade e repetibilidade da característica analisada, correlações genéticas entre características de interesse econômico, diferencial de seleção e ganho genético potencialmente alcançável (PEREIRA, 1998).

Para que uma característica seja considerada na seleção em gado de leite, alguns pontos como importância econômica da característica avaliada, facilidade e custo de registro sobre estas características e grau de controle genético devem ser levados em consideração. A Tabela 1 mostra que

quantidades de leite, gordura e proteína, porcentagem de gordura e proteína e persistência da lactação satisfazem os três requisitos, sendo herdáveis em diferentes proporções. Algumas correlações genéticas entre características em gado de leite, mostradas na tabela 2, também são avaliadas e levadas em consideração na hora da seleção.

Tabela 1. Herdabilidade ( $h^2$ ) para algumas características de produção e qualidade do leite em gado leiteiro.

Característica	( $h^2$ )
Quantidade de leite	0,25
Quantidade de gordura	0,25
Quantidade de proteína	0,25
Porcentagem de gordura	0,50
Porcentagem de proteína	0,50
Persistência de lactação	0,40

Fonte: Pereira (1998) e Wilcox (1992).

Tabela 2. Correlações genéticas entre características de produção em gado de leite.

Características	Correlações ( $R^2$ )
Quantidade de leite-Longevidade	0,50 a 0,70
Quantidade de leite-% de gordura	- 0,07 a - 0,70
Quantidade de leite-% de proteína	- 0,10 a - 0,50
Produção de leite-Produção de gordura	0,82
Produção de leite-Produção de proteína	0,86

Fonte: Teixeira(1997) e Pereira(1998).

Embora haja uma tendência de redução na porcentagem de gordura, há um aumento na produção desta com o aumento da produção total de leite.

A longevidade ou vida produtiva está relacionada positivamente à produção de leite, sendo a produção na primeira lactação o melhor indicador da longevidade (TEIXEIRA, 1997).

Sabe-se que a maioria das características de importância econômica apresenta uma variação contínua. O estudo dessas características, denominadas métricas ou quantitativas, baseia-se em métodos biométricos,

assumindo variação causada pelo efeito de diversos locos, sofrendo influência do meio e ainda a ocorrência da interação genótipo-ambiente (LEMOS, 1994).

Do ponto de vista estritamente genético PEREIRA (1998) salientou que a produção de leite sofre variações devido às diferenças genéticas entre raças e entre indivíduos dentro de uma mesma raça. Isto, segundo ele, evidencia as diferenças de frequências 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.

Este mesmo pesquisador, em 1983, citou que quando se trabalha com melhoramento genético é importante evidenciar alguns conceitos para o completo entendimento do cruzamento e suas ações na descendência dos genes. Entre os objetivos do cruzamento destacam-se a produção de heterose, incorporação de genes desejáveis na população e a complementação entre raças pela incorporação de características desejáveis combinadas dentro da população.

O termo "grau de sangue", segundo RAMALHO (1990) é comumente utilizado para indicar a porcentagem média de alelos de uma determinada raça que o rebanho possui. Nesse caso, de acordo com ele, quando se realizam cruzamentos entre duas raças diferentes a geração  $F_1$  é denominada de mestiços ou cruzados. Porém, quando se refere a animais puro-sangue (PO ou PC), conceitua-se como sendo aquele que apresenta expressões fenotípicas dentro dos padrões raciais e são obtidos por acasalamentos, por tantas gerações quantas são exigidas pelas normas de registro de cada raça. O autor saliente que, ao contrário do que se possa pensar, os animais puros-sangue

são altamente heterozigóticos, apresentando homozigose principalmente nos locos que controlam características morfológicas marcantes.

## 4) MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Departamento de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia.

### **4.1) População e obtenção de dados quantitativos**

Para a realização deste trabalho utilizou-se de animais provenientes de rebanhos leiteiros da região tropical de cerrado do Triângulo Mineiro e Norte do Estado de São Paulo.

O rebanho era dividido em cruzados de Gir e Holandês : nos graus de  $\frac{1}{2}$  sangue,  $\frac{3}{4}$  e  $\frac{7}{8}$  de sangue holandês e puros holandeses : PC (puro por cruzamento) e PO (puro de origem).

Uma amostra de 116 animais foi escolhida ao acaso, sendo 63 bovinos cruzados de Gir e Holandês e 53 puros Holandeses, levando em consideração a exigência de que todos tivessem o controle dos dados quantitativos feito pelas associações de gado de leite regionais e nacional. Foi obtido, de cada animal, dados sobre dias de lactação da primeira lactação (DL), produção de leite corrigida para 305 dias (PT), quantidade total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG).

Os animais foram originados de 5 rebanhos, divididos da seguinte maneira : número 1(JC) com 22 vacas puras e 14 cruzadas, número 2(MC) com 21 vacas puras, número 3(MR) com 35 vacas cruzadas, número 4(SP) com 10 vacas puras e número 5(TI) com 14 vacas cruzadas.

#### **4.2) Colheita de sangue**

Retirou-se dois a seis ml de sangue de cada um dos 116 bovinos adultos, fêmeas com a primeira lactação encerrada e corrigida para 305 dias, através da punção da veia jugular, utilizando o sistema de coleta à vácuo, em tubos siliconizados com 0,5 ml de citrato de sódio 0,129M tamponado (tubos Vacutainer® BD ref. 367654 e agulhas Vacutainer® BD ref.367320-25\*8). O material foi encaminhado ao Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia, onde era mantido sobre refrigeração entre 4 a 8°C em posição vertical para permitir a sedimentação dos eritrócitos e leucócitos, durante no mínimo 24 a 48 horas.

### 4.3) *Extração de DNA*

O DNA foi obtido à partir de 500  $\mu$ l de sangue refrigerado, tomado na transição entre o plasma e eritrócitos, após sedimentação, conforme protocolo descrito por BORGES (1997). Inicialmente, o volume de 1 ml de sangue foi adicionado a um tubo de microcentrífuga de 2 ml, junto a um mesmo volume de tampão de lise não diluído (20 mM de Tris-HCl, 5 mM de EDTA, pH 7.5, 640 mM de sacarose, 10 mM de  $MgCl_2$  e 4 % de Triton X-100), agitando lentamente e incubando-o em gelo por 10 minutos. Centrifugou-se uma primeira vez à 4000 gmax por 1 minuto, seguida por mais duas a três lavagens com tampão de lise diluído duas vezes, intercaladas por 10 minutos de incubação no gelo. Após a obtenção de um "pellet" livre de hemoglobina, adicionou-se 200  $\mu$ l de 10mM Tris-HCl, 1 mM de EDTA, sarcosyl 1% e 10  $\mu$ l de proteinase K (10 mg/ml), incubando a solução de células durante a noite à 50°C. Acrescentou-se, então, 500  $\mu$ l de 8 M guanidíne-HCl e 0,49 M de acetato de amônia, agitou-se de uma a duas horas e foi adicionado 800  $\mu$ l de isopropanol à temperatura ambiente, agitando levemente até precipitar o DNA. Centrifugou-se então à 4000 gmax por 10 minutos, descartando o sobrenadante e procedendo com duas lavagens subsequentes do "pellet" de DNA (centrifugações à 4000 gmax de um a dois minutos) com isopropanol 60 % ou etanol 70 %. O DNA foi seco à vácuo e diluído em 0,5 a 1 ml de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

#### 4.4. Genotipagem dos animais

Dentre os animais amostrados, os genótipos foram determinados para o hormônio do crescimento (ZHANG *et al.*, 1993). A sequência da região amplificada e sítios de restrição enzimática são mostrados na Figura 3.

```

1141 cgagggatgcgtcctaggggtggggaggcaggaaggggtgaatccacaccccctccacac
1202 agtgggaggaaactgaggagttcagccgtattttatccaagtagggatgtggttagggga
1261 gcagaaacgggggtgtgtgggggtggggaggggtccgaataaggcggggaggggaaccgcg
1321 caccagcttagacctgggtgggtgtgttctccccaggagcgcacctacatccgggagg
1381 gacagagatactccatccagaacaccaggtgccttctgcttctgaaacctccgg
1441 cccccacgggcaagaatgaggcccagcagaaatcagtgagtggaacctcggaccgagga
1501 gcaggggacctcctcatcctaagtaggctgcccagctccgcacc ggccctggggcggc
ct gg no alelo D

1561 cttctccccgagggtggcggaggttgttgatggcagtgaggatgatggtgggcgggtgt
1621 ggcaggaggtcctcgggcagaggccgacctgcagggctgcccagaccgcggcaccca
1681 ccgaccaccacctgccagcaggacttgagctgcttcgcatctcactgctcctcatcca
1741 gtcgtggcttgggcccctgcagttcctcagcagagtctcaccaacagcttggtgttgg
1801 cacctcggaccgtgtctatgagaagctgaaggacctggaggaaggcatctggccctgat
1861 gcggggtgggatggcgttgtgggtcccttccatgtgggggcatgcccgccctctcctgg
1921 ctagccaggagaatgcacgtgggcttggggagacagatccctgctctcctctttct
1981 agcagtccagcctgacctcgggaaacctttccctttgaaacctcctcctcgtccc
2041 ttccaagcctgtaggggaggggtggaaaatggagcgggcaggagggagctgctcctgag

```

Figura 3. Sequência da região amplificada por PCR do gene GH com a localização dos primers (negrito e sublinhado), sítios de restrição *Msp* I (negrito c'cgg) e sítio que diferencia os alelos C e D na posição 1547 (Genebank Database acesso M57764). Primers e endonucleases segundo ZHANG *et al.* (1993).

O produto da PCR do GH constitui 891 pares de bases (pb), sendo 177 do intron 2, 117 pb do exon III, 227 pb do intron 3, 162 pb do exon IV e 208 pb do 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). Para a verificação do polimorfismo entre os animais, na restrição enzimática utilizou-se quatro unidades da enzima *Msp* I sobre o produto total da amplificação por um período de duas horas à 37°C para genotipagem.

As reações de amplificação foram realizadas em um termociclador modelo PTC100 MJ Research e otimizadas visando a diminuição do volume e quantidade de reagentes.

O programa de PCR foi realizado em 34 ciclos com as seguintes temperaturas e tempos :

- Temperatura de desnaturação → 94°C / 1 minuto,
- Temperatura de anelamento → 60°C / 1 minuto,
- Temperatura de extensão → 72°C / 1 minuto

Sendo uma desnaturação inicial de 10 minutos e uma extensão final de 10 minutos.

No processo de otimização da reação de PCR para o hormônio do crescimento bovino, testou-se duas concentrações de *Taq* DNA polimerase, duas de  $MgCl_2$  e duas de DNA molde, como mostrado na Tabela 3.

Tabela 3. Processo de otimização da reação de PCR para o hormônio GH bovino.

Reagentes /Reações	1	2	3	4	5	6	7	8
MgCl <sub>2</sub> (mM)	1	1	1	1	1,5	1,5	1,5	1,5
Primers(pmol)	8	8	8	8	8	8	8	8
DNTPs(nmol)	8	8	8	8	8	8	8	8
Taq Pol. (U)	2	2	3	3	3	3	2	2
DNA (ng)	100	200	100	200	100	200	100	200
Vol. (μl)	30	30	30	30	30	30	30	30

Para eletroforese, utilizou-se gel de agarose 1,5 % corado com brometo de etídio.

A genotipagem foi feita com a visualização dos géis corados em um transluminador de luz ultravioleta e a separação dos diferentes genótipos foi obtida conforme a clivagem e o tamanho das bandas, cujo esquema está representado na Figura 4.

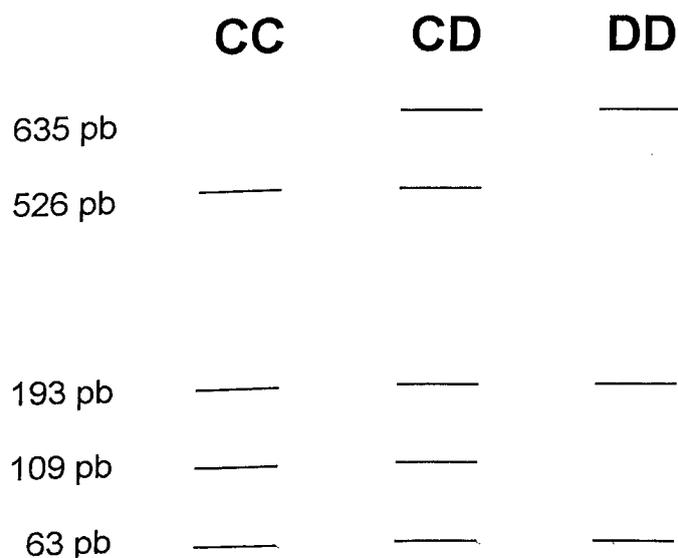


Figura 4. Desenho esquemático de um gel de agarose apresentando os três possíveis genótipos após a restrição enzimática, com as respectivas bandas e pesos moleculares (CC : bandas 526, 193, 109 e 63 pb; CD : bandas 635, 526, 193, 109 e 63; DD : bandas 635, 193 e 63).

#### 4.5. Análise Estatística

A análise estatística foi feita por análise de variância no SAS software versão 6.0 (1992) entre genótipos, grau de sangue e rebanhos com os dados de dias de lactação, produção total de leite e gordura e porcentagem de gordura.

As associações entre genótipos, grau de sangue e rebanhos e as características quantitativas, foram testadas através dos seguintes modelos lineares fixos :

1)

$$Y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

onde:

$Y_{ij}$  = é a observação da característica (dias de lactação(DL), produção total de leite (PT), produção total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG)) no  $i_{th}$  genótipo.

$\mu$  = média geral

$G_i$  = efeito do  $i_{th}$  genótipo assumindo o valor 0, 1 e 2; sendo 0=CC, 1=CD e 2=DD.

$e_{ij}$  = erro aleatório com distribuição normal

2)

$$Y_{ij} = \mu + GS_i + e_{ij}$$

onde:

$Y_{ij}$  = é a observação da característica (dias de lactação(DL), produção total de leite (PT), produção total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG)) no  $i_{th}$  grau de sangue.

$\mu$  = média geral

$GS_i$  = efeito do  $i_{th}$  grau de sangue assumindo o valor de 1 ou 2; sendo 1 para cruzados e 2 para puros.

$e_{ij}$  = erro aleatório com distribuição normal

3)

$$Y_{ij} = \mu + RE_i + e_{ij}$$

onde:

$Y_{ij}$  = é a observação da característica (dias de lactação(DL), produção total de leite (PT), produção total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG)) no  $i_{th}$  rebanho.

$\mu$  = média geral

$RE_i$  = efeito do  $i_{th}$  rebanho assumindo valores de 1 a 5, de acordo com o rebanho analisado, sendo 1 = JC, 2 = MC, 3 = MR, 4 = SP e 5 = TI.

$e_{ij}$  = erro aleatório com distribuição normal

## 5) RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Otimização da PCR para GH

Deve-se levar em consideração que para uma boa amplificação de fragmentos maiores (acima de 500 pb), alguns cuidados como a boa qualidade do DNA na extração e no armazenamento, são fundamentais. O resultado da otimização pode ser observado na figura 5. Nesse caso, todos os 3 fatores tiveram efeitos significativos no processo de otimização da reação. A quantidade aumentada de Taq polimerase não teve interferência na especificidade da reação: contudo, o nível ótimo para amplificação foi obtido com 2 U de Taq DNA polimerase. A quantidade de  $MgCl_2$  ficou em 1,0 mM, devendo-se ressaltar a importância da quantidade deste elemento na reação, uma vez que sua concentração pode afetar especificamente no anelamento dos "primers", dissociação das fitas, especificidade dos produtos, formação de dímeros de "primers" e a fidelidade e atividade da enzima. A concentração ótima de DNA de 200 ng é explicada pela qualidade do DNA na extração e a relação DNA/proteína (INNIS, 1989).

As condições ótimas de amplificação do GH foram : 200 ng de DNA; 1,0 mM de  $MgCl_2$  ; 8,0 nmoles de dNTPs, 8,0 pmoles de "primers" e 2 U de Taq DNA polimerase.

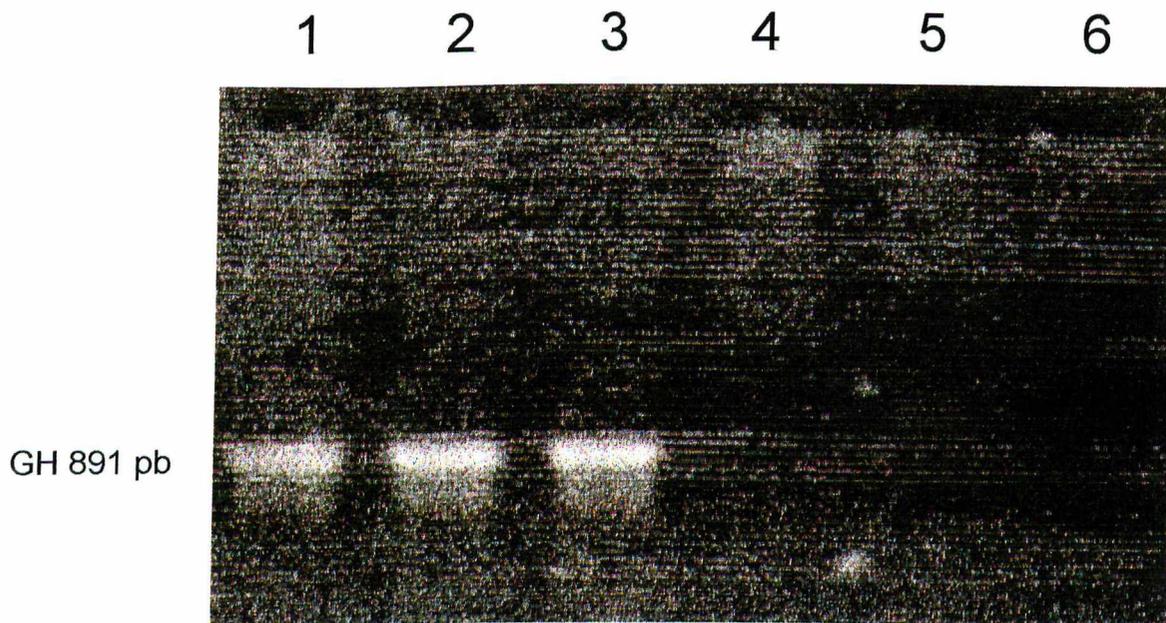


Figura 5. Otimização da reação de amplificação do GH. A reação de otimização inclui 1 e 1,5 mM de  $MgCl_2$ , 2 e 3 U de Taq polimerase, 100 e 200 ng de DNA, 8 pmoles de "primers" e 8 nmoles de dNTPs em 30  $\mu$ l, sob um programa que inclui 34 ciclos à 62°C, 72°C e 94°C por 1 minuto. O produto de amplificação (15  $\mu$ l) foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1,5 % e corado com brometo de etídio. 2 U de Taq DNA polimerase e 200 ng de DNA (colunas 1, 2 e 3). 3 U de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA (Colunas 4, 5 e 6).

Nas colunas 1, 2 e 3 da Figura 5 é mostrado a amplificação de uma banda de DNA de 891 pb (GH) sendo que nas colunas 4, 5 e 6 não houve amplificação. Na análise dos produtos amplificados no gel de agarose da Figura 5, foi evidenciado que o melhor resultado obtido foi com a concentração de 200 ng de DNA e duas unidades de Taq DNA Polimerase.

## 5.2. Genotipagem dos Animais

A genotipagem dos animais foi feita baseada no padrão de bandas apresentado na Figura 6

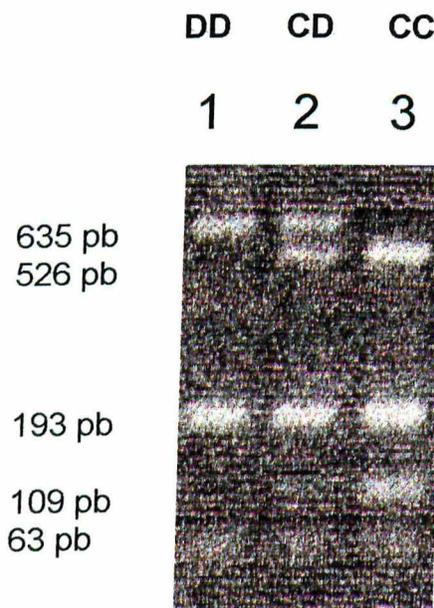


Figura 6. Genotipagem do GH de bovinos utilizando PCR e restrição enzimática por *Msp* I.

Na Figura 6 o indivíduo homocigoto para o alelo C é caracterizado por quatro fragmentos sendo 526, 193, 109 e 63 pb (coluna 3), enquanto que o homocigoto para o alelo D perde um sítio de restrição para a *Msp* I dentro do intron 3 do gene, produzindo três fragmentos sendo 635, 193 e 63 pb (coluna 1). A coluna 2 mostra o animal heterocigoto CD e a presença de cinco bandas de DNA sendo 635, 526, 193, 109 e 63.

### 5.3. Frequências genotípicas e alélicas.

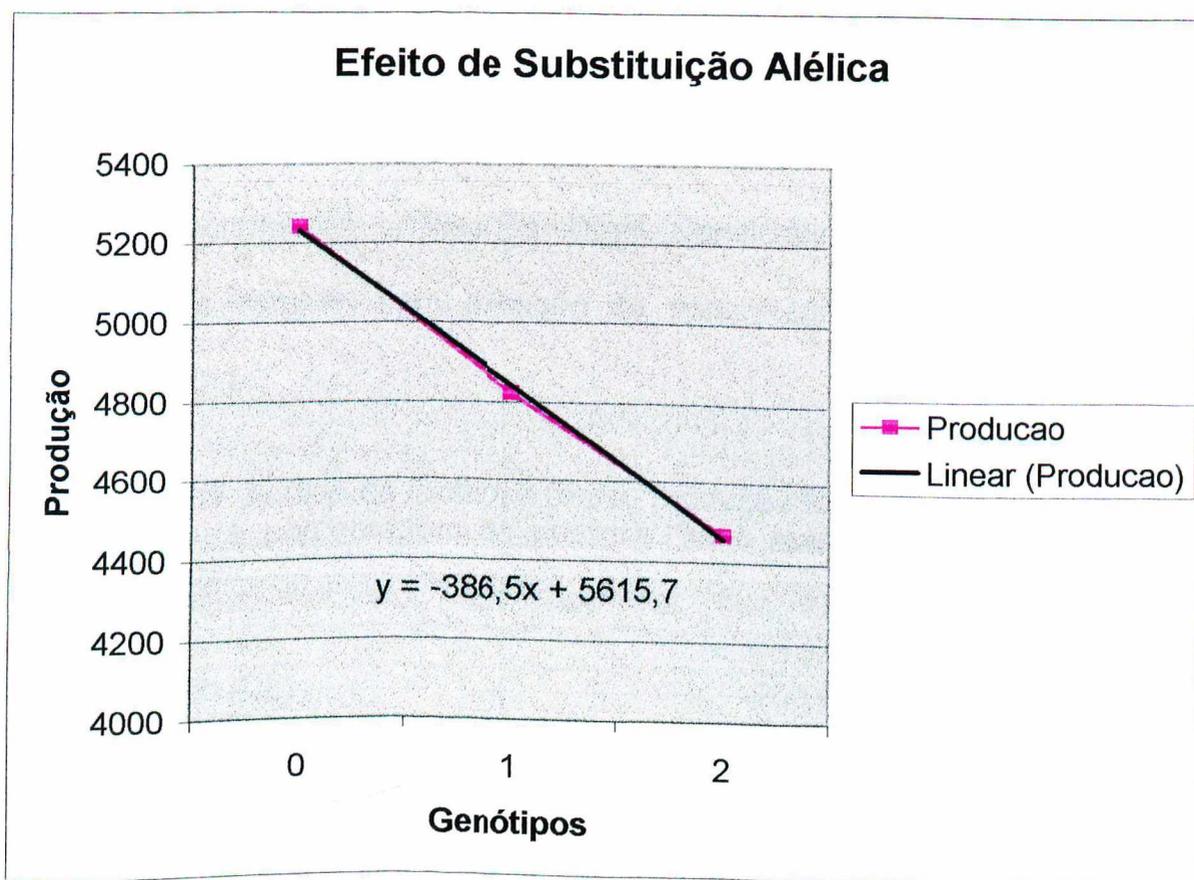
Após a genotipagem dos animais cruzados e puros, foram encontradas as frequências genotípicas e alélicas do polimorfismo gênico do GH, mostrados na Tabela 4. É importante observar que as frequências alélicas estão invertidas quanto ao grau de sangue, sendo o alelo C o mais frequente nos animais puros.

Tabela 4. Determinação das frequências genotípicas e alélicas do gene GH nos animais cruzados e puros.

	N	Frequência genotípica			Frequência alélica	
		CC	CD	DD	C	D
Cruzados	63	0.2063	0.4762	0.3175	0.4444	0.5556
Puros	53	0.3396	0.4717	0.1887	0.5755	0.4245
Total	116	0.2586	0.4741	0.2672	0.5043	0.4957

N = número de animais

Figura 7. Efeito de substituição alélica. Genótipo x, sendo 0 = CC, 1 = CD e 2 =



DD.

A Figura 7 mostra o gráfico de produção de leite de acordo com o genótipo e o efeito de substituição alélica. A fórmula  $y = -386,5x + 5615,7$  mostra que para cada alelo D observa-se uma diminuição de 386,5 quilogramas de leite no final da lactação.

#### 5.4. Grau de sangue, genótipo e rebanho $\times$ características quantitativas analisadas.

As características analisadas foram significativas ( $P < 0,05$ ) entre as raças (grau de sangue) com exceção da porcentagem de gordura, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Dados de dias de lactação (dias), produção total (Kgs), gordura total (Kgs) e porcentagem de gordura (%) e sua relação com grau de sangue.

	Cruzado	Puro
Dias de lactação (DL)	269.69 <sup>a</sup>	307.13 <sup>b</sup>
Produção Total (PT)	4555.39 <sup>c</sup>	5122.01 <sup>d</sup>
Gordura total (GT)	148.87 <sup>a</sup>	175.27 <sup>b</sup>
Porcentagem de gordura (PG)	3.36 <sup>e</sup>	3.52 <sup>e</sup>

<sup>a,b</sup> Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ( $P < 0,02$ ).

<sup>c,d</sup> Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ( $P < 0,05$ ).

<sup>e</sup> Médias com sobrescritos iguais, são iguais.

Para o estudo do polimorfismo do gene GH no loco estudado neste trabalho ( loco C/D ) encontrou-se uma frequência genotípica de 0,3396, 0,4717 e 0,1817 para os genótipos CC, CD e DD, respectivamente, nas fêmeas holandesas puras, mostrando diferença significativa ( $p < 0,01$ ) na produção total de leite (Tabela 6). No trabalho de SABOUR *et al.* (1997), os valores encontrados foram diferentes dos aqui obtidos, 0,81, 0,18 e 0,01, respectivamente, para vacas holandesas e não se verificou diferença significativa nos valores estimados para produção de leite no loco C/D, provavelmente devido ao efeito de seleção e também devido aos rebanhos brasileiros serem originários por cruzamentos entre raças.

Em relação a frequência alélica, o trabalho apresentou valores de 0,42 e 0,56 para o alelo D em animais puros e cruzados, respectivamente. Resultados diferentes dos observados no trabalho de ZHANG *et al.* (1993), onde a frequência do alelo D para animais da raça Holandesa foi de 0,26. Em animais da raça Hereford os mesmos autores presenciaram apenas indivíduos homozigotos para o alelo C.

Tabela 6. Dados de dias de lactação (dias), produção total (Kgs), gordura total (Kgs) e porcentagem de gordura (%) e sua relação com os diferentes genótipos.

	CC	CD	DD
Dias de lactação (DL)	296.20	292.66	276.36
Produção total (PT)	5236.39 <sup>a</sup>	4810.67 <sup>b</sup>	4466.04 <sup>c</sup>
Gordura total (GT)	171.61 <sup>d</sup>	160.63 <sup>e</sup>	153.98 <sup>f</sup>
Porcentagem de gordura (PG)	3.38 <sup>d</sup>	3.45 <sup>e</sup>	3.54 <sup>f</sup>

<sup>a,b,c</sup> Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ( $P < 0,01$ ).

<sup>d,e,f</sup> Médias com diferentes sobrescritos, são diferentes ( $P < 0,11$ ).

BORGES (1997) mostrou em bezerros de corte frequências similares às holandesas para Angus e Simental, diferenciando apenas para a raça Nelore. Encontrou ainda diferença significativa para ganho de peso do nascimento ao desmame para animais heterozigotos em relação aos homozigotos DD.

Devemos ressaltar que os valores de dias de lactação, produção total de leite e produção total de gordura foi sempre maior nos animais CC e que os animais CD e DD tiveram valores decrescentes em relação ao primeiro genótipo, lembrando mais uma vez que a frequência do alelo D foi maior nos animais cruzados.

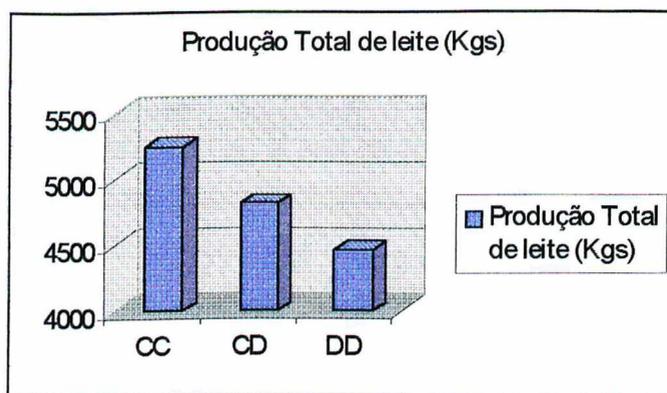


Figura 8. Produção total de leite em quilos e seus respectivos genótipos para o gene GH em vários graus de sangue e rebanhos.

A Figura 8 mostra as diferentes produções de leite de acordo com o genótipo.

Para os estudos do locus L/V (Leucina e valina), LUCY *et al.* (1993), encontraram em vacas holandesas a frequência genotípica de 0,93 e 0,07 respectivamente, correlacionando estimativas de produção de leite com variação do gene bST. No entanto para o gado Friesian GROCHOWSKA *et al.*; (1999) concluíram 0,69 e 0,31 de frequência genotípica para leucina e valina respectivamente, mostrando diferença significativa na liberação de GH no sangue destes animais relacionado aos diferentes genótipos, enquanto LEE *et al.*, (1996) chegaram a conclusão que a presença do alelo valina (frequência de 0.137) foi correlacionada com o decréscimo dos valores estimados para produção de leite.

Na Tabela 8 mostramos as diferenças de dias de lactação, Produção total de leite, Gordura total e porcentagem de gordura nos diferentes rebanhos analisados e atribuímos estas diferenças ao grau de sangue dos referidos rebanhos, lembrando que os animais com o genótipo CC obtiveram maior

produção total (Tabela 7) e que para os animais puros a frequência do alelo C foi maior (Tabela 5).

Tabela 7. Dados de dias de lactação (dias), produção total (Kgs), gordura total (Kgs) e porcentagem de gordura (%) e sua relação com o rebanho analisado.

Rebanhos	1	2	3	4	5
Dias de lactação (DL)	271.99 <sup>a</sup>	275.55 <sup>b</sup>	322.54 <sup>c</sup>	324.44 <sup>d</sup>	247.51 <sup>e</sup>
Produção total (PT)	3855 <sup>a</sup>	6775 <sup>b</sup>	2623 <sup>c</sup>	8475 <sup>d</sup>	2462 <sup>e</sup>
Gordura total (GT)	134.59 <sup>a</sup>	231.76 <sup>b</sup>	92.00 <sup>c</sup>	255.72 <sup>d</sup>	96.28 <sup>e</sup>
Porcentagem de gordura (PG)	3.47 <sup>a</sup>	3.41 <sup>b</sup>	3.45 <sup>c</sup>	3.00 <sup>d</sup>	3.86 <sup>e</sup>

<sup>a,b,c,d,e</sup> Letras sobrescritas diferentes na mesma linha, significam diferenças estatísticas a nível de 1%.

Levando em consideração os resultados obtidos neste trabalho, deve-se analisar a importância do alelo C e seu efeito na seleção de animais em rebanhos leiteiros. A partir do momento em que se obtêm uma relação entre o marcador molecular em estudo e uma característica quantitativa de interesse econômico, o processo de seleção torna-se claro e rápido, possibilitando sua utilização com mais segurança e critério.

Nos rebanhos analisados e em outros rebanhos passíveis de análise, a presença do alelo C passa a ser uma indicação de maior produção de leite. A genotipagem deste alelo deve ser considerada uma arma de grande importância nos processos de seleção genética, uma vez que haverá uma diminuição significativa no intervalo entre gerações analisadas, bem como um estudo mais detalhado e confiável da segregação de genes de interesse dentro das famílias.

## 6) CONCLUSÃO

Sob as condições do presente trabalho os resultados obtidos permitem concluir que:

- Nos animais puros a frequência do alelo C do gene do hormônio do crescimento foi maior (0,5755) quando comparado aos animais cruzados (0,4444) , salientando para maior produção total de leite e gordura e maior número de dias de lactação para os animais puros.
- Com relação ao genótipo, animais CC apresentaram maior valor de produção total de leite estatisticamente significativa.
- A porcentagem de gordura no leite (PG) não foi estatisticamente diferente para animais cruzados e puros e para os genótipos CC, CD e DD.
- Todos os rebanhos tiveram diferenças significativas para dias de lactação (DL), produção total de leite (PT) e gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG).
- O efeito de substituição alélica mostrou uma equação  $y = -386,5x + 5615,7$ , sendo y a produção total de leite e x os diferentes genótipos.

## ***Influência do gene do hormônio do crescimento em características quantitativas de bovinos de leite***

---

### RESUMO

As mais recentes tecnologias da biologia molecular tornaram possível o estudo do polimorfismo do DNA e sua relação com características quantitativas de interesse econômico em bovinos de leite. Utilizou-se o hormônio do crescimento (GH) como marcador molecular para estudar seu efeito sobre as características quantitativas, tais como produção total de leite (PT), dias de lactação (DL), produção total de gordura (GT) e porcentagem de gordura (PG) em gado leiteiro. Um total de 116 animais, sendo 63 cruzados de Gir com Holandês e 53 puros da raça Holandesa, foram genotipados para o GH e os genótipos utilizados para o estudo de sua ligação com as características quantitativas. Os animais foram escolhidos ao acaso em regiões tropicais do Triângulo Mineiro e Norte do estado de São Paulo com condições similares de manejo sanitário e nutricional, e todos com dados oficiais sobre sua 1ª lactação. As condições ótimas de amplificação do GH incluíram 200 ng de DNA, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 8 nmoles de dNTPs, 8 pmoles de "primers" e 2 unidades de Taq polimerase, sob 94°C de desnaturação inicial por 10 minutos, seguidos de 34 ciclos à 94°C por 1' para desnaturação, 60°C por 1' para anelamento, 72°C por 1' para extensão, seguidos de uma extensão final de 10 minutos. A frequência do alelo C nos animais puros foi de 0,5755 contra 0,4444 nos

animais cruzados. A frequência do genótipo CC nos animais puros também foi maior quando comparado aos animais cruzados, sendo de 0,3396 e 0,2063, respectivamente. A análise estatística mostrou diferenças significativas ( $P < 0,01$ ) na produção total de leite, sendo as maiores para o genótipo CC e as menores para o genótipo DD. Os animais puros foram superiores aos cruzados em suas médias para dias de lactação, produção total de leite e gordura.

---

---

## The Influence of the Growth Hormone Gene on Quantitative Traits of Dairy Cattle

### SUMMARY

The latest technology on molecular biology made possible the study of DNA polymorphism and its relation to quantitative traits of economical interest in dairy cattle. We use the growth hormone (GH) as a molecular marker to study its effect on total milk production (PT), days of lactation (DL), total fat production (GT) and percentage of fat on the dairy cattle. A total of 116 animals, from which 63 were a cross of Gir and Holstein and 53 were pure Holstein, were genotyped for the GH and the genotypes used for the study of its connection with the quantitative traits. The animals were chosen at random in tropical areas of the Triângulo Mineiro and north of the São Paulo state, in similar conditions of nutrition and hygiene and we demanded that all animals had official records of their first lactation. The reaction conditions for the amplification of the GH included 200ng of DNA, 1 mM of  $MgCl_2$ , 8 nmoles of dNTPs, 8 pmoles of primers and 2 units of taq polymerase, under a 94°C for initial denaturation, 60°C for 1' of curling (annealing), 72°C for 1' for the extension followed by a 10' final extension.

The frequency of the C allele on the pure animals was 0.5755 against a 0.4444 on the crossed animals. The frequency (rate) of the genotype CC on the pure animals was also higher compared to the crossed animals, respectively 0.3396 and 0.2063. The statistics analysis showed different between the total milk production ( $p < 0.01$ ), being the highest for the CC genotype. The pure animals had a higher rate ( frequency) on lactation days, of total production of milk and fat.

## 7) BIBLIOGRAFIAS

BECKMANN, J. S., KASHI, Y., HALLERMAN, E. M., NAVE, A ., SOLLER, M.

Restriction fragment length polymorphism among israeli Holstein-Friesian dairy bulls. **Anim. Genet.**, v.17, n.1, p.25-38, 1989.

BECKMANN, J. S., SOLLER, M. Molecular markers in the genetic improvement of farm animals. **BioTechnology** , v.5, p.573-575, 1987.

BISARO, R., BELOWS, J. Bovine Growth Hormone and the Dairy Industry. **United States Department of agriculture/National Agricultural Library.** 1986, 19 pp, Text.

BISHOP, M. D. et al. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology** , v.43, p.61-70,1995. 10

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

BURTON, J. L., McBRIDE, B. W., BLOCK, E., GLIMM, D. R., KENNELLY, J. J. A review of bovine growth hormone. **Can. J. Anim. Sci.**, v.74, p.167-201, 1994. 80

- BYATT, J. C., WARREN, W. C., EPPARD, P. J. Ruminant placental lactogens: Structure and biology. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.2911-2923, 1992.
- COWAN, C. M., DENTINE, M. R., AX, R. L., SCHULER, L. A. . Restriction fragment length polymorphisms associated with growth hormone and prolactin genes in holstein bulls: evidence for a novel growth hormone allele. **Anim. Genet**, v.20, n.2, p.157-165, 1989.
- DUKES, H. H. **Fisiologia dos animais domésticos**. 10.ed. São Paulo. [ S.l:S.n ] 1990. 798 p.
- DURÃES, M. C., MARTINEZ, M. L., VALENTE, J. Programa Nacional de pesquisa em melhoramento genético no CNPGL. In: Simpósio Brasileiro de melhoramento genético de bovino leiteiro nos trópicos, 1., 1982. **Anais...**, Belo Horizonte: CNPGL-Coronel Pacheco, 1982. p.19-41.
- FALAKI, M., PRANDI, A. ., CORRADINI , C., SNEYERS, M., GENGLER, N., MASSART, S., FAZZINI, U., BURNY, A. ., PORTETELLE, D., RENAVILLE, R. Relationships of growth hormone gene and milk protein polymorphism to milk production traits in Simmental cattle. **J. Dairy Res**, v.64, n.1, p.47-56, 1997.

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

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

GLUCKMAN, P. D., BREIER, B. H. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. **J. Dairy Sci**, n.70, p.443-466, 1987.

GORDON, D. F., QUICK, D. P., ERWIN, C. R. et al . Nucleotide sequence of the bovine growth hormone chromosomal gene. **Mol. Cell. Endocrinol**, v.33, p.81-95, 1983.

GROCHOWSKA, R., ZWIERZCHOWSKI, L., SNOCHOWSKI, M., REKLEWSKI, Z. Stimulated growth hormone (GH) release in Friesian cattle with respect to GH genotypes. **Reprod. Nutr. Dev**, v.39, n.2, p.171-180, 1999.

HALLERMAN, E. M., NAVE, A ., KASHI, Y., HOLZER, Z., SOLLER, M.,  
BECKMANN, J. S. Restriction fragment length polymorphisms in dairy and  
beef cattle at the growth hormone and prolactin loci. **Anim. Genet**, v.18,  
n.3, p.213-222,1987.

HILBERT, P., MARCOTTE, A ., SCHWRES, A ., HANSET, R., VASSART, G.,  
GEORGES, M. Analysis of genetic variation in the Belgian Blue cattle  
breed using DNA sequence polymorphism at the growth hormone, low  
density lipoprotein receptor, alpha-subunit of glycoprotein hormones and  
thyroglobulin loci. **Anim. Genet**, v.20, n.4, p.383-393, 1989.

HOJ, S., FREDHOLM, M., LARSEN, N. J., NIELSEN, V. H. Growth hormone  
gene polymorphism associated with selection for milk fat production in  
lines of cattle. **Anim. Genet**, v.24, n.2, p.91-95, 1993.

INNIS, M. A., GELFAND, D. H., SNINSKY, J. J., WHITE, T. J. **PCR Protocols,**  
**A guide to methods and applications.** San Diego: Academic Press,  
1989. 482 p.

JEFFREYS, A. J., WILSON, V., THEIN, S. L. Hipervariable "minisatellite" regions in human DNA. **Nature**, v.314, p.67, 1985.

KENNEDY, B. W., VERRINDER GIBBINS, A. M., GIBSON J. P., SMITH C. Coalescence of molecular and quantitative genetics for livestock improvement. **J. Dairy Sci**, v.73, p.2619-2627, 1990.

KENNEDY, B. W., QUINTON, M., VAN ARENDONK, J. A. M. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. **J. Anim. Sci**, v.70, p.2000-2012, 1992.

LAGZIEL, A., LIPKIN, E., SOLLER, M. Association between SSCP haplotypes at the bovine growth hormone gene and milk protein percentage. **Genetics**, v.142, n.3, p.941-951, 1996.

LEE, B. K., LIN, G. F., CROOKER, B. A., MURTAUGH, M. P., HANSEN, L. B., CHESTER-JONES, H. Association of somatotropin (BST) gene polymorphism at the 5<sup>th</sup> exon with selection for milk yield in holstein cows. **Domest. Anim. Endocrinol**, v.13, n.4, p.373-381, 1996.

LEMOS, A. de M. A utilização dos polimorfismos bioquímicos e sistemas de grupos sanguíneos no melhoramento de bovinos. Coronel Pacheco, MG:Embrapa-CNPGL, **Documentos**, 56, 1994. 47p. (Embrapa/CNPGL).

LUCY, M. C., HAUSER, S. D., EPPARD, P. J., KRIVI, G. G., CLARK, J. H., BAUMAN, D. E., COLLER, R. J. Variants of somatotropin in cattle : gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domest. Anim. Endocrinol**, v.10, n.4, p.325-333, 1993.

MOODY, D. E., POMP, D., NEWMAN, S., MacNEIL, M. D. Characterization of DNA polymorphism in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **J. Anim. Sci**, v.74, p.1784-1793, 1996.

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

PEREIRA, J. C. C. **Melhoramento genético aplicado aos animais domésticos**. Belo Horizonte, 1983. 430p.

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

QUELLER, D. C., STRASSMANN, J. E., HUGUES, C. R. Microsatellites and Kinship. **Tree**, v.8, n.8, p.285-288, 1993.

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

ROCHA, J. L., BAKER, J. E., WOMACK, J. O ., SANDERS, J. O., TAYLOR, J. F. Statistical association between restriction fragment length polymorphism and quantitative traits in beef cattle. **J. Anim. Sci**, v.70, p.3360-3370,1992.

RODRIGUES, C. V., GUIMARAES, S. E. F., FONSECA, C. T., LIMA, R. M. G., PINHEIRO, L. E. L. Genotipagem do gene do hormônio do crescimento nas raças nelore, holândes e chianina usando a técnica da RFLP-PCR. In. CONGRESSO PANAMERICANO DE CIÊNCIAS VETERINÁRIAS, 15., 1996, Campo Grande. **Anais...**

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

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

- SAIKI, R. D., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., HIGUCHI, R., HORN, G. T., MULLIS, K. B., ERLICH, H. A . Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science** , v.239, p.487-491, 1988.
- SNEYERS, M., RENAUVILLE, R., FALAKI, M., DEVOLDER, A ., BOONEN, F., MARCHAND, E., PRANDI, A., BURNY, A., PORTETELLE, D. Taq I restriction fragment length polymorphisms for growth hormone in bovine breeds and their association with quantitative traits. **Growth Regul.**, v.4, n.3, p.108-112, 1994.
- SOUTHERN, E. M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **J. Mol. Biol.**, n.98, p.503-517, 1975.
- SUTTON, E. Heredity, evolution and society. **Cummings**, v.13. p. 308-313, 1998.
- TEIXEIRA, N. M. Melhoramento genético em gado de leite – seleção de vacas e touros. **Circular técnica**, 43, Juiz de Fora, MG: Embrapa-CNPGL, 1997. 40p. (Embrapa-CNPGL).

THEILMANN, J. L., SKOW, L. C., BAKER, J. F., WOMACK, J. E. Restriction fragment length polymorphisms for growth hormone, prolactin, osteonectin, alpha crystallin, gamma crystallin, fibronectin and 21-steroid hydroxylase in cattle. **Anim. Genet.**, v.20, n.3, p.257-266, 1989.

TRYER, D. L., SMITH, J. E., LEIPOLD, H. W. Implications of genetics markers and maps for veterinary medicine. *JAVMA* 10(197):1376-1380. 1990 APUD  
BOTSTEIN, B., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. **Am. J. Hum. Genet.**, v.32, p.314-331, 1980.

UNANIAN, M. M., DeNISE, S. K., ZHANG, H. M., AX, R. L. Polymerase chain reaction-restriction length polymorphism in the *bovine Growth Hormone* gene. **J. Anim. Sci.**, v.72, p.2203, 1994.

VUKASINOVIC, N., DENISE, S. K., FREEMAN, A. E. Association of growth hormone loci with milk yield traits in Holstein bulls. **J. Dairy Sci.**, v.82, n.4, p.788-794, 1999.

WALDEN, P. D., RUAN, W., FELDMAN, M., KLEINBERG, D. L. Evidence that the mammary fat pad mediates the action of growth hormone in mammary gland development. **Endocrinology**. v.139, n.2, p.659-662, 1998.

- WELLER, J. L., KASHI, Y., SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v.73, p.2525-2537, 1990.
- WILCOX, C.J. Genetics: basic concepts. In: VAN HORN H.H. WILCOX, C.J. Large dairy herd management. Champaign: **ADSA**, 1992. P. 1-7
- YAO, J., AGGREY, S. E., ZADWORNY, D., HAYES, J. F., KUHNLEIN, U. Sequence variations in the bovine growth hormone gene characterized by single-strand conformation polymorphism (SSCP) analysis and their association with milk production traits in holsteins. **Genetics**, v.144, n.4, p.1809-1816, 1996.
- ZHANG, H. M., BROWN, D. R., DeNISE, S. K., AX R. L. Polymerase Chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the *bovine somatotropin* gene. **J. Anim. Sci.**, v. 71, p.2276, 1993.