



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

**POLIMORFISMOS NOS GENES DA VIA DO HORMÔNIO
DO CRESCIMENTO E EFEITOS NOS ÍNDICES
PRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

UBERLÂNDIA – MG
2008



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

**POLIMORFISMOS NOS GENES DA VIA DO HORMÔNIO
DO CRESCIMENTO E EFEITOS NOS ÍNDICES
PRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO**

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

Orientador: Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho

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

UBERLÂNDIA – MG
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

- Q3p Queiroz, Luciana Benedetti de, 1978-
 Polimorfismos nos genes da via do hormônio do crescimento e
 efeitos nos índices produtivos em bovinos da raça Girolando / Luciana
 Benedetti de Queiroz. - 2008.
 67 f. : il.
- Orientador: Luiz Ricardo Goulart Filho.
 Tese (doutorado) – Universidade Federal de Uberlândia, Programa
 de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
 Inclui bibliografia.
1. Polimorfismo (Genética) - Teses. 2. Leite - Produção - Teses. 3.
 Marcadores moleculares - Teses. I. Goulart Filho, Luiz Ricardo, 1962-
 II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
 em Genética e Bioquímica. III. Título.

CDU:591.151



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

POLIMORFISMOS NOS GENES DA VIA DO HORMÔNIO DO CRESCIMENTO E EFEITOS NOS ÍNDICES PRODUTIVOS EM BOVINOS DA RAÇA GIROLANDO

Aluna: Luciana Benedetti de Queiroz

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Luiz Ricardo Goulart Filho (Orientador)

Examinadores:

Marco Antônio Machado (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite – Juiz de Fora)

Gerson Barreto Mourão (Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – Piracicaba)

Lúcia Galvão de Albuquerque (Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho – Jaboticabal)

Marcelo Emílio Beletti (Universidade Federal de Uberlândia – Uberlândia)

Data de Defesa: 30/05/2008

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

(Orientador)

Tributo Àquele Que Tudo Merece
Deus – Pai, Filho e Espírito Santo

Tua Palavra declara, Senhor, que tua graça é melhor que a vida (Sl 63:03). Isto é verdade, pois que seria de nossa vida sem tua graça? Seria algo sem rumo, sem sentido, sem qualquer realização que nos desse verdadeira alegria.

Além disso, o teu profeta (Lm 03:23) garante que tu renovas as tuas misericórdias sobre nós a cada manhã. Isto é tudo de que necessitamos para caminharmos em vitória.

Vitória que acabo de alcançar por tua graça e tua misericórdia.

Aceita, Senhor, a minha mais sincera gratidão!

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que me ajudaram nesta caminhada!

Jamais poderei enumerar cada uma delas.

Mas, algumas se destacam pela proximidade e suporte no dia a dia.

São elas:

Meu marido – pelo apoio, compreensão, paciência nos momentos de estresse e, principalmente, pelo seu amor. Sem ele, como eu suportaria várias horas de estudos e pesquisas que, tantas vezes, me levaram a desgastes físicos e emocionais. Eu te amo, Nixon, por tudo isso e por tudo mais!

Meus pais – Kleber e Regina. Sou grata a vocês, queridos pais, pelo amor, pelo acompanhamento, pelo empenho em fazerem o melhor por mim, e pelas orações a meu favor, que nunca faltaram!

Amo vocês! Obrigada por tudo!

Minha irmã Luana e meu cunhado Vinicius - especialíssimos!

Outros colaboradores:

Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart – meu sábio e otimista orientador.

Prof. Dr. Edmundo Benedetti – meu amigo e conselheiro.

Como enumerar cada orientação, cada ensinamento, cada compartilhar de sabedoria, cada correção? Foram meses de paciência, acompanhamento competente e seguro! Como sou grata a vocês, meus amigos, companheiros de tantas batalhas e, agora, participantes desta vitória. Hei de lembrar-me para sempre de cada momento que passamos juntos em busca da concretização do meu ideal! Obrigada por tudo!

Rossana, Fausto, Paula, Júlio, Marcelo e Tatiane – convivência e ajuda no desenvolvimento deste projeto.

Maurício Machaim, Guilherme, Carlos, Rone, Juliana Franco, Karina, Ana Cândida, Juliana Alves, Oseas, Luciana ... – companheiros presentes nesta fase especial de minha vida.

Mel e Meg – minhas princesinhas que me alegraram no cansaço do dia-a-dia.

E não poderia deixar de citar:

Produtores da Associação Brasileira dos Criadores de Girolando

Associação Brasileira dos Criadores de Girolando

Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de Uberlândia

BioGenetics Tecnologia Molecular *Ltda*

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

SUMÁRIO

Apresentação	1
Fundamentação teórica	6
1. Interações hormonais na via do hormônio do crescimento	7
2. Melhoramento genético de bovinos de leite	14
RFLP	17
PCR	17
PCR-RFLP	19
3. Raça Girolando	19
Referências bibliográficas	22
Capítulo único	27
Resumo	28
Abstract	29
Introdução	30
Material e métodos	32
1. Material biológico e coleta de dados	33
2. Extração de DNA	34
3. Genotipagem dos animais	35
PCR-RFLP para o gene <i>GHRH</i>	36
PCR-RFLP para o gene <i>GHRHR</i>	36
PCR-RFLP para o gene <i>Pit1</i>	37
PCR-RFLP para o gene <i>GH</i>	37
PCR-RFLP para o gene <i>IGF1</i>	38
PCR-RFLP para o gene <i>IGF1R</i>	38
4. Análise das reações de PCR-RFLP	39
5. Análises estatísticas	39

Resultados	41
1. Genotipagem dos animais	41
2. Frequências genotípicas e alélicas	43
3. Análise de associação	44
Estudo de associação dos genes individuais	44
Estudo de associação das interações gênicas	47
Discussão	49
O polimorfismo <i>GHRH/HaeIII</i>	49
O polimorfismo <i>GHRHR/Eco57I</i>	50
O polimorfismo <i>Pit1/Hinfl</i>	50
O polimorfismo <i>GH/Mspl</i>	51
O polimorfismo <i>IGF1/SnaBI</i>	52
O polimorfismo <i>IGF1R/TaqI</i>	53
Interações entre os polimorfismos gênicos	53
Referências	57
Anexo 1	62

LISTA DE FIGURAS

Revisão bibliográfica

- Figura 1** - Representação esquemática mostrando a regulação neuroendócrina da produção, secreção do GH e seus locais alvos de ação 13

Capítulo único

- Figura 1** - Representação esquemática das interações gênicas na via do GH e seus efeitos na lactação 31
- Figura 2** - Padrões genotípicos obtidos por eletroforese em gel de agarose 2,5% para os polimorfismos nos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R*, após a reação de PCR-RFLP 42
- Figura 3** - Análise de regressão das médias dos quadrados mínimos da produção total de leite considerando os genótipos dos genes *Pit1* (A) e *GH* (B) em bovinos da raça Girolando 47

LISTA DE TABELAS

Capítulo único

Tabela 1 -	Relação do número de fazendas e fêmeas da raça Girolando utilizadas no presente estudo por município brasileiro	33
Tabela 2 -	Sequências dos oligonucleotídeos para a amplificação dos genes <i>GHRH</i> , <i>GHRHR</i> , <i>Pit1</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> , <i>IGF1R</i> , tamanho dos fragmentos gerados (pb - pares de base), sítios de restrição de cada enzima e localizações cromossômicas dos genes	35
Tabela 3 -	Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos nos genes <i>GHRH</i> , <i>GHRHR</i> , <i>Pit1</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> em bovinos da raça Girolando	43
Tabela 4 -	Efeitos dos genes <i>GHRH</i> , <i>GHRHR</i> , <i>Pit1</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> nas características produtivas em bovinos da raça Girolando ..	45
Tabela 5 -	Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) das características de produção de leite para cada genótipo dos genes <i>GHRH</i> , <i>GHRHR</i> , <i>Pit1</i> , <i>GH</i> , <i>IGF1</i> e <i>IGF1R</i> , em bovinos da raça Girolando	46
Tabela 6 -	Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica produção total de leite (kg) para a interação dos genes <i>Pit1</i> e <i>IGF1</i> , em bovinos da raça Girolando	47
Tabela 7 -	Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica produção média diária de leite (kg) para a interação dos genes <i>Pit1</i> e <i>IGF1</i> , em bovinos da raça Girolando	48
Tabela 8 -	Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica duração da lactação (dias) para a interação dos genes <i>Pit1</i> e <i>GHRHR</i> , em bovinos da raça Girolando	48

Tabela 9 -	Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica duração da lactação (dias) para a interação dos genes <i>IGF1</i> e <i>GHRH</i> , em bovinos da raça Girolando	49
-------------------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Grau Celsius
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
Δ	Delta
Nº	Número
A	Adenina
AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AMP	Adenosina Monofosfato
C	Citosina
cDNA	Ácido Desoxirribonucléico Complementar
CLO	Controle Leiteiro Oficial
CREB	<i>cAMP Response Element-Binding</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DL	Duração da Lactação
dATP	Desoxiadenosina Trifosfatada
dCTP	Desoxicitidina Trifosfatada
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfatada
dNTP	Desoxirribonucleotídeo Trifosfatado
dTTP	Desoxitimidina Trifosfatada
<i>Eco57I</i>	<i>Escherichia coli</i> RFL57 (Enzima de Restrição)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetraacético
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i> (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação)
g	Gramma

G	Guanina
GABA	<i>Gama-Aminobutyric Acid</i>
GH	<i>Growth Hormone</i> (Hormônio do Crescimento)
GHR	<i>Growth Hormone Receptor</i> (Receptor do Hormônio do Crescimento)
GHBP	<i>Growth Hormone Binding Protein</i>
GHRH	<i>Growth Hormone Releasing Hormone</i> (Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento)
GHRHR	<i>Growth Hormone Releasing Hormone Receptor</i> (Receptor do Hormônio Liberador do Hormônio do Crescimento)
GHRP	<i>Growth Hormone-Releasing Peptide</i>
GL	Grau de Liberdade
<i>HaeIII</i>	<i>Haemophilus aegyptius</i> (Enzima de Restrição)
HCl	Ácido Clorídrico
<i>HinfI</i>	<i>Haemophilus influenzae</i> R _f (Enzima de Restrição)
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IGF1	<i>Insulin-like Growth Factor 1</i> (Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1)
IGF1R	<i>Insulin-like Growth Factor 1 Receptor</i> (Receptor do Fator de Crescimento Semelhante à Insulina 1)
INGEB	Instituto de Genética e Bioquímica
JAK2	<i>Janus Kinase 2</i>
kDa	QuiloDalton
kg	Quilograma
M	Molar
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mRNA	Ácido Ribonucléico Mensageiro
<i>MspI</i>	<i>Moraxella species</i>
ng	Nanograma
NMDA	<i>N-Methyl-D,1-Aspartate</i>
<i>Oct</i>	<i>Octamer Transcription Factor</i>
PACAP	<i>Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide</i>
pb	Pares de base
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Reação em Cadeia da Polimerase)
PCR-RFLP	<i>Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
pH	Potencial de Hidrogênio
Pit1	<i>Pituitary Specific Transcription Factor 1</i> (Fator de Transcrição da Pituitária 1)
PMD	Produção Média Diária de Leite
pmol	Picomol
PT	Produção Total de Leite
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RAPD	<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>
RNA	Ácido Ribonucléico
rpm	Rotação por Minuto
SAM	<i>S-adenosylmethionine</i> (Cofator Enzimático)
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
<i>SnaBI</i>	<i>Sphaerotilus natans</i> (Enzima de Restrição)
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single Stranded Conformation Polymorphism</i>
SSR	<i>Simple Sequence Repeat</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
T	Timina
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i> (Enzima DNA Polimerase)
<i>TaqI</i>	<i>Thermus aquaticus</i> YT-1 (Enzima de Restrição)
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA
TE	Tampão Tris-EDTA

TRH	<i>Thyrotropin-Releasing Hormone</i>
U	Unidade de Enzima
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
<i>unc-86</i>	Fator de Transcrição Neural de <i>Caenorhabditis elegans</i>
χ^2	Teste do Qui-Quadrado

Apresentação

A decorative L-shaped line in a light gray color, consisting of a horizontal segment and a vertical segment that meet at a right angle, positioned to the right and below the title.

A dimensão continental do Brasil associada aos seus recursos naturais, humanos e econômicos, faz do agronegócio um dos mais importantes segmentos da economia do país. De acordo com a FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*), a produção mundial de leite de vaca no ano de 2006 foi de 549.694.000 de toneladas. O Brasil ocupou a sexta posição, abaixo dos Estados Unidos, Índia, China, Rússia e Alemanha, produzindo 25.398.219.000 de litros, sendo 9.740.310.000 no Sudeste (maior produtor nacional), 7.038.521.000 no Sul, 3.721.881.000 no Centro-Oeste, 3.198.039.000 no Nordeste e 1.699.467.000 na região Norte, segundo a pesquisa de Produção da Pecuária Municipal do ano de 2006, divulgada pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística). Minas Gerais foi o principal estado em produção de leite (7.094.111.000 de litros).

Apesar da produtividade de leite por vaca estar aumentando continuamente desde 1999 no Brasil, os valores são considerados ainda baixos. Conforme dados do IBGE/Produção da Pecuária Municipal, a produtividade por vaca/ano atingiu 1.213 litros em 2006. A região Sul obteve os melhores índices, com uma média de produção de leite por vaca de 2.066 litros/ano, acompanhada pelo Sudeste (1.355 litros/ano), Centro-Oeste (1.115 litros/ano), Nordeste (767 litros/ano) e Norte (597 litros/ano).

Considerando a disponibilidade de terras para a expansão da agricultura, das pastagens e a possibilidade de incorporação de novas tecnologias, o Brasil apresenta potencial para o aumento da produção e incremento da produtividade animal, o que pode ser alcançado com o melhoramento genético dos rebanhos, nutrição balanceada, condições adequadas de manejo e maior profissionalização na gestão das fazendas.

Duas são as ferramentas disponíveis para se promover o melhoramento genético de qualquer espécie: seleção e cruzamento. A seleção pode ser definida como sendo a eliminação de determinados genótipos da população, tendo como efeito primário o aumento da frequência gênica favorável e, conseqüentemente, a redução da frequência dos genes de efeitos desfavoráveis. Na seleção natural, os indivíduos portadores de genótipos mais adaptados sobrevivem e vão deixando maior descendência na população. Na seleção artificial, praticada pelo homem, os indivíduos são escolhidos para produzirem descendentes, permitindo, portanto, a reprodução apenas dos animais de interesse. A seleção em um rebanho pode ser

realizada pela escolha dos melhores fenótipos (seleção fenotípica) ou genótipos (seleção genotípica).

Historicamente, o melhoramento genético dos animais teve como base a seleção de indivíduos com fenótipo desejável para gerar descendentes. Com os trabalhos de Mendel, os princípios da genética começaram a ser desvendados e as descobertas de métodos para o estudo do DNA, de equipamentos sofisticados, ferramentas estatísticas e informática (bioinformática), propiciaram o surgimento da Genômica.

As recentes tecnologias para a análise molecular da variabilidade do DNA possibilitam determinar pontos de referência nos cromossomos, denominados marcadores moleculares ou marcadores genéticos de DNA, os quais podem ser utilizados para avaliar as diferenças genéticas entre dois ou mais indivíduos. Com a identificação de marcadores ligados a características de importância econômica, animais geneticamente superiores para caracteres de interesse no melhoramento podem ser escolhidos por meio da chamada seleção assistida por marcadores.

As técnicas de genética molecular são poderosas ferramentas que vieram para auxiliar com grande potencial os métodos clássicos de melhoramento, e podem ser usadas para tornar os processos de seleção mais rápidos e eficientes, permitindo sistemas mais rentáveis de exploração da pecuária leiteira.

É importante verificar que no momento que o homem assumiu o papel de conduzir a seleção artificialmente, passou a ser ele o responsável pela escolha dos animais para reprodução. Sabendo que o melhoramento genético tem como objetivo geral alterar a composição genética do rebanho para aumentar os lucros dos produtores, torna-se fundamental, antes de sua implantação, o conhecimento dos valores econômicos e parâmetros genéticos das características de interesse, já que uma seleção mal conduzida pode resultar em prejuízos difíceis de serem reparados.

O melhoramento genético em bovinos de leite tem como objetivo primário melhorar a eficiência da produção. Um dos obstáculos para a seleção de rebanho leiteiro é o fato da produção de leite ser expressa apenas após a primeira parição e o progresso genético ser essencialmente fundamentado na utilização de touros geneticamente superiores, cuja identificação, a partir da produção de suas filhas, devido à ausência de expressão desta característica nos machos, requer tempo e

dinheiro. O uso de marcadores moleculares para assistir a seleção dos animais deve propiciar uma redução de custos ao produtor, visto que se pode conhecer o potencial genético do indivíduo no início da vida e determinar diretamente o mérito genético dos touros.

Os genes do eixo somatotrópico ou via do GH (*Growth Hormone*, hormônio do crescimento) exercem importantes funções fisiológicas na lactação, o que os tornam alvos de estudos envolvendo marcadores moleculares para a produção de leite.

O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), buscando obter e fixar uma raça leiteira tropical, oficializou a criação brasileira do Girolando, animal resultante do cruzamento Holandês x Gir ($\frac{5}{8}$ Holandês e $\frac{3}{8}$ Gir). Esta raça, altamente adaptada e apresentando boa capacidade de produção, constitui uma expectativa promissora para o mundo tropical.

Considerando o número limitado de estudos com objetivo de se analisar os efeitos dos polimorfismos nos genes da via do GH em características de interesse na produção de leite do Girolando, a Associação Brasileira dos Criadores da raça, tendo como finalidade o melhoramento genético, buscou uma parceria com a UFU (Universidade Federal de Uberlândia) para o desenvolvimento do projeto “Seleção associada a marcadores moleculares visando o aumento da produtividade leiteira em bovinos da raça Girolando”.

O trabalho apresentado a seguir visa associar polimorfismos em seis genes (*GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1*, *IGF1R*) a índices produtivos (produção total de leite, produção média diária de leite, duração da lactação) e verificar as possíveis interações entre eles, a fim de se determinar combinações genotípicas favoráveis a uma maior produção de leite na raça Girolando. Os animais foram genotipados com a técnica de PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*). A análise de associação dos genes individuais e de suas interações (dois a dois) às características estudadas será abordada em um único capítulo.

Em resumo, pretende-se, a partir da finalização desta pesquisa envolvendo animais Girolando, fornecer informações moleculares que possam ser utilizadas como ferramentas complementares aos métodos clássicos de melhoramento da

raça para uma seleção mais rápida e eficiente dos indivíduos, visando à obtenção de um rebanho geneticamente superior e economicamente rentável.

Fundamentação Teórica

1. Interações Hormonais na Via do Hormônio do Crescimento

A lactação, uma característica poligênica, gera diferenças de desempenho devido a alterações genéticas em genes que codificam os hormônios e os fatores de crescimento envolvidos na fisiologia deste processo.

O desenvolvimento da glândula mamária e o mecanismo da lactação são regulados por interações entre o estrógeno, progesterona, prolactina, hormônio do crescimento, lactogênios placentários, glicocorticóides, hormônios tireoidianos e a insulina. O hormônio do crescimento parece ser o principal regulador da lactação na espécie bovina (TUCKER, 2000).

Hormônios do hipotálamo propiciam interações entre o sistema nervoso e o endócrino por meio da regulação das atividades de células específicas da adeno-hipófise (MAYO *et al.*, 2000). A secreção do GH (*Growth Hormone*, hormônio do crescimento) está sob controle do GHRH (*Growth Hormone Releasing Hormone*, hormônio liberador do hormônio do crescimento) e da somatostatina.

O peptídeo hipotalâmico GHRH atua na célula somatotrófica hipofisária, estimulando a proliferação celular durante o desenvolvimento e regulando a sua habilidade na produção e secreção do GH (MAYO *et al.*, 2000). A somatostatina inibe a liberação do GH (PETERSENN; SCHULTE, 2000), mas não há evidência de sua ação na síntese do mesmo ou na proliferação dos somatotrofos (TUGGLE; TRENKLE, 1996).

Na adeno-hipófise, a influência do GHRH e da somatostatina é modulada por fatores hipotalâmicos, neurotransmissores e hormônios da circulação agindo diretamente na glândula (TUGGLE; TRENKLE, 1996). GHRPs (*Growth Hormone-Releasing Peptides*), dopamina, norepinefrina, acetilcolina, leptina, neuropeptídeo Y, galanina, serotonina, TRH (*Thyrotropin-Releasing Hormone*), NMDA (*N-Methyl-D,1-Aspartate*) e GABA (*Gama-Aminobutyric Acid*) são fatores neuroendócrinos que regulam a secreção do GH e podem atuar via GHRH e somatostatina ou por meio de um mecanismo independente destes dois hormônios (McMAHON *et al.*, 2001). De acordo com Radcliff *et al.* (2001), o neuropeptídeo hipotalâmico PACAP (*Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide*) também tem a capacidade de influenciar a regulação da secreção endógena do GH em bovino.

Há indícios de que a produção do GHRH e da somatostatina possa ocorrer na hipófise, tornando possível a existência de um controle neuroendócrino local da secreção de GH e proliferação de somatotrofos (TUGGLE; TRENKLE, 1996).

O peptídeo GHRH pertence à família do glucagon/secretina (PETERSENN; SCHULTE, 2000). Este hormônio apresentou 44 aminoácidos, ao ser isolado do hipotálamo bovino (ESCH *et al.*, 1983). O GHRH humano, quando comparado aos GHRHs suíno, bovino/caprino e ovino, demonstrou 93, 89 e 86% de homologia na sequência de aminoácidos, respectivamente (LING *et al.*, 1984), indicando que os GHRHs suíno, bovino/caprino e ovino diferem do GHRH humano, nesta mesma ordem, em 3, 5 e 6 resíduos (BAILE; BUONOMO, 1987).

A sequência de aminoácidos nos resíduos de 1 a 27, que constitui o núcleo ativo do GHRH, é conservada nos mamíferos (TUGGLE; TRENKLE, 1996). Uma pesquisa demonstrou que o GHRH humano, bovino e seus análogos, assim como o do rato podem atuar na liberação do GH em células somatotróficas de bovino *in vitro* (SOLIMAN *et al.*, 1997).

Na glândula adeno-hipófise, o GHRH exerce a sua função ao se ligar a um receptor específico localizado nos somatotrofos (PETERSENN; SCHULTE, 2000). O GHRHR (*Growth Hormone Releasing Hormone Receptor*, receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento) é encontrado principalmente na hipófise, mas pode ser observado em alguns outros tecidos (MAYO *et al.*, 2000).

O GHRHR pertence à família B-III da superfamília de receptores acoplados à proteína G e estruturalmente apresenta um domínio extracelular amino-terminal, fundamental para a interação hormonal. Apesar de sua importância, este domínio isoladamente não é suficiente para conferir uma ligação de alta afinidade; *loops* extracelulares e resíduos em domínios transmembrânicos são determinantes para uma interação específica com o GHRH (DeALMEIDA; MAYO, 1998).

O cDNA do *GHRHR* em bovinos, humanos, suínos e roedores codifica uma proteína de 423 aminoácidos, e com 407 aminoácidos, em ovinos. Analisando a sequência nucleotídica na região carboxi-terminal do receptor, observou-se que a proteína truncada, também encontrada em caprinos, apresenta uma substituição do triptofano 408 por um códon de parada (TGG para TGA) e uma deleção de 11 nucleotídeos no final 3' da região codificante (HORIYAWA *et al.*, 2001).

Em um estudo de caracterização e expressão do *GHRHR*, Connor, Ashwell e Dahl (2002) verificaram que a sequência de aminoácidos no bovino apresenta homologia de 93, 90, 89, 87 e 85%, comparada às sequências em ovino, suíno, humano, rato e camundongo, respectivamente, demonstrando uma proteína com estrutura e função altamente conservadas entre as espécies. Quanto aos tecidos analisados (íleo, ovário, adeno-hipófise, testículo, hipotálamo, pâncreas e fígado bovino), a expressão do receptor foi detectada apenas na glândula adeno-hipófise e no hipotálamo.

A expressão do gene *GHRHR* pode ser controlada pelo próprio GHRH, por glicocorticóides, hormônios tireoidianos e pelos hormônios sexuais (PETERSENN; SCHULTE, 2000). O promotor do gene *GHRHR* apresenta sítios de ligação para o Pit1 (*Pituitary Specific Transcription Factor 1*, fator de transcrição da pituitária 1), tornando-o também importante na expressão específica do receptor na hipófise (MAYO *et al.*, 2000).

Pit1 é uma proteína com 291 aminoácidos, apresentando um domínio POU de ligação ao DNA, característico de uma família de genes que inclui o *Pit1*, *Oct-1* (*Octamer Transcription Factor*), *Oct-2*, *unc-86* (fator de transcrição neural de *Caenorhabditis elegans*) (HERR *et al.*, 1988).

Em mamíferos, a proteína Pit1 é altamente conservada, tendo 90 a 94% de homologia, considerando a proteína total, e 97 a 99%, quanto à região de domínio POU. O mRNA origina duas proteínas de 33 e 31 kDa (Pit1 α) com propriedades semelhantes, mas proteínas Pit1 possuindo diferenças funcionais são geradas por *splicing* alternativo (Pit1 β , Pit1T, Pit1 Δ 4, Pit1 Δ 3) (TUGGLE; TRENKLE, 1996).

Há forte evidência genética do requerimento por Pit1 na expressão do GH, da prolactina e subunidade β da tireotropina (TUGGLE; TRENKLE, 1996). O Pit1 pode também positivamente auto-regular a expressão do seu próprio gene (CHEN *et al.*, 1990).

Estudando a estrutura e a função do *GHRHR*, Petersenn e Schulte (2000) revisaram a transdução de sinal do receptor e controle da transcrição e secreção do GH. A interação do GHRH com o *GHRHR* no somatotrofo ativa a proteína G, estimulando a adenilato ciclase e ocasionando a produção de AMP (Adenosina Monofosfato) cíclico, o qual parece ser um mensageiro secundário para a síntese e secreção do GH induzido pelo GHRH e proliferação somatotrófica. O acréscimo

de AMP cíclico intracelular ativa os canais de íon na membrana, gerando o influxo de íons cálcio no somatotrofo. O aumento de cálcio citosólico livre leva à liberação do GH de grânulos secretórios.

De acordo com Petersenn e Schulte (2000), o AMP cíclico ainda estimula a proteína quinase A, a qual fosforila vários substratos citoplasmáticos e nucleares. CREB (*cAMP Response Element-Binding*) é um substrato nuclear que impulsiona a transcrição do gene *Pit1*, ativando, conseqüentemente, a expressão do GH. O fator de transcrição CREB, após fosforilado pela proteína quinase A, pode atuar também no promotor do gene *GH*, favorecendo a sua transcrição. Mecanismos adicionais têm sido sugeridos com base em estudos fisiológicos. A estimulação da transcrição do gene *GH* pelo GHRH já tinha sido demonstrada (BARINAGA *et al.*, 1983).

O GH pertence a uma classe de hormônios que inclui o GH, a prolactina e lactogênios placentários. O GH é sintetizado como uma proteína precursora, com um peptídeo sinal na região amino-terminal que é removido na secreção hormonal (KOPCHICK; ANDRY, 2000).

O GH, na espécie bovina, é uma proteína de 191 aminoácidos e apresenta uma heterogeneidade complexa, tendo diferentes formas moleculares (SECCHI; BORROMEO, 1997). São encontradas quatro variantes do GH, as quais surgem da combinação de dois possíveis aminoácidos na região amino-terminal (alanina ou fenilalanina) e dois possíveis aminoácidos na posição 127 (leucina ou valina) (WOOD *et al.*, 1989). A variação na região amino-terminal se deve a diferenças na clivagem do peptídeo sinal, resultando em moléculas com 191 aminoácidos, quando a alanina está presente ou 190 aminoácidos, em presença da fenilalanina (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

As sequências de aminoácidos do GH são idênticas para o ovino e caprino, tendo 99% de homologia em comparação com a espécie bovina. Considerando os GHs em suíno, equino e humano, o GH bovino apresenta, respectivamente, 90,6, 89,5 e 66,5% de similaridade (SECCHI; BORROMEO, 1997).

A regulação do GH pode ser dividida em três níveis: basal (em células não-hipofisárias), específica do tipo celular (no somatotrofo, controlada principalmente pelo *Pit1*) e induzida por hormônios (hormônio da tireóide, glicocorticóide, ácido retinóico, activina e insulina) (TUGGLE; TRENKLE, 1996). Os esteróides sexuais,

estado nutricional, fatores metabólicos e ambientais podem influenciar a secreção do GH (GLUCKMAN; BREIER; DAVIS, 1987).

O GH é sintetizado, estocado e secretado, de forma pulsátil, pelas células somatotróficas da adeno-hipófise (PETERSENN; SCHULTE, 2000). No entanto, o hormônio também pode ser produzido nas gônadas, placenta e glândula mamária, atuando localmente por mecanismos parácrinos ou autócrinos (HULL; HARVEY, 2001).

A habilidade do GH em promover seus efeitos depende de uma interação hormonal com proteínas de ligação específicas. Destas, a mais importante parece ser o GHR (*Growth Hormone Receptor*, receptor do hormônio do crescimento). A presença hormonal, estado nutricional e o controle específico tecidual/celular são fatores que regulam a expressão do GHR (KOPCHICK; ANDRY, 2000).

O GH se liga ao GHR induzindo a dimerização do receptor (um complexo consistindo de dois GHRs e uma molécula de GH) e ativação da tirosina quinase JAK2 (*Janus Kinase 2*). A fosforilação de JAK2 e GHR recruta e aciona moléculas sinalizantes – os fatores de transcrição STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), os substratos 1 e 2 do receptor da insulina, levando à liberação de mensageiros secundários – diacilglicerol, cálcio, óxido nítrico e favorecendo a ativação de enzimas – a fosfolipase A2, MAP (*Mitogen-Activated Protein*) quinase, proteína quinase C. Estes eventos regulam a função celular, como transcrição de gene, transporte de metabólito, atividade enzimática, resultando nos vários efeitos do GH (ARGETSINGER; CARTER-SU, 1996). A dimerização do GHR procede de forma sequencial, com a ligação do sítio 1 seguida pela interação do sítio 2 do GH ao seu receptor (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

GHBP (*Growth Hormone Binding Protein*) é uma proteína de ligação ao GH que corresponde à forma solúvel do domínio extracelular do GHR e apresenta um papel fisiológico significativo, devendo atuar como reservatório para o GH liberado da hipófise, mantendo-o disponível no soro (KOPCHICK; ANDRY, 2000).

O GH pode agir diretamente nos tecidos, mas é possível também que atue indiretamente por meio do IGF1 (*Insulin-like Growth Factor 1*, fator de crescimento semelhante à insulina 1) sintetizado localmente ou no fígado (HULL; HARVEY, 2001). O IGF1, um peptídeo de 70 aminoácidos, exerce os seus efeitos biológicos pela ligação ao IGF1R (*Insulin-like Growth Factor 1 Receptor*, receptor do fator de

crescimento semelhante à insulina 1) na superfície celular (GLUCKMAN; BREIER; DAVIS, 1987). A Figura 1 esquematiza a regulação neuroendócrina da produção do GH, sua secreção e seus locais alvos de ação. O GH e IGF1 são fundamentais para a repressão da atividade do sistema (MAYO *et al.*, 2000).

Os efeitos biológicos do GH podem ser somatogênicos, os quais estimulam a proliferação celular, ou metabólicos, envolvendo o metabolismo de carboidrato, lipídeo, proteína e minerais em diversos tecidos (ETHERTON; BAUMAN, 1998).

A principal função do GH é promover o crescimento longitudinal pós-natal (KOPCHICK; ANDRY, 2000). Atua, ainda, na diferenciação e desenvolvimento da glândula mamária (FELDMAN *et al.*, 1993), tem extrema importância nas fases da lactação: mamogênese, lactogênese, galactopoiese, involução (SVENNERSTEN-SJAUNJA; OLSSON, 2005) e exerce influência na reprodução (HULL; HARVEY, 2001). Diferentes padrões de crescimento e de desenvolvimento ovariano foram observados em bovinos com deficiência no receptor do GH (CHASE *et al.*, 1998).

Considerando os efeitos no processo da lactação, o GH favorece a síntese do leite com composição normal, permite uma maior disponibilidade de nutrientes para a produção láctea, aumenta a atividade por célula secretória, assim como a manutenção destas células e proporciona maior aporte sanguíneo para a glândula mamária (ETHERTON; BAUMAN, 1998). Todas estas ações devem ser mediadas pelo IGF1, mas existe evidência de uma ação direta do GH na glândula mamária (FLINT; GARDNER, 1994).

A involução da glândula mamária bovina, um processo importante para as subsequentes lactações que se caracteriza por perda das células epiteliais devido a apoptose, está associada ao declínio da concentração de prolactina, GH e IGF1 (ACCORSI *et al.*, 2002).

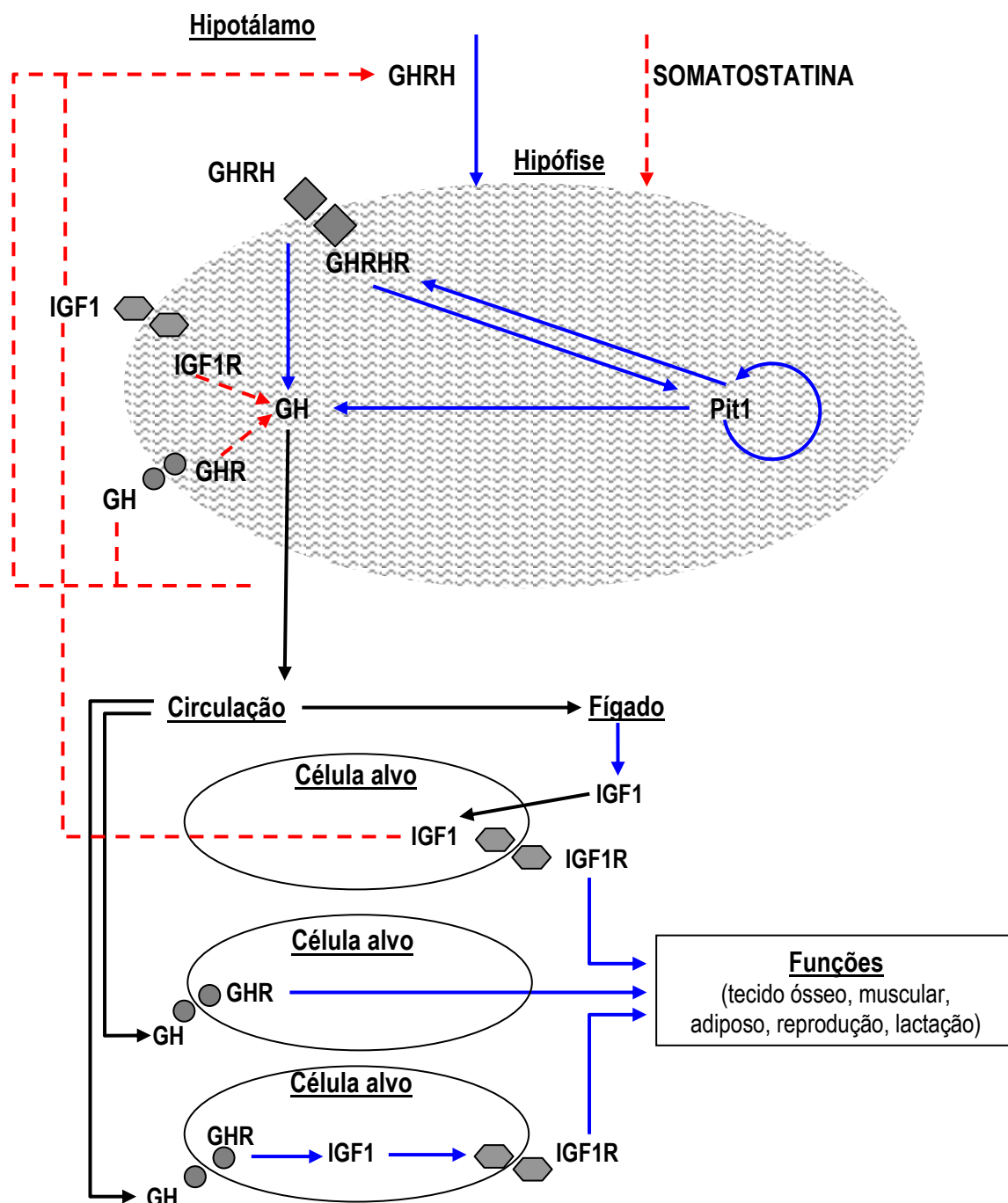


Figura 1 - Representação esquemática mostrando a regulação neuroendócrina da produção, secreção do GH e seus locais-alvo de ação. O círculo em cinza representa um somatotrofo; as setas azuis representam estímulos positivos e as vermelhas estímulos negativos; , e representam interações proteína-receptor.

2. Melhoramento Genético de Bovinos de Leite

Nos rebanhos leiteiros brasileiros, a baixa produtividade ocorre como efeito de dois fatores: mau desempenho reprodutivo, traduzido pela idade avançada ao primeiro parto, longo intervalo de partos, em decorrência dos manejos nutricional e sanitário aos quais os animais são submetidos; e inferior qualidade genética dos indivíduos, indicada por meio da produção, duração da lactação e persistência na produção (FARIA, 2001). Baseado nestas informações, verifica-se a necessidade de se buscar, na bovinocultura de leite, modelos de seleção genética garantindo o uso de animais superiores para características economicamente importantes.

A produção de leite é a soma dos efeitos do ambiente, da genética da vaca e da possível interação do meio com a genética. A genética propicia ao animal a capacidade de produzir leite, enquanto o ambiente fornece as condições para que ele o produza (VALENTE; DURÃES; MARTINEZ, 2001). A proporção da variação de origem genética aditiva e a proporção da variação pela influência do ambiente podem ser medidas por meio do coeficiente de herdabilidade, cujo valor é, para a produção de leite, 0,25 ou 25%, aproximadamente (FREITAS, 2001).

Tanto o genótipo como o ambiente têm um papel decisivo na manifestação fenotípica. De nada vale um genótipo superior quando o ambiente é desfavorável, assim como também não adianta muito melhorar o ambiente se o genótipo não é o adequado (RAMALHO; SANTOS; PINTO, 2000).

Os métodos de seleção disponíveis para determinada característica podem ser separados em seleção individual, seleção pelo *pedigree*, seleção pela família, seleção pela progênie. Com base na produção de suas filhas, o teste de progênie possibilita identificar, avaliar, selecionar e também difundir os reprodutores de alto valor genético visando elevar a produção de leite e a produtividade dos rebanhos. Este método de seleção é essencial para um programa de melhoramento de gado leiteiro, uma vez que produção de leite é uma característica que não se expressa nos machos (VALENTE; VERNEQUE; DURÃES, 2001) e estes, por deixarem um grande número de descendentes, especialmente se forem usados em programas de inseminação artificial, são os principais responsáveis pelo melhoramento dos rebanhos (PENNA *et al.*, 2001). Por outro lado, são necessários, no mínimo, cinco

anos para a obtenção de um touro geneticamente provado para produção de leite (MACHADO; MARTINEZ, 2001).

A seleção clássica se baseia no fenótipo e, nesta situação, a morfologia do animal, a medida das produções ou a avaliação dos desempenhos dos indivíduos podem ser consideradas (VALENTE; VERNEQUE; DURÃES, 2001). No entanto, existem muitos casos em que o fenótipo não se expressa no animal ou ainda é de difícil mensuração (MARTINEZ; MACHADO, 2001). Somado a isto, o fenótipo não retrata fielmente o genótipo de um indivíduo para a maioria das características de interesse econômico, pois a variação genética é poligênica e a expressão gênica é intensamente influenciada pelo ambiente. Estes caracteres são denominados quantitativos e os locos que controlam a expressão dos mesmos são chamados QTLs (*Quantitative Trait Loci*) (MACHADO; MARTINEZ, 2001).

Nos últimos anos, várias tecnologias foram desenvolvidas para estudo dos genes e variação genética em nível molecular que, aliadas à grande capacidade computacional de análise dos dados, trazem uma nova perspectiva em relação ao progresso genético em programas de melhoramento animal.

QTLs afetando características de importância em bovinos leiteiros, como a produção e composição do leite, a quantidade de células somáticas (um indicador de resistência à mastite), longevidade e o tipo, têm sido identificados (RON *et al.*, 1994; ASHWELL *et al.*, 1998; HEYEN *et al.*, 1999; HEYEN *et al.*, 2003; CHEN *et al.*, 2006).

Marcadores moleculares ou marcadores genéticos de DNA são segmentos cromossômicos que permitem detectar diferenças na sequência do DNA e podem ser utilizados para determinação de paternidade, construção de mapas genéticos, isolamento de genes, mapeamento de características de herança quantitativa e a seleção assistida por marcadores.

A principal expectativa da aplicação dos QTLs é a seleção dos animais por marcadores moleculares. Com a detecção de marcadores ligados a caracteres de interesse econômico, indivíduos de ambos os sexos podem ser selecionados com base nos genótipos que possuem para os marcadores estabelecidos (MACHADO; MARTINEZ, 2001).

A seleção assistida por marcadores moleculares possibilita a determinação do potencial genético do animal com uma maior precisão e antes da expressão do

seu fenótipo, sem que seja preciso avaliar sua produção ou ainda de sua progênie (COUTINHO; REGITANO, 2001). Consequentemente, indivíduos de alto potencial genético são mantidos nos rebanhos, enquanto os com baixo potencial podem ser descartados, evitando os custos necessários para manutenção do animal durante vários anos (MACHADO; MARTINEZ, 2001).

A utilização de marcadores moleculares apresenta extrema importância na implementação dos esquemas de acasalamento (BISHOP; HAWKINS; KEEFER, 1995), seleção de características de baixa herdabilidade, difícil mensuração, alto custo de medição e expressão tardia (VAN EENENNAAM; DAVIS, 2005).

Programas de melhoramento têm combinado informações fenotípicas com marcadores genéticos buscando alcançar maior eficiência na seleção dos futuros reprodutores. A seleção assistida por marcadores está sendo considerada um dos melhores métodos para a incorporação de elementos moleculares em programas de melhoramento e a máxima exploração dos benefícios desta tecnologia deverá ser obtida por um balanço adequado entre processos quantitativos e moleculares.

Os programas de melhoramento animal baseados na seleção assistida por marcadores requerem três fases para serem estabelecidos: fase de detecção – os QTLs são localizados e seus efeitos no fenótipo estimados, fase de avaliação – os marcadores são avaliados em populações comerciais e fase de implementação – os marcadores são combinados às informações fenotípicas e de *pedigree* para a predição do mérito genético dos indivíduos na população (DAVIS; DeNISE, 1998).

Considerando que a aplicação da genômica torna possível a identificação de genes ligados a características importantes economicamente (CASAS, 2006), o constante avanço das pesquisas na área de genética molecular proporcionará um número crescente de marcadores para serem empregados em programas de melhoramento animal.

Os polimorfismos genômicos podem modificar a função dos genes e alterar a formação dos produtos gênicos, contribuindo para o aparecimento de diferentes fenótipos entre os animais. Conhecendo seus efeitos nas etapas da lactação, os genes da via do GH têm sido utilizados nos estudos de variação molecular em associação com o mérito genético de determinadas raças de bovinos de leite.

Inúmeros métodos na biologia molecular estão disponíveis atualmente para a detecção da variabilidade genética em nível do DNA, como RFLPs (*Restriction*

Fragment Length Polymorphisms), Microssatélites, SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) (BEUZEN; STEAR; CHANG, 2000), SSRs (*Simple Sequence Repeats*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*), PCR (*Polymerase Chain Reaction*), Minissatélites, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998), SSCP (*Single Stranded Conformation Polymorphisms*), PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism*), dentre outros.

RFLP

Por RFLP, entende-se, o polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição. Este polimorfismo é evidenciado pela fragmentação do DNA devido ao uso de enzimas de restrição e a visualização dos fragmentos por hibridização com sondas marcadas (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1998).

As enzimas de restrição se ligam ao DNA e clivam a dupla fita do mesmo em sítios específicos dentro ou ao lado de sequências particulares reconhecidas por cada enzima (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Como formam um rastro contínuo, os fragmentos resultantes da digestão enzimática não podem ser visualizados no gel de agarose, tornando-se necessário, para serem identificados, a utilização de uma sonda marcada que deve ser hibridizada ao DNA, após este ter sido transferido do gel para uma membrana de nylon ou nitrocelulose, por um método denominado *Southern Blot* (SOUTHERN, 1975).

Para a detecção do polimorfismo RFLP, as sequências de nucleotídeos nas fitas de DNA dos indivíduos comparados devem ser distintas, podendo resultar de mutações, deleções e/ou inserções nos sítios de restrição das enzimas. A técnica tem a vantagem de ser codominante, pois permite identificar e distinguir genótipos heterozigotos dos homozigotos.

PCR

Uma das marcantes contribuições ao estudo de marcadores moleculares foi o desenvolvimento da reação de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). Criada em meados da década de 80 por Kary Mullis, é uma técnica utilizada para

a amplificação de poucas moléculas de DNA ou RNA *in vitro*, com consequente produção de várias cópias.

A PCR é extremamente sensível e envolve interações cinéticas complexas entre DNA molde (obtido a partir de métodos de extração de ácidos nucleicos que mantenham a sua integridade), DNA produto, *primers* (oligonucleotídeos), dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP), enzima (DNA polimerase), tampão e magnésio, em três etapas: desnaturação do DNA molde, separando a dupla fita de DNA; ligação dos *primers* ao DNA a ele complementar, fornecendo um sítio de iniciação para a enzima polimerase catalisar a incorporação dos nucleotídeos e extensão da nova fita, originando um novo DNA de dupla fita. Os estágios de desnaturação, ligação dos *primers* e síntese do novo DNA são conhecidos por ciclo (HOY, 1994).

A reação de PCR consiste de ciclos repetidos envolvendo, geralmente, três temperaturas e tempos diferentes. A quantidade ótima de ciclos varia de 25 a 45, dependendo principalmente da concentração inicial de DNA utilizada como molde. A etapa da desnaturação necessita de alta temperatura para romper as pontes de hidrogênio que mantém hibridizadas as duas fitas de DNA molde e subsequente produto (HOY, 1994). Condições típicas de desnaturação podem ser 95°C por 30 segundos ou 97°C durante 15 segundos. A temperatura e o tempo de ligação dos *primers* dependem da composição, comprimento e da concentração dos mesmos. Temperaturas mais altas contribuem para o aumento da especificidade da reação. A síntese do novo DNA normalmente requer uma temperatura de 72°C e o tempo de extensão depende do tamanho e da concentração da sequência molde (INNIS; GELFAND, 1990).

Toda reação é executada automaticamente em um aparelho termociclador, programado para alcançar as temperaturas específicas de cada etapa e realizar o número de ciclos desejados. Um único protocolo de reação não é apropriado para todas as situações e cada nova aplicação exige minuciosa e criteriosa otimização.

Finalizado o processo, uma alíquota é obtida para a análise dos resultados por meio de eletroforese em gel de agarose ou acrilamida.

PCR-RFLP

Na técnica de PCR-RFLP, a sequência considerada alvo é amplificada pela reação de PCR, seguindo-se posteriormente uma digestão do produto amplificado com enzima de restrição, para se detectar possíveis mutações de ponto presentes no DNA (MACHADO; MARTINEZ, 2001).

O processo de clivagem do DNA com uma enzima de restrição depende de alguns parâmetros – pureza do DNA a ser digerido; temperatura ótima de reação, que pode variar entre 37 e 65°C, conforme a enzima; e composição do tampão de reação. O tempo de digestão depende da quantidade de enzima e de substrato. A observação das condições adequadas para cada enzima é essencial na obtenção da máxima atividade e especificidade da reação (REGITANO, 2001).

Um número limitado de fragmentos é obtido após a digestão com a enzima de restrição apropriada, os quais podem ser visualizados por meio de eletroforese em gel de agarose e facilmente discriminados pelo tamanho.

A técnica de PCR-RFLP é rápida e não envolve hibridizações, mas exige o conhecimento da sequência do DNA para a síntese dos *primers* usados na reação de PCR. A sua principal vantagem, em relação ao RFLP, parece ser o fato de que somente o segmento de DNA com o sítio polimórfico de restrição é amplificado.

3. Raça Girolando

As condições de clima e de solo do Brasil comportam a existência de três sistemas para a produção de leite: sistemas que utilizam o gado zebu, sistemas que utilizam o gado europeu, sistemas que utilizam o gado mestiço, resultante do cruzamento de uma raça zebuína e outra européia. O zebu é um animal rústico, demonstrando boa adaptação ao clima tropical, tolerante a elevadas temperaturas e umidade, resistente a ectoparasitos, no entanto com baixa produção de leite. O europeu, pelo fato de não ser natural das regiões tropicais, é sensível ao calor e a ectoparasitos, mas apresenta uma alta produção de leite, considerando os países de origem. Os mestiços ficam numa posição intermediária entre seus pais quanto à rusticidade e produção leiteira (GOMES, 2001).

Um terço da superfície do planeta está localizado na faixa tropical, gerando a intensa busca por animais bem adaptados ao clima da região para se obter uma exploração zootécnica de resultados compatíveis com a demanda do mercado. O cruzamento *Bos taurus* (europeu) e *Bos indicus* (zebu), principalmente Holandês x Gir, é uma prática utilizada no Brasil visando à obtenção do animal Girolando, que se refere ao gado leiteiro tropical $\frac{5}{8}$ Holandês e $\frac{3}{8}$ Gir, embora haja tendência de se denominar Girolando qualquer mestiço Holandês-Gir.

A primeira notícia do surgimento do Girolando no Brasil ocorreu na década de 40 com a cobertura, por acaso, de vacas Holandesas por um touro Gir no Vale do Paraíba (estado de São Paulo). Desde então, a multiplicação destes indivíduos foi acelerada, visto que a rusticidade do Gir e a produção do Holandês podiam ser adquiridas em um único tipo animal, com qualidades importantes para a produção leiteira econômica nos trópicos. Posteriormente, a criação brasileira do Girolando foi oficializada pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento).

O Arquivo Zootécnico Nacional da Embrapa Gado de Leite contém dados atualizados referentes aos rebanhos leiteiros de diferentes raças no Brasil. A raça Holandesa produz cerca de 6.210 litros de leite/lactação, em um período médio de 305 dias, considerando somente a primeira lactação. Para o rebanho Girolando, a produção de leite está em torno de 4.012 litros/lactação, com uma duração média de 276 dias. Apresentando uma produtividade inferior, se encontram as raças Gir e Guzerá, com 2.731 e 1.976 litros/lactação, respectivamente (ZOCCAL, 2007).

As raças leiteiras européias estão, há tempos, sob um intenso processo de seleção, principalmente pelo teste de progênie realizado em países desenvolvidos e de clima temperado. O Gir Leiteiro foi a raça zebuína pioneira (1985) no Brasil e no mundo a estabelecer um programa delineado de melhoramento, com avaliação genética de touros a partir do desempenho produtivo das suas progênies (PENNA *et al.*, 2001).

A implantação do teste de progênie na raça Girolando, para a identificação e seleção de touros geneticamente superiores, deu-se início em 1997. Um total de 65 reprodutores foi distribuído em nove grupos (seis no primeiro grupo, oito no segundo, seis no terceiro, cinco no quarto, sete no quinto, sete no sexto, oito no sétimo, nove no oitavo e nove touros no nono grupo). Destes animais, já foram avaliados 25 reprodutores pertencentes aos quatro primeiros grupos e os outros

40 encontram-se em teste, com uma previsão de resultados para 2009 (quinto grupo) 2010 (sexto grupo), 2011 (sétimo grupo), 2012 (oitavo grupo) e 2013 (nono grupo).

Responsável por grande parcela da produção leiteira nacional, o Girolando pode se consolidar como o principal gado leiteiro do mundo tropical por meio da incorporação de informações moleculares na seleção dos animais, tornando mais eficientes os programas de melhoramento genético da raça.

Referências Bibliográficas*

ACCORSI, P.A.; PACIONI, B.; PEZZI, C.; FORNI, M.; FLINT, D.J.; SEREN, E. Role of prolactin, growth hormona and insulin-like growth factor 1 in mammary gland involution in the dairy cow. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 85, n. 3, p. 507-513, Mar. 2002.

ARGETSINGER, L.S.; CARTER-SU, C. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 76, n. 4, p. 1089-1107, Oct. 1996.

ASHWELL, M.S.; DA, Y.; VAN TASSELL, C.P.; VANRADEN, P.M.; MILLER, R.H.; REXROAD, C.E.Jr. Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and type traits in a United States Holstein population. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 81, n. 12, p. 3309-3314, Dec.1998.

BAILE, C.A.; BUONOMO, F.C. Growth hormone-releasing factor effects on pituitary function, growth, and lactation. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 70, n. 2, p. 467-473, Feb. 1987.

BARINAGA, M.; YAMOMOTO, G.; RIVIER, C.; VALE, W.; EVANS, R.; ROSENFELD, G. Transcriptional regulation of growth hormone gene expression by growth hormone-releasing factor. **Nature**, London, v. 306, n. 3, p. 84-85, Nov. 1983.

BEUZEN; N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, London, v. 160, n. 1, p. 42-52, Jul. 2000.

BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, Los Altos (Calif.), v. 43, n. 1, p. 61-70, Jan. 1995.

CASAS, E. Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales. **Archivos Latinoamericanos de Producción Animal**, Maracaibo (Venezuela), v. 14, n. 1, p. 24-31, 2006.

CHASE, C.C.Jr.; KIRBY, C.J.; HAMMOND, A.C.; OLSON, T.A.; LUCY, M.C. Patterns of ovarian growth and development in cattle with a growth hormone receptor deficiency. **Journal of Animal Science**, Champaign (Ill.), v. 76, n. 1, p. 212-219, Jan. 1998.

CHEN, H.Y.; ZHANG, Q.; YIN, C.C.; WANG, C.K.; GONG, W.J.; MEI, G. Detection of quantitative trait loci affecting milk production traits on bovine chromosome 6 in a Chinese Holstein population by the daughter design. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 89, n. 2, p. 782-790, Feb. 2006.

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

CHEN, R.P.; INGRAHAM, H.A.; TREACY, M.N.; ALBERT, V.R.; WILSON, L.; ROSENFELD, M.G. Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. **Nature**, London, v. 346, n. 6284, p. 583-586, Aug. 1990.

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

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

DAVIS, G.P.; DeNISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, Champaign (Ill.), v. 76, n. 9, p. 2331-2339, Sept. 1998.

DeALMEIDA, V.I.; MAYO, K.E. Identification of binding domains of the growth hormone-releasing hormone receptor by analysis of mutant and chimeric receptor protein. **Molecular Endocrinology**, Baltimore, v. 12, n. 5, p. 750-765, May 1998.

ESCH, F.; BÖHLEN, P.; LING, N.; BRAZEAU, P.; GUILLEMIN, R. Isolation and characterization of the bovine hypothalamic growth hormone releasing factor. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 117, n. 3, p. 772-779, Dec. 1983.

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

FARIA, V.P. Avanços e desafios em P & D no segmento da produção da cadeia agroalimentar do leite no Brasil. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 165-213.

FELDMAN, M.; RUAN, W.; CUNNINGHAM, B.C.; WELLS, J.A.; KLEINBERG, D.L. Evidence that the growth hormone receptor mediates differentiation and development of the mammary gland. **Endocrinology**, Baltimore, v. 133, n. 4, p. 1602-1608, Oct. 1993.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Classes de marcadores moleculares para análise genética. In: _____. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3.ed. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1998. p. 13-68.

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. **Endocrinology**, Springfield, v. 135, n. 3, p. 1119-1124, Sept. 1994.

FREITAS, A.F. Genética e estatística: princípios. In: VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed.) **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 9-32.

GLUCKMAN, P.D.; BREIER, B.H.; DAVIS, S.R. Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 70, n. 2, p. 442-466, Feb. 1987.

GOMES, S.T. Avanços sócio-econômicos em sistemas de produção de leite. In: VILELA, D.; BRESSAN, M.; CUNHA, A.S. **Cadeia de lácteos no Brasil: restrições ao seu desenvolvimento**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 141-156.

HERR, W. et al. The POU domain: a large conserved region in the mammalian pit-1, oct-1, oct-2, and *Caenorhabditis elegans* unc-86 gene products. **Genes Development**, Cold Spring Harbor (N.Y.), v. 2, n. 12-A, p. 1513-1516, Dec. 1988.

HEYEN, D.W. et al. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. **Physiological Genomics**, Bethesda, v. 1, n. 3, p. 165-175, Nov. 1999.

HEYEN, D.W. et al. **The identification of quantitative trait loci influencing milk production and health traits in dairy cattle**. Disponível: <<http://traill.outrreach.uiuc.edu/uploads/dairynet/papers/TheIdentification.pdf>>. Acesso em: 15 fev. 2003.

HORIKAWA, R.; GAYLINN, B.D.; LYONS, C.E.Jr.; THORNER, M.O. Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. **Endocrinology**, Springfield, v. 142, n. 6, p. 2660-2668, Jun. 2001.

HOY, M.A. DNA amplification by the polymerase chain reaction: molecular biology made accessible. In: _____. **Insect molecular genetics: an introduction to principles and applications**. San Diego: Academic Press, 1994. p. 203-244.

HULL, K.L.; HARVEY, S. Growth hormone: roles in female reproduction. **The Journal of Endocrinology**, London, v. 168, n. 1, p. 1-23, Jan. 2001. Review.

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

KOPCHICK, J.J.; ANDRY, J.M. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. **Molecular Genetics and Metabolism**, Orlando, v. 71, n. 1/2, p. 293-314, Sept./Oct. 2000. Review.

LING, N.; ESCH, F.; BÖHLEN, P.; BRAZEAU, P.; WEHRENBURG, W.B.; GUILLEMIN, R. Isolation, primary structure, and synthesis of human hypothalamic somatocrinin: growth hormone-releasing factor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 81, n. 14, p. 4302-4306, July 1984.

MACHADO, M.A.; MARTINEZ, M.L. Marcadores moleculares: fundamentos e aplicações. In: VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed.) **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 215-230.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Identificação de locos de características quantitativas (QTL). In: VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed.) **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 231-255.

MAYO, K.E.; MILLER, T.; DeALMEIDA, V.; GODFREY, P.; ZHENG, J.; CUNHA, S.R. Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. **Recent Progress in Hormone Research**, New York, v. 55, p. 237-267, 2000.

McMAHON, C.D.; RADCLIFF, R.P.; LOOKINGLAND, K.J.; TUCKER, H.A. Neuroregulation of growth secretion in domestic. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 20, n. 2, p. 65-87, Feb. 2001.

MONTALDO; H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Eletronic Journal of Biotechnology**, Chile, v. 1, n. 2, 1998.

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

PETERSENN, S.; SCHULTE, H.M. Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. **Vitamins and Hormones**, New York, v. 59, p. 35-69, 2000.

RADCLIFF, R.P.; LOOKINGLAND, K.J.; CHAPIN, L.T.; TUCKER, H.A. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide induces secretion of growth hormone in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 21, n. 3, p. 187-196, Oct. 2001.

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

REGITANO, L.C.A. Análise de polimorfismo de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP). In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. p. 188-194.

RON, M.; BAND, M.; YANAI, A.; WELLER, J.I. Mapping quantitative trait loci with DNA microsatellites in a commercial dairy cattle population. **Animal Genetics**, Oxford, v. 25, n. 4, p. 259-264, Aug. 1994.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

SECCHI, C.; BORRAMEO, V. Structure and function of bovine growth hormone: bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. **Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications**, Amsterdam, v. 688, n. 2, p. 161-177, Jan. 1997.

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

SOUTHERN, E.M. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. **Journal of Molecular Biology**, New York, v. 98, n. 3, p. 503-517, Nov. 1975.

SVENNERSTEN-SJAUNJA, K.; OLSSON, K. Endocrinology of milk production. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 29, n. 2, p. 241-258, Aug. 2005.

TUCKER, H.A. Hormones, mammary growth, and lactation: a 41-year perspective. **Journal of Dairy Science**, Lancaster (Pa.), v. 83, n. 4, p. 874-884, Apr. 2000.

TUGGLE, C.K.; TRENKLE, A. Control of growth hormone synthesis. **Domestic Animal Endocrinology**, Stoneham, v. 13, n. 1, p. 1-33, Jan. 1996. Review.

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

VALENTE, J.; VERNEQUE, R.S.; DURÃES, M.C. Seleção: métodos e auxílios. In: VALENTE, J.; DURÃES, M.C.; MARTINEZ, M.L.; TEIXEIRA, N.M. (Ed.) **Melhoramento genético de bovinos de leite**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2001. p. 33-56.

VAN EENENNAAM, A.; DAVIS, U.C. **Marker-assisted selection in beef cattle**. Disponível em: <<http://animalscience.ucdavis.edu/animalbiotech>> Acesso em: Jan. 2005.

WOOD, D.C. et al. Purification and characterization of pituitary bovine somatotropin. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 264, n. 25, p. 14741-14747, Sept. 1989.

ZOCCAL, R. Produtividade do rebanho brasileiro. Disponível em: <<http://www.cnp.gl.embrapa.br/>> Acesso em: 27/03/2007.

Capítulo Único

1

¹ Formato de submissão para *Animal Genetics* (Referências, Nomenclaturas e Tabelas)
Trabalho completo descrito detalhadamente – os resultados obtidos serão subdivididos
em produções bibliográficas

Resumo

A investigação de polimorfismos gênicos pode possibilitar a descoberta de importantes associações com características quantitativas e explicar uma parte da variabilidade existente. Considerando o papel fundamental do eixo somatotrópico na regulação da lactação, o objetivo deste estudo foi associar polimorfismos em seis genes: *hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRH)*, *receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento (GHRHR)*, *fator de transcrição da pituitária 1 (Pit1)*, *hormônio do crescimento (GH)*, *fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1)*, *receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF1R)* aos caracteres produção total de leite, produção média diária de leite e duração da lactação, analisando os efeitos das interações gênicas em bovinos Girolando %. Foram genotipadas 356 fêmeas pela técnica de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)*. As análises estatísticas foram feitas por meio de um modelo misto e as médias agrupadas por genótipos foram comparadas pelo teste t de *Student*. Os resultados revelaram uma superioridade do heterozigoto (*GHRH/HaeIII*) para produção total ($p < 0,01$) e produção média diária de leite ($p < 0,05$). Efeitos favoráveis ($p < 0,05$) do genótipo BB comparado ao AA (*Pit1/Hinfl*) e do CC em relação ao DD (*GH/Mspl*) também foram verificados na produção de leite. Observaram-se efeitos aditivos do alelo B (*Pit1/Hinfl*) e C (*GH/Mspl*) na produção de leite, gerando um aumento na lactação de 116,2 kg e 68,51 kg de leite, respectivamente, para cada alelo incorporado. Com a análise das interações gênicas, uma superioridade ($p < 0,05$) do genótipo BB (*Pit1*) na presença do AA (*IGF1*) foi demonstrada na produção total e média diária de leite. Menor duração da lactação ($p < 0,05$) foi encontrada nos indivíduos com as combinações genotípicas AA(*Pit1*)/BB(*GHRHR*), BB(*Pit1*)/AA(*GHRHR*) e AB(*IGF1*)/AA(*GHRH*). Neste trabalho, a importância verificada dos polimorfismos gênicos na via do GH sugere a possibilidade destes genes se tornarem potenciais marcadores moleculares para assistir a seleção de animais Girolando, sendo uma ferramenta auxiliar nos programas de melhoramento genético da raça.

Palavras-chave: marcadores moleculares, eixo somatotrópico, produção de leite, Girolando, PCR-RFLP.

Abstract

The continuous investigation on gene polymorphisms may lead to the discovery of important associations with quantitative traits, explaining part of the existing variability. Considering the essential role of the somatotrophic axis in the regulation of lactation, the purpose of this study was to associate polymorphisms of six genes: *growth hormone releasing hormone (GHRH)*, *growth hormone releasing hormone receptor (GHRHR)*, *pituitary specific transcription factor 1 (Pit1)*, *growth hormone (GH)*, *insulin-like growth factor 1 (IGF1)*, *insulin-like growth factor 1 receptor (IGF1R)*, with production traits of dairy cattle, such as: total milk production, average daily milk production and lactation period, analyzing the effects of gene interactions in bovine $\frac{5}{8}$ Girolando. Genotyping of the 356 females was accomplished by the Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) technique. Statistical analyses were performed by using a mixed model and the averages grouped by genotype were compared by the Student t test. Results revealed a superiority of the heterozygote (*GHRH/HaeIII*) to total production ($p < 0.01$) and average daily milk production ($p < 0.05$). Favorable effects ($p < 0.05$) of the BB genotype compared to AA (*Pit1/Hinfl*) and CC in relation to DD (*GH/Mspl*) were also verified in the milk production. Additive effects of allele B (*Pit1/Hinfl*) and C (*GH/Mspl*) were observed in the milk production, generating an increase in the lactation of 116.2 kg and 68.51 kg of milk, respectively, for each incorporated allele. Through the analysis of gene interactions, a superiority ($p < 0.05$) of genotype BB (*Pit1*) in the presence of AA (*IGF1*) was demonstrated in total and average daily milk production. A shorter lactation period ($p < 0.05$) was still found in individuals with the genotypic combinations AA(*Pit1*)/BB(*GHRHR*), BB(*Pit1*)/AA(*GHRHR*), AB(*IGF1*)/AA(*GHRH*). The importance of gene polymorphisms in the GH pathway identified in this study suggests that these genes may become potential molecular markers to assist the selection of the Girolando breed as an auxiliary tool in genetic improvement programs.

Key words: molecular markers, somatotrophic axis,
milk production, Girolando, PCR-RFLP.

Introdução

O Brasil ocupa uma posição destacada na produção mundial de leite, mas a produtividade do rebanho bovino nacional ainda é baixa, em consequência do mau desempenho reprodutivo e inferior qualidade genética dos animais. Nutrição balanceada, condições adequadas de manejo, maior profissionalização na gestão das fazendas e melhoramento genético são fatores essenciais para o aumento da produção e incremento da produtividade animal.

O melhoramento genético em bovinos leiteiros tem como principal objetivo melhorar a eficiência da produção. Um dos obstáculos para a seleção dos animais é o fato da produção de leite ser expressa somente depois da primeira parição e o progresso genético ser essencialmente baseado no uso de touros geneticamente superiores, que, por não expressarem a característica, são avaliados por meio do teste de progênie. A seleção assistida por marcadores moleculares, realizada por diferenças na sequência do DNA entre indivíduos, permite determinar diretamente e no início da vida o potencial genético do animal, sendo uma alternativa eficaz de inclusão da informação molecular nos programas de melhoramento, possibilitando uma maior acurácia da resposta obtida na seleção do rebanho.

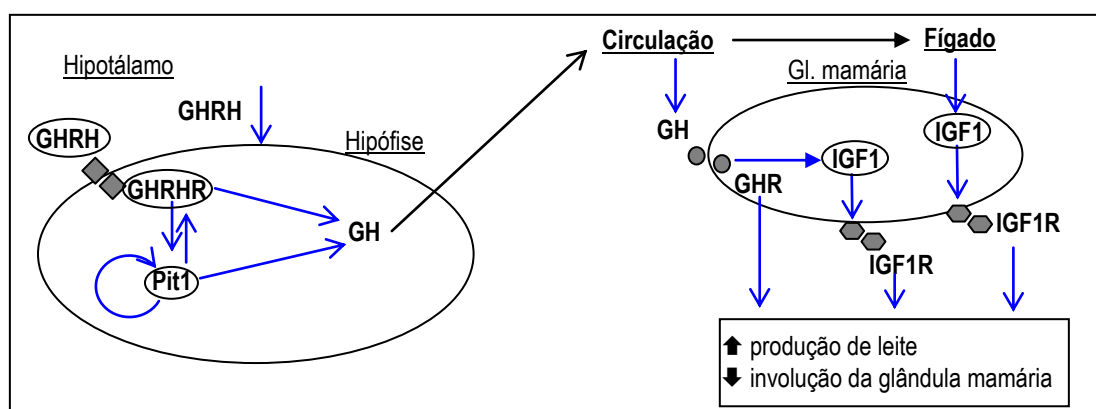
Polimorfismos de DNA afetam a expressão do gene devido a modificações no *splicing* alternativo, alterações na estabilidade do RNA, na taxa e regulação da transcrição gênica ou na sequência de aminoácidos (Parmentier *et al.* 1999). Para a produção de leite, diferenças de desempenho são observadas entre os animais devido a alterações que ocorrem em genes que codificam os hormônios e fatores de crescimento envolvidos na fisiologia da lactação.

A utilização da técnica de *Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP) tem permitido a identificação, em bovinos, de polimorfismos nos genes do eixo somatotrópico – *hormônio liberador do hormônio do crescimento* (*GHRH*)/*HaeIII* (Moody *et al.* 1995), *receptor do hormônio liberador do hormônio do crescimento* (*GHRHR*)/*Eco57I* (Connor *et al.* 1999), *fator de transcrição da pituitária 1* (*Pit1*)/*Hinfl* (Woollard *et al.* 1994), *hormônio do crescimento* (*GH*)/*MspI* (Zhang *et al.* 1993), *fator de crescimento semelhante à insulina 1* (*IGF1*)/*SnaBI* (Ge *et al.* 2001) e *receptor do fator de crescimento semelhante à insulina 1* (*IGF1R*)/*TaqI* (Moody *et al.* 1996).

O GH é sintetizado, estocado e secretado, de forma pulsátil, pelas células somatotróficas da glândula adeno-hipófise (Petersenn & Schulte 2000), podendo ser produzido também nas gônadas, placenta e glândula mamária (Hull & Harvey 2001). Este hormônio tem uma importante função na mamogênese, lactogênese, galactopoiese e involução da glândula mamária (Svennersten-Sjaunja & Olsson 2005). Segundo Etherton & Bauman (1998), o mesmo favorece a síntese do leite, possibilita maior disponibilidade de nutrientes para a produção láctea, aumenta a atividade e a manutenção das células secretórias e proporciona um maior aporte sanguíneo para a glândula mamária.

Os numerosos hormônios neuroendócrinos que afetam a secreção do GH em animais domésticos têm sido revisados (McMahon *et al.* 2001). Dois principais peptídeos estão envolvidos: GHRH e somatostatina (Secchi & Borromeo 1997). O GHRH atua por meio de sua ligação a um receptor específico nos somatotrofos, o GHRHR (Horikawa *et al.* 2001), estimulando a liberação do GH, e a somatostatina inibe a secreção do mesmo (Tuggle & Trenkle 1996). O Pit1 parece importante na expressão específica do *GHRHR* (Mayo *et al.* 2000) e requerido na expressão do *GH*, *prolactina* e *subunidade β da tireotropina* (Tuggle & Trenkle 1996). Depois de liberado, o GH pode agir diretamente nos tecidos (Flint & Gardner 1994) e ainda ter suas ações mediadas pelo IGF1 local ou hepático (Hull & Harvey 2001), o qual atua pela ligação ao IGF1R na superfície celular (Gluckman *et al.* 1987).

A Figura 1 representa, esquematicamente, as interações gênicas na via do GH e seus efeitos na lactação.



Gl. mamária = célula da glândula mamária.

Figura 1 - Representação esquemática das interações gênicas na via do GH e seus efeitos na lactação.

Considerando o papel fundamental do eixo somatotrópico na regulação da lactação, os polimorfismos identificados nos genes da via do GH em bovinos têm sido estudados visando à associação de diferenças genéticas a características de produção leiteira e, conseqüentemente, incorporação de marcadores moleculares nos programas de seleção e acasalamento.

O Girolando se refere ao gado leiteiro tropical com $\frac{5}{8}$ de genes Holandês e $\frac{3}{8}$ de genes Gir. A criação brasileira desta raça possibilitou aliar a rusticidade do Gir à capacidade produtiva do Holandês em um mesmo animal, com qualidades importantes para produção de leite nos trópicos. Entretanto, trabalhos envolvendo marcadores moleculares na raça Girolando são bastante limitados. A descoberta e validação de marcadores têm sido realizadas em *Bos taurus* e recentemente em *Bos indicus*, sendo imprescindível o desenvolvimento de pesquisas em animais mestiços, já que marcadores moleculares podem apresentar expressões distintas, assim como efeitos variados nos caracteres de interesse para os diversos grupos genéticos, populações-alvo e condições de ambiente.

Considerando a importância de se desenvolver estudos, principalmente em sistemas de criação brasileiros, analisando possíveis associações entre variações moleculares e características economicamente importantes na raça Girolando, o presente trabalho teve como objetivo associar os polimorfismos nos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1*, *IGF1R* à produção total de leite, produção média diária de leite e duração da lactação, verificando os efeitos das interações gênicas, com a finalidade de se determinar combinações genotípicas favoráveis que possam ser empregadas como ferramentas para complementar os métodos clássicos de melhoramento, visando à seleção mais rápida e eficiente dos animais Girolando.

Material e Métodos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia (INGEB/UFU), com o apoio do BioGenetics Tecnologia Molecular *Ltda*, Uberlândia - Minas Gerais.

1. Material Biológico e Coleta de Dados

Para a realização deste experimento, foram coletadas amostras de sangue de 356 fêmeas da raça Girolando ($\frac{5}{8}$ Holandês e $\frac{3}{8}$ Gir), provenientes de diversas fazendas (Tabela 1).

Tabela 1 - Relação do número de fazendas e fêmeas da raça Girolando utilizadas no presente estudo por município brasileiro.

Estado	Município	Número de Fazendas	Número de Fêmeas
Minas Gerais	Araguari	1	15
	Araxá	2	26
	Baldim	1	52
	Carmo do Rio Claro	1	20
	Itaúna	1	14
	Oliveira	1	10
	Onça de Pitangui	1	45
	Uberaba	2	24
	Uberlândia	2	65
Goiás	Goiás	1	10
	Gouvelândia	1	6
	Quirinópolis	1	19
São Paulo	Icém	1	6
	Nova Granada	1	21
Rio de Janeiro	Miguel Pereira	1	23
Total		18	356

Os animais são registrados pela Associação Brasileira dos Criadores de Girolando e participam de um Controle Leiteiro Oficial (CLO). O CLO, ferramenta principal na seleção de gado de leite, consiste na mensuração e correspondente registro da produção individual das matrizes, tendo como finalidade a estimativa da produção de leite, gordura, proteína e outros componentes quanti-qualitativos por lactação para a comparação entre indivíduos por meio do seu valor genético.

Baseada nas normas e procedimentos presentes na Portaria Nº45 de 10 de outubro de 1986 da Secretaria Nacional de Produção Agropecuária do Ministério da Agricultura (Normas Técnicas para a execução do Serviço de Controle Leiteiro em Bovídeos), a Associação desenvolveu um regulamento destinado ao Serviço de Controle Leiteiro da Raça Girolando, o qual se encontra no Anexo 1.

Os dados do CLO foram disponibilizados pelo Serviço de Controle Leiteiro da Associação, incluindo informações de produção total de leite, produção média diária de leite e duração da lactação, referentes às lactações individualizadas dos animais Girolando.

As amostras de sangue foram coletadas da veia mamária dos animais em tubos tipo *vacutainer*, com solução anticoagulante e, em seguida, encaminhadas ao Laboratório de Genética Molecular, INGEB/UFU, para a extração do DNA total.

2. Extração de DNA

O DNA das amostras de sangue dos animais foi extraído a partir de uma alíquota de 500 μ L retirada da camada de leucócitos e colocada em um *eppendorf* de 2 mL, com a adição de 1 mL de tampão de lise não diluído (20 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 640 mM sacarose; 10 mM $MgCl_2$; 4% Triton X-100), realizando-se uma centrifugação a 8000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* lavado duas vezes com tampão de lise diluído (1:1). Posteriormente, 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1 mM EDTA) + sarcosyl 1%, 10 μ L de proteinase K (10 mg/mL) foram adicionados ao *pellet* e a solução incubada a 65 °C *overnight*. Em seguida, foram acrescentados 300 μ L de 8 M guanidina-HCl / 0,49 M de acetato de amônia, procedendo-se vigorosa agitação durante 1 hora a temperatura ambiente. O DNA foi precipitado com 800 μ L de isopropanol absoluto com posterior centrifugação a 8000 rpm durante 10 minutos. O *pellet* de DNA foi lavado mais duas vezes com isopropanol 60% (8000 rpm por 2 minutos), diluído em 500 μ L de tampão TE e estocado a 4 °C.

A quantidade e integridade do DNA foram verificadas por eletroforese em gel de agarose 1,5%, utilizando 100 volts durante 1 hora, tampão de corrida TBE (45 mM Tris-Borato pH 8,3; 1 mM EDTA) 0,5 X, brometo de etídio (10 μ g/mL) para coloração e visualização sob luz ultravioleta pelo sistema de vídeo documentação *ImageMaster*® VDS (Pharmacia Biotech).

3. Genotipagem dos Animais

A genotipagem das 356 fêmeas Girolando para os genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R* foi realizada por PCR-RFLP.

As sequências de todos os *primers* utilizados na pesquisa, os fragmentos gerados, os sítios de restrição de cada enzima e as localizações cromossômicas dos genes estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Sequências dos oligonucleotídeos para a amplificação dos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1*, *IGF1R*, tamanho dos fragmentos gerados (pb - pares de base), sítios de restrição de cada enzima e localizações cromossômicas dos genes.

Gene	Sequência de <i>Primers</i> 5'-3' (<i>forward/reverse</i>)	Tamanho (pb)	Sítio de Restrição	Cromossomo
<i>GHRH</i>	GTAAGGATGC(C/T)(A/G)CTCTGGGT TGCCTGCTCATGATGTCCTGGA	455	<i>HaeIII</i> 5'-G G [^] C C-3' 3'-C C [^] G G-5'	13
<i>GHRHR</i>	ACGCCACCCTCTTTCACCAG CATCCTGGGTGCTTCTTGAAG	425	<i>Eco57I</i> 5'-C T G A A G(N) ₁₆ [^] -3' 3'-G A C T T C(N) ₁₄ [^] -5'	4
<i>Pit1</i>	AAACCATCATCTCCCTTCTT AATGTACAATGTGCCTTCTGAG	451	<i>HinfI</i> 5'-G [^] A N T C-3' 3'-C T N A [^] G-5'	1
<i>GH</i>	ATCCACACCCCCTCCACACAGT CATTTTCCACCCTCCCCTACAG	891	<i>MspI</i> 5'-C [^] C G G-3' 3'-G G C [^] C-5'	19
<i>IGF1</i>	ATTACAAAGCTGCCTGCCCC ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT	249	<i>SnaBI</i> 5'-T A C [^] G T A-3' 3'-A T G [^] C A T-5'	5
<i>IGF1R</i>	CCCAATGGATTGATCCTCATGT GCTGTGTAGTTCCCTGGGTT	625	<i>TaqI</i> 5'-T [^] C G A-3' 3'-A G C [^] T-5'	21

A seguir se encontram descritas as condições de reação, amplificação e de restrição enzimática para cada gene estudado, as quais foram experimentalmente determinadas. Todas as reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (MJ Research).

PCR-RFLP para o Gene *GHRH*

A reação de PCR-RFLP foi desenvolvida baseada no trabalho de Moody *et al.* (1995). O produto amplificado do gene *GHRH* bovino abrange parte do *exon* 2, *intron* 2 e parte do *exon* 3, com o sítio polimórfico localizado no *intron* 2 (Dybus & Grzesiak 2006).

A amplificação do gene *GHRH* foi realizada com 150 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1 mM de $MgCl_2$; 100 μM de dNTP (cada um) e 3,5 pmoles dos *primers forward* (*exon* 2) e *reverse* (*exon* 3), em um volume de 25 μL . O seguinte programa foi utilizado: 95 °C por 5 minutos; 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 58 °C durante 40 segundos e 72 °C por 40 segundos; extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Uma alíquota de 20 μL do amplificado foi submetida à restrição enzimática a 37 °C por no mínimo 2 horas, com 1 U da enzima *HaeIII* (Invitrogen) e tampão da enzima 1 X, para um volume final de 22,5 μL .

PCR-RFLP para o Gene *GHRHR*

A genotipagem dos animais foi realizada tendo como referência o trabalho de Connor *et al.* (1999). As regiões de ligação do *primer forward* e *reverse* estão presentes, respectivamente, no *exon* 6 e *intron* 6 do gene *GHRHR* bovino, com o polimorfismo localizado provavelmente no *intron* 6.

A reação de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para o *GHRHR* foi feita em um volume final de 30 μL , com o uso de 100 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1,5 mM de $MgCl_2$; 100 μM de cada dNTP e 5,0 pmoles dos *primers*, sendo incubada a 95 °C por 30 segundos, 62 °C durante 30 segundos, 72 °C por 40 segundos (total de 35 ciclos), precedida de uma desnaturação inicial a 95 °C por 5 minutos e posterior extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Para a digestão de 20 μL do produto amplificado, em um volume total de 25 μL , foram incubados 1 U da enzima *Eco57I* (Fermentas), tampão da enzima 1 X e

0,01 mM do cofator enzimático SAM (*S-adenosylmethionine*) a 37 °C no período mínimo de 2 horas.

PCR-RFLP para o Gene *Pit1*

Os animais foram genotipados tendo como base o trabalho de Woollard *et al.* (1994). Os *primers* foram desenhados a partir de regiões do *intron V* e *exon 6* do gene *Pit1* bovino, sendo a base molecular do polimorfismo, segundo Dierkes *et al.* (1998), uma mutação silenciosa (G→A) no *exon 6*.

Para a amplificação, foram utilizados 150 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1,5 mM de MgCl₂; 100 µM de cada dNTP e 10,0 pmoles dos *primers* específicos para o gene *Pit1*, em um volume total de 30 µL. A reação foi realizada com o seguinte programa: 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos a 95 °C por 30 segundos, 56 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 5 minutos.

O produto gerado pela PCR foi submetido à restrição enzimática, com uso de 2 U da enzima *HinfI* (Invitrogen) e tampão da enzima 1 X, em um volume final de 25 µL, para digerir 20 µL do amplificado em 5 horas a 37 °C.

PCR-RFLP para o Gene *GH*

Os animais foram genotipados para o polimorfismo localizado por Zhang *et al.* (1993) no *intron 3* do gene *GH* em bovino, cuja base molecular parece ser uma transição C→T na posição 1547 (Yao *et al.* 1996). O produto amplificado abrange parte do *intron 2*, *exon III*, *intron 3*, *exon IV* e parte do *intron 4*.

A PCR foi realizada em um volume de 50 µL, nas seguintes condições: 150 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1,0 mM de MgCl₂; 100 µM de dNTP (cada um) e 5,0 pmoles dos *primers forward* (*intron 2*) e *reverse* (*intron 4*) para o gene *GH*. Posteriormente, a solução foi submetida a 36 ciclos, tendo o primeiro ciclo uma desnaturação inicial de 97 °C por 1 minuto e 30 segundos, ligação dos *primers* de 64 °C por 1 minuto e extensão de 72 °C durante 1 minuto, seguido de 35 ciclos a 94 °C por 1 minuto, 64 °C por 1 minuto, 72 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 5 minutos.

Uma alíquota de 10 µL do produto amplificado por PCR foi incubada com 5 U da enzima *MspI* (Fermentas) e tampão da enzima 1 X, em um volume final de 15 µL, para a digestão enzimática a 37 °C por no mínimo 2 horas.

PCR-RFLP para o Gene *IGF1*

A reação de PCR-RFLP foi desenvolvida baseada no trabalho de Ge *et al.* (2001). O polimorfismo identificado anteriormente por Ge *et al.* (1997) é um ponto de mutação T (alelo A)→C (alelo B) na região regulatória do gene *IGF1* bovino, 512 pb *upstream* do códon de iniciação ATG.

Para amplificação do gene *IGF1* foram utilizados 100 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1,5 mM de MgCl₂; 100 µM de cada dNTP e 5,0 pmoles dos *primers*, em um volume de 30 µL. A reação foi realizada com o programa descrito a seguir: 95 °C por 5 minutos; 30 ciclos de 94 °C por 1 minuto, 58 °C durante 45 segundos e 72 °C por 1 minuto; extensão final a 72 °C por 10 minutos.

Um volume de 20 µL do amplificado foi digerido a 37 °C por 5 horas, com 2 U da enzima *SnaBI* (Amersham Pharmacia) e tampão da enzima 1 X, para uma solução total de 25 µL.

PCR-RFLP para o Gene *IGF1R*

O polimorfismo identificado no gene *IGF1R* bovino por Moody *et al.* (1996) foi utilizado para a genotipagem dos animais e está localizado em uma região não codificante (*intron*) do gene (Curi *et al.* 2005).

A reação de amplificação do gene *IGF1R* para um volume total de 30 µL e com 100 ng de DNA genômico; 1 U de *Taq* DNA polimerase Platinum (Invitrogen); tampão da enzima 1 X; 1,5 mM de MgCl₂; 100 µM de cada dNTP e 10,0 pmoles dos *primers*, foi submetida a 35 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 62 °C durante 40 segundos, 72 °C por 40 segundos, com uma desnaturação inicial de 95 °C por 5 minutos e extensão final de 72 °C por 5 minutos.

Para a restrição de 20 µL do produto amplificado, em um volume final de 25 µL, 2 U da enzima *TaqI* (Fermentas) e tampão da enzima 1 X foram incubados a 65 °C *overnight*.

4. Análise das Reações de PCR-RFLP

Os amplicons obtidos após a digestão para os polimorfismos *GHRH/HaeIII*, *GHRHR/Eco57I*, *Pit1/Hinfl*, *GH/MspI*, *IGF1/SnaBI* e *IGF1R/TaqI* foram separados eletroforéticamente em gel de agarose 2,5%, utilizando 120 volts durante 1 hora, tampão de corrida TBE (45 mM Tris-Borato pH 8,3; 1 mM EDTA) 0,5 X e brometo de etídio (10 µg/mL) para coloração. As imagens do gel foram capturadas sob luz ultravioleta pelo aparelho *ImageMaster*[®] VDS (Pharmacia Biotech).

Os genótipos dos animais foram determinados para cada gene por meio da identificação do tamanho dos fragmentos gerados após a restrição enzimática, os quais foram comparados a padrões de DNA de tamanho conhecido (*ladder*).

5. Análises Estatísticas

As frequências genotípicas e alélicas foram calculadas e o equilíbrio da população foi investigado conforme modelagem matemática proposta por Hardy-Weinberg, realizando-se o teste do χ^2 e utilizando $p^2 + 2pq + q^2$ para analisar as frequências genotípicas esperadas, a partir das frequências alélicas previamente observadas. Devido à presença de uma classe genotípica com pequeno número de animais, a correção de Yates, que consiste em subtrair 0,5 dos desvios entre a frequência observada e a esperada, foi utilizada para o gene *IGF1R* visando uma melhor acurácia do teste (Ramalho *et al.* 2000).

Nos estudos individuais e na análise das interações gênicas, a associação entre os polimorfismos nos genes da via do GH e as características produção total de leite, produção média diária de leite e duração da lactação foi verificada pelo modelo misto, utilizando o procedimento *Mixed* do programa estatístico SAS 9.1.3 (*Statistical Analysis System* 2005) e o teste t de *Student* para a comparação das médias agrupadas por genótipos:

$$y_{ijk(l)mnop} = \mu + R_i + G_j + \delta_{ijk(l)} + S_{m(i)} + A_n + M_o + O_p + \beta (l_{ijk(l)mnop} - \bar{l}) + \varepsilon_{ijk(l)mnop}$$

em que:

$y_{ijk(l)mnop}$ = valor observado da característica em estudo;

μ = média geral;

R_i = efeito fixo do i -ésimo rebanho, com $i = 1, 2, \dots, 18$;

G_j = efeito fixo do j -ésimo genótipo; $j = 1, 2, 3$;

$\delta_{ijk(l)}$ = efeito aleatório associado a l -ésima vaca (com $l = 1, 2, \dots, 350$ para a característica produção total de leite e $l = 1, 2, \dots, 352$ para produção média diária de leite e duração da lactação) dentro do k -ésimo pai (com $k = 1, 2, \dots, 136$), no j -ésimo genótipo e i -ésimo rebanho; assumindo $\delta_{ijk(l)} \sim N(0, I\sigma_d^2)$, em que $I\sigma_d^2$ é a matriz identidade de variância e covariância, pois se assume independência de resíduos;

$S_{m(i)}$ = efeito fixo do m -ésimo sistema alimentar dentro da i -ésimo rebanho; $m = 1, 2$;

A_n = efeito fixo do n -ésimo ano de parto; $n = 1, 2, \dots, 13$ para a produção total de leite e $n = 1, 2, \dots, 14$ para produção média diária de leite e duração da lactação;

M_o = efeito fixo do o -ésimo mês de parto; $o = 1, 2, \dots, 12$;

O_p = efeito fixo da p -ésima ordem de parto; $p = 1, 2, \dots, 7$;

β = coeficiente linear (covariável) associado à duração da lactação (para a característica produção total de leite);

$l_{ijk(l)mnop}$ = duração da lactação (para produção total de leite);

$\bar{l}$ = média da duração da lactação (para produção total de leite);

$\varepsilon_{ijk(l)mnop}$ = efeito aleatório associado a l -ésima vaca dentro do k -ésimo pai, no j -ésimo genótipo e i -ésimo rebanho na p -ésima ordem de parto; assumindo $\varepsilon_{ijk(l)mnop} \sim V(0, V\sigma_e^2)$, sendo que $V\sigma_e^2$ é a matriz de variância e covariância que foi modelada, pois se assume dependência de resíduos.

Em adição aos efeitos dos genes estudados, o modelo incluiu os efeitos fixos de fazenda, regime alimentar adotado na fazenda, ordem da lactação, mês e ano do início da lactação. Para produção total de leite, considerou-se ainda, como covariável, o efeito linear da duração da lactação, em dias. Os efeitos aleatórios do pai da vaca, vaca dentro da fazenda e do resíduo também foram pesquisados. Simultaneamente, foi considerada uma estrutura de componentes de variância devido às medidas repetidas no mesmo animal.

As variáveis com valores discrepantes foram eliminadas da análise, assim como foram desconsideradas e/ou agrupadas classes com poucas observações.

Todos os animais analisados eram ordenhados duas vezes ao dia. Devido à baixa frequência, as lactações de ordens maiores do que sete (8, ..., 11) foram consideradas de sétima ordem. Os regimes alimentares foram agrupados em 1 = extensivo (pasto com suplemento de sal mineralizado) ou semi-intensivo (pasto com suplementação volumosa mais mineralizado) e 2 = intensivo (confinamento).

Os efeitos das interações gênicas nas características de produção de leite foram estudados considerando-se dois genes: *Pit1/GHRH*, *Pit1/GHRHR*, *Pit1/GH*, *Pit1/IGF1*, *Pit1/IGF1R*, *GHRH/GHRHR*, *GH/GHRH*, *IGF1/GHRH*, *IGF1R/GHRH*, *GH/GHRHR*, *IGF1/GHRHR*, *IGF1R/GHRHR*, *IGF1/GH*, *IGF1R/GH* e *IGF1/IGF1R*.

Resultados

1. Genotipagem dos Animais

Os padrões genotípicos obtidos para os genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R* após a reação de PCR-RFLP estão representados na Figura 2.

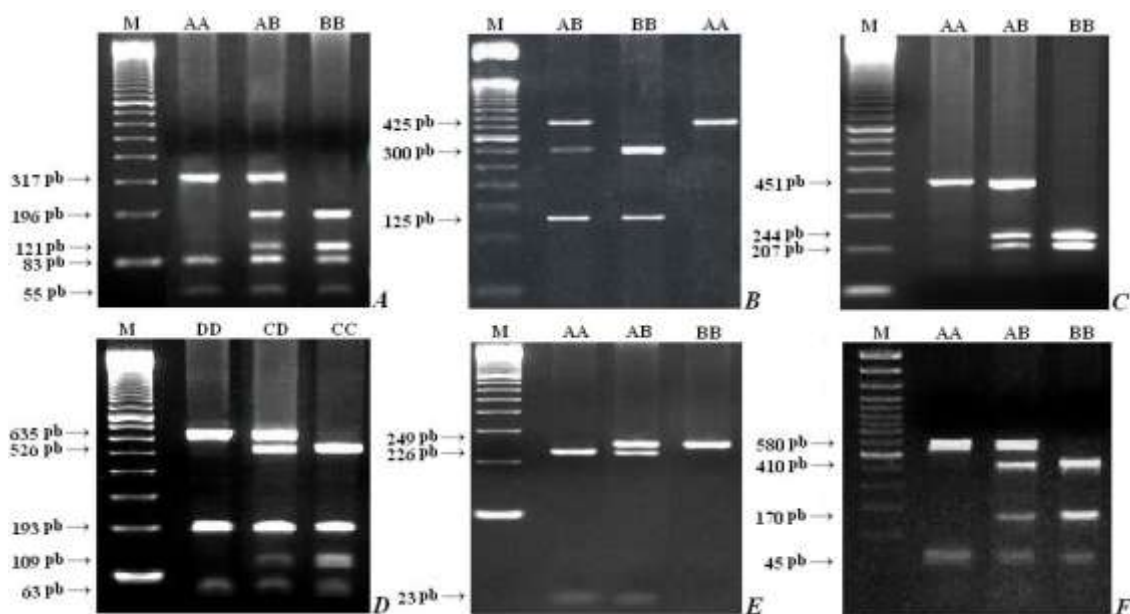


Figura 2 - Padrões genotípicos obtidos por eletroforese em gel de agarose 2,5% para os polimorfismos nos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R*, após a reação de PCR-RFLP.

A- *GHRH/HaeIII*; B- *GHRHR/Eco57I*; C- *Pit1/HinfI*; D- *GH/MspI*; E- *IGF1/SnaBI*; F- *IGF1R/TaqI*. M - Marcador de peso molecular de 50 pb (B) e 100 pb (A, C, D, E, F).

Dois alelos, A e B, foram identificados para o polimorfismo *GHRH/HaeIII*. O genótipo AA apresentou três fragmentos de 317, 83 e 55 pb, enquanto o genótipo BB revelou fragmentos de 196, 121, 83 e 55 pb. Os animais heterozigotos foram caracterizados pela presença de cinco fragmentos, devido à combinação dos dois padrões homozigotos (Figura 2A).

O polimorfismo *GHRHR/Eco57I* gerou dois alelos, A e B. O genótipo AA, com 425 pb, foi determinado pela ausência de digestão enzimática. O genótipo BB foi caracterizado pela presença de dois fragmentos de restrição, 300 e 125 pb. Os animais AB apresentaram três fragmentos de 425, 300 e 125 pb (Figura 2B).

Duas variantes genéticas do polimorfismo *Pit1/HinfI* foram observadas, A e B. A ausência do sítio para a restrição enzimática possibilitou a identificação do genótipo AA, com 451 pb. O genótipo BB revelou dois fragmentos de 244 e 207 pb. Os animais AB foram identificados pela presença de três fragmentos de 451, 244 e 207 pb (Figura 2C).

Dois diferentes alelos foram encontrados para o polimorfismo *GH/MspI*. Os indivíduos homozigotos para o alelo C foram caracterizados pelos fragmentos de 526, 193, 109 e 63 pb, enquanto homozigotos para o alelo D foram determinados

pela presença de 635, 193 e 63 pb. Os animais heterozigotos apresentaram cinco fragmentos de 635, 526, 193, 109 e 63 pb (Figura 2D).

Foram verificados dois alelos, A e B, para o polimorfismo *IGF1/SnaBI*. O genótipo AA revelou dois fragmentos de restrição de 226 e 23 pb, o genótipo BB foi determinado pela presença de um único fragmento de 249 pb e o genótipo AB apresentou três fragmentos de 249, 226 e 23 pb (Figura 2E).

Para o polimorfismo *IGF1R/TaqI*, os alelos A e B foram observados. Dois fragmentos de 580 e 45 pb caracterizaram o genótipo AA, enquanto o genótipo BB revelou três fragmentos de restrição, 410, 170 e 45 pb. Os animais AB foram identificados pela presença de fragmentos de 580, 410, 170 e 45 pb (Figura 2F).

2. Frequências Genotípicas e Alélicas

As frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos *GHRH/HaeIII*, *GHRHR/Eco57I*, *Pit1/Hinfl*, *GH/Mspl*, *IGF1/SnaBI*, *IGF1R/TaqI* estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3 - Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos nos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R* em bovinos da raça Girolando.

Genes	Frequência				
	Genotípica			Alélica	
<i>GHRH</i>	AA (n=10) 0,0281	AB (n=131) 0,3680	BB (n=215) 0,6039	A 0,2121	B 0,7879
<i>GHRHR</i>	AA (n=34) 0,0955	AB (n=171) 0,4803	BB (n=151) 0,4242	A 0,3357	B 0,6643
<i>Pit1</i>	AA (n=21) 0,0590	AB (n=108) 0,3034	BB (n=227) 0,6376	A 0,2107	B 0,7893
<i>GH</i>	CC (n=147) 0,4129	CD (n=145) 0,4073	DD (n=64) 0,1798	C 0,6166	D 0,3834
<i>IGF1</i>	AA (n=33) 0,0927	AB (n=153) 0,4298	BB (n=170) 0,4775	A 0,3076	B 0,6924
<i>IGF1R</i>	AA (n=246) 0,6910	AB (n=106) 0,2978	BB (n=4) 0,0112	A 0,8399	B 0,1601

n = número de animais.

Os resultados do teste do χ^2 demonstraram que a população estudada está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p > 0,05$) para os genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *IGF1* e *IGF1R*, indicando que tanto as frequências alélicas como as genóticas se mantêm constantes de geração a geração. No entanto, o teste do χ^2 revelou que as frequências genóticas para o gene *GH* não estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 0,05$), verificando-se, com os resultados, uma baixa heterozigose e sobre-representação dos genótipos CC e DD no rebanho avaliado.

3. Análise de Associação

Estudo de Associação dos Genes Individuais

Os efeitos dos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R* nos índices produtivos estudados se encontram na Tabela 4. Não foi possível a realização do estudo da associação entre o polimorfismo *IGF1R/TaqI* e a produção média diária de leite.

O gene *GHRH* apresentou um efeito dominante ($p < 0,01$) para a produção total e média diária de leite.

Efeitos aditivos do gene *Pit1* foram verificados na produção total ($p < 0,05$) e produção média diária de leite ($p = 0,0558$).

O gene *GH* revelou efeitos aditivos ($p < 0,05$) para a produção total e média diária de leite.

Efeito dominante ($p = 0,0572$) do gene *IGF1R* foi observado na produção total de leite.

As médias dos quadrados mínimos (*Least Squares Means*) e respectivos erros padrões das características para cada genótipo estão presentes na Tabela 5. Os resultados deste trabalho não demonstraram associações significativas ($p > 0,05$) entre os polimorfismos *GHRHR/Eco57I*, *IGF1/SnaBI* e as características de produção leiteira estudadas.

Uma superioridade do genótipo AB ($p < 0,01$) foi verificada na associação entre o polimorfismo *GHRH/HaeIII* e a produção total de leite, quando comparado aos genótipos AA (+ 395,68 kg) e BB (+ 185,33 kg). Para a produção média diária

de leite, um efeito favorável do genótipo AB também foi observado em relação ao AA ($p = 0,0382$) e BB ($p = 0,0079$) (+ 1.120 g e + 560 g, respectivamente).

O estudo do polimorfismo *Pit1/Hinfl* revelou um efeito negativo do genótipo AA na produção total de leite (- 207,98 kg e - 232,49 kg), quando comparado ao AB ($p = 0,0572$) e BB ($p = 0,0325$), respectivamente. Uma diferença significativa ($p = 0,0558$) foi observada na produção média diária de leite entre AA (12,40 kg) e BB (13,15 kg), sendo o genótipo BB mais favorável para a característica.

Na análise do polimorfismo *GH/Mspl*, foi observada uma superioridade do genótipo CC em relação ao DD ($p = 0,0479$) para produção total de leite (+ 137,03 kg). Um efeito negativo do DD também foi demonstrado na produção média diária de leite, ao se comparar os genótipos CD ($p = 0,0515$) e CC ($p = 0,0222$) (- 490 g e - 570 g, respectivamente).

Tabela 4 - Efeitos dos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R* nas características produtivas em bovinos da raça Girolando.

Genes	Características					
	PT		PMD		DL	
	GL	p	GL	p	GL	p
<i>GHRH</i>						
Efeito Aditivo	887	0,1469	872	0,2880	792	0,8522
Efeito Dominante	773	0,0009*	757	0,0076*	624	0,7893
<i>GHRHR</i>						
Efeito Aditivo	909	0,1773	938	0,1472	723	0,4665
Efeito Dominante	923	0,6207	961	0,7744	867	0,0948
<i>Pit1</i>						
Efeito Aditivo	822	0,0325**	818	0,0558**	714	0,2321
Efeito Dominante	888	0,1779	904	0,3233	827	0,1131
<i>GH</i>						
Efeito Aditivo	893	0,0479**	923	0,0222**	807	0,9434
Efeito Dominante	853	0,4207	860	0,2887	743	0,2256
<i>IGF1</i>						
Efeito Aditivo	722	0,5949	713	0,3488	562	0,4324
Efeito Dominante	861	0,6663	884	0,1392	735	0,7849
<i>IGF1R</i>						
Efeito Aditivo	436	0,3423	-	-	266	0,7033
Efeito Dominante	603	0,0572**	-	-	425	0,4155

* Significativo em nível de 1% de probabilidade.

** Significativo em nível de 5% de probabilidade.

GL= Grau de Liberdade, PT= Produção Total de Leite, PMD= Produção Média Diária de Leite, DL= Duração da Lactação.

Tabela 5 - Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) das características de produção de leite para cada genótipo dos genes *GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*, *GH*, *IGF1* e *IGF1R*, em bovinos da raça Girolando.

Genes	Características		
	PT (kg)	PMD (kg)	DL (dias)
<i>GHRH</i>			
AA	3378,47 (158,83) ^b	12,31 (0,59) ^b	276,16 (13,31) ^a
AB	3774,15 (86,55) ^a	13,43 (0,34) ^a	276,97 (6,87) ^a
BB	3588,82 (83,00) ^b	12,87 (0,32) ^b	273,87 (6,61) ^a
<i>GHRHR</i>			
AA	3582,32 (108,34) ^a	12,76 (0,41) ^a	268,18 (8,76) ^a
AB	3611,66 (85,96) ^a	12,92 (0,33) ^a	278,47 (6,68) ^a
BB	3694,34 (83,78) ^a	13,19 (0,32) ^a	273,33 (6,55) ^a
<i>Pit1</i>			
AA	3443,64 (127,85) ^b	12,40 (0,48) ^b	263,52 (10,54) ^a
AB	3651,62 (87,24) ^a	13,01 (0,34) ^{ab}	278,19 (6,93) ^a
BB	3676,13 (83,54) ^a	13,15 (0,32) ^a	274,47 (6,58) ^a
<i>GH</i>			
CC	3679,47 (83,98) ^a	13,15 (0,33) ^a	272,79 (6,68) ^a
CD	3652,39 (84,08) ^{ab}	13,07 (0,33) ^a	278,29 (6,70) ^a
DD	3542,44 (97,85) ^b	12,58 (0,37) ^b	273,21 (7,95) ^a
<i>IGF1</i>			
AA	3698,57 (111,70) ^a	13,39 (0,42) ^a	280,19 (9,14) ^a
AB	3645,84 (88,51) ^a	12,91 (0,34) ^a	275,53 (6,96) ^a
BB	3645,78 (85,37) ^a	13,06 (0,33) ^a	273,68 (6,69) ^a
<i>IGF1R</i>			
AA	3678,17 (81,43) ^a	-	274,33 (6,40) ^a
AB	3570,12 (91,26) ^a	-	278,43 (7,25) ^a
BB	3860,40 (202,28) ^a	-	268,35 (16,48) ^a

Médias seguidas por letras diferentes dentro das colunas diferem estatisticamente em nível de 5% de probabilidade pelo teste t de *Student*.

PT= Produção Total de Leite, PMD= Produção Média Diária de Leite, DL= Duração da Lactação.

Os efeitos aditivos do alelo B (*Pit1/Hinfl*) e do alelo C (*GH/Mspl*) para a produção total de leite se encontram na Figura 3. As incorporações individuais de cada alelo B e C nos respectivos genótipos geram um aumento, respectivamente, de 116,2 kg e 68,51 kg de leite na lactação.

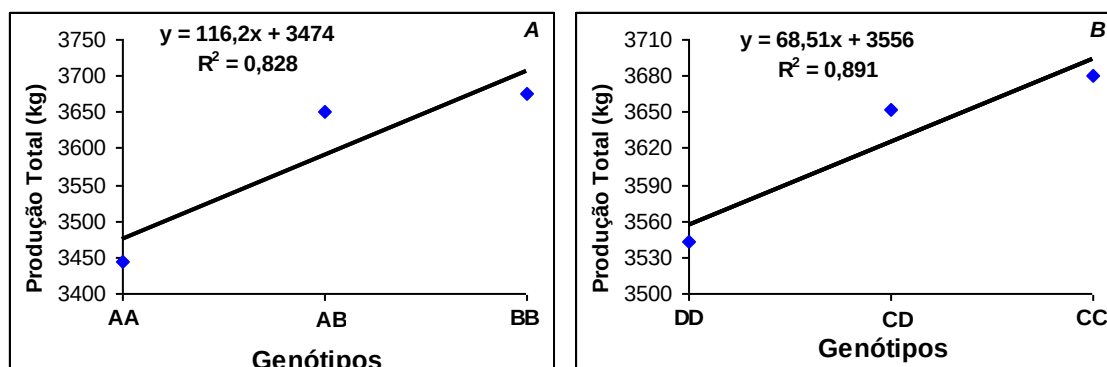


Figura 3 - Análise de regressão das médias dos quadrados mínimos da produção total de leite considerando os genótipos dos genes *Pit1* (A) e *GH* (B) em bovinos da raça Girolando.

Estudo de Associação das Interações Gênicas

Nas análises de associações das interações gênicas, efeitos significativos do *Pit1/GHRH*, *Pit1/GH*, *Pit1/IGF1R*, *GHRH/GHRHR*, *GH/GHRH*, *IGF1R/GHRH*, *GH/GHRHR*, *IGF1/GHRHR*, *IGF1R/GHRHR*, *IGF1/GH*, *IGF1R/GH* e *IGF1/IGF1R* não foram observados ($p > 0,05$) nas características de produção de leite.

Os resultados do presente trabalho demonstraram efeitos significativos do *Pit1/IGF1* para a produção total ($p = 0,0357$) e produção média diária de leite ($p = 0,0021$). O *Pit1/GHRHR* e *IGF1/GHRH* apresentaram um efeito significativo ($p = 0,0489$ e $p = 0,0265$, respectivamente) na duração da lactação.

As médias dos quadrados mínimos e os erros padrões das características para as interações significativas estão presentes nas Tabelas de 6 a 9. A análise da interação gênica *Pit1/IGF1* demonstrou a superioridade do genótipo BB (*Pit1*) na presença do AA (*IGF1*) ($p < 0,05$) para produção total (3948,96 kg) e produção média diária de leite (14,50 kg) (Tabelas 6 e 7, respectivamente).

Tabela 6 - Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica produção total de leite (kg) para a interação dos genes *Pit1* e *IGF1*, em bovinos da raça Girolando.

<i>IGF1</i>	<i>Pit1</i>		
	AA	AB	BB
AA	3183,14 (244,84) ^{Ab}	3552,29 (169,91) ^{Ab}	3948,96 (141,20) ^{Aa}
AB	3459,86 (212,53) ^{Aa}	3763,02 (109,50) ^{Aa}	3619,89 (93,16) ^{Ba}
BB	3496,56 (156,91) ^{Aa}	3586,56 (99,00) ^{Aa}	3673,51 (91,80) ^{Ba}

Médias seguidas por letras diferentes (maiúsculas na coluna, minúsculas na linha) diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de Student.

Tabela 7 - Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica produção média diária de leite (kg) para a interação dos genes *Pit1* e *IGF1*, em bovinos da raça Girolando.

<i>IGF1</i>	<i>Pit1</i>		
	AA	AB	BB
AA	11,65 (0,90) ^{Ab}	12,43 (0,61) ^{Ab}	14,50 (0,52) ^{Aa}
AB	12,19 (0,78) ^{Aa}	13,44 (0,41) ^{Aa}	12,81 (0,35) ^{Ba}
BB	12,66 (0,57) ^{Aa}	12,81 (0,38) ^{Aa}	13,21 (0,35) ^{Ba}

Médias seguidas por letras diferentes (maiúsculas na coluna, minúsculas na linha) diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de *Student*.

Com os resultados da análise do *Pit1/GHRHR* apresentados na Tabela 8, observou-se menor duração da lactação ($p = 0,0272$) para a interação genotípica AA(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (243,43 dias) quando comparada ao AA(*Pit1*)/AA(*GHRHR*) (299,57 dias), no entanto não houve diferença significativa ($p > 0,05$) em relação ao AA(*Pit1*)/AB(*GHRHR*) (271,55 dias). Fixando o genótipo AA (*Pit1*), sugere-se um possível efeito desfavorável do alelo B (*GHRHR*) no período de lactação.

Conforme a Tabela 8, verificou-se ainda menor duração da lactação para o AA(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (243,43 dias) comparado ao AB(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (278,19 dias) ($p = 0,0111$) e BB(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (271,01 dias) ($p = 0,0323$), sendo estes estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$). Considerando o genótipo BB (*GHRHR*), sugere-se um provável efeito negativo do alelo A (*Pit1*) no período de lactação.

A duração da lactação para o genótipo BB (*Pit1*) foi inferior na presença do AA (*GHRHR*), ao se comparar o efeito do genótipo AB (*GHRHR*) (- 23,89 dias) ($p = 0,0133$) (Tabela 8). Diferença significativa não foi encontrada ($p > 0,05$) entre BB(*Pit1*)/AA(*GHRHR*) (254,10 dias) e BB(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (271,01 dias), assim como entre BB(*Pit1*)/AB(*GHRHR*) (277,99 dias) e BB(*Pit1*)/BB(*GHRHR*) (271,01 dias).

Tabela 8 - Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica duração da lactação (dias) para a interação dos genes *Pit1* e *GHRHR*, em bovinos da raça Girolando.

<i>GHRHR</i>	<i>Pit1</i>		
	AA	AB	BB
AA	299,57 (23,37) ^{Aa}	274,28 (10,86) ^{Aa}	254,10 (10,87) ^{Ba}
AB	271,55 (14,50) ^{ABa}	274,89 (8,04) ^{Aa}	277,99 (7,09) ^{Aa}
BB	243,43 (13,64) ^{Bb}	278,19 (8,20) ^{Aa}	271,01 (7,00) ^{ABa}

Médias seguidas por letras diferentes (maiúsculas na coluna, minúsculas na linha) diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de *Student*.

O estudo da interação *IGF1/GHRH* (Tabela 9) revelou uma menor duração da lactação ($p < 0,05$) para *AB(IGF1)/AA(GHRH)* (190,34 dias), especialmente ao se comparar o efeito do *BB(IGF1)/AA(GHRH)* (294,52 dias) nesta característica.

Tabela 9 - Médias dos quadrados mínimos e erro padrão (em parênteses) da característica duração da lactação (dias) para a interação dos genes *IGF1* e *GHRH*, em bovinos da raça Girolando.

<i>GHRH</i>	<i>IGF1</i>		
	AA	AB	BB
AA	282,58 (22,62) ^{Aa}	190,34 (33,52) ^{Bb}	294,52 (17,19) ^{Aa}
AB	287,93 (12,13) ^{Aa}	282,35 (8,25) ^{Aa}	270,13 (7,85) ^{Aa}
BB	272,96 (12,20) ^{Aa}	274,14 (7,33) ^{Aa}	275,47 (7,24) ^{Aa}

Médias seguidas por letras diferentes (maiúsculas na coluna, minúsculas na linha) diferem estatisticamente ($p < 0,05$) pelo teste t de *Student*.

Discussão

O polimorfismo *GHRH/HaeIII*

Considerando o polimorfismo *GHRH/HaeIII*, observou-se neste estudo uma superioridade do heterozigoto na produção total e produção média diária de leite (Tabela 5), diferindo dos resultados apresentados na literatura. Na raça Polonesa Vermelha e Branca, um efeito favorável do homozigoto AA foi verificado para a produção e composição do leite (Kmieć *et al.* 2007), entretanto não foi encontrado efeito genotípico nas características de produção leiteira da raça Polonesa Preta e Branca (Dybus & Grzesiak 2006) e Frisona Italiana (Messina *et al.* 1999).

O estudo na raça Girolando demonstrou uma baixa frequência do genótipo AA (0,0281) (Tabela 3), inferior à frequência de 0,096 na raça Polonesa Vermelha e Branca (Kmieć *et al.* 2007), 0,0545 na raça Polonesa Preta e Branca (Dybus & Grzesiak 2006), 0,077 em touros Holandeses Frísios (Parmentier *et al.* 1999) e de 0,06 em animais Frísios Italianos (Messina *et al.* 1999). A frequência muito baixa do genótipo AA no rebanho Girolando pode ter interferido nos resultados, inibindo a presença de um efeito aditivo do alelo A para produção total e produção média diária de leite, visto que os animais AB foram superiores, quando comparados aos indivíduos BB para estas características, e/ou mascarando possíveis associações do polimorfismo *GHRH/HaeIII* com a duração da lactação. No entanto, o efeito de

heterose deve ser considerado, o que sugere a seleção dos animais heterozigotos para o aumento de produção de leite no rebanho.

O polimorfismo *GHRHR/Eco57I*

Os resultados desta pesquisa não demonstraram associações significativas entre o polimorfismo *GHRHR/Eco57I* e os caracteres de produção de leite (Tabela 5). No entanto, tem sido reportado que este polimorfismo pode interferir na ligação do GHRH ao seu receptor (GHRHR), comprometendo o estímulo para a secreção do GH nas células somatotróficas da adeno-hipófise (Parmentier *et al.* 1999). Se esta hipótese fosse verdadeira, haveria um decréscimo na produção leiteira com a redução da secreção do GH, e, certamente, a presença do genótipo desfavorável teria influência nos índices estudados, o que não foi evidenciado. Contudo, não se pode afirmar definitivamente que este polimorfismo no gene *GHRHR* não influi nas características associadas à produção de leite, visto que outros polimorfismos gênicos da via do GH podem estar atuando.

Pesquisas na espécie bovina envolvendo o polimorfismo *GHRHR/Eco57I* não foram encontradas na literatura.

O polimorfismo *Pit1/Hinfl*

O estudo do polimorfismo *Pit1/Hinfl* na raça Girolando revelou uma menor frequência do genótipo AA (0,0590) (Tabela 3), similarmente ao trabalho de Silva *et al.* (2006), que demonstraram pequena frequência do genótipo AA (0,0137) em animais F₁ (½ Holandês:½ Gir) e nenhum indivíduo AA na população F₂ (F₁ x F₁). Mattos *et al.* (2004) também não encontraram animais homozigotos para o alelo A em Gir. Os resultados apresentados justificam a menor frequência do genótipo AA no rebanho Girolando, visto ser esta raça oriunda do cruzamento Gir x Holandês.

Na raça Polonesa Preta e Branca, nenhuma associação foi verificada entre o polimorfismo *Pit1/Hinfl* e características de produção leiteira (Dybus *et al.* 2004). Em outro rebanho desta mesma raça, Zwierzchowski *et al.* (2002) observaram um efeito favorável do heterozigoto na produção diária de leite e seus componentes (sólidos totais, proteína, lactose, sólidos sem presença de gordura), enquanto o

genótipo AA afetou positivamente as concentrações dos sólidos totais, gordura e proteína. Em touros Holandeses, Renaville *et al.* (1997) e Parmentier *et al.* (1999) demonstraram uma superioridade do alelo A para produção de leite e proteína. Os resultados destes trabalhos diferem dos achados na raça Girolando, em que um efeito desfavorável do genótipo AA foi encontrado na produção de leite (Tabela 5).

As divergências encontradas entre as pesquisas podem ser explicadas por uma possível ligação do gene *Pit1* a outro(s) gene(s) influenciando o processo da lactação. Contudo, a presença de um efeito aditivo do alelo B na produção de leite sugere a utilização do polimorfismo *Pit1/Hinfl* para assistir a seleção dos animais Girolando e direcionar os cruzamentos, buscando um aumento da frequência do alelo B no rebanho e um provável acréscimo de 116,2 kg de leite na lactação para cada alelo favorável incorporado (Figura 3).

O polimorfismo *GH/Mspl*

Numerosos polimorfismos têm sido localizados no gene *GH* em bovinos. O estudo do polimorfismo *GH/Mspl* demonstrou um efeito desfavorável do genótipo DD na produção de leite da raça Girolando (Tabela 5), estando de acordo com os resultados dos trabalhos publicados anteriormente, os quais parecem indicar uma superioridade do alelo C na mesma característica. Pawar *et al.* (2007) verificaram o efeito favorável do alelo C na produção leiteira. Yao *et al.* (1996), Dybus (2002) e Zhou *et al.* (2005) observaram maiores produções de leite, proteína e gordura em animais CC, apesar de Falaki *et al.* (1996) não terem encontrado associações positivas entre o polimorfismo *GH/Mspl* e características de interesse na produção de leite.

Os alelos C e D do polimorfismo *GH/Mspl* apresentaram na raça Girolando frequência de 0,6166 e 0,3834, respectivamente (Tabela 3). Conforme a literatura, maiores frequências dos alelos C e D são geralmente encontradas em *Bos taurus* e *Bos indicus*, na mesma ordem. A frequência do alelo C foi de 0,875 em animais Holandeses Chineses (Beijing) (Zhou *et al.* 2005), 0,842 em Piemontês (Di Stasio *et al.* 2003), 0,873 na raça Polonesa Preta e Branca (Dybus 2002) e 0,63 na raça Chianina (Rodrigues *et al.* 1997), enquanto o alelo D teve uma frequência de 0,64 em animais Brahman (Beauchemin *et al.* 2006), 0,81 em Gir (Mattos *et al.* 2004) e

0,85 em Nelore (Unanian *et al.* 2000; Unanian *et al.* 2002). Considerando que a raça Girolando se refere ao animal 5% Holandês (*Bos taurus*) e 95% Gir (*Bos indicus*), maior frequência do alelo C seria mesmo esperada, mas observa-se ainda grande influência genética do Gir, com elevada frequência do alelo D.

Lagziel *et al.* (2000) também encontraram baixas e moderadas frequências do alelo D em *Bos taurus* e altas frequências em *Bos indicus*. Os mesmos autores verificaram ainda baixas frequências do alelo D em raças provenientes do norte da Europa, Europa Ocidental e África Ocidental, moderadas frequências em raças da Europa Oriental ou países do Mar Mediterrâneo e altas frequências em raças procedentes do subcontinente indiano, sugerindo que o alelo D tenha se originado possivelmente em *Bos indicus* e se difundido em raças taurinas. Esta hipótese foi reforçada em um estudo com 17 raças bovinas (*Bos indicus*), no qual Sodhi *et al.* (2007) observaram maior frequência do alelo D (média de 0,87) nos animais e um decréscimo na presença do mesmo à medida que se afastava do subcontinente indiano.

O efeito aditivo do alelo C (*GH/Mspl*) demonstrado na produção de leite da raça Girolando sugere a utilização deste polimorfismo para a seleção dos animais e escolha dos cruzamentos, visando aumentar a frequência do alelo C no rebanho e, conseqüentemente, obter a adição de 68,51 kg de leite na lactação para cada alelo favorável incorporado (Figura 3).

O polimorfismo *IGF1/SnaBI*

Os resultados do presente estudo não revelaram associações significativas entre o polimorfismo *IGF1/SnaBI* e os índices produtivos investigados (Tabela 5), concordando com a pesquisa de Hines *et al.* (1998) em animais Holandeses, na qual nenhum efeito do mesmo polimorfismo foi demonstrado nas características de produção leiteira. Diferentemente destes trabalhos, em Holandeses Frísios da Polônia, uma superioridade do heterozigoto foi observada por Siadkowska *et al.* (2006) tanto na produção diária de leite corrigida para gordura como na produção corrigida para gordura e proteína, e em bovinos de corte, uma maior produção de leite foi verificada por Kim & Marshall (1999) em animais com o genótipo AA. Não

foram encontrados na literatura outros estudos envolvendo a análise dos efeitos deste polimorfismo em bovinos de leite.

O alelo B do polimorfismo *IGF1/SnaBI* foi mais frequente (0,6924) na raça Girolando (Tabela 3), similarmente aos resultados de Curi *et al.* (2005), os quais observaram uma maior frequência do alelo B em Canchim (0,650), ½ Simental:½ Nelore (0,800) e em animais ½ Angus:½ Nelore (0,680).

O polimorfismo *IGF1R/TaqI*

No presente trabalho, foram demonstradas frequências baixas do genótipo BB (0,0112) e alelo B (0,1601) nos animais da raça Girolando (Tabela 3), estando de acordo com os resultados evidenciados por Curi *et al.* (2005), cuja pesquisa revelou a frequência média de 0,25 para o alelo B em diferentes grupos genéticos (Nelore, Canchim, ½ Simental:½ Nelore e ½ Angus:½ Nelore).

Efeitos significativos do polimorfismo *IGF1R/TaqI* nos índices produtivos da raça Girolando não foram verificados (Tabela 5), contudo a frequência muito baixa do genótipo BB (0,0112) no rebanho pode ter interferido nos resultados. Análises de associações entre este polimorfismo e características de interesse em bovinos de leite não foram encontradas na literatura, e conforme as conclusões de Moody *et al.* (1996), o uso do polimorfismo *IGF1R/TaqI* em estudos envolvendo a espécie bovina deve ser limitado devido à ausência do alelo B em *Bos taurus* e uma baixa frequência em *Bos indicus*.

Interações entre os polimorfismos gênicos

No estudo das interações gênicas, um efeito favorável do genótipo BB(*Pit1*) na presença do AA(*IGF1*) foi demonstrado para produção de leite (Tabelas 6 e 7). Segundo Tuggle & Trenkle (1996), o fator de transcrição *Pit1* apresenta um papel fundamental na expressão do gene *GH*. Baseado nesta informação da literatura, sugere-se que a presença do sítio de restrição para a enzima *Hinfl* no gene *Pit1* influencie positivamente a expressão do *GH*. Confirmando esta hipótese, Franco *et al.* (2005) observaram a associação de um polimorfismo no *intron 5* do *Pit1* em suínos com níveis de mRNA do *GH*.

O aumento na expressão do *GH* pode ocorrer por meio da auto-regulação do gene *Pit1* e/ou interferência na produção de transcritos alternativos. É possível que o fator *Pit1* regule favoravelmente a expressão do seu próprio gene (Chen *et al.* 1990) e que proteínas *Pit1* com diferenças funcionais se originem por *splicing* alternativo (Tuggle & Trenkle 1996).

O GH, após sintetizado e liberado pelas células somatotróficas da adeno-hipófise (Petersenn & Schulte 2000), pode ativar a produção local ou hepática do IGF1 para mediar os seus efeitos (Renaville *et al.* 2002) no processo da lactação. Sugere-se, a partir desta informação, que a maior expressão do *GH* proposta nos animais BB(*Pit1*) proporcione um aumento na secreção hormonal, estimulando a síntese do IGF1. No entanto, considerando o efeito poligênico das características quantitativas, o *Pit1* pode também estar ligado a outro(s) gene(s) que influenciam a lactação.

Animais BB(*Pit1*)/AA(*IGF1*) apresentaram maior produção de leite (3948,96 kg/lactação e 14,50 kg/dia) (Tabelas 6 e 7, respectivamente), quando comparados aos indivíduos BB(*Pit1*) (3676,13 kg/lactação e 13,15 kg/dia) (Tabela 5), indicando que a presença do genótipo AA(*IGF1*) deve potencializar os efeitos demonstrados na produção leiteira ao se incorporar o alelo B (*Pit1/Hinfl*). É provável que o ponto de mutação T→C no promotor do gene *IGF1* esteja ligado a polimorfismo(s) no mesmo ou em outro gene (Curi *et al.* 2005; Siadkowska *et al.* 2006).

Os resultados da análise dos efeitos da interação *Pit1/IGF1* comprovaram a participação destes genes na regulação da lactação e revelaram a importância da seleção de animais BB(*Pit1*)/AA(*IGF1*) para se obter uma maior produção de leite no rebanho.

A interação entre os polimorfismos no exon 6 (*Pit1*) e no intron 6 (*GHRHR*) apresentou um efeito significativo na duração da lactação. O GHRH hipotalâmico controla a secreção do GH por meio de sua ligação ao GHRHR nos somatotrofos. Segundo Mayo *et al.* (2000), o promotor do gene *GHRHR* contém sítios de ligação para o *Pit1*, demonstrando a importância deste fator de transcrição na expressão do receptor na adeno-hipófise e comprovando a interação gênica encontrada. O polimorfismo *Pit1/Hinfl*, possivelmente, está afetando a expressão do *GHRHR* e a disponibilidade de receptor para a ligação do GHRH, comprometendo a liberação do GH das células somatotróficas.

Supõe-se ainda que o polimorfismo *GHRHR/Eco57I* esteja interferindo no estímulo para a secreção do GH, já que variantes do *GHRHR* geradas por *splicing* alternativo foram caracterizadas em camundongo, rato, suíno, humano e devem diferir em suas propriedades sinalizantes (Petersenn & Schulte 2000).

Considerando o estudo do *Pit1/GHRHR*, é provável que haja uma interação cruzada e reversa entre os homozigotos para ambos os genes. Os resultados da análise desta combinação gênica parecem indicar um menor período de lactação para os indivíduos *AA(Pit1)/BB(GHRHR)* e *BB(Pit1)/AA(GHRHR)* (Tabela 8). Visto que o IGF1, sintetizado por estímulo do GH, atua como um fator de sobrevivência celular ou anti-apoptótico na glândula mamária (Sorensen & Knight 2002), uma redução na secreção do GH (conforme proposta anterior) pode afetar a produção do IGF1 e manutenção da sobrevivência celular, gerando a involução da glândula mamária e consequente declínio na duração da lactação.

O presente trabalho demonstrou claramente a interdependência dos genes *Pit1* e *GHRHR* influenciando o período de lactação, sendo fundamental, para um aumento na duração da lactação, a ausência de indivíduos *AA(Pit1)/BB(GHRHR)* e *BB(Pit1)/AA(GHRHR)* no rebanho.

Na análise da combinação gênica *IGF1/GHRH*, menor período de lactação foi verificado nos animais *AB(IGF1)/AA(GHRH)* (Tabela 9). Baseado na literatura, sabe-se que o *GHRH* interage com o seu receptor para estimular a produção e a liberação do GH. No entanto, se a expressão do gene *GHRHR* pode ser regulada pelo próprio *GHRH* (Petersenn & Schulte 2000), é provável que o polimorfismo no *intron 2* do *GHRH* interfira na expressão do seu receptor e, consequentemente, na secreção do GH, influenciando a síntese do IGF1, a sobrevivência das células na glândula mamária e a duração da lactação.

Diferença média de 104 dias foi observada no período de lactação entre os animais *AB(IGF1)/AA(GHRH)* (190,34 dias) e *BB(IGF1)/AA(GHRH)* (294,52 dias) (Tabela 9), demonstrando ainda a importância do polimorfismo *IGF1/SnaBI* nesta característica.

Considerando uma baixa frequência do genótipo *AA (GHRH/HaeIII)* na raça Girolando (Tabela 3), um possível efeito de amostragem pode ter comprometido os resultados encontrados no estudo da interação entre os genes *IGF1* e *GHRH*. No entanto, não se deve descartar a ação desta combinação gênica na duração

da lactação, ou seja, a manutenção de indivíduos AB(*IGF1*)/AA(*GHRH*) precisa ser evitada no rebanho para a obtenção de um maior período de lactação.

Apenas quatro interações significativas foram identificadas neste trabalho, mas envolveram polimorfismos em genes pertencentes ao início (*GHRH*, *GHRHR*, *Pit1*) e final (*IGF1*) do eixo somatotrópico, o que possibilita considerá-los capazes suficientemente de gerar alterações fundamentais em características de produção leiteira.

Os resultados discutidos no presente estudo comprovam a necessidade de se avaliar os efeitos das interações gênicas em características quantitativas, visto que combinações genótípicas diferentes podem apresentar ações completamente distintas e extremamente significativas nos índices avaliados.

A importância dos polimorfismos nos genes da via do GH observada nesta pesquisa sugere a incorporação da genética molecular na seleção dos animais da raça Girolando, buscando uma maior produção de leite e/ou duração da lactação. A utilização combinada da seleção baseada no desempenho fenotípico e seleção assistida por marcadores moleculares propiciará o desenvolvimento de esquemas de acasalamento garantindo na população um aumento na frequência dos alelos favoráveis às características de produção leiteira e, em consequência, programas mais eficientes de melhoramento genético.

Em conclusão, a identificação dos polimorfismos nos genes da via do GH como fatores genéticos que contribuem para variações nos índices produtivos dos animais Girolando sugere a possibilidade de serem utilizados nos programas de melhoramento da raça como marcadores moleculares para assistir a seleção dos indivíduos AB (*GHRH*/*HaeIII*), BB (*Pit1*/*HinfI*) e CC (*GH*/*MspI*), visando uma maior produção de leite no rebanho. Considerando os efeitos das combinações gênicas, o aumento na produção de leite pode ser obtido pela seleção de animais com a interação genotípica BB(*Pit1*)/AA(*IGF1*), e para maior duração da lactação, indica-se evitar a presença de indivíduos AA(*Pit1*)/BB(*GHRHR*), BB(*Pit1*)/AA(*GHRHR*) e AB(*IGF1*)/AA(*GHRH*) na população.

Referências

- Beauchemin V.R., Thomas M.G., Franke D.E. & Silver G.A. (2006) Evaluation of DNA polymorphisms involving growth hormone relative to growth and carcass characteristics in Brahman steers. *Genetics and Molecular Research* **5**, 438-47.
- Chen R.P., Ingraham H.A., Treacy M.N., Albert V.R., Wilson L. & Rosenfeld M.G. (1990) Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. *Nature* **346**, 583-6.
- Connor E.E., Ashwell M.S., Kappes S.M. & Dahl, G.E. (1999) Mapping of the bovine growth hormone-releasing hormone receptor (GHRH-R) gene to chromosome 4 by linkage analysis using a novel PCR-RFLP. *Journal of Animal Science* **77**, 793-4.
- Curi R.A., Oliveira H.N., Silveira A.C. & Lopes C.R. (2005) Association between IGF-1, IGF-1R and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livestock Production Science* **94**, 159-67.
- Dierkes B., Kriegesmann B., Baumgartner B.G. & Brenig B. (1998) Partial genomic structure of the bovine PIT1 gene and characterization of a HinfI transition polymorphism in exon 6. *Animal Genetics* **29**, 405.
- Di Stasio L., Brugiapaglia A., Destefanis G., Albera A. & Sartore S. (2003) GH1 as candidate gene for variability of meat production traits in Piemontese cattle. *Journal Animal Breeding and Genetics* **120**, 358.
- Dybus A. (2002) Associations of growth hormone (GH) and prolactina (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. *Animal Science Papers and Reports* **20**, 203-12.
- Dybus A., Szatkowska I., Czerniawska-Piatkowska E., Grzesiak W., Wójcik J., Rzewucka E. & Zych S. (2004) *PIT1-HinfI* gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. *Archiv für Tierzucht* **47**, 557-63.
- Dybus A. & Grzesiak W. (2006) GHRH/HaeIII gene polymorphism and its associations with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. *Archiv für Tierzucht* **49**, 434-8.
- Etherton T.D. & Bauman D.E. (1998) Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological Reviews* **78**, 745-61.

- Falaki M., Gengler N., Sneyers M., Prandi A., Massart S., Formigoni A., Burny A., Portetelle D. & Renaville R. (1996) Relationships of polymorphisms for growth hormone and growth hormone receptor genes with milk production traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *Journal of Dairy Science* **79**, 1446-53.
- Flint D.J. & Gardner M. (1994) 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. *Endocrinology* **135**, 1119-24.
- Franco M.M., Antunes R.C., Oliveira K.M., Pereira C.D., Biase F.H., Nunes F.M.F. & Goulart L.R. (2005) Association of a PIT1 gene polymorphism with growth hormone mRNA levels in pig pituitary glands. *Genetics and Molecular Biology* **28**, 16-21.
- Ge W., Davis M.E. & Hines H.C. (1997) Two SSCP alleles detected in the 5'-flanking region of bovine IGF1 gene. *Animal Genetics* **28**, 351-3.
- Ge W., Davis M.E., Hines H.C., Irvin K.M. & Simmen R.C. (2001) Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-1 concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science* **79**, 1757-62.
- Gluckman P.D., Breier B.H. & Davis S.R. (1987) Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *Journal of Dairy Science* **70**, 442-66.
- Hines H.C., Ge W., Zhao Q. & Davis M.E. (1998) Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor 1 loci with lactation traits in Holsteins. *Animal Genetics* **29**, 69.
- Horikawa R., Gaylinn B.D., Lyons C.E.Jr. & Thorner M.O. (2001) Molecular cloning of ovine and bovine growth hormone-releasing hormone receptors: the ovine receptor is C-terminally truncated. *Endocrinology* **142**, 2660-8.
- Hull K.L. & Harvey S. (2001) Growth hormone: roles in female reproduction. *The Journal of Endocrinology* **168**, 1-23.
- Kim J.H. & Marshall D.M. (1999) Associations of beef production traits with polymorphisms in the growth hormone gene and IGF (Insulin-Like Growth Factor-1) gene, *Beef report*.
- Kmieć M., Kowalewska-Luczak I., Kulig H., Terman A., Wierzbicki H. & Lepczyński A. (2007) Associations between GHRH/HaeIII restriction polymorphism and milk

- production traits in a herd of dairy cattle. *Journal of Animal and Veterinary Advances* **6**, 1298-303.
- Lagziel A., DeNise S., Hanotte O., Dhara S., Glazko V., Broadhead A., Davoli R., Russo V. & Soller M. (2000) Geographic and breed distribution of an Msp I PCR-RFLP in the bovine growth hormone (bGH) gene. *Animal Genetics* **31**, 210-3.
- Mattos K.K., Lama S.N.D., Martinez M.L. & Freitas A.F. (2004) Association of bGH and Pit-1 gene variants with milk production traits in dairy Gyr bulls. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **39**, 147-50.
- Mayo K.E., Miller T., DeAlmeida V., Godfrey P., Zheng J. & Cunha S.R. (2000) Regulation of the pituitary somatotroph cell by GHRH and its receptor. *Recent Progress in Hormone Research* **55**, 237-67.
- McMahon C.D., Radcliff R.P., Lookingland K.J. & Tucker H.A. (2001) Neuroregulation of growth secretion in domestic. *Domestic Animal Endocrinology* **20**, 65-87.
- Messina M., Vrech E., Pezzi P. & Prandi A. (1999) Marcatori genetici associati all'asse somatotropico e polimorfismo delle proteine del latte. *La Razza Bruna Italiana* **3**, 27-29.
- Moody D.E., Pomp D. & Barendse W. (1995) Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine growth hormone-releasing hormone gene. *Journal of Animal Science* **73**, 3789.
- Moody D.E., Pomp D. & Barendse W. (1996) Linkage mapping of the bovine insulin-like growth factor-1 receptor gene. *Mammalian Genome* **7**, 168-9.
- Parmentier I., Portetelle D., Gengler N., Prandi A., Bertozzi C., Vleurick L., Gilson R. & Renaville R. (1999) Candidate gene markers associated with somatotrophic axis and milk selection. *Domestic Animal Endocrinology* **17**, 139-48.
- Pawar R.S., Tajane K.R., Joshi C.G., Rank D.N. & Bramkshtri B.P. (2007) Growth hormone gene polymorphism and its association with lactation yield in dairy cattle. *Indian Journal of Animal Sciences* **77**, 884-8.
- Petersenn S. & Schulte H.M. (2000) Structure and function of the growth-hormone-releasing hormone receptor. *Vitamins and Hormones* **59**, 35-69.
- Ramalho M., Santos J.B. & Pinto C.B. (2000) Genética na agropecuária. Globo, São Paulo. 359p.

- Renaville R., Gengler N., Vrech E., Prandi A., Massart S., Corrandini C., Bertozzi C., Mortiaux F., Burny A. & Portetelle D. (1997) Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein-Friesian bulls. *Journal of Dairy Science* **80**, 3431-8.
- Renaville R., Hammadi M. & Portetelle D. (2002) Role of the somatotrophic axis in the mammalian metabolism. *Domestic Animal Endocrinology* **23**, 351-60.
- Rodrigues C.V., Guimarães S.E.F. & Pinheiro L.E.L. (1997) Frequências alélicas das variantes do hormônio de crescimento bovino por análise de polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição (RFLP) em raças de corte. *Revista Brasileira de Reprodução Animal* **21**, 189-92.
- Secchi C. & Borromeo V. (1997) Structure and function of bovine growth hormone: bovine growth hormone as an experimental model for studies of protein-protein interactions. *Journal of Chromatography B Biomedical Sciences and Applications* **688**, 161-77.
- Siadkowska E., Zwierzchowski L., Oprzadek J., Strzalkowska N., Bagnicka E. & Krzyzewski J. (2006) Effect of polymorphism in IGF-1 gene on production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *Animal Science Papers and Reports* **24**, 225-37.
- Silva M.V.G.B., Martinez M.L., Machado M.A., Nascimento C.S., Campos A.L., Guimarães M.F.M., Azevedo A.L.S., Moita A.K.F. & Lui J.F. (2006) Genes do eixo somatotrófico e características de crescimento numa população F2 de bovinos. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **41**, 981-6.
- Sodhi M., Mukesh M., Prakash B., Mishra B.P., Sobti R.C., Singh K.P., Singh S. & Ahlawat S.P.S. (2007) MspI allelic patterns of bovine growth hormone gene in Indian Zebu cattle (*Bos indicus*) breeds. *Biochemical Genetics* **45**, 145-53.
- Sorensen A. & Knight C.H. (2002) Endocrine profiles of cows undergoing extended lactation in relation on the control of lactation persistency. *Domestic Animal Endocrinology* **23**, 111-23.
- Statistical Analysis System (SAS) (2005) SAS user's guide: Statistical Analysis Systems. Version 6.11, SAS Instit., Inc, Cary, NC.
- Svennersten-Sjaunja K. & Olsson K. (2005) Endocrinology of milk production. *Domestic Animal Endocrinology* **29**, 241-58.

- Tuggle C.K. & Trenkle A. (1996) Control of growth hormone synthesis. *Domestic Animal Endocrinology* **13**, 1-33.
- Unanian M.M., Barreto C.C., Freitas A.R., Cordeiro C.M.T. & Josahkian L.A. (2000) Associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com a característica peso em bovinos da raça nelore. *Revista Brasileira de Zootecnia* **29**, 1380-6.
- Unanian M.M., Barreto C.C., Cordeiro C.M.T., Freitas A.R. & Josahkian L.A. (2002) Possible associations between bovine growth hormone gene polymorphism and reproductive traits. *Brazilian Archives of Biology and Technology* **45**, 293-9.
- Woollard J., Schmitz C.B., Freeman A.E. & Tuggle C.K. (1994) HinfI polymorphism at the bovine PIT1 locus. *Journal of Animal Science* **72**, 3267.
- Yao J., Aggrey S.E., Zadworny D., Hayes J.F. & Kühnlein U. (1996) 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* **144**, 1809-16.
- Zhang H.M., Brown D.R., DeNise S.K. & Ax R.L. (1993) Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism analysis of the bovine somatotropin. *Journal of Animal Science* **71**, 2276.
- Zhou G.L., Liu H.G., Liu C., Guo S.L., Zhu Q. & Wu Y.H. (2005) Association of genetic polymorphism in GH gene with milk production traits in Beijing Holstein cows. *Journal of Biosciences* **30**, 595-8.
- Zwierzchowski L., Krzyzewski J., Strzalkowska N., Siadkowska E. & Ryniewicz Z. (2002) 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. *Animal Science Papers and Reports* **20**, 213-27.

Anexo 1

Regulamento do Serviço de Controle Leiteiro da Girolando

(Baseado na Portaria SNAP 45/86 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento)

Capítulo I - da Conceituação e Objetivos.

- 1- A prova de controle leiteiro consiste na mensuração e correspondente registro da produção individual das vacas leiteiras, através de procedimentos metodológicos pré-estabelecidos, com a finalidade de estimar a produção leiteira, de gordura e eventualmente de outros componentes quanti-qualitativos por lactação, visando à comparação entre indivíduos.
- 2- As múltiplas finalidades do controle leiteiro, estruturado como “prova zootécnica”, podem ser sintetizadas em seleção, manejo, pesquisa e publicidade.
- 3- O controle leiteiro, realizado com fins de seleção, objetiva a identificação dos reprodutores (machos e fêmeas) capazes de gerar populações com maior potencial genético e capacidade de adaptação, para melhorar a eficiência econômica do processo produtivo.

Capítulo II - das Competências e Atribuições das Organizações.

- 1- Das organizações estaduais (associações de criadores e/ou outras instituições).
 - 1.1- Promover, orientar e coordenar a execução da prova de controle leiteiro, através de núcleos regionais de prestação de serviço.
 - 1.2- Promover o retorno aos criadores das informações zootécnicas geradas em todos os níveis de processamento.
 - 1.3- Conscientizar os criadores da importância de participarem efetivamente nos trabalhos de melhoramento.
 - 1.4- Responder legalmente pelos serviços prestados ao ministério da agricultura e às associações de criadores.
- 2- Das associações de criadores.
 - 2.1- Promover, orientar e coordenar a execução da prova de controle leiteiro, através de núcleos regionais, realização de reunião ou evento técnico para criadores e técnicos credenciados e visitas técnicas dos supervisores aos produtores.
 - 2.2- Orientar os criadores sob os aspectos de manejo, de nutrição, de melhoramento genético e critérios de seleção dos animais.
 - 2.3- Proceder aos controles leiteiros de inspeção em todos os rebanhos e aos testes de funcionamento dos equipamentos utilizados pelos criadores, pelo menos três vezes ao ano, e nos núcleos regionais de prestação de serviço, pelo menos uma vez ao ano.
 - 2.4- Treinar e credenciar os controladores para o serviço de controle leiteiro dos núcleos regionais.
 - 2.5- Promover a capacitação dos criadores para execução do controle leiteiro no que se refere ao procedimento metodológico e normas técnicas, adequacidade dos equipamentos, coleta de amostras para análise de componentes do leite e orientação no registro/coleta dos dados em formulários apropriados.
 - 2.6- Enviar trimestralmente informações dos serviços de controle leiteiro e genealógico à Embrapa - Centro Nacional de Pesquisa de Gado de Leite.
 - 2.7- Divulgar os resultados das avaliações genéticas, com base nas publicações oficiais.

- 2.8- Implantar a automação dos pedigrees, para facilitar o acesso às informações relacionadas aos dados de produção total das lactações encerradas e aos resultados das análises de estimativas do valor genético dos animais registrados.
- 2.9- Definir as classes de idade e divisões das lactações para fins de elaboração e publicação dos relatórios das lactações encerradas.
- 2.10- Definir a classificação de títulos, tais como “escol”, “mérito”, “reprodutora emérita”, etc... para as publicações promocionais.
- 3- Do centro nacional de processamento de dados/CNPGL/EMBRAPA/MAPA.
 - 3.1- Assessorar científica e tecnologicamente a estruturação, organização e execução dos programas integrados estaduais e dos programas independentes de melhoramento genético.
 - 3.2- Proceder às avaliações genéticas de vacas e touros pelas características de interesse econômico.
 - 3.3- Emitir relatórios anuais de avaliações genéticas de vacas e touros pelas características de interesse econômico.
 - 3.4- Proceder às estimativas da capacidade de transmissão genética dos touros jovens, oriundos dos acasalamentos especiais, a partir das informações do pai, da mãe e do avô materno.
- 4- Da secretaria de produção animal - SNPA/MA.
 - 4.1- Planejar, organizar e acompanhar as atividades inerentes ao processo tecnológico.
 - 4.2- Promover, coordenar e fiscalizar os serviços de provas zootécnicas e de processamento das informações, desenvolvidas em nível estadual por instituições integradas ao sistema de melhoramento.
 - 4.3- Publicar e divulgar, periodicamente, os resultados das avaliações de estimativas genéticas de vacas e touros, elaboradas pelo Centro Nacional de Processamento de Dados.

Capítulo III – dos Procedimentos Metodológicos.

- 1- Para efeito de reconhecimento oficial deve ser adotado um dos seguintes planos e métodos de controle leiteiro:
 - 1.1- Dos planos de controle leiteiro.
 - 1.1.1-Oficial (OF): controle realizado pelo controlador vinculado à organização credenciada, com visitas para pesagem do leite e coleta de amostras para análise, em todos os controles, de acordo com o método definido.
 - 1.1.2-Oficial Supervisionado (OS): controle realizado pelo controlador vinculado à organização credenciada, com visitas para pesagem do leite e coleta de amostras para análise, alternando com controle realizado pelo produtor ou outra pessoa por ele autorizada.
 - 1.1.3-Produtor Supervisionado (PS): controle realizado pelo produtor ou outra pessoa por ele autorizada para pesagem do leite e coleta de amostras para análise, com visitas trimestrais do supervisor vinculado à organização credenciada para supervisionar a execução do controle leiteiro.
 - 1.2- Dos métodos de controle leiteiro.
 - 1.2.1-Mensal: aplicado ao sistema de duas ou três ordenhas, realizado mensalmente, admitindo-se um intervalo entre os controles de 15 a 45 dias, impondo-se a mensuração do total de leite produzido no período de 24 horas.
 - 1.2.2-Mensal alternado: aplicado ao sistema de duas ou três ordenhas, realizado mensalmente, admitindo-se um intervalo entre os controles de 15 a 45 dias, impondo-se a mensuração do leite produzido alternadamente a cada visita.
 - 1.2.3-Bimestral: aplicado ao sistema de duas ou três ordenhas, realizado a cada dois meses, admitindo-se um intervalo entre os controles de 45 a 75 dias, impondo-se a aferição do total de leite produzido no período de 24 horas.

- 2- Qualquer que seja o método utilizado, as mensurações devem ser aplicadas em todas as vacas em lactação do rebanho em regime de 2 ou 3 ordenhas, em 24 horas.
- 3- Será admitida somente a prática de um dos métodos de controle leiteiro para o mesmo rebanho.
- 4- O serviço de controle leiteiro deve ser efetuado no horário habitual de ordenha do rebanho, exceto nas propriedades que adotam como norma a prática de uma ordenha.
- 5- Nos casos em que se adota uma ordenha como rotina, no dia do controle realizar-se-á duas ordenhas, compatibilizando-se o horário da ordenha da tarde com o da ordenha de esgota do dia anterior.
- 6- No caso de propriedades que adotam ordenha com bezerro ao pé, esta rotina deve ser obedecida no dia do controle.
- 7- O número de ordenhas diárias a ser realizado rotineiramente pelo criador (02 ou 03 ordenhas) será livre até o 45º dia de lactação. A partir de então, o criador optará por uma das rotinas de ordenha.

Capítulo IV – das Normas Técnicas de Execução.

- 1- Das responsabilidades e privilégios do criador-proprietário.
 - 1.1- Para se beneficiar do controle leiteiro oficial, o criador deve-se associar a associação credenciada pelo Ministério da Agricultura, técnica-administrativamente estruturada para este fim, informar-se das condições básicas para a execução dessa prova e concordar com as normas que regerão o respectivo serviço.
 - 1.2- No ato da inscrição do rebanho no controle leiteiro, o criador deverá preencher:
 - 1.2.1-Ficha de inscrição e compromisso formal com o serviço oficial de controle leiteiro.
 - 1.2.2-O “mapa de identificação do rebanho”, incluindo todas as fêmeas secas ou em produção e as novilhas cobertas ou em idade de reprodução.

Obs: Poderão ser inscritas fêmeas de qualquer grau de sangue ou idade, com ou sem registro.
 - 1.3- Informar o horário habitual da ordenha, para apreciação, por ocasião da visita do supervisor e comunicar, com antecedência de até 10 dias, no caso de alteração.
 - 1.4- Manter um arquivo zootécnico próprio para consultas, possibilitando as informações aos supervisores no exercício de suas atividades.
 - 1.5- Responsabilizar-se pela idoneidade das informações prestadas ao serviço de controle leiteiro e ao supervisor, por ocasião da visita de inspeção.
 - 1.6- Aceitar, sem prévio aviso, as visitas do supervisor para a inspeção do controle leiteiro. Caso o criador seja informado da data da visita do supervisor para inspeção do controle leiteiro, será obrigatória a ordenha de esgotamento dos animais.
 - 1.7- Comunicar antecipadamente por escrito, à organização responsável pelo serviço de controle leiteiro, as datas não recomendáveis para as visitas do supervisor, com caracterização dos motivos, aceitando, contudo, decisão sobre a alteração do plano de visitas.
 - 1.8- Em casos excepcionais, solicitar, por escrito, o reteste do rebanho ao serviço de controle leiteiro até quinze dias decorridos da realização da inspeção, com a devida justificativa, ficando o julgamento da necessidade a critério da organização responsável pela execução dos trabalhos.
 - 1.9- Responsabilizar-se pelas despesas de alimentação e hospedagem do supervisor, no exercício de suas funções, sempre que forem obrigados a pernoitar no local desses serviços.
 - 1.10- Facilitar o trabalho de identificação dos animais, auxiliando o supervisor nesta tarefa.
 - 1.11- Notificar ao serviço de controle leiteiro sempre que ocorrer surto de doenças infecto-contagiosas no seu rebanho.

- 1.12- O criador inscrito no serviço de controle leiteiro receberá:
 - 1.12.1-Relatórios periódicos, contendo as seguintes informações de seu rebanho:
 - a- Cálculos de produção por lactação
 - b- Intervalo entre partos
 - c- Idade ao primeiro parto
 - d- Vida útil produtiva
 - e- Médias do rebanho
 - f- Índices genéticos e capacidade de produção dos animais
 - 1.12.2-Certificação do índice genético de seus animais pelo valor genético positivo, no caso dos machos, e quando estiverem incluídas entre as melhores vacas (30% da população estadual controlada), no caso das fêmeas.
 - 1.12.3-Oportunidade de ter bezerros com certificados para ingresso no teste de progênie de touros jovens ou comercialização privilegiada, desde que os pais sejam positivos e as mães estejam entre as melhores vacas (30% da população estadual controlada).
- 2- Da identificação dos animais a serem controlados.
 - 2.1- Os animais devem ser identificados, obrigatoriamente, antes do início do serviço de controle leiteiro, fazendo-se uso do:
 - a- Nome completo e/ou apelido
 - b- Raça e grau de sangue
 - c- Número de registro genealógico e/ou número particular
 - d- Data de nascimento
 - e- Nome completo do pai e da mãe quando houver conhecimento
 - f- Número de registro genealógico do pai e da mãe
 - 2.2- Os números de identificação dos animais transcritos nas planilhas de anotações dos dados zootécnicos do rebanho devem ser os mesmos atribuídos pelo serviço de registro genealógico.
- 3- Dos supervisores e criadores-controladores. Os supervisores e criadores-controladores, para o exercício de suas atividades, terão de:
 - 3.1- Supervisores - serem treinados, capacitados e credenciados pela associação responsável.
 - 3.2- Criadores-controladores - serem treinados e orientados pela associação responsável.
 - 3.3- Coletar em recipientes adequados as amostras de leite para análise e remetê-las bem acondicionadas aos laboratórios credenciados, juntamente com as planilhas que contém os dados dos animais.
 - 3.4- Manter, confidencialmente, as informações de desempenho dos rebanhos controlados.
 - 3.5- Observar rigorosamente todas as normas e o regulamento do serviço de controle leiteiro.
 - 3.6- O supervisor deve assinar e datar os relatórios de controle leiteiro, juntamente com o criador ou seu preposto, certificando-se de que todas as normas foram cumpridas, deixando uma cópia em poder deste.
 - 3.7- O criador-controlador deve assinar, datar os relatórios e enviá-los à associação responsável no máximo 07 dias após a data do controle leiteiro.
Único-A Girolando não se responsabilizará pelo atraso na emissão de relatórios, caso ocorra atraso por parte do criador-controlador no envio das planilhas de campo devidamente preenchida.
 - 3.8- Caso o controle leiteiro não seja efetuado por supervisores, é obrigatório o envio da cópia da matrícula na cooperativa ou adquirente do leite comercializado no ato da inscrição no serviço de controle leiteiro, bem como comprovante de leite comercializado um dia anterior ao controle, no dia do controle e um dia depois do controle leiteiro.

- 3.9- O supervisor deve identificar e fazer uma checagem completa dos animais e escrituração a cada inspeção, notificando ao criador e ao serviço de controle leiteiro as irregularidades observadas.
- 3.10- Anotar toda e qualquer ocorrência observada nos animais, individualmente, por ocasião do controle leiteiro.
Ex: (parto, secagem, venda, morte, doença, aborto, animais que irão participar de exposições, etc.).
- 3.11- Anotar o sistema de alimentação e especificar os componentes e as quantidades oferecidas.
- 3.12- Aferir a tara das balanças e dos baldes, assim como dos demais equipamentos.
- 3.13- Presenciar a ordenha de todas as vacas no rebanho ficando a seu critério o número de vacas a serem ordenhadas simultaneamente.
- 3.14- Os supervisores não devem executar a inspeção ou o controle leiteiro em rebanhos cujos proprietários tenham consigo qualquer grau de parentesco.
- 3.15- No caso de se verificarem produções muito maiores na última ordenha de controle do que na ordenha de esgotamento (maior que 20%), esta poderá ser anulada nos registros, estendendo-se os controles por mais uma ordenha até serem completadas as 24 horas.
- 3.16- O supervisor deve ter sempre em mente que é representante do SCL da associação para qual presta serviços e que não está a soldo do criador, não estando assim sujeito a outras instruções.
- 4- Das mensurações e expressões dos resultados na lactação.
 - 4.1- Nos casos de transferência de animais entre rebanhos submetidos ao controle leiteiro oficial, desde que o período entre controles não exceda a 75 dias, as informações devem ser consideradas para fins de cálculo de lactação.
 - 4.2- Durante os serviços de controle leiteiro, os resultados da pesagem do leite são expressos em quilogramas, com uma casa decimal e transcritos em formulário apropriado.
 - 4.3- O controle leiteiro será executado em todos os animais em produção no rebanho.
 - 4.4- O primeiro controle da lactação não deve iniciar-se até o quinto dia pós-parto, porém, para cálculo da duração do período de lactação, o primeiro dia de produção a ser considerado deve ser o dia subsequente ao parto.
 - 4.5- Somente deverão ser inscritas fêmeas com até 60 (sessenta) dias de produção após o parto e as que parirem a seguir.
 - 4.6- Nas propriedades equipadas com ordenhadeira mecânica de fluxo contínuo, podem ser utilizados medidores volumétricos de fluxo lácteo para mensuração do leite produzido, desde que sejam previamente aferidos pelo serviço de controle leiteiro, anotando-se a respectiva observação em planilha.
 - 4.7- Nos casos de reteste pelo serviço de controle leiteiro, os dados podem substituir os do controle anterior a critério da organização responsável pela execução do serviço.
 - 4.8- Pode ser considerada como causa de encerramento de lactação:
 - a- Secagem pré-parto (60 dias antecedentes ao parto)
 - b- Secagem por baixa produção, até o mínimo de 2,0 kg
 - c- Aborto após o nono mês de lactação, com início de nova lactação
 - d- Doença, morte ou venda do animal
 - e- Morte da cria
 - f- Parto subsequente, sem período seco
 - g- Glândulas mamárias perdidas por mastite
 - 4.9- Quando o animal for afastado do serviço de controle leiteiro, a data de encerramento da lactação será de quinze dias após a data do último controle.
 - 4.10- As lactações não podem ser consideradas quando o intervalo entre dois controles consecutivos for superior a 45 dias.

- 4.11- Para efeito de classificação, de acordo com a categoria ou número de ordenhas em que se desenvolveu, elas serão classificadas em:
 - a- 2x - quando em duas ordenhas
 - b- 3x - quando em três ordenhas
 - 4.12- As lactações serão acompanhadas, normalmente, da parição até o momento da secagem, sendo procedidos cálculos das quantidades de leite e componentes produzidos:
 - 4.12.1-Em 305 dias ou de menor duração para todas as lactações controladas.
 - 4.12.2-Em 365 dias ou menos para as lactações que excederam 305 dias.
 - 4.12.3-Até a secagem, sem limite de duração para as lactações que excederam 365 dias.
 - 4.13- Os resultados encontrados em 305 e até 365 dias serão utilizados para divulgação em relatório, comunicação ao criador e transcrição em ficha de produção e produção vitalícia, computando-se:
 - a- Quantidade de leite em quilograma
 - b- Quantidade de gordura em quilograma (opcional)
 - c- Quantidade de proteína em quilograma (opcional)
 - d- Percentagem média de gordura (opcional)
 - e- Percentagem média de proteína (opcional)
 - f- Contagem de células somáticas (opcional)
 - 4.14- Dependendo da causa do encerramento da lactação, esta pode ser calculada, desde que o animal tenha sido submetido a um mínimo de três controles.
- 5- Das fraudes e sanções.
- 5.1- Os criadores que não adotarem o controle leiteiro dentro das diretrizes estabelecidas nestas normas não terão seus rebanhos reconhecidos oficialmente em controle e consequentemente seus animais não poderão ser avaliados geneticamente.
 - 5.2- Serão passíveis de sanções, que vão desde a anulação parcial ou total dos dados registrados até a sua exclusão do serviço de controle leiteiro, os criadores que adotarem práticas não permitidas como:
 - 5.2.1-Administração de qualquer droga ou estimulantes aos animais por ocasião do controle leiteiro.
 - 5.2.2-Uso de quaisquer produtos farmacológicos que interfiram no funcionamento da glândula tireóide do animal em controle.
 - 5.2.3-Uso de ocitocina, no dia anterior ou durante o controle leiteiro dos seus animais.
 - 5.2.4-Tratamento preferencial de manejo e alimentação entre os animais.
 - 5.2.5-Quaisquer outros métodos ou artifícios que interfiram na produção de leite obtida normal e rotineiramente.
 - 5.2.6-Por ocorrência do controle leiteiro de inspeção, o controle leiteiro anterior a este poderá ser invalidado se a sua produção for superior a 20% a produção do dia da inspeção e ocorra em 30% dos animais do rebanho, salvo novas aquisições.
- 6- Os casos omissos serão resolvidos pela associação responsável.

Uberaba - MG,13 de agosto de 1.999.