

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DA REGIÃO PROMOTORA E DO
ÉXON 8 NO GENE GHR E SUAS RELAÇÕES COM A LACTAÇÃO
OBSERVADA E AJUSTADA PARA 305 DIAS EM VACAS DA RAÇA
HOLANDESA**

Vanderlei Alves Cardoso

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Arnhold

GOIÂNIA

2016



TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1 **1. Identificação do material bibliográfico:** ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

1 **2. Identificação da Tese ou Dissertação**

2

Nome completo do autor: Vanderlei Alves Cardoso

Título do trabalho: **DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DA REGIÃO PROMOTORA E DO ÉXON 8 NO GENE GHR E SUAS RELAÇÕES COM A LACTAÇÃO OBSERVADA E AJUSTADA PARA 305 DIAS EM VACAS DA RAÇA HOLANDESA**

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO¹**

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 29 / 08 / 2016

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

²A assinatura deve ser escaneada.

VANDERLEI ALVES CARDOSO

**DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DA REGIÃO PROMOTORA E DO
ÉXON 8 NO GENE GHR E SUAS RELAÇÕES COM A LACTAÇÃO
OBSERVADA E AJUSTADA PARA 305 DIAS EM VACAS DA RAÇA
HOLANDESA**

Dissertação apresentada para a
obtenção do título de Mestre em
Zootecnia junto à Escola de
Veterinária e Zootecnia da
Universidade Federal de Goiás.

Área de concentração:

Produção Animal

Orientador:

Prof. Dr. Emmanuel Arnhold – EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Profa. Dra. Ângela Adamski da Silva Reis – ICB/UFG

GOIÂNIA

2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cardoso, Vanderlei Alves
DIVERSIDADE HAPLOTÍPICA DA REGIÃO PROMOTORA E DO
ÉXON 8 NO GENE GHR E SUAS RELAÇÕES COM A LACTAÇÃO
OBSERVADA E AJUSTADA PARA 305 DIAS EM VACAS DA RAÇA
HOLANDESA [manuscrito] / Vanderlei Alves Cardoso, Emmanuel
Arnhold, Angela Adamski da Silva Reis. - 2016.
xii, 54 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Emmanuel Arnhold; co-orientadora Dra.
Angela Adamski da Silva Reis.
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2016.
Bibliografia. Anexos.
Inclui abreviaturas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. PCR-RFLP. 2. Haplótipos. 3. Alul. 4. Sspl. 5. Produção de leite. I.
Arnhold, Emmanuel. II. Reis, Angela Adamski da Silva. III. Arnhold,
Emmanuel, orient. IV. Reis, Angela Adamski da Silva, co-orient. V.
Título.

CDU 635

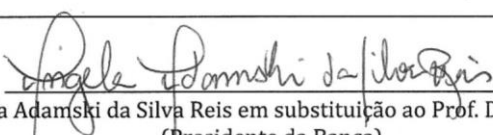
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

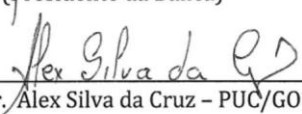


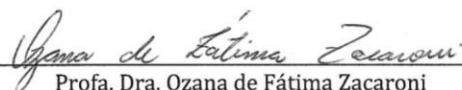
1 ATA NÚMERO 31/2016 DA SESSÃO DE JULGAMENTO DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
2 MESTRADO DO (A) ALUNO **VANDERLEI ALVES CARDOSO** DO PROGRAMA DE PÓS-
3 GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA DA ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA DA
4 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS. Aos 15/07/2016, a partir das 10h00min, na sala
5 01 da Coordenação de Pós Graduação em Ciência Animal PPGCA da Escola de Veterinária
6 e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, nesta Capital, realizou-se a sessão pública
7 de Defesa de Dissertação intitulada "**Polimorfismos no exon 8 e região promotora do**
8 **GHR e suas interferências na produção e composição do leite de vacas Holandesas**
9 **no estado de Goiás, Brasil**", para obtenção do título de **Mestre em Zootecnia**, junto à
10 área de Concentração: **Produção Animal**. Os trabalhos foram instalados pelo (a)
11 Presidente da Comissão Julgadora, Orientador (a) **Profa. Dra. Angela Adamski da Silva**
12 **Reis em substituição ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold**, com a participação dos demais
13 membros da Banca Examinadora, **Prof. Dr. Alex Silva da Cruz - PUC/GO** e **Profa. Dra.**
14 **Ozana de Fátima Zacaroni**. Iniciando os trabalhos, o (a) Presidente concedeu a palavra
15 ao (a) candidato (a) **VANDERLEI ALVES CARDOSO**, para exposição em **QUARENTA**
16 **MINUTOS** do seu trabalho. A seguir, o senhor Presidente concedeu a palavra, pela ordem,
17 aos demais membros da banca, os quais passaram a arguir o (a) candidato (a), durante o
18 prazo máximo de **VINTE MINUTOS**, assegurando-se ao mesmo, igual prazo para
19 responder aos Senhores Membros da Banca Examinadora. Ultimada a arguição, que se
20 desenvolveu nos termos regimentais, a Comissão, em sessão secreta, expressou seu
21 julgamento, considerando o (a) candidato (a) Aprovado
22 (aprovado/reprovado) pelos seus membros. Proclamados os resultados da Banca
23 Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar lavrou-se a presente ata que,
24 após lida e achada conforme vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

25 A Banca Examinadora aprovou a seguinte modificação no título da dissertação:

26 Diversidade haplotípica da região promotora e do exon 8
27 no gene GHR e suas relações com a lactação observada
28 ajustada para 305 dias em vacas da raça holandesa
29
30


Profa. Dra. Angela Adamski da Silva Reis em substituição ao Prof. Dr. Emmanuel Arnhold
(Presidente da Banca)


Prof. Dr. Alex Silva da Cruz - PUC/GO


Profa. Dra. Ozana de Fátima Zacaroni

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de realizar o sonho de concluir mais uma etapa da minha vida. Agradeço pela força e determinação que o Senhor colocou em meu coração para superar todos os obstáculos nesta jornada.

Agradeço, consideravelmente, a minha esposa Flaviane Oliveira da Cunha Cardoso pelo seu apoio, paciência, dedicação, colaboração e motivação neste tempo que foi subtraído de sua companhia para dedicação aos meus estudos. A ela que sempre esteve disposta a sacrificar suas atividades profissionais para se dedicar isoladamente na responsabilidade familiar durante a minha ausência. A ela que considero como companheira, confidente, namorada, esposa, mulher... a quem amo muito.

Aos meus filhos que sempre estão me dando apoio e incentivo em tudo que faço, apenas com as suas presenças na minha vida. A eles que me encorajam com gestos tão simples e grandiosos como seus abraços, beijos e a pergunta “papai o senhor não vai demorar a voltar, vai?”. A vocês Heitor Emanuel da Cunha Cardoso e Káiron da Cunha Cardoso.

Ao meu orientador Professor Dr. Emmanuel Arnhold que se dedicou a me ajudar em muitas questões do meu trabalho, desde o início das atividades até a conclusão final da dissertação. Pela sua colaboração mesmo em questões totalmente fora de seus objetivos de pesquisa normais.

Agradeço também a minha coorientadora Professora Dra. Ângela Adamski da Silva Reis que se prontificou a me ajudar. Pela sua colaboração nos momentos mais difíceis da minha jornada neste mestrado. Pela sua paciência nos momentos em que tudo parecia conspirar contra os resultados. Pela sua orientação em assuntos específicos e delicados da metodologia desenvolvida.

Agradeço fielmente e com o coração cheio de orgulho a dois “colegas” que me ofereceram momentos de conselhos, orientação, aprendizado e, acima de tudo, instrução para o crescimento cultural e para vida. Agradeço à Professora Dra. Eliane Sayuri Miyagi Okada e ao Professor Dr. Aldi Fernandes de Souza França, obrigado!

À Fazenda Lages e todos os profissionais e membros da equipe de trabalho, que me ajudaram na coleta das amostras e dos dados. Em especial ao proprietário Sr. Luis Carlos

Figueiredo pela confiança e disponibilidade em ceder dados, instalações e animais para realização deste trabalho.

Agradeço a todos os colegas do laboratório pela disponibilidade e apoio nos momentos mais difíceis e pelas atividades prestadas durante o período de extração e análise do DNA.

Aos membros da banca examinadora pela atenção dispensada na avaliação dessa dissertação.

"Feliz o homem que acha sabedoria,
e o homem que adquire conhecimento;
porque melhor é o lucro que ela dá do que o da prata,
e melhor a sua renda do que o ouro mais fino."

Provérbios 3: 13-14

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. Genes que apresentam relação direta na produção e composição do leite bovino	3
2.2. O gene do <i>Receptor do Hormônio do Crescimento (GHR)</i>	6
2.3. Características moleculares e fisiologia da proteína do Receptor Transmembrana do Hormônio do Crescimento	9
2.4. Principais SNP no gene do <i>GHR</i>	14
2.4.1. Polimorfismo na região promotora do gene <i>GHR</i>	16
2.4.2. Polimorfismo no éxon 8 do <i>GHR</i>	17
3. OBJETIVOS	19
3.1. Objetivo geral	19
3.2. Objetivos específicos.....	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Delineamento do estudo	20
4.2. Animais e dados de produção.....	20
4.3. Coleta das amostras	21
4.4. Extração e quantificação do DNA.....	21
4.5. Identificação dos polimorfismos no gene <i>GHR</i> com uso das enzimas <i>AluI</i> e <i>SspI</i> pela técnica de PCR-RFLP.....	22
4.6. Análise estatística	26
5. RESULTADOS	28
5.1 Lactação dos animais.....	28
5.2 Resultados da genotipagem	29
5.2 Frequências alélicas e genotípicas.....	32
5.3 Efeitos dos genótipos sobre a produção e composição do leite bovino	32
6. DISCUSSÃO	39
7. CONCLUSÃO	42
8. REFERÊNCIAS.....	43

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Estrutura do gene do *GHR* humano e do camundongo. A linha horizontal representa a sequência de introns e os retângulos indicam a posição dos éxons. Os éxons são indicados pelos respectivos domínios criados após a tradução do gene..... 8
- FIGURA 2 - Modelo esquemático do *GHR* mostrando os domínios extracelular, transmembrana e intracelular com a região do BOX-1..... 10
- FIGURA 3 - Esquema mostrando a estrutura dimensional do *GHR*. No lado esquerdo é apresentado o receptor inativo antes da ligação com o GH e a direita observa-se o receptor ativado após a interação com o hormônio do crescimento..... 11
- FIGURA 4 - Vias de sinalização do receptor de GH. Algumas das vias de sinalização são iniciadas por ativação de JAK2 pelo GH. JAK2 fosforila SHC, levando à ativação de MAPK. JAK2 também fosforila fatores de transcrição STATs. MAPK e STATs são importantes para regulação da transcrição de genes do GH. JAK2 fosforila proteínas IRS, que são importantes para levar a ativação de PI 3'K (PI3K-quinase) que determina a ativação do transporte de glicose..... 13
- FIGURA 5 - Vias de sinalização do *GHR* após ligação do GH. Observar a via da proteína STAT5 que é fosforilada pela JAK2 e formam dímeros. Esses dímeros de STAT5 são direcionados para o núcleo e se ligam diretamente ao DNA sinalizando sua ativação via sítio GLE e spi2.1..... 13
- FIGURA 6 - Sequência FASTA do fragmento posicionado na região promotora do gene do *GHR* demonstrando a posição e sequência dos primers e locais de restrição da enzima *AluI*..... 24
- FIGURA 7 - Sequência FASTA do fragmento posicionado no éxon 8 do gene do *GHR* demonstrando a posição e sequência dos primers e local de restrição da enzima *SspI*..... 24

FIGURA 8 - Gráfico apresentando a distribuição normal das médias de lactação das vacas utilizadas no experimento.....	28
FIGURA 9 - Gráfico das médias de lactação apresentando a diferença entre as médias ajustadas para 305 dias da primeira (PL1) e segunda lactação (PL2) lactações.....	29
FIGURA 10 - Gel de poliacrilamida demonstrado os fragmentos resultantes da digestão da enzima <i>AluI</i> e os respectivos genótipos. Amostra 2448 apresentando genótipo <i>AluI</i> (-/-), amostra 1278 com genótipo <i>AluI</i> (+/+) e amostra 2794 com genótipo <i>AluI</i> (+/-).....	30
FIGURA 11 - Gel de poliacrilamida apresentando os fragmentos resultantes da digestão da enzima <i>SspI</i> e os respectivos genótipos. Amostra 2452 apresentando o genótipo <i>SspI</i> (-/-), amostra 2246 com o genótipo <i>SspI</i> (+/+) e amostra 2290 apresentando o genótipo <i>SspI</i> (+/-).....	31
FIGURA 12 - Gráfico com as médias de lactação (colunas) e seus respectivos desvios padrões (barras), distribuídos segundo os diferentes grupos de haplótipos.....	36

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) envolvidos nas características fenotípicas de produção e composição de leite bovino.....	5
TABELA 2 - Principais SNPs no gene do receptor do hormônio do crescimento (<i>GHR</i>) e suas relações com a produção e composição do leite bovino.....	15
TABELA 3 - <i>Primers</i> utilizados para genotipagem dos fragmentos do gene <i>GHR</i> para identificação dos respectivos polimorfismos.....	22
TABELA 4 - Condições de termociclagem para a genotipagem dos fragmentos da região promotora e éxon 8 do gene do <i>GHR</i>	25
TABELA 5 - Haplótipos resultantes da associação dos diferentes genótipos na população estudada.....	32
TABELA 6 - Relação entre os genótipos da região promotora (<i>AluI</i>) do gene do <i>GHR</i> sobre as médias de lactação ajustadas para 305 dias e a composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas.....	34
TABELA 7 - Relação entre os genótipos da região promotora (<i>SspI</i>) do gene do <i>GHR</i> sobre as médias de lactação ajustadas para 305 dias e a composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas.....	35
TABELA 8 - Efeito dos haplótipos (região promotora e éxon 8) do gene do <i>GHR</i> sobre as médias de lactação e suas respectivas composições em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas.....	37

SIGLAS E ABREVIATURAS

BTA	- do inglês bovine taurus autosome (cromossomo bovino autossômico)
CCS	- contagem de células somáticas
ECS	- escore de células somáticas
ESD	- estrato seco total
EST	- estrato seco desengordurado
F279Y	- polimorfismo com substituição do aminoácido fenilalanina por uma tirosina na posição 279
<i>GHR</i>	- receptor do hormônio do crescimento
ICB	- Instituto de Ciências Biológicas
IGF-1	- fator de crescimento da insulina 1
JAK-2	- receptor intracelular janus kinase 2
MAPA	- Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
NCBI	- centro nacional de informação biotecnológica
PCR-RFLP	- amplificação pela reação em cadeia da polymerase com uso de enzimas de restrição
UFG	- Universidade Federal de Goiás
QTLs	- do inglês quantitative trait loci (loci de características quantitativas)
SNPs	- do inglês Single Nucleotide Polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

RESUMO

Existem vários fatores que podem interferir na produção de leite em bovinos, entre os quais, as características ambientais e o perfil genético são os mais importantes. O uso de ferramentas para avaliação genética dos animais em especial a identificação de SNPs, os quais são capazes de interferir na capacidade produtiva, está sendo amplamente estudado e utilizado na produção animal. Neste sentido, o objetivo do presente trabalho foi verificar a distribuição das variantes polimórficas da região promotora e do éxon 8 no gene do *Receptor do Hormônio do Crescimento (GHR)* em vacas da raça Holandesa em lactação. Foram utilizados dados das lactações e composição do leite na primeira e segunda lactação de 106 vacas do município de Cristalina, Goiás. As amostras de sangue periférico foram coletadas e o material genômico foi purificado (DNA). Os genótipos foram analisados pela técnica de PCR-FRLP com o uso da enzima *AluI* na região promotora e *SspI* para o éxon 8 do gene do *GHR*, respectivamente. Para a análise dos dados das lactações e composição do leite foi realizada análise de variância e teste de tukey. Foram observadas frequências alélicas de 47,64% para *AluI*(-) e 52,36% para *AluI*(+), para o polimorfismo da região promotora, 49,53% para *SspI*(-) e 50,47% para *SspI*(+) para o polimorfismo do éxon 8 do gene. Quanto as frequências genotípicas, a região promotora apresentou 12,26%, 70,76% e 16,98% para os genótipos *AluI*(-/-), *AluI*(+/-) e *AluI*(+/+) respectivamente. Enquanto a região do éxon 8 apresentou frequências de 7,55%, 83,96% e 8,49% para os genótipos *SspI*(-/-), *SspI*(+/-) e *SspI*(+/+) respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) para produção e composição do leite sobre o efeitos dos polimorfismos da região promotora (*AluI*) e éxon 8 (*SspI*) do gene do *GHR*. A composição em EST e ESD se mostraram maiores para os genótipos *SspI*(-/-) porem com níveis de significância $P=0,06$ e $P=0,05$ respectivamente para EST e ESD. Quanto a interação entre os dois polimorfismos e seus efeitos sobre a produção e composição do leite, não foram observadas diferenças estatisticamente significativa ($P>0,05$).

Palavras-chave: PCR-RFLP, haplótipos, *AluI*, *SspI*, produção de leite.

ABSTRACT

There are several factors that may affect the milk yield in cattle, among which the environmental characteristics and the genetic profile are the most important. The use of tools for genetic evaluation of animals, in particular the identification of SNPs, which are able to interfere with the production capacity, is being widely studied and used in animal production. In this sense, the objective of this study was to investigate the distribution of polymorphic variants of the promoter region and exon8 in gene of growth hormone receptor (GHR) in Holstein cows in milk. They used data from lactations and milk composition in the first and second lactation of 106 cows in the municipality of Cristalina, Goiás. The blood samples were collected and the genomic material was purified (DNA). The genotypes were analyzed by PCR-FRLP technique using the *AluI* enzyme in the promoter region and *SspI* to the exon8 of the GHR gene, respectively. For the data analysis of lactation and milk composition was performed analyses of variance and Tukey test. Allelic frequencies of 47.64% were observed for *AluI* (-) and 52.36% for *AluI* (+) for the polymorphism of the promoter region, 49.53% for *Ssp* (-) and 50.47% for *Ssp* (+) for the polymorphism of exon8 of the gene. As to the genotypic frequencies, the promoter region had 12.26%, 70.76% and 16.98% for *AluI* genotypes (- / -), *AluI* (+/-) and *AluI* (+ / +) respectively. While the region of exon8 presented frequencies of 7.55%, 83.96% and 8.49% for genotypes *Ssp* (- / -), *SspI* (+/-), and *SspI* (+ / +) respectively. No statistically significant differences were found ($P > 0.05$) for the production and composition of milk on the effects of polymorphisms of the promoter region (*AluI*) and exon 8 (*SspI*) of the GHR gene. The composition EST and ESD were higher for *SspI* genotypes (- / -), but with significance level $P = 0.06$ and $P = 0.05$ respectively for EST and ESD. The interaction between the two polymorphisms and their effects on milk production and composition, no statistically significant differences were observed ($P > 0.05$).

Keywords: PCR-RFLP haplotypes, *AluI*, *SspI*, milk production.

1. INTRODUÇÃO

A lactação é uma característica que depende dos fatores ambientais e do perfil genético do animal. Dentre os fatores ambientais a composição da dieta e características da alimentação dos animais apresenta maior impacto¹, seguido das condições climáticas, como temperatura e umidade, características de manejo e estrutura das instalações e também da saúde da glândula mamária². Com relação ao perfil genético, o fator racial apresenta grande interferência na produção e composição do leite, porém diferenças existentes dentro da mesma raça caracteriza-se como melhoramento genético da própria raça.

A seleção de animais produtivos é o objetivo da produção animal, e para isso a seleção dentro da raça passou a ser um método mais usado na escolha de animais com potenciais raciais acima da média, e hoje o melhoramento genético apresenta um número maior de ferramentas, como a análise de marcadores moleculares, para realizar a seleção de animais mais produtivos. O uso de métodos de avaliação molecular se tornou uma das técnicas de seleção mais eficiente para verificação do perfil genético mais produtivo dentro de uma população.

A análise de QTLs (do inglês, *Quantitative Trati Loci*) passou a ser uma forma de verificação de animais com produção superior, quanto a determinadas características produtivas específicas^{3, 4}. Deste modo foram criadas diferentes técnicas de verificação, análise e comparação de alterações genéticas nos animais de produção. Entre elas podemos citar os SNPs (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*) que são resultantes de alterações em uma única base nitrogenada do DNA capaz de determinar alterações na sequencia dos aminoácidos da proteína codificada e assim causar mudanças fisiológicas no animal. A detecção da presença de SNPs pode ser realizada pelas técnicas de PCR-RFLP (Amplificação pela Reação em Cadeia da Polimerase com uso de enzimas de restrição), a técnica de amplificação alelo específico (ASA), o sequenciamento genético e a técnica de espectrometria de massa (MAL-TOF), entre outras.

Pesquisas para determinar uma quantidade cada vez maior de QTLs capazes de interferir na produção e composição do leite bovino, vêm sendo realizadas principalmente com o uso de SNPs presentes nestes QTLs que apresentam alta capacidade de determinar mudanças na produção e composição do leite. Os genes com presença de SNPs com maior

relação de alterações fenotípicas relacionadas ao leite bovino estão presentes em diferentes cromossomos, tais como os BTA01 e 06⁵ e BTA14 e 20³ que se mostraram com um maior número de genes com presença de SNPs relacionados a dados de produção em vacas holandesas.

O gene do *Receptor do Hormônio de Crescimento (GHR)*, presente no BTA 20 bovino, apresenta diferentes SNPs capazes de interferir tanto na lactação quanto na composição do leite. Dentre todos os SNPs estudados neste gene, os polimorfismos *AluI* encontrado na região promotora do gene^{6, 7} e o polimorfismo F279Y presente no éxon 8^{8, 9} apresentam uma alta relação com alterações de produção do leite em vacas holandesas.

Deste modo, a avaliação da distribuição das variantes polimórficas da região promotora e do éxon 8 no gene *GHR* e suas relações com a lactação e composição do leite de vacas holandesas é importante para agregar conhecimento ao setor de produção de bovinos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Genes que apresentam relação direta na produção e composição do leite bovino

Com os avanços das técnicas de avaliação genética de espécies de animais domésticos em associação com a biologia molecular, em especial os estudos do DNA e suas variações genéticas, têm aberto novas perspectivas nos sistemas de produção, e permitem entender qual a relação entre as mudanças genéticas e as características de interesse econômico. Os estudos se baseiam na presença de alterações genéticas que definem características de interesse econômico, onde essas alterações são, na sua maioria, variações contínuas e são expressas por muitos loci gênicos, que são denominados Loci de Características Quantitativas (QTL – do inglês, *Quantitative Trait Loci*).

Os QTL são regiões cromossômicas associadas a variabilidade das características complexas que podem ser influenciadas por vários genes e ao mesmo tempo pelo ambiente¹⁰. Com a identificação dos QTLs e a compreensão dos diferentes mecanismos de ação sobre a fisiologia animal, permitiu a realização de seleção para desempenho superior sobre características de interesse econômico, tais como a produção de leite, taxa de crescimento, fertilidade, resistência a condições de ambiente e doenças¹¹. É comum em um QTL a presença de um ou mais genes candidatos cuja ação determina uma característica de interesse na produção animal, o uso destas informações prévias sobre o gene localizado na região de um QTL e que de alguma forma tem sua função metabólica envolvida na fisiologia e desenvolvimento da característica, torna este gene um candidato para utilização em processos de seleção. Para a identificação de um gene envolvido numa característica complexa utilizam-se várias técnicas, e dentre elas podemos citar a demonstração de que a substituição de uma variante nucleotídica pode resultar na mudança do fenótipo de um grupo de animais dentro de uma população específica¹².

Uma vez estabelecido quais são as alterações genéticas responsáveis pela mudança nas características fenotípicas dentro de uma população estudada, realiza-se a detecção das diferenças na sequência genotípica do gene na população avaliada, essas diferenças quando ocorrem pela substituição de uma única base nitrogenada, e denominado Polimorfismo de Nucleotídeo Único (SNP – do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism*). Várias técnicas de detecção de SNPs estão disponíveis, e dentre estas podemos citar a técnica

de clivagem do DNA previamente amplificado (PCR-RFLP), a técnica de amplificação alelo específico (ASA), sequenciamento, e a técnica que envolve a espectrometria de massa MADI-TOF (do inglês, *Mass Array by Sequenom*).

Deste modo os SNPs passaram a ser um tipo de marcador molecular muito utilizado na bovinocultura leiteira, caracterizado como uma variação genética localizada na mesma posição do genoma em uma população e manifestado em indivíduos diferentes do ponto de vista fenotípico. Existe um número grande de SNPs que foram mapeados dentro de diferentes QTLs e que apresentam relação direta com a produção e composição do leite bovino (Tabela 1) e que estão presentes em diferentes genes no genoma bovino. Shopen et al.¹³ identificaram regiões polimórficas no *BTA5*, *BTA6*, *BTA11* e *BTA14* associados a composição de proteína e teor de lactose, estes foram associados com os genes α -lactoalbumina (*BTA5*), α s1-caseína, α s2-caseína, β -caseína e k-caseína no *BTA6* e β -lactoglobulina no *BTA11*. As regiões polimórficas *BTA14*, *BTA19* e *BTA26* foram associadas com a produção e os ácidos graxos no leite¹⁴⁻¹⁶, e as regiões *BTA6*, *BTA10*, *BTA15* e *BTA20* associados ao escore de células somáticas^{3, 17}. A região cromossômica *BTA20* foi associada a produção de leite, composição de proteína, gordura e células somáticas¹⁸.

Desde a primeira varredura de todo o genoma por QTLs com efeito sobre as características de produção de leite em bovinos¹⁹, muitos estudos parciais e totais foram realizados com esse propósito. Estudos preliminares de mapeamento genético voltados para as características de produção e composição do leite realizados por Moody et al.²⁰, Arranz et al.²¹ e Moio et al.²² apresentaram o QTL no cromossomo 20 com a presença de SNPs com relação direta com a produção de leite e sua composição em proteína, gordura e células somáticas. Em 1999 Aggrey et al.⁶ realizou um estudo de sequenciamento e uso de enzimas de restrição, e observou a presença de SNP no cromossomo 20 e sua relação direta com a produção de leite e sua composição em proteína e gordura. Posteriormente foram realizados diversos estudos associando SNPs do cromossomo 20 com dados produtivos em bovinos leiteiros. Em 2007 Fontanesi et al.²³ investigou a presença do polimorfismo do Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*) e observou que ocorre a substituição de uma base nitrogenada no gene codificante da proteína do *GHR*, com a substituição da base consequentemente foi realizada a substituição do aminoácido fenilalanina pela tirosina na posição 279 desta proteína. Esta alteração no DNA levou a mudanças fenotípicas como o aumento da produção de leite e alteração da composição de gordura e proteína.

TABELA 1 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) envolvidos nas características fenotípicas de produção e composição de leite bovino

Gene	BTA1	Características fenotípicas envolvidas	Referência
<i>CXCR1</i> – <i>Interleukin-8 receptor-α</i>	2	Escore de Células Somáticas (ECS), mastite clínica	Leyva-Baca et al. ²⁴
<i>STAT1</i>	2	Teor e produção de gordura e proteína, produção de leite	Cobanoglu et al. ²⁵
<i>LEP</i> – <i>Leptin</i>	4	Produção de leite, teor de proteína e gordura	Glantz et al. ²⁶ Matteis et al. ²⁷
<i>CD4</i> – <i>Cluster of differentiation 4</i>	5	Escore de Células Somáticas (ECS)	He et al. ²⁸
<i>IGF-1</i> – <i>Insulin-like growth factor 1</i>	5	Teor e produção de gordura e proteína, Escore de Células Somáticas (ECS)	Bonakdar et al. ²⁹ Mullen et al. ³⁰
<i>OLR1</i> – <i>Oxidized low-density lipoprotein (lectin-like) receptor 1</i>	5	Teor e produção de proteína e gordura, perfil de ácidos graxos	Wang et al. ³¹
<i>ABCG2</i> – <i>ATP-binding cassette, sub-family G, member 2</i>	6	Teor de proteína e gordura, produção de gordura	Ron et al. ³²
<i>B-CN</i> – β -casein	6	Composição proteica	Visker et al. ³³
<i>CSN1S1</i> , <i>CSN1S2</i> – <i>as1-casein e as2-casein</i>	6	Composição proteica	Huang et al. ³⁴
<i>TLR4</i> – <i>Toll-like receptor 4</i>	8	Escore de Células Somáticas (ECS)	Sharma et al. ³⁵
<i>B-LG</i> – β -lactoglobulin	11	Composição proteica	Huang et al. ³⁴
<i>DGAT1</i> – <i>Diacylglycerol O-acyltransferase</i>	14	Perfil de ácidos graxos, teor de gordura e proteína, produção de leite e produção de gordura	Jiang et al. ³⁶ Duchemin et al. ¹⁵
<i>CYHR1</i> – <i>Cysteine e Histidine-rich 1</i>	14	Produção de leite, teor de gordura e proteína, produção de gordura e proteína	Jiang et al. ³⁶ Minozzi et al. ³⁷
<i>FASN</i> – <i>Fatty acid synthase</i>	19	Teor de gordura e perfil de ácidos graxos, produção de proteína e gordura	Morris et al. ³⁸ Matsumoto et al. ³⁹ Alim et al. ⁴⁰
<i>GH1</i> – <i>Growth hormone 1</i>	19	Produção, teor de proteína e gordura, Escore de Células Somáticas (ECS)	Signorelli et al. ⁴¹ Mullen et al. ⁴²
<i>SREBF1</i>	19	Perfil de ácidos graxos	Nafikov et al. ⁴³
<i>GHR</i> – <i>Growth hormone receptor</i>	20	Produção de leite, proteína e gordura, teor de proteína gordura e caseína	Rahbar et al. ⁷ Rahmatalla et al. ⁹ Ma et al. ⁴⁴
<i>PRL</i> – <i>Prolactin</i>	23	Produção de leite, teor de gordura, perfil de ácidos graxos	Schennink et al. ⁴⁵ Lü et al. ⁴⁶
<i>SCD1</i> – <i>Stearoyl-CoA desaturase 1</i>	26	Perfil de ácidos graxos, produção de leite, gordura e proteína.	Macciotta et al. ⁴⁷ Alim et al. ⁴⁸
<i>MBL1</i> – <i>Mannose-binding lectin 1</i>	28	Escore de Células Somáticas (ECS)	Wang et al. ⁴⁹ Yuan et al. ⁵⁰

Outros trabalhos como os de Rahbar et al.⁷, Rahmatalla et al.⁹ e Ma et al.⁴⁴ apresentaram resultados semelhantes utilizando animais provenientes de outras regiões do planeta e até mesmo com raças diferentes, demonstrando a forte relação entre a presença de uma QTL no cromossomo 20 e do SNP específico inserido dentro desta região cromossômica com a função do *GHR* e consequentemente a expressão fenotípica deste gene.

2.2. O gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*)

Atualmente o genoma bovino apresenta mais de 6,2 milhões de SNPs conhecidos, e estudos mais recentes permitiram a identificação de diferentes genes relacionados com a produção e composição do leite, e dentre eles o *GHR* tem apresentado ótimos resultados quanto a sua relação direta entre SNPs e características fenotípicas de produção e composição do leite^{9, 18, 44}.

Estudos preliminares de mapeamento genético identificaram SNPs de alta relação com características de produção e composição de leite, Aggrey et al.⁶ apresentou uma alteração de base na região promotora do gene (Região 5'-UTR) capaz de interferir na expressão do gene do *GHR* e consequentemente determinar alterações na composição do leite bovino. Estudos posteriores nesta mesma região promotora foram apresentados resultados semelhantes, confirmando a presença deste SNP na região reguladora do gene do *GHR*^{8, 51-53}. Waters et al.⁸ realizaram um estudo deste gene e verificou que existem SNPs capazes de interferir na produção e composição do leite, os mesmos autores encontraram alterações genéticas do tipo substituição de bases únicas no éxon 8, éxon 10, intron 1-3 e região promotora do gene, e dentre eles as alterações do éxon 8 foram aqueles que apresentaram maior relação com mudanças na produção e composição do leite bovino. Estes sites no gene do *GHR* com suas respectivas alterações de bases nitrogenadas (SNPs) foram analisados e revisados por um grande número de trabalhos em diferentes regiões do planeta^{7, 9, 23}, apresentando resultados semelhantes, confirmando assim a relação positiva destes polimorfismos com a produção e composição do leite bovino no gene do *GHR*.

O gene do *GHR* está localizado no cromossomo 20 do DNA dos bovinos (*Bos taurus*) com identificação genômica AC_000177 e apresenta mais de 72.000 Kpb. Este gene é responsável pela codificação da proteína do receptor do hormônio do crescimento (receptor transmembranar do GH) responsável pela cascata de sinalização através do domínio

citoplasmático⁵⁴. A transdução do sinal começa com a fosforilação de tirosinas no receptor e outras proteínas celulares⁵⁵. Muitas das funções fisiológicas do *GH* são exercidas através da regulação da transcrição de outros genes, dentre eles o Fator-1 de crescimento semelhante a insulina (IGF-1), que é um fator de transcrição de enzimas metabólicas⁵⁶.

O *GHR* está posicionado no cromossomo 20 e possui um total 10 éxons, dentre estes inicialmente acreditava-se que o éxon dois era o códon responsável pela iniciação da tradução⁵⁷, mas estudos mais recentes demonstraram que o gene *GHR* apresenta diversos éxons líderes⁵⁸. A transcrição apresenta um sítio de regulação posicionado na região 5'-UTR com diferentes variantes, denominados de 1A, 1B, 1C, 1D, 1F, 1H e 1I que apresentaram maior eficiência quando comparadas com os moldes tradicionais, e deste modo apresentando diferenças significativas nos modelos de *GHR* 5'-UTR – liciferase de tradução⁵⁸.

De acordo com os estudos de Kopchick e Andry⁵⁹ realizados em humanos e camundongos, a regulação da expressão do gene *GHR* ocorre pela região promotora e éxon-1, onde estes são responsáveis pela codificação de inicialização. Como pode ser observado na Figura 1, a expressão do gene codifica toda a proteína do *GHR* determinando os diferentes domínios proteicos em função da sequência do gene. Deste modo o éxon-2 é responsável por codificar os primeiros aminoácidos da proteína, e serão responsáveis por estruturar a região inicial do domínio extracelular do *GHR*. Os éxons-3 a 7 são responsáveis pela codificação da maior parte do domínio extracelular. O éxon-8 codifica os três últimos aminoácidos do domínio extracelular, os quatro aminoácidos iniciais do domínio intracelular, e todos os aminoácidos hidrofóbicos do domínio transmembrana, local este que apresenta a mutação do tipo substituição de bases formando o polimorfismo F279Y do gene do *GHR*⁹. Os éxons finais 9 e 10 possuem as bases nitrogenadas responsáveis por codificar os aminoácidos restantes da região intracelular, onde se localiza a região do Box-1, responsável pela fosforilação da proteína JAK-2 que inicia o processo de sinalização celular em resposta a indução do *GHR* pelo GH⁵⁵.

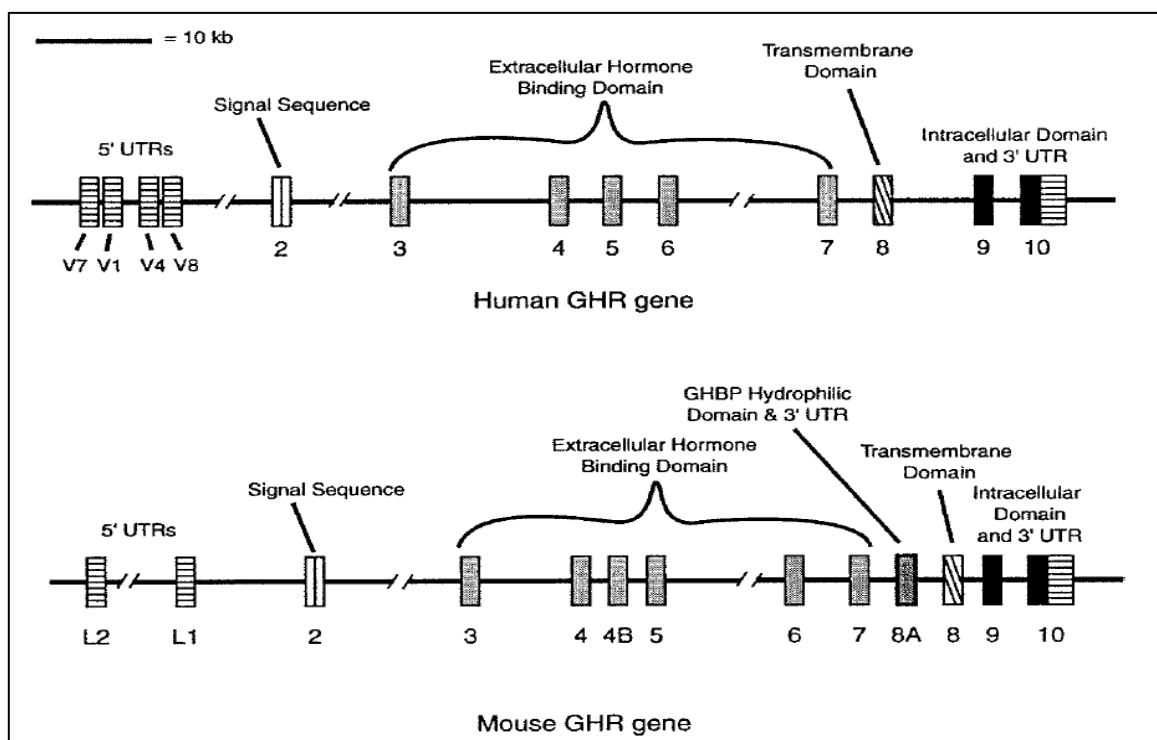


FIGURA 1 – Estrutura do gene do *GHR* humano e do camundongo. A linha horizontal representa a sequência de introns e os retângulos indicam a posição dos éxons. Os éxons são indicados pelos respectivos domínios criados após a tradução do gene.

Fonte: Kopchick e Andry⁵⁹

O gene do *GHR* apresenta um número grande de polimorfismos em diferentes regiões, podendo ser encontradas alterações tanto na região promotora, nos íntrons e nos éxons. Deste modo este gene se torna um possível candidato para análise de potencial genético por marcador molecular em processos seletivos no futuro. Dentre os polimorfismos encontrados ao longo deste gene em bovinos e com relação direta com a capacidade de produção de leite e mudanças na sua composição, podemos citar aqueles presentes na região promotora (*GHR*2.6, *GHR*4.1, *GHR*4.2, *GHR*6.1, *GHR* 9.1, *AluI*)^{6, 8, 52}, no éxon 1A (AF126288-145)⁸ e no Éxon 8 (F279Y)^{8, 23, 44}. Porém os resultados apresentam maior relação de variação entre a produção e/ou composição do leite bovino aqueles SNPs que estão localizados no éxon 8, sendo denominado polimorfismo genético do tipo F279Y do gene do receptor do hormônio do crescimento^{7, 9, 23, 44}.

2.3. Características moleculares e fisiologia da proteína do Receptor Transmembrana do Hormônio do Crescimento

O GH (Hormônio do Crescimento) ou somatotropina é um hormônio sintetizado pela hipófise, especificamente pela parte anterior, é sua principal função é a promoção do crescimento através do estímulo das cartilagens epifisárias de ossos longos e da massa muscular. Este hormônio também é responsável pelas funções metabólicas específicas como reações anabólicas, lipolíticas e agonistas semelhante a insulina⁶⁰. A secreção de GH é controlado pelo *GHRH* (Hormônio liberador do hormônio do crescimento), somatostatina e em menor intensidade pela *GHRelina*^{61, 62}. A concentração de GH e IGF-1 (hormônio de crescimento semelhante a insulina) na corrente sanguínea também são responsáveis por controlar a liberação do GH pelo processo de *feedback* negativo, atuando diretamente no hipotálamo ou na própria hipófise⁶².

Após a secreção, a GH age através da ligação com seu receptor de membrana (*GHR*), estimulando a produção hepática e tecidual de IGF-I, um polipeptídeo de cadeia pequena com 79 aminoácidos, com grande semelhança estrutural com a pró-insulina, sendo o responsável primordial pelos efeitos biológicos da GH⁶³. Segundo Oliveira et al.⁶⁴ a IGF-I é produzido pelo tecido hepático e também em outros tecidos corporais. Esse hormônio é secretado pelo fígado em resposta ao estímulo da GH, sendo o mais potente estimulador da síntese proteica corporal⁶⁵, e deste modo é considerado o mediador dos efeitos anabólicos da GH.

O Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*) pertence a uma classe de receptores químicos denominados Classe I das Citocinas, que são responsáveis pela regulação de vários processos, incluindo o crescimento pós-natal, a eritropoiese, mielopoiese, lactação e outros processos metabólicos corporais⁶⁶. Os membros da família das citocinas incluem os receptores de eritropoietina, b-cadeia das interleucinas (IL-2, IL-9, IL-11 e IL-12), Trombopoietina e fator de inibição da leucemia, distantes podemos apresentar também os receptores de interferon⁶⁷.

A *GHR* apresenta uma estrutura tridimensional na membrana citoplasmática com três diferentes domínios moleculares, um extracelular, um hidrofóbico único transmembranar e um intracelular (Figura 2). A região extracelular apresenta dois domínios onde o primeiro possui 123 aminoácidos (1 ao 123) e o segundo com 118 aminoácidos (128 ao 138) e um resíduo de ligação (124 ao 127), totalizando 244 aminoácidos⁶⁶, estes domínios apresentam

uma alta afinidade de ligação, conferindo uma grande capacidade de interação específica com o GH⁵⁴. O domínio citoplasmático apresenta uma região proximal rica em prolina conhecida como BOX-1 que apresenta esquematicamente uma estrutura presente no grupo das citocinas representado por: C-XXX-AL-P-X-P, onde o C representa o resíduo hidrofóbico, X é uma aminoácido qualquer, AL é o resíduo alifático e P é uma prolina⁵⁹, uma segunda região hidrofóbica e encontrada abaixo do BOX-1 em direção ao C-terminal sendo denominado BOX-2^{54, 59}. A região do BOX-1 é um domínio extremamente importante para a formação da reação de dimerização do *GHR* e ativação do receptor intracelular do tipo quinase (Janus Kinase – JAK-2)^{55, 68}.

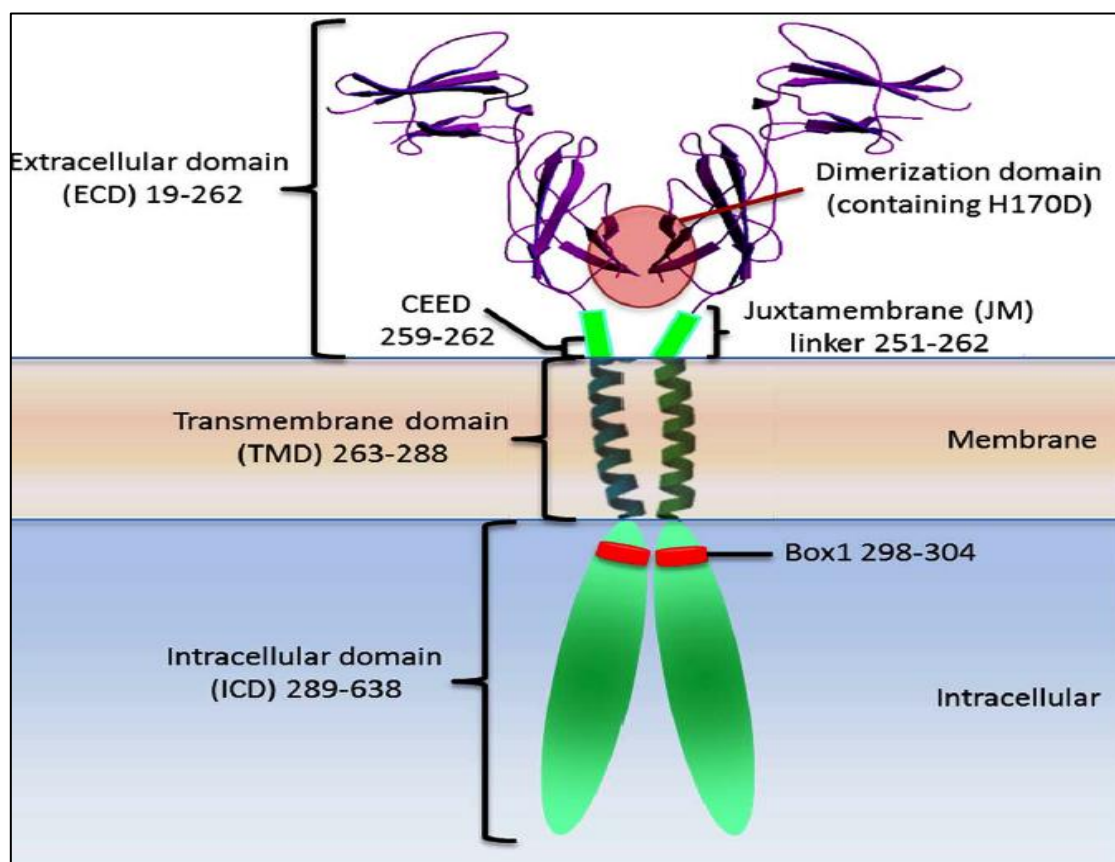


FIGURA 2 – Modelo esquemático do *GHR* mostrando os domínios extracelular, transmembrana e intracelular com a região do BOX-1.
Fonte: Brooks et al.⁵⁵.

O conceito da ação do *GHR* foi determinado por avaliação da estrutura biofísica associada a mecanismos de dados, e isso levou a um modelo de ativação do receptor onde a dimerização do receptor era induzida por hormônio, causando a mudança conformacional dos domínios intracelulares, e com isso a ativação de cadeias catalíticas dentro dos próprios domínios, que levaram a ativação de quinases⁵⁵. O início da sinalização do *GHR* requer uma

única molécula de GH que se liga aos dois domínios extracelulares de modo a fazer com que ocorra a dimerização do receptor e consequentemente sua mudança conformacional⁵⁴. Como pode ser visto na Figura 3, a mudança estrutural do receptor ocorre pela aposição dos dois domínios intracelulares do receptor e deste modo a separação dos domínios intracelulares com ativação do BOX-1, e deste modo ativação dos domínios JAK-2, iniciando todas as reações bioquímicas de ativação celular de responsabilidade do receptor do hormônio do crescimento^{55, 69}.

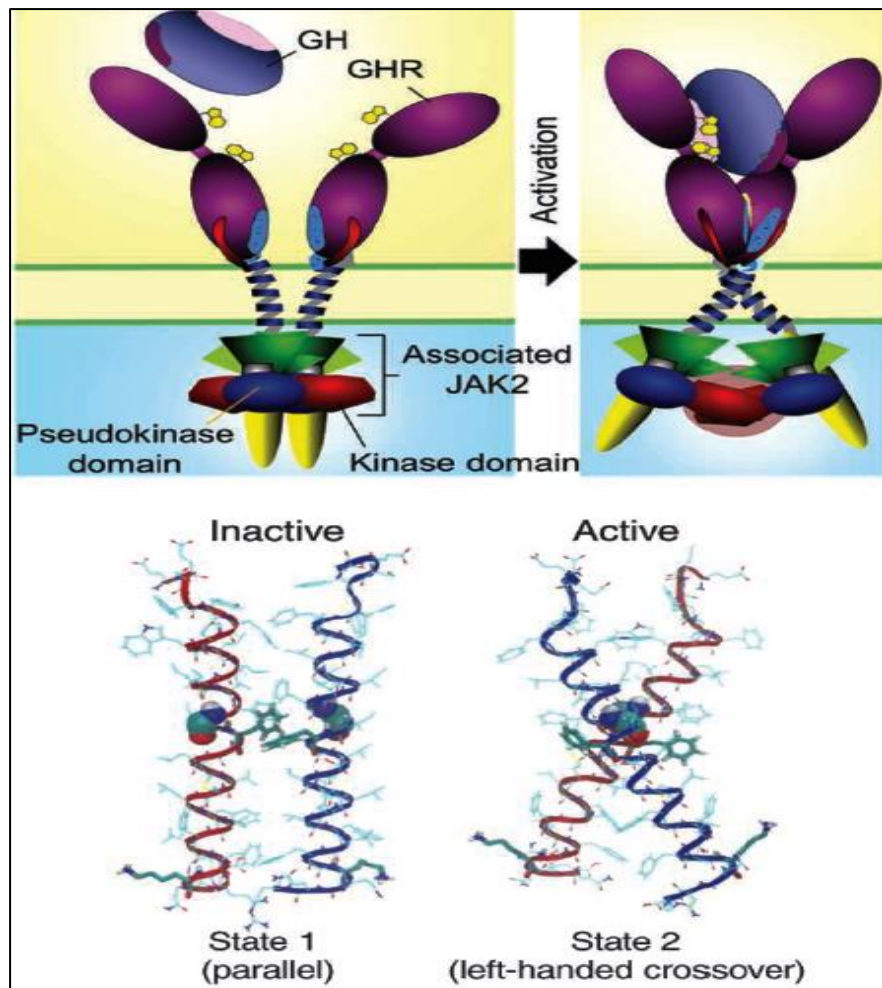


FIGURA 3 – Esquema demonstrando a estrutura dimensional do *GHR*. No lado esquerdo é apresentado o receptor inativo antes da ligação com o GH e a direita observa-se o receptor ativado após a interação com o hormônio do crescimento.
Fonte: Brooks et al.⁵⁵.

Após a ligação do GH no domínio extracelular, a conformação espacial do *GHR* é alterada causando uma importante mudança na estrutura intracelular da proteína. Com essa mudança ocorre a ativação da JAK-2 no domínio BOX-1 através da aproximação dos dois domínios do receptor, causando deste modo a fosforilação da tirosina. Essas tirosinas fosforiladas são importantes para formar sítios de ligação de alta afinidade para uma grande variedade de proteínas de sinalização, que contém domínios de ligação tais como os Domínios Obrigatórios de Fosfotirosina (POD) e src Homology 2 (SH2)^{55, 70}. Tais ativações determinam reações que se assemelham aquelas causadas pela insulina, dentre essas incluem o aumento transitório nos níveis de glicose, transporte de aminoácidos, a lipogênese e a síntese proteica. Como efeito da ativação pelo GH ocorre a fosforilação dos substratos do receptor de insulina tipo 1,2 e 3 (IRS-1,2 e 3), e isso determina o transporte de glicose para o interior da célula, como pode ser visto na Figura 4. A ação do GH para a redução de gordura corporal envolve tanto a diminuição da lipogênese quanto o aumento da lipólise, porém os mecanismos de sinalização pelo qual o GH regula esses processos não estão completamente esclarecidos, mas acredita-se que o envolvimento das proteínas STATs apresentam importante papel nesta regulação⁷⁰.

Após a liberação do GH muitas proteínas são fosforiladas juntamente com a JAK-2, dentre elas uma proteína com 95 kDa é ativada, esta proteína foi identificada como Ativador e Transdutor de Sinal de Transcrição s (STATs)^{55, 69, 71}. A Figura 5 mostra a participação das proteínas STATs na sinalização do *GHR* após a ativação pelo GH. As proteínas STATs são um grupo de proteínas que após a ativação pelas citocinas, participam no processo de expressão de vários genes. A STAT5 é ativada pela ação de fosforilação da JAK2, após a fosforilação adequada as proteínas STAT citoplasmática formam dímeros que são translocados para o núcleo celular, onde ocorre a ativação da transcrição do gene por ligação ao DNA^{55, 69}. A STAT5 foi inicialmente clonada e identificada em glândulas de ovelhas, onde essa proteína se ligava ao gene responsável pela codificação glandular do fator de b-caseína. Deste modo a STAT5 é a principal proteína fosforilada pela JAK2 com função definida de indução da expressão gênica e desta forma finalização da ação do GH sobre a ligação com seu receptor, o *GHR*⁵⁹.

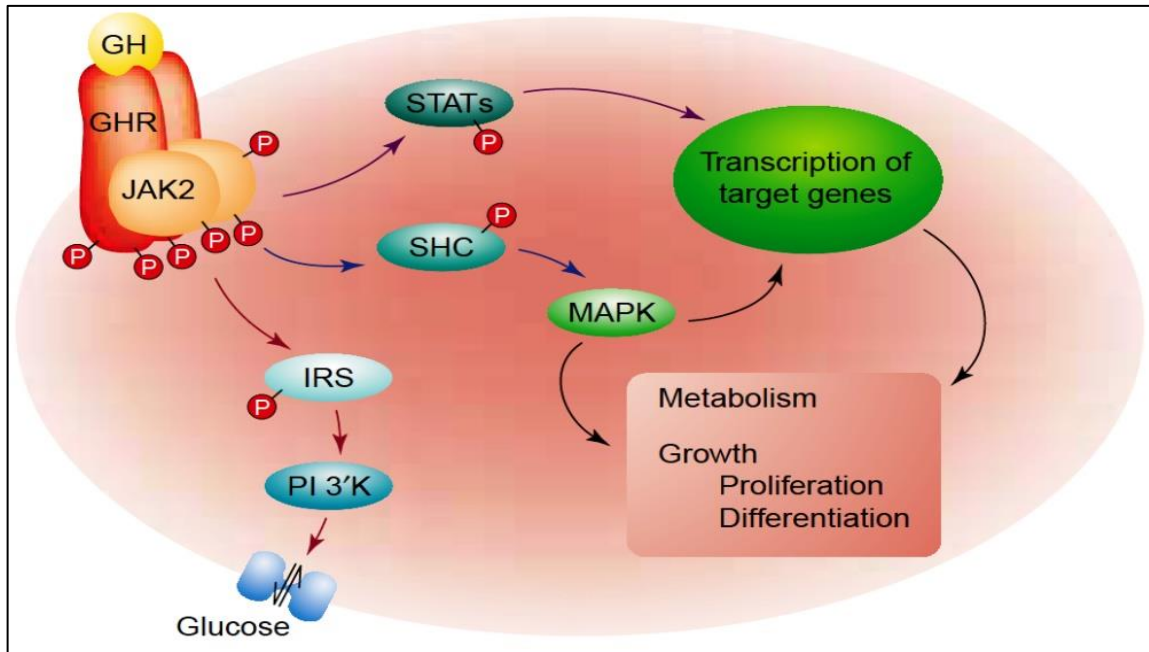


FIGURA 4 – Vias de sinalização do receptor de GH. Algumas das vias de sinalização são iniciadas por ativação de JAK2 pelo GH. JAK2 fosforila SHC, levando à ativação de MAPK. JAK2 também fosforila fatores de transcrição STATs. MAPK e STATs são importantes para regulação da transcrição de genes do GH. JAK2 fosforila proteínas IRS, que são importantes para levar a ativação de PI 3'K (PI3K-quinase) que determina a ativação do transporte de glicose. Fonte: Herrington e Carter-Su⁷⁰.

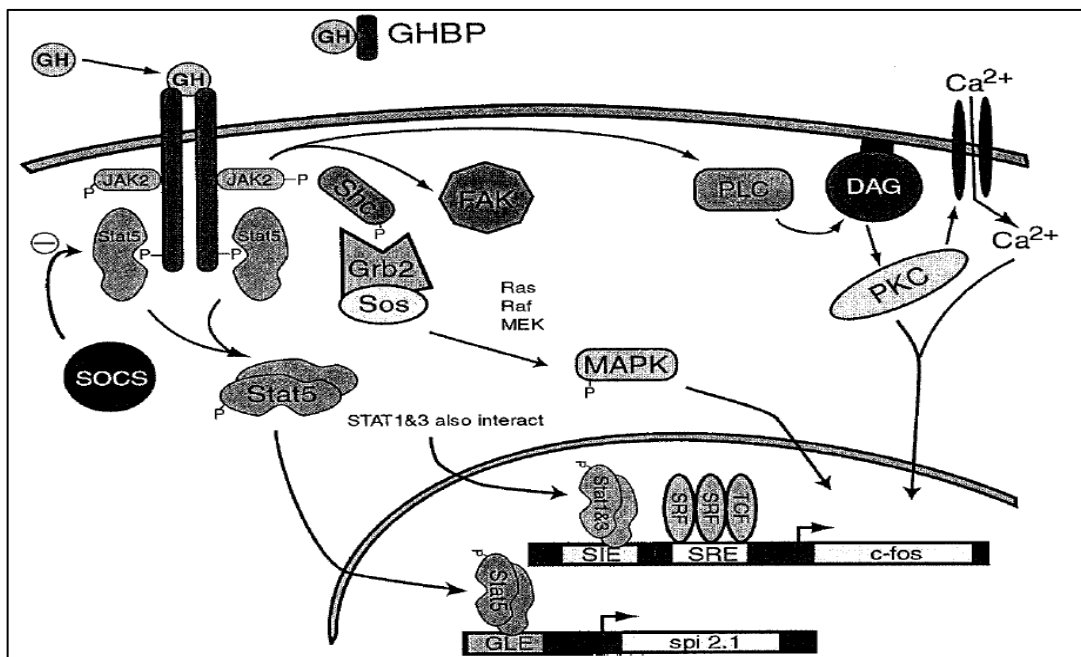


FIGURA 5 – Vias de sinalização do GHR após ligação do GH. Observar a via da proteína STAT5 que é fosforilada pela JAK2 e formam dímeros. Esses dímeros de STAT5 são direcionados para o núcleo e se ligam diretamente ao DNA sinalizando sua ativação via sítio GLE e spi 2.1. Fonte: Kopchick e Andry⁵⁹.

2.4. Principais SNP no gene do *GHR*

O gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*) está localizado no cromossomo 20 do cariótipo dos bovinos, e é responsável pela codificação da proteína transmembranar do receptor do hormônio do crescimento⁵⁵. Esse gene apresenta 10 éxons, onde o primeiro participa da regulação de codificação do mesmo, podemos identificar também uma região promotora 5'UTR e nove íntrons⁵⁹. De acordo com o NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/280805>) o gene do *GHR* em *Bos taurus* apresenta 226 kpb (quilos pares de bases) e 68 sites de mutação por substituição de bases, ou seja, polimorfismo genético do tipo SNPs.

Dentre os diferentes SNPs encontrados no gene do *GHR* dos bovinos um grande número foi estudado quanto a sua capacidade de interferir na produção animal. Dentre os estudos foram avaliados a capacidade de mudança fenotípica em relação a produção e composição da carne e carcaça de bovinos de corte^{52, 72, 73}, mas principalmente foram avaliados as mudanças realizadas na produção e composição do leite bovino. A Tabela 2 apresenta os principais pontos de mutação do tipo SNP no gene do *GHR* e suas interferências na produção e composição do leite bovino.

De acordo com vários estudos realizados em diferentes locais, utilizando diferentes raças de bovinos leiteiros, o polimorfismo genético do tipo SNP localizado no gene do receptor do hormônio do crescimento que mais interfere na produção de leite é o F279Y localizado no éxon 8 do gene, com capacidade de interferir na produção de leite e composição do leite^{7, 8, 23, 41, 44, 74, 75}. As alterações de produção são diferentes para cada SNP e podem apresentar correlação entre ou não entre esses SNPs, para cada base alterada existe uma mudança na síntese proteica do receptor do hormônio^{7, 9, 23, 41} ou simplesmente uma mudança na transcrição da informação genética^{6, 7, 51}.

TABELA 2 – Principais SNPs no gene do receptor do hormônio do crescimento (*GHR*) e suas relações com a produção e composição do leite bovino

Nome do SNP	Local no gene	Alteração fenotípica encontrada	Referência
<i>Alu I</i>	Região 5' UTR região promotora	A substituição da base A por T determina aumento nos teores de gordura no leite de vacas Holandesas	Aggrey et al. ⁶ Curi et al. ⁵²
<i>Snps5021</i>	Intron 8	Aumento de proteína na raça holandesa	Rahbar et al. ⁷ Signorelli et al. ⁴¹
<i>Snps507</i>	Região 5' UTR região promotora	Aumento nos teores de gordura e proteína	Signorelli et al. ⁴¹
<i>GHR4.2</i>	Região 5' UTR região promotora	A substituição da base G por T determina aumento da produção leite, gordura e proteína	Waters et al. ⁸
<i>GHR6.1</i>	Região 5' UTR região promotora	A substituição da base A por G determina aumento da produção de gordura e proteína	Waters et al. ⁸
<i>A-154G-NsiI</i>	Região 5' UTR região promotora	A substituição da base A por G determina diminuição da composição do leite em sólidos totais, sólidos desengordurados, proteína e gordura	Maj et al. ⁷⁶ Maj et al. ⁵¹
<i>FnU4HI-Tsel</i> (C-1104T)	Região 5' UTR região promotora	Não apresentou resultados significativos	Maj et al. ⁷⁷ Maj et al. ⁷⁶
<i>T-887C - AccI</i>	Região 5' UTR região promotora	O heterozigoto apresenta maior produção energia no leite e maior sólidos totais	Maj et al. ⁵¹
<i>GHR19.1(ss15</i> <i>9831016)</i>	Intron 2-3	A substituição da base A por C determina leves aumentos na composição de gordura e proteína	Waters et al. ⁸
<i>F126288pos.1</i> <i>49</i>	Éxon 1A Região promotora	A substituição da base A por G determina aumento na composição do leite em proteína e gordura	Garrett et al. ⁷⁸ Waters et al. ⁸
<i>Snps5021</i>	Éxon 8	A substituição da base T por C determina leves aumentos na produção de proteína	Signorelli et al. ⁴¹
<i>HpyCh4IIIA-</i> <i>Gpos.241</i>	Éxon 8 e Intron 8	Não avaliado para gado leiteiro	Maskur et al. ⁷²
<i>Snps7419 e</i> <i>Snps7470</i>	Éxon 10	Não apresentou resultados significativos	Signorelli et al. ⁴¹
<i>F279Y</i>	Éxon 8	A substituição da base T por A determina o aumento da produção de leite e a diminuição da composição do leite em proteína e gordura O alelo A determina aumento da produção O alelo T determina o aumento da composição do leite	Blott et al. ⁷⁵ Viitala et al. ⁷⁴ Fontanesi et al. ²³ Banos et al. ⁷⁹ Signorelli et al. ⁴¹ Sun et al. ⁸⁰ Rahbar et al. ⁷ Waters et al. ⁸ Rahmatalla et al. ⁹ Ma et al. ⁴⁴
<i>Rs110265189p</i> <i>os.650</i>	Éxon 10	Não apresentou resultados significativos	Mancini et al. ¹⁸

2.4.1. Polimorfismo na região promotora do gene *GHR*

O gene do *GHR* apresenta uma estrutura formada por 10 éxons, nove introns e uma região promotora de regulação gênica 5'-UTR. Dentre os 10 éxons o primeiro não apresenta atividade de transcrição o mesmo participa como regulador da ativação do gene em questão juntamente com outros éxons não traduzidos. Essa região 5'-UTR não codificante é responsável pela regulação da transcrição do gene e apresenta nove éxons não traduzidos, localizados ao longo de sua posição, estes são denominados como 1A, 1B, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H e 1I. A expressão destes ocorre de forma alternada a partir de pelo menos três promotores diferentes, denominados de P1, P2 e P3 que são ativados por vários fatores de transcrição nuclear⁸, onde todos são ativados por vários fatores de transcrição diferentes, incluindo a ligação direta do fator nuclear de hepatócitos -4y (HNF-4y) e Sp1^{81, 82}. A transcrição do gene *GHR* em bovinos é iniciada por três promotores principais da sequência de éxons da região 5'-UTR do gene, estes apresentados como 1A, 1B e 1C, gerando as variantes de RNAm do tipo 1A, 1B e 1C respectivamente⁵⁸.

A região de ligação das enzimas reguladoras da transcrição que se ligam ao TATA Box do gene *GHR* ocorre na localização anterior e próxima a sequência de início do éxon 1 (TAC) com uma distância de 30 pb⁸³. A sequência do TATA Box esta localizado na região promotora do gene classificada como P1, este promotor está inserido no éxon 1A que é uma região específica de regulação do gene, esta região pode ser encontrada pelo número U15731.2 no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/13570031/?report=genbank>).

A região promotora 5'-UTR apresenta um número grande de polimorfismos em diferentes regiões dos éxons não traduzidos que regulam a expressão gênica⁸. Estes polimorfismos são importantes para a compreensão da transcrição do RNAm para construção do *GHR* e também para determinar as diferenças encontradas entre animais com expressões gênicas capazes de interferir na produção animal por mudanças na função do receptor do hormônio do crescimento⁸⁴.

Dentre os polimorfismos encontrados na região 5'-UTR do gene do *GHR* Aggrey et al.⁶ realizou um estudo de sites de polimorfismos do tipo SNPs na região promotora do gene localizada no éxon 1A onde os autores apresentam três sítios de restrição enzimáticas capazes de interferir na produção e composição do leite bovino. Com base neste estudo o polimorfismo do tipo PCR-RFLP com uso da enzima de restrição *AluI* na posição -1182 (mutação de transição de uma A para T) apresentou uma elevação nos teores de gordura no

leite para os animais que apresentavam restrição enzimática comparados com aqueles que não o apresentavam. Os polimorfismos identificados com as enzimas de restrição *AccI* na posição -892 (mutação de transição de uma C para T) e a enzima *StuI* na posição -232 (mutação de transição de uma C para T) da região promotora, não apresentaram diferenças significativas entre os animais com restrição enzimáticas daqueles que não a tiveram. Estes mesmos pontos de polimorfismos do tipo PCR-RFLP foram estudados por outros autores, encontrando resultados semelhantes⁷ ou não encontraram resultados significativos⁵³.

Outros sítios de polimorfismos do tipo SNPs da região promotora foram identificados e associados com a capacidade de interferir na produção e composição do leite bovino, como pode ser observado na Tabela 2. Waters et al.⁸ fizeram um estudo com 39 SNPs em diferentes pontos da região 5'-UTR do gene do *GHR*, dentre estes pontos de polimorfismos foram encontrados apenas dois SNPs com capacidade de interferir na produção e composição do leite, o SNP *GHR*4.2 (mutação G para T) localizado na posição 34153375 do cromossomo 20 do genoma bovino e o SNP *GHR*6.1 (mutação A para G) na posição 34121009 com associações de aumento na produção de leite para o SNP *GHR*4.2 e aumentos de gordura e proteína para ambos SNPs. Polimorfismos associados com o aumento da produção e composição do leite foram encontrados no SNP Snp5021⁴¹, T-887C *AccI*⁵¹ e AF126288 pos -149^{8, 78}. Aqueles associados com a diminuição da produção e composição foi apresentado o SNP A-154G *NsiI*^{51, 76} e aqueles que não apresentaram alterações como foi relatado por Maj et al.⁷⁷ no SNP FnU4HI *TseI* com uma transição de C para T na posição -1104 do gene.

2.4.2. Polimorfismo no éxon 8 do *GHR*

O gene do *GHR* apresenta um número grande de polimorfismos e estes podem ser encontrados na região promotora do gene, nos íntrons e nos éxons. Dentre os polimorfismos encontrados ao longo deste gene em bovinos e que apresentam relação direta com a produção de leite e mudanças na sua composição, podemos apresentar aqueles presentes na região promotora^{6, 8, 52}, no éxon 1A⁸ e no Éxon 8^{8, 23, 44}. Porém os resultados apresentam maior relação de variação entre a produção e/ou composição do leite bovino os polimorfismos que estão localizados no éxon 8^{7, 9, 23, 44}.

Estudos realizados por Waters et al.⁸ mostram que o polimorfismo do tipo SNP no gene do *GHR* são capazes de interferir na produção e composição do leite, os mesmos autores encontraram essas alterações no éxon 8, éxon 10, intron 1-3 e região promotora do gene, e dentre elas as alterações do éxon 8 foram aqueles que apresentaram maior relação com mudanças na produção e composição do leite bovino.

O éxon-8 codifica os três últimos aminoácidos do domínio extracelular bem como os quatro aminoácidos iniciais do domínio intracelular, e todos os aminoácidos hidrofóbicos do domínio transmembrana⁵⁹. O polimorfismo existente neste éxon é do tipo SNP com uma substituição da base nitrogenada Timina pela base Adenina, formando assim uma mutação de substituição do aminoácido Fenilalanina pelo aminoácido Adenina na posição 279 da sequência de aminoácidos da proteína do receptor do hormônio do crescimento^{7, 9, 23}. De acordo com os dados no NCBI, podemos observar também a presença de um SNP por substituição da base Timina pela base Adenina, onde esta troca ocorre na posição 4734 pb a partir do início da tradução da proteína do *GHR*. Este SNP pode ser identificado a partir da posição 63 pb a partir do início da sequência do éxon 8.

A substituição da base Timina (T) pela base Adenina (A) determina uma alteração na função do receptor do hormônio do crescimento permitindo assim mudanças na produção do animal. Animais com a presença da base T em ambos os cromossomos (homozigotos para T) apresentam uma melhor capacidade para produção de leite com níveis mais elevados de gordura e proteína, enquanto animais com a base A em ambos os cromossomos (homozigoto para A) determinam uma melhor capacidade de produção total de leite^{9, 44, 75}. Embora Banos et al. 2008⁽⁷⁹⁾ e Signorelli et al.⁴¹ não encontraram resultados significativos entre os grupos de animais estudados para a produção de leite, foi observado alterações na produção de gordura para os animais com o alelo A^{41, 79} e melhor capacidade de ingestão de matéria seca e energia para os animais com a presença do alelo T⁷⁹.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Verificar a distribuição das variantes polimórficas da região promotora e do éxon 8 no gene do Receptor do Hormônio do Crescimento (*GHR*) em vacas da raça Holandesa em lactação.

3.2. Objetivos específicos

Estimar as frequências genotípicas e fenotípicas para os polimorfismos encontrados na região promotora do gene do *GHR* no grupo estudado.

Estimar as frequências genotípicas e fenotípicas para os polimorfismos encontrados no éxon 8 do gene do *GHR* no grupo estudado.

Avaliar estatisticamente a associação dos polimorfismos encontrados na região promotora e éxon 8 do gene do *GHR* e seus efeitos sobre a lactação e suas respectivas composições do leite em proteína, gordura, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Delineamento do estudo

A primeira fase experimental constitui na coleta de dados das duas primeiras lactações e das respectivas composições do leite. Esta etapa foi realizada na Fazenda Lajes, situada no município de Cristalina/Goiás, localizada a 228 km a leste da capital estadual, Goiânia. A propriedade apresentava uma média de 740 vacas em lactação com produção de aproximadamente 23.000 kg de leite por dia.

A segunda fase do experimento foi realizada no laboratório de Genética Molecular e Microrganismos do Instituto de Ciências Biológicas (ICB-II) da Universidade Federal de Goiás (UFG), onde foram realizadas as extrações de DNA e análises de polimorfismo genético.

Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Goiás, sob protocolo nº 054/2015.

4.2. Animais e dados de produção

Foram usadas no estudo 106 vacas (*Bos taurus taurus*) da raça Holandesa. Estes animais foram criados em sistema de confinamento total do tipo Free Stall. As vacas são ordenhadas três vezes ao dia. A dieta dos animais obedecia uma cota diária composta por ração total, com consumo *ad libitum*. O consumo de água foi *ad libitum* em bebedouros específicos. O ambiente é controlado com uso de aspersores e ventiladores capazes de formar um microclima interno suficiente para evitar o estresse térmico.

Os dados de produção foram obtidos a partir de um Banco de Dados *in loco*, integrado com a Associação Goiana de Criadores de Gado Holandês. A lactação dos animais foi ajustada em 305 dias com o propósito de equiparar as produções dos animais. As pesagens de leite foram realizadas automaticamente pelo equipamento de ordenha, fazendo parte da rotina de manejo da propriedade. Amostras de leite foram coletadas individualmente, após cada ordenha, com uma frequência de uma coleta por mês, obedecendo às recomendações de coleta e envio do laboratório LQL da Escola de Veterinária da UFG. As amostras foram enviadas para análise da composição em gordura (GORD), proteína (PROT), estrato seco total (EST), estrato seco desengordurado (ESD) e contagem de células somáticas (CCS). As

análises foram realizadas utilizando o princípio analítico de Citometria de Fluxo para determinação da contagem de células somáticas. Para a determinação da composição centesimal de gordura e proteína foi utilizada a técnica por Infra-Vermelho Próximo.

A seleção dos animais a serem utilizados no experimento foi realizada dentro de um grupo total de mais de 700 animais dentro da propriedade, e destes foram selecionados 150 animais obedecendo aos seguintes critérios: Apenas vacas em lactação; animais que apresentaram a primeira e segunda lactação completa; apenas animais que apresentaram o primeiro parto no ano de 2011, 2012 ou 2013; foram excluídas as vacas que não possuíam dados de composição do leite dentro da média, ou seja, muito acima ou muito abaixo dos padrões raciais; eliminação aleatória até obter um quantitativo de 150 vacas dentro do rebanho. Após a seleção dos animais foi realizada a coleta de sangue, no momento da coleta alguns animais não estavam presente na fazenda, por motivo de morte ou venda, e 12 vacas foram transferidas para outro município para coleta e transferência de embriões. Deste modo foram coletadas amostras de sangue para extração de DNA de 106 vacas.

4.3. Coleta das amostras

A coleta de amostras para extração do DNA foi realizada através do sangue periférico. As amostras de sangue foram coletadas da veia coccígea dos animais. Foram coletados 4 mL de sangue em tubo heparinizado à vácuo. Imediatamente, após a coleta, as amostras foram homogeneizadas e colocadas em caixas isotérmicas com gelo seco a uma temperatura inferior a -78°C , para serem transportadas até ao laboratório. No mesmo dia da coleta, as amostras foram armazenadas em Freezer -80°C até o momento de extração e purificação de DNA.

4.4. Extração e quantificação do DNA

Para extração e purificação de DNA das amostras obtidas, foi utilizado o kit de extração *PureLink® Genomic DNA Kits* (Invitrogen®) onde foi obedecido o protocolo de extração sugerido pelo fabricante (ANEXO A). Após a extração, as amostras foram rotuladas e armazenadas em freezer a -20°C . Posteriormente a extração e purificação do material genômico, as amostras foram previamente quantificadas por espectrofotometria em

quantificador específico (NanoDrop® - Thermo Scientific), e novamente armazenadas à -20°C até o momento em que as mesmas foram utilizadas nas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR, do inglês *Polymerase Chain Reaction*).

4.5. Identificação dos polimorfismos no gene *GHR* com uso das enzimas *AluI* e *SspI* pela técnica de PCR-RFLP

Para análise dos genótipos do gene do *GHR* mediante PCR-RFLP foram avaliados dois pontos diferentes no gene, o primeiro foi realizado no fragmento posicionado na região promotora do gene (Éxon 1A) usando a enzima de restrição *AluI*. Para amplificação desta região utilizou-se os *primers* sugeridos por Aggrey et al.⁶ como apresentado na Figura 6 e Tabela 3.

O segundo ponto para observação do polimorfismo foi desenvolvido no éxon 8 do gene, e para isso utilizou-se a enzima *SspI* e os *primers* sugeridos por Fontanesi et al.²³ para obtenção do fragmento de DNA. Como descrito por Fontanesi et al.²³ o local do polimorfismo no éxon 8 não apresenta sítio de restrição para nenhuma enzima conhecida. Deste modo foi desenvolvido um *primer* capaz de substituir uma base nitrogenada timina (T) por uma adenina (A) na sequência do fragmento onde se localiza o polimorfismo estudado, e deste modo criar um sítio de restrição da enzima *SspI* (AAT^tATT) no local onde se localiza o polimorfismo utilizado neste estudo, como pode ser observado na Figura 7 e Tabela 3.

TABELA 3 - *Primers* utilizados para genotipagem dos fragmentos do gene *GHR* para identificação dos respectivos polimorfismos

<i>Primers</i>	Sequência	Amplicom
Região promotora	F: 5' TCGTGCACAGCAGCTCAACC 3'	842 pb
	R: 5' AGCAACCCCACTGCTGGGCAT 3'	
Éxon 8	F: 5' AATACTTGGGCTAGCAGTGACA <u>A</u> TAT 3'	182 pb
	R: 5' AGCTTTCACCTGGGTTGATGA 3'	

A = base nitrogenada inserida no local da base timina através do primer.

Todas as amostras foram submetidas à PCR utilizando um volume final de 25µL, contendo aproximadamente 100ng de DNA das amostras previamente quantificadas, 0,2

nmoles de cada *primer* (Tabela 3), 1X PCR *Buffer* (1 mM de Tris-HCl), 1,3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP (dATP, dTTP, dGTP, dCTP) e 1,0 U Taq DNA polimerase *platinum*. As amostras foram amplificadas em termociclador (BioRad T100 – Thermal Cycler) de acordo com o protocolo que pode ser observado na Tabela 4.

Os produtos pós PCR foram encaminhados à análise da amplificação dos fragmentos 842 pb (região promotora do gene) foi utilizado 9 µL do produto da PCR com adição de 1 µL de tampão de corrida (EDTA 0,5 mM, bromofenol blue 0,25%, glicerol), a mistura foi submetida a eletroforese em gel de agarose a 2% com 5 µl de brometo, banhado em TBE 1X, mediante aplicação de um campo elétrico constante de 85 mV por 1,5 horas. Posteriormente o gel foi visualizado em transluminador com luz ultravioleta e em seguida as imagens foram capturadas para análise da amplificação. Foi utilizado marcador molecular de 100 pb.

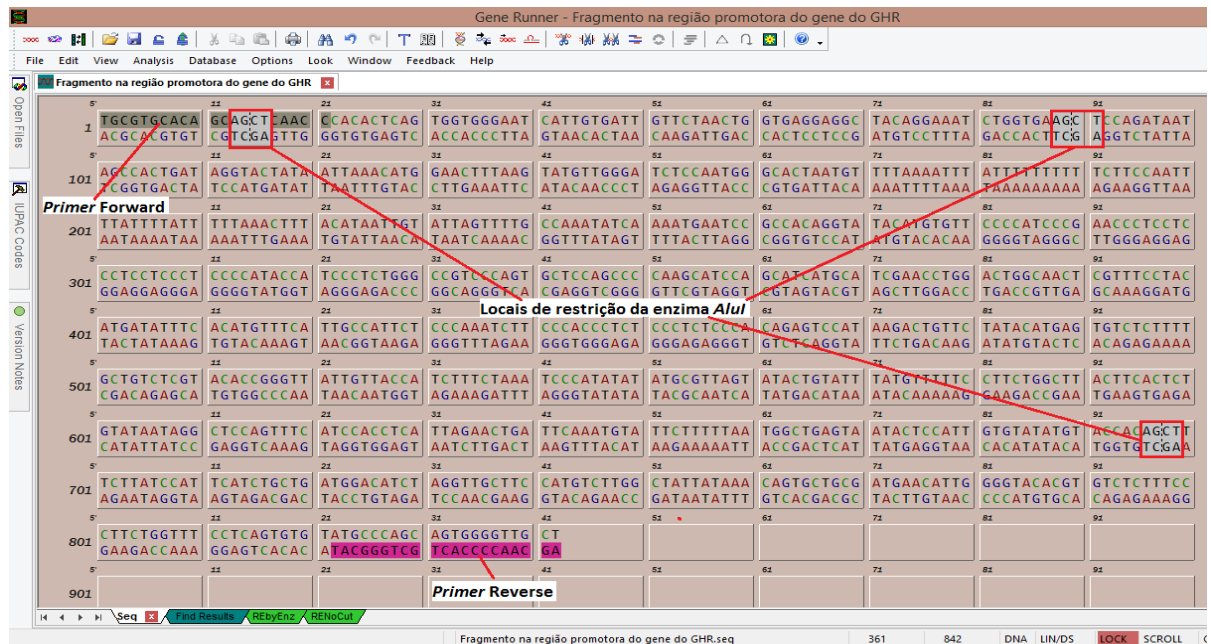


FIGURA 6 – Sequência FASTA do fragmento posicionado na região promotora do gene do *GHR* demonstrando a posição e sequência dos primers e locais de restrição da enzima *AluI*. Dados obtidos com uso do software GeneRunner.

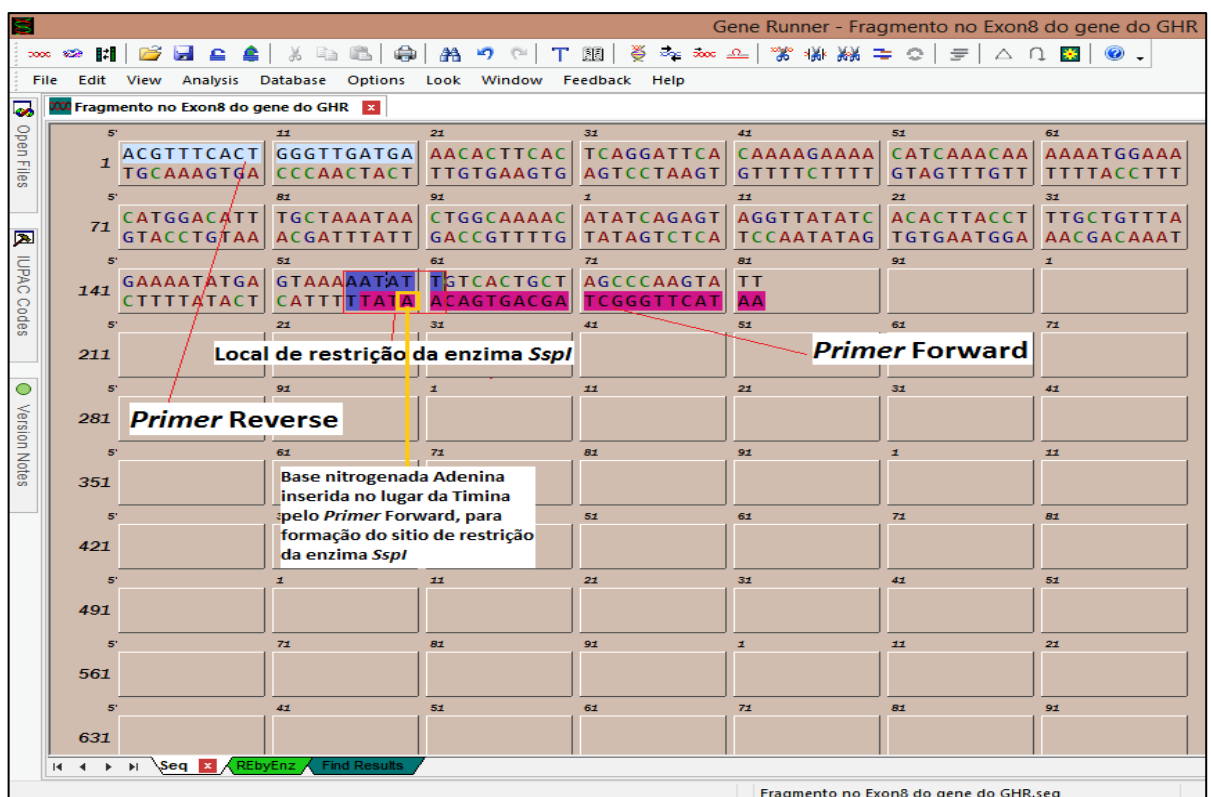


FIGURA 7 – Sequência FASTA do fragmento posicionado no éxon 8 do gene do *GHR* demonstrando a posição e sequência dos primers e local de restrição da enzima *SspI*. Dados obtidos com uso do software GeneRunner.

TABELA 4 - Condições de termociclagem para a genotipagem dos fragmentos da região promotora e éxon 8 do gene do *GHR*

Etapas PCR	Temperatura	Tempo (min.)	Ciclos
Desnaturação inicial	94°C	5:00	1
Desnaturação cíclica	94°C	1:00	35
Anelamento	59°C	1:00	35
Extensão cíclica	72°C	1:30	35
Extensão final	72°C	7:00	1
Armazenamento	4°C	∞	1

Os fragmentos de 842 pb foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *AluI*. Na reação enzimática foram utilizados 10 µL de solução, que continham água Mili-Q Estéril, 1X de tampão da enzima, 0,5 U da enzima *AluI* e 10 µL de *amplicon*. Posteriormente, as amostras foram submetidas à digestão enzimática por 1 hora à 37°C, com posterior inativação enzimática por 20 minutos à 60°C. Após a digestão os fragmentos foram identificados através de visualização em gel de poliacrilamida 12%. Para visualização dos fragmentos foram utilizados 9 µl do produto da digestão pela enzima *AluI* e 1µL de solução de tampão de corrida (EDTA 0,5 mM, bromofenol blue 0,25%, glicerol), como marcador molecular foi utilizado fragmentos de 10 pb. A solução foi depositada no gel de poliacrilamida imerso em TBE 1X, previamente preparado e solidificado, com acrilamida 40% (acrilamida, bis-acrilamida e água destilada), TBE 10X, APS 10%, TEMED e água destilada. Para separação dos fragmentos foi realizada eletroforese vertical com uma tensão de 80 mV por 4 horas. Para visualização dos fragmentos resultantes da digestão enzimática, o gel foi corado pela técnica de Nitrato de Prata (AgNO₃) [Anexo A], e em seguida as imagens foram capturadas em câmera digital para análise dos fragmentos e identificação dos polimorfismos.

Para análise da amplificação dos fragmentos de 182 pb (éxon 8 do gene do *GHR*) foi utilizado as mesmas técnicas descritas anteriormente para o fragmento de 842 pb da região promotora. Após a amplificação os fragmentos foram submetidos à técnica de PCR-RFLP utilizando a enzima de restrição *SspI*. Nesta reação foram utilizados 10 µL da solução de restrição (0,5 U da enzima *SspI*, 1X de tampão da enzima, água Mili-Q Estéril) e 10 µL de *amplicon*. A digestão enzimática foi realizada em termociclador por 1 hora a 37°C e posterior inativação da enzima por 20 minutos à 60°C. Após a digestão os fragmentos foram

identificados através de visualização em gel de poliacrilamida 12%. Para visualização dos fragmentos foram utilizados 9 µL do produto da digestão pela enzima *SspI* e 1µL de solução de tampão de corrida (EDTA 0,5 mM, bromofenol blue 0,25%, glicerol), como marcador molecular foi utilizado fragmentos de 10 pb. A solução foi depositada no gel de poliacrilamida imerso em TBE 1X, previamente preparado e solidificado com acrilamida 40% (acrilamida, bis-acrilamida e água destilada), TBE 10X, APS 10%, TEMED e água destilada. Para separação dos fragmentos foi realizada eletroforese vertical com uma tensão de 80 mV por 4 horas. Para visualização dos fragmentos resultantes da digestão enzimática, o gel foi corado pela técnica de Nitrato de Prata (AgNO_3) [Anexo A], e em seguida as imagens foram capturadas em câmera digital para análise dos fragmentos e identificação dos polimorfismos.

4.6. Análise estatística

Para a análise dos dados das médias de lactação e composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas, foi realizada análise de variância e teste de tukey (quando necessário) considerando o modelo estatístico abaixo:

$$Y_{ijklmnopq} = \mu + G1_i + G2_j + G1G2_{ij} + ESTP_k + ANOP_l + b_1IDPP_m + b_2IEP_n \\ + LACT_o + TOR_p + ANI_q + e_{ijklmnopq}$$

Onde $Y_{ijklmnopq}$ é a característica de produção ou composição do leite, μ é a média geral das observações, $G1_i$ e $G2_j$ são os efeitos fixos dos polimorfismos da região promotora (AA, AB, BB) e éxon 8 (YY, FY, FF) do gene do *GHR* respectivamente, $G1G2_{ij}$ é o efeito da interação entre os respectivos polimorfismos, $ESTP_k$ é o efeito fixo da estação de parto ($k=1,2$), $ANOP_l$ é o efeito fixo do ano de parto ($l=1,2,3,4,5$), b_1IDPP_m é o coeficiente de regressão associado com a idade ao primeiro parto, b_2IEP_n é o coeficiente de regressão associado com o intervalo entre partos, $LACT_o$ é o efeito fixo da lactação ($q=1,2$), TOR_p é o efeito aleatório do touro ($o=1,2,3,...,71$), ANI_q é o efeito aleatório individual do animal ($p=1,2,3,...,106$), e $e_{ijklmnopq}$ é o erro residual.

Para realização das análises estatísticas foi utilizado o *software* R (R Core Team, 2016)⁸⁵, com o auxílio dos pacotes lme4, lmerTest e lsmeans. Para análise das médias das lactações foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk.

5. RESULTADOS

5.1 Lactação dos animais

Os dados das lactações dos animais foram obtidos das duas primeiras lactações, onde cada lactação foi ajustada para 305 dias. As pesagens de leite bem como a coleta de amostras para análise da composição em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas foram realizados mensalmente como parte da rotina da fazenda.

As médias das lactações ajustadas para 305 dos animais foram analisadas e testadas estatisticamente pelo teste de Shapiro-Wilk a um nível de significância de $P < 0,05$ com a finalidade de verificar a distribuição normal destes animais em função da produção. Verificou-se que os animais utilizados no experimento apresentaram uma distribuição normal quanto as suas médias de lactação como pode ser observado na Figura 8.

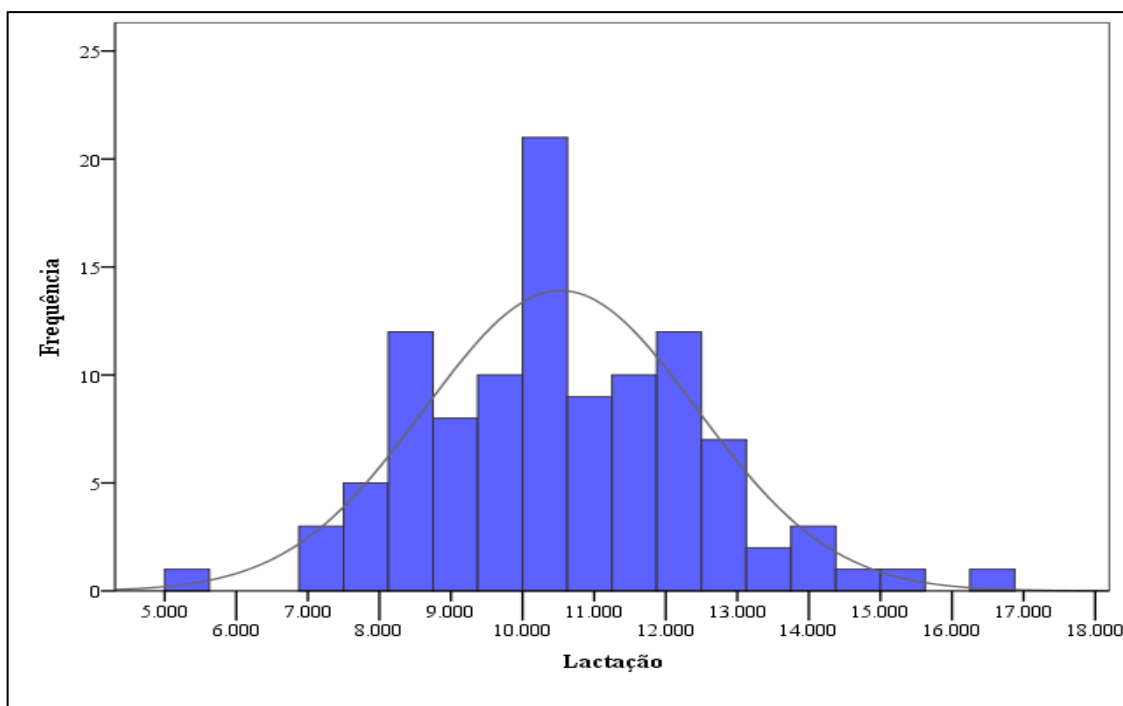


FIGURA 8 – Gráfico apresentando a distribuição normal das médias de lactação das vacas utilizadas no experimento.

Quando comparamos a primeira e segunda lactação podemos observar que existe um pequeno acréscimo na média de produção da primeira para a segunda lactação, como pode ser observado na Figura 9.



FIGURA 9 – Gráfico das médias de lactação apresentando a diferença entre as médias ajustadas para 305 dias da primeira (PL1) e segunda (PL2) lactações.

5.2 Resultados da genotipagem

O resultado da PCR-RFLP com uso da enzima *AluI* no fragmento de 842 pb da região promotora do gene do *GHR* bovino produziu três genótipos diferentes como pode ser observado na Figura 10. A digestão *AluI*(-/-) produziu três fragmentos de 753, 75 e 14 pb demonstrando assim a ausência do sítio de restrição e deste modo a presença do polimorfismo com a substituição da base nitrogenada A por T e deste modo caracterizando o animal homozigoto para ausência de restrição (AA). Para a digestão *AluI*(+/+) produziu quatro fragmentos de 608, 145, 75 e 14 pb e deste modo foi possível observar a ausência da substituição da base nitrogenada A por T, determinando a característica de uma animal homozigoto para restrição da enzima (BB). A digestão do tipo *AluI*(+/-) produziu cinco fragmentos de 753, 608, 145, 75 e 14 pb, demonstrando que alguns fragmentos apresentavam o sítio de restrição e outros não apresentavam a restrição da enzima *AluI*, e deste modo foi

possível observar a característica de um animal heterozigoto para a respectiva restrição enzimática (AB).

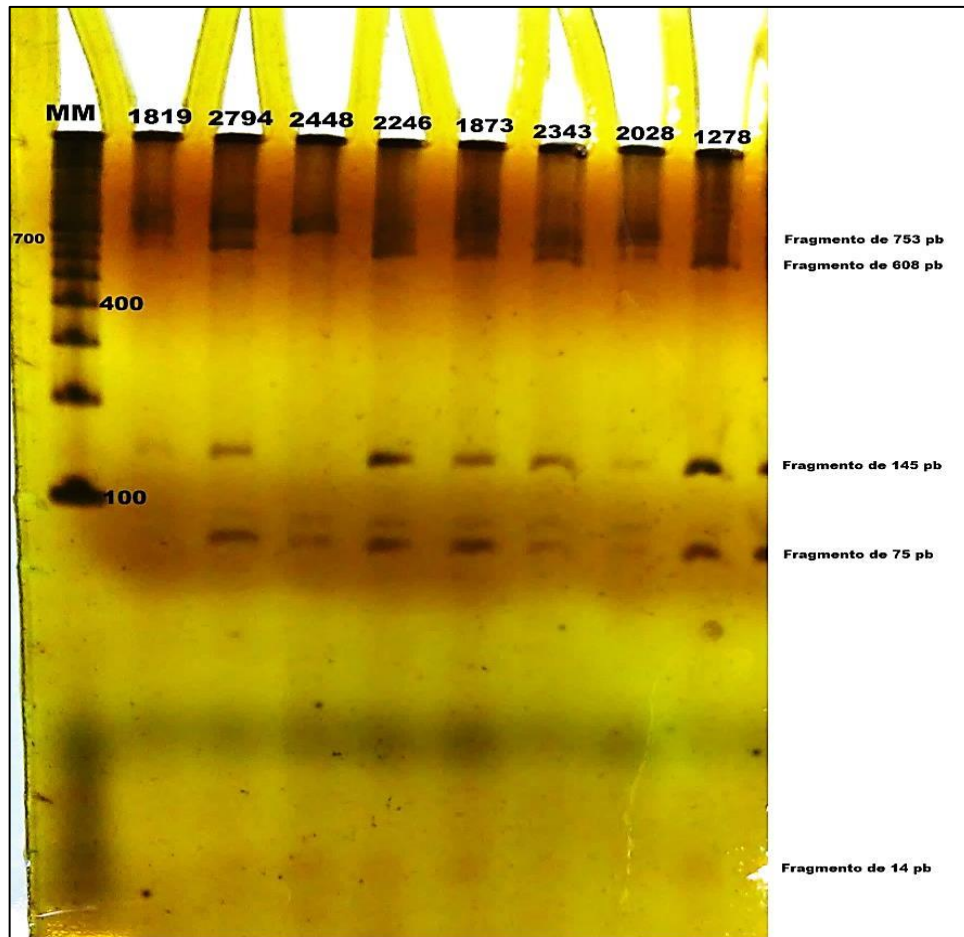


FIGURA 10 - Gel de poliacrilamida demonstrado os fragmentos resultantes da digestão da enzima *AluI* e os respectivos genótipos. Amostra 2448 apresentando genótipo *AluI*(-/-), amostra 1278 com genótipo *AluI*(+/+) e amostra 2794 com genótipo *AluI*(+/-).

Para o fragmento de 182 pb do éxon 8 do gene do *GHR* bovino, o resultado da PCR-RFLP com o uso da enzima *SspI* produziu três genótipos como pode ser observado na Figura 11. A ação da enzima *SspI* somente resultou na digestão do fragmento quando o mesmo apresentava a base T, e deste modo foi produzido dois fragmentos com 158 e 24 pb, caracterizando o animal como *SspI*(+/+), ou seja, homozigoto para restrição enzimática, determinando a tradução do aminoácido Fenilalanina na posição 279 da sequência proteica do receptor do GH e deste modo formando o genótipo FF.

Quando o fragmento não apresentava sítio de restrição para a enzima, o resultado no gel revelava somente o fragmento original com 182 pb, demonstrando que ocorreu a substituição da base T pela base A e deste modo formando um animal do tipo *SspI*(-/-) que se caracteriza como homozigoto para ausência de restrição, determinando a tradução do aminoácido tirosina na posição 279 da sequência da proteína do *GHR* formando o genótipo do tipo YY. A digestão enzimática do tipo *SspI*(+/-) caracterizou a presença de um animal do tipo heterozigoto por apresentar fragmentos de 182, 158 e 24 pb demonstrando que alguns fragmentos originais apresentava sítios de restrição (presença da base T) enquanto que outros não o apresentavam (presença da base A), determinando deste modo a tradução dos aminoácidos fenilalanina e tirosina na posição 279 da proteína do *GHR* e caracterizando o animal com genótipo do tipo FY.

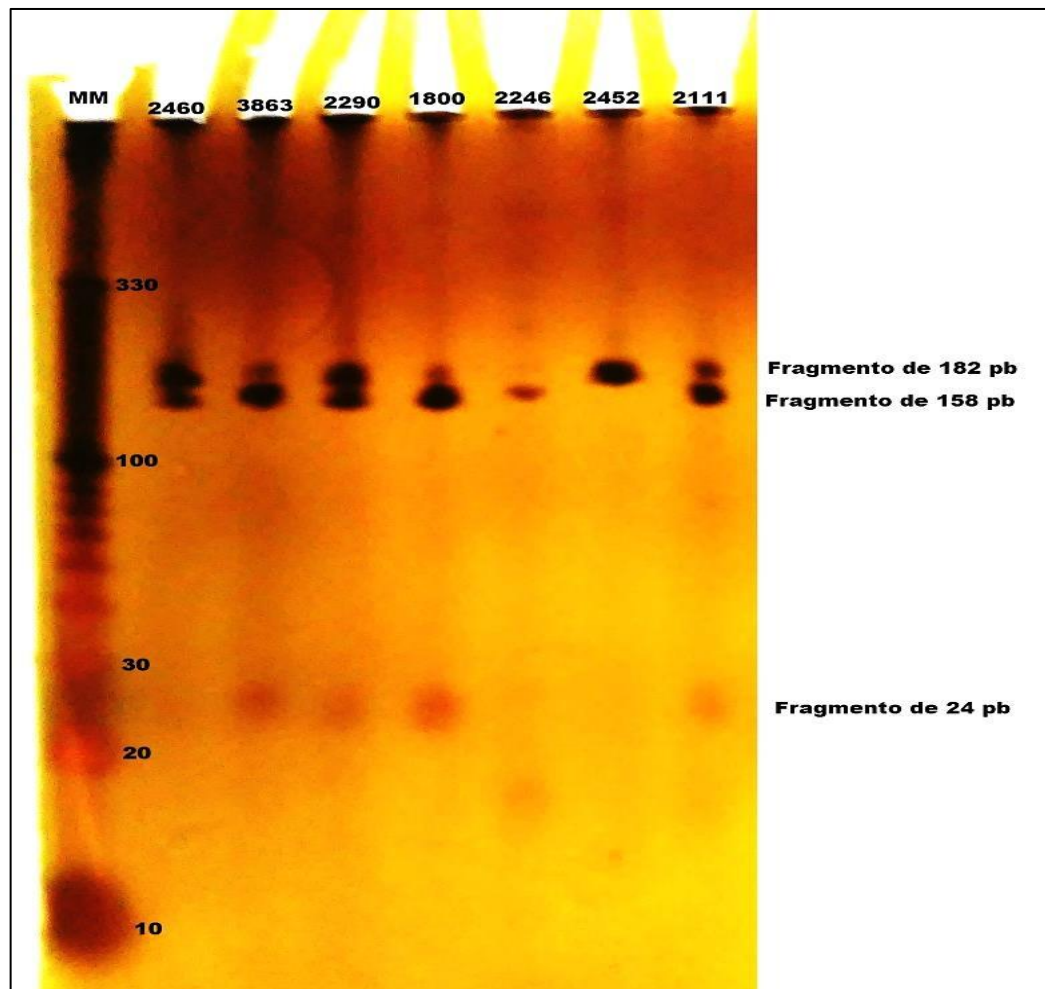


FIGURA 11 - Gel de poliacrilamida apresentando os fragmentos resultantes da digestão da enzima *SspI* e os respectivos genótipos. Amostra 2452 apresentando o genótipo *SspI*(-/-), amostra 2246 com o genótipo *SspI*(+/-) e amostra 2290 apresentando o genótipo *SspI*(+/-).

5.2 Frequências alélicas e genotípicas

Para o polimorfismo da região promotora o alelo *AluI*(-) foi menor com uma frequência de 47,64% na população estudada, enquanto o alelo *AluI*(+) apresentou uma frequência de 52,36%. As diferentes frequência genotípica observadas nos géis foram de 12,26% para *AluI*(-/-), 70,76% para *AluI*(+/-) e 16,98% para *AluI*(+/+), onde apresentaram um número de 13, 75 e 18 animais respectivamente para cada genótipo.

Para o polimorfismo do éxon 8 o alelo *SspI*(-) também se caracterizou com uma frequência menor, apresentando 49,53%, enquanto o alelo *SspI*(+) apresentou 50,47% na população deste trabalho. Com relação as frequências genotípicas foi observado valores de 7,55%, 83,96% e 8,49% para o homozigoto *SspI*(-/-), heterozigoto *SspI*(+/-) e homozigoto *SspI*(+/+) respectivamente, com um número de 8 animais para *SspI*(-/-), 89 animais para *SspI*(+/-) e 9 animais para *SspI*(+/+).

Quando utilizamos da interação dos dois polimorfismos, ou seja, a presença ou não de ambas alterações de bases do tipo SNP no mesmo animal, podemos observar que a população estudada apresentou animais com diferentes combinações dos genótipos dos polimorfismos, porem não foi identificado o haplótipo BBYY - *AluI*(+/+) e *SspI*(-/-), como demonstrado na Tabela 5.

TABELA 5 – Haplótipos resultantes da associação dos diferentes genótipos na população estudada

Genótipos ^a	AA	AB	BB
YY	3	5	0
FY	8	66	15
FF	2	4	3

^aAA, AB e BB corresponde aos genótipos *AluI*(-/-), *AluI*(+/-) e *AluI*(+/+) respectivamente; YY, FY e FF corresponde aos genótipos *SspI*(-/-), *SspI*(+/-) e *SspI*(+/+) respectivamente

5.3 Efeitos dos genótipos sobre a produção e composição do leite bovino

Os efeitos dos dois sites de polimorfismos no gene do *GHR*, na região promotora (Tabela 6) e éxon 8 (Tabela 7), não reproduziram valores significativos para produção de leite e sua composição em gordura, proteína, estrato seco total e escore de células somáticas, mas

apresentou uma pequena relação de aumento no estrato seco desengordurado ($P=0,05$) para o polimorfismo YY (*SspI*(-/-)) na região do éxon 8 do gene (Tabela 7).

Os genótipos encontrados na região promotora do gene não apresentaram efeito significativo ($P=0,08$) no aumento da lactação, como pode ser observado na Tabela 6. As características avaliadas quanto a composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas também não apresentaram diferenças estatísticas a um nível de significância ($P<0,05$) para o polimorfismo da região promotora do gene.

Os efeitos do polimorfismo no éxon 8 do gene também não apresentaram efeito significativo a um nível de significância ($P<0,05$). Quanto à composição do leite o genótipo YY apresentou uma pequena relação quanto ao aumento nos teores de estrato seco desengordurado, com um nível de significância de $P=0,05$, como pode ser observado na Tabela 7. Os outros fatores avaliados quanto a composição do leite (gordura, proteína e escore de células somáticas) não apresentaram relação ($P>0,05$) com os genótipos encontrados no éxon 8 deste estudo.

Quando verificamos o efeito da associação com os diferentes haplótipos encontrados (região promotora e éxon 8), observamos que não teve relação com a lactação e composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas ao nível de significância $P<0,05$, como pode ser observado na Tabela 8 e Figura 12.

TABELA 6 – Relação entre os genótipos da região promotora (*AluI*) do gene do *GHR* sobre as médias de lactação ajustadas para 305 dias e a composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas

Variável	Genótipo	n	Médias	SE ¹
LACT	AA	13	11.627	654
	AB	75	10.212	478
	BB	18	9.902	977
GORD	AA	13	390	24,47
	AB	75	351	17,87
	BB	18	364	36,62
PROT	AA	13	358	18,78
	AB	75	321	13,72
	BB	18	309	28,12
EST	AA	13	12,3	0,263
	AB	75	12,3	0,192
	BB	18	13,0	0,392
ESD	AA	13	8,76	0,109
	AB	75	8,75	0,079
	BB	18	8,96	0,163
ESC	AA	13	18,9	0,316
	AB	75	19,4	0,232
	BB	18	19,9	0,454

¹Erro padrão da média. LACT – lactação ajustada para 305 dias (Kg). GORD – gordura (Kg). PROT – proteína (Kg). EST – estrato seco total (%). ESD – estrato seco desengordurado (%). ESC – escore de células somáticas.

TABELA 7 - Relação entre os genótipos da região promotora (*SspI*) do gene do *GHR* sobre as médias de lactação ajustadas para 305 dias e a composição do leite em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas

Variável	Genótipo	n	Médias	SE ¹
LACT	YY	9	9.762	1.015
	FY	89	10.293	305
	FF	8	11.686	690
GORD	YY	9	369	37,97
	FY	89	355	11,38
	FF	8	381	25,78
PROT	YY	9	309	29,17
	FY	89	323	8,73
	FF	8	355	19,78
EST	YY	9	13,1	0,407
	FY	89	12,3	0,123
	FF	8	12,3	0,279
ESD	YY	9	9,09	0,168
	FY	89	8,74	0,050
	FF	8	8,64	0,115
ESC	YY	9	19,6	0,474
	FY	89	19,4	0,155
	FF	8	19,3	0,343

¹Erro padrão da média. LACT – lactação ajustada para 305 dias (Kg). GORD – gordura (Kg). PROT – proteína (Kg). EST – estrato seco total (%). ESD – estrato seco desengordurado (%). ESC – escore de células somáticas..

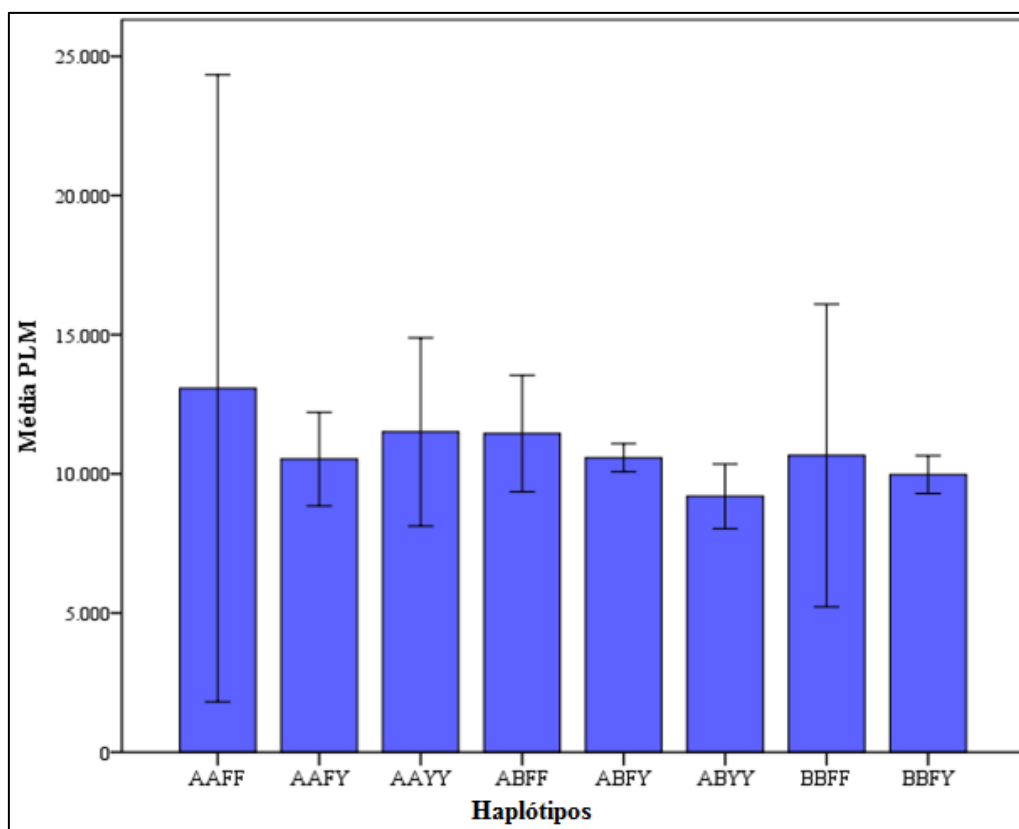


FIGURA 12 – Gráfico com as médias de lactação (colunas) e seus respectivos desvios padrões (barras), distribuídos segundo os diferentes grupos de haplótipos.

TABELA 8 - Efeito dos haplótipos (região promotora e éxon 8) do gene do *GHR* sobre as médias de lactação e suas respectivas composições em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas

Variável	Polimorfismos		n	Médias	SE ¹
	Região Promotora	Éxon 8			
LACT	AA	FY	8	10.384,85	707,49
		YY	3	11.379,92	1.188,94
		FF	2	13.116,87	1.433,67
	AB	YY	5	8.911,65	997,23
		FY	66	10.512,22	271,14
		FF	4	11.211,53	1.024,02
	BB	FY	15	9.982,91	542,97
		FF	3	10.730,17	1.164,08
		YY	0	NA ²	NA
GORD	AA	FY	8	352,77	26,43
		YY	3	407,86	44,51
		FF	2	409,51	53,54
	AB	YY	5	326,61	37,28
		FF	66	361,16	38,40
		FY	4	365,38	10,14
	BB	FY	15	347,01	20,25
		FF	3	373,75	43,53
		YY	0	NA	NA
PROT	AA	FY	8	332,88	20,30
		YY	3	351,66	34,18
		FF	2	388,99	41,13
	AB	YY	5	286,76	28,64
		FY	4	325,62	7,78
		FF	66	350,18	29,48
	BB	FY	15	311,08	15,56
		FF	3	326,14	33,43
		YY	0	NA	NA

TABELA 8 - Efeito dos haplótipos (região promotora e éxon 8) do gene do *GHR* sobre as médias de lactação e suas respectivas composições em gordura, proteína, estrato seco total, estrato seco desengordurado e escore de células somáticas (Continuação)

EST	AA	FF	2	11,88	0,575
		FY	8	12,35	0,283
		YY	3	12,79	0,477
	AB	FF	66	12,05	0,410
		FY	4	12,30	0,109
		YY	5	12,68	0,400
	BB	FY	15	12,27	0,218
		FF	3	12,96	0,467
		YY	0	NA	NA
ESD	AA	FF	2	8,46	0,238
		FY	8	8,74	0,117
		YY	3	9,06	0,198
	AB	FF	66	8,69	0,170
		FY	4	8,72	0,045
		YY	5	8,83	0,165
	BB	FY	15	8,76	0,090
		FF	3	8,83	0,165
		YY	0	NA	NA
ECS	AA	FF	2	18,53	0,680
		YY	3	19,00	0,560
		FY	8	19,25	0,338
	AB	FY	4	19,32	0,139
		YY	5	19,40	0,481
		FF	66	19,56	0,480
	BB	FY	15	19,60	0,269
		FF	3	19,79	0,554
		YY	0	NA	NA

¹Erro padrão da média. ²Dado não avaliado. LACT – lactação ajustada para 305 dias (Kg). GORD – gordura (Kg). PROT – proteína (Kg). EST – estrato seco total (%). ESD – estrato seco desengordurado (%). ECS – escore de células somáticas.

6. DISCUSSÃO

Os hormônios, os fatores de crescimento e as proteínas reguladoras associados com o eixo somatotrófico (GnRH, GH, *GHR*) apresentam características moleculares fortes como candidatos para marcadores moleculares de características quantitativas para os animais de produção. O gene que codifica o receptor do hormônio do crescimento (*GHR*) associado com os genes do GH, do fator de crescimento (IGF-I), da prolactina entre outros podem contribuir fortemente para seleção genética dos animais de criação^{72, 86}.

Neste estudo preocupou-se especificamente com o gene do *GHR* onde foi realizada a identificação de dois polimorfismos e verificação da relação com as características de produção e composição do leite bovino. O gene do *GHR* em trabalhos realizados por diversos autores, apresentou-se como um forte candidato como marcador molecular para seleção de bovinos leiteiros^{8, 51, 53}. Entre os dois locais diferentes investigados para a presença do polimorfismo, a região promotora do gene (éxon 1A) apresentou substituição de base como pode ser observado com o uso da enzima *AluI*, confirmando a descrição de Aggey et al.⁶. As frequências alélicas neste polimorfismo se mantiveram dentro das expectativas apresentada por outros autores^{6, 53, 87}, porém as frequências genótípicas não foram consistentes com os trabalhos publicados anteriormente. A região do éxon 8 do gene do *GHR* (polimorfismo F279Y) foi outro local de investigação, e este também apresentou frequências alélicas semelhante ao trabalho de Sun et al.⁸⁰, enquanto as frequências genótípicas não se mostraram próximas a encontradas por outros autores^{8, 74, 79}. Foi verificado valores superiores para os heterozigotos em ambos os polimorfismos (região promotora e éxon 8). Entre os fatores que podem ter contribuído para este fato, pode ser o baixo número de animais analisados e o uso de uma única propriedade, apresentando deste modo uma menor diversidade genética, como apresentado no trabalho de Viitala et al.⁷⁴.

Os polimorfismos do gene do *GHR* na região promotora (éxon 1A) com o uso da enzima *AluI* (PCR-RFLP) e no éxon 8 com a enzima *SspI* (F279Y) apresenta resultados promissores quanto a associação com a produção e composição do leite como demonstrados nos trabalhos de Aggrey et al.⁶, Rahbar et al.⁷, Waters et al.⁸ e Rahmatalla et al.⁹.

Observando as médias de lactação dos animais avaliados neste trabalho, observou-se que os animais com genótipo *AluI* (-/-) apresentaram uma média levemente maior

que os demais grupos, embora não apresente diferença estatística ($P=0,08$), resultados semelhantes, foram apresentados por Agreey et al.⁶, porém estes autores obtiveram diferenças significativas ($P<0,05$). Quanto ao éxon 8 as médias de lactação também apresentaram leves aumentos para o genótipo FF, embora a diferença estatística não foi significativa ($P=0,06$), é isso não condiz com os resultados apresentados nos trabalhos anteriores sobre este polimorfismo, onde os autores obtiveram médias de produção mais elevada para o genótipo YY com um nível de significância $P<0,05$ ^{8, 9, 44, 75}.

Quanto a composição do leite os polimorfismos da região promotora (*AluI*) e região do éxon 8 não apresentaram associação significativa ($p<0,05$) com a produção de gordura, proteína confirmando os resultados apresentados por Schnaider et al.⁵³ e Maj et al.⁵¹. No que se refere a composição em estrato seco total (EST), estrato seco desengordurado (ESD) e escore de células somáticas (ECS) no leite, este trabalho não teve associação significativa ($P<0,05$), e isso condiz com resultados obtidos anteriormente^{6, 7, 51, 53}, porém Maj et al.⁵¹ encontrou efeito significativo quando realizou a interação com outros polimorfismos localizados no mesmo gene, demonstrando que existe um aumento significativo de EST e ESD para o genótipo *AluI*(+/-) combinado com os genótipos *AccI*(+/-), *Fnu4HI*(+/+) e *NsiI*(-/-).

Os resultados de produção e composição do leite também foram avaliados quanto ao efeito da existência associativa dos haplótipos encontrados. Dentro das possibilidades de interação entre os haplótipos (Tabela 5), não foi identificado animais com a presença do haplótipo BBYY, e isso se deve ao baixo número de animais utilizados no experimento. Considerando os demais haplótipos encontrados, não foi verificada diferença estatística ($P<0,05$) para as médias de lactação ajustada para 305 dias e composição do leite em proteína, gordura, EST, ESD e ECS. Maj et al.⁵¹ realizou um estudo de efeito da presença de mais de um polimorfismo no gene do *GHR*, estes autores observaram um aumento na fração de gordura e proteína do leite para o alelo (+) nas enzimas *AluI*, *AccI* e *Fnu4HI* e (-) na enzima *NsiI*.

Conforme apresentado, o genótipos encontrados na região promotora e éxon 8 e seus respectivos efeitos sobre a lactação e composição do leite mostrou-se completamente divergente aos trabalhos apresentados anteriores^{8, 9, 44, 75}, este fato pode ter ocorrido pelo baixo número de animais avaliados e por se considerar apenas dados de uma única propriedade, diminuindo desta forma a variação genética, que pode ser observada pela elevada frequência de genótipos heterozigotos.

7. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados encontrados pode se concluir que, as frequências alélicas se mantiveram dentro das médias esperadas; as frequências genotípicas apresentaram um valor maior para o heterozigoto em ambos polimorfismos avaliados; os polimorfismos e seus respectivos haplótipos não apresentaram efeito sobre a lactação e composição do leite no estudo em questão; os efeitos dos polimorfismos não se mostraram como esperado pela literatura consultada.

8. REFERÊNCIAS

1. González FHD, Dürr JW, Fontaneli RS. Uso do leite para monitorar a nutrição e o metabolismo de vacas leiteiras Porto Alegre, RS2001 [20 out 2014]. Available from: <http://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/26656/000308502.pdf?sequence=1>.
2. Fonseca LFL, Santos MV. Qualidade do leite e controle de mastite. São Paulo: Lemos; 2000. 175 p.
3. Ashwell MS, Heyen DW, Sonstegard TS, Van Tassell CP, Da Y, VanRaden PM, et al. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. *Journal of dairy science*. 2004;87(2):468-75.
4. Miles CM, Wayne M. Quantitative Trait Locus (QTL) Analysis. *Nature Education*. 2008;1:208 - 14.
5. Nadesalingam J, Plante Y, Gibson JP. Detection of QTL for milk production on Chromosomes 1 and 6 of Holstein cattle. *Mamm Genome*. 2001;12(1):27-31.
6. Aggrey SE, Yao J, Sabour MP, Lin CY, Zadworny D, Hayes JF, et al. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. *J Hered*. 1999;90(1):148-51.
7. Rahbar R, Rahimi G, Ansari Pirsaraei Z, Gholizadeh M. Identification of polymorphism in promoter region of growth hormone receptor (GHR) gene and its association with milk related traits in Holstein cows. *African Journal of Biotechnology*. 2010;9(33):5460-4.
8. Waters SM, McCabe MS, Howard DJ, Giblin L, Magee DA, MacHugh DE, et al. Associations between newly discovered polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone receptor gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Animal genetics*. 2010;42(1):39-49.
9. Rahmatalla SA, Muller U, Strucken EM, Reissmann M, Brockmann GA. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. *J Appl Genet*. 2011;52(4):459-65.
10. Schielzeth H, Husby A. Challenges and prospects in genome-wide quantitative trait loci mapping of standing genetic variation in natural populations. *Ann N Y Acad Sci*. 2014;1320(1):35-57.
11. Williams JL. The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. *Rev Sci Tech*. 2005;24(1):379-91.
12. Glazier AM, Nadeau JH, Aitman TJ. Finding genes that underlie complex traits. *Science*. 2002;298(5602):2345-9.
13. Schopen GC, Visker MH, Koks PD, Mullaart E, van Arendonk JA, Bovenhuis H. Whole-genome association study for milk protein composition in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2011;94(6):3148-58.

14. Bouwman AC, Visker MH, van Arendonk JA, Bovenhuis H. Genomic regions associated with bovine milk fatty acids in both summer and winter milk samples. *BMC genetics*. 2012;13:93.
15. Duchemin S, Bovenhuis H, Stoop WM, Bouwman AC, van Arendonk JA, Visker MH. Genetic correlation between composition of bovine milk fat in winter and summer, and DGAT1 and SCD1 by season interactions. *Journal of dairy science*. 2013;96(1):592-604.
16. Li X, Ekerljung M, Lundstrom K, Lunden A. Association of polymorphisms at DGAT1, leptin, SCD1, CAPN1 and CAST genes with color, marbling and water holding capacity in meat from beef cattle populations in Sweden. *Meat science*. 2013;94(2):153-8.
17. Meredith BK, Kearney FJ, Finlay EK, Bradley DG, Fahey AG, Berry DP, et al. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC genetics*. 2012;13:21.
18. Mancini G, Nicolazzi EL, Valentini A, Chillemi G, Marsan PA, Santus E, et al. Association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) and milk production traits in Italian Brown cattle. *Livestock Science*. 2013;157:93-9.
19. Georges M, Nielsen D, Mackinnon M, Mishra A, Okimoto R, Pasquino AT, et al. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. *Genetics*. 1995;139(2):907-20.
20. Moody DE, Pomp D, Barendse W, Womack JE. Assignment of the growth hormone receptor gene to bovine chromosome 20 using linkage analysis and somatic cell mapping. *Animal genetics*. 1995;26(5):341-3.
21. Arranz JJ, Coppieters W, Berzi P, Cambisano N, Grisart B, Karim L, et al. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. *Animal genetics*. 1998;29(2):107-15.
22. Moisio S, Elo K, Kantanen J, Vilkki J. Polymorphism within the 3' flanking region of the bovine growth hormone receptor gene. *Animal genetics*. 1998;29(1):55-7.
23. Fontanesi L, Scotti E, Tazzoli M, Beretti F, Dall'Olio S, Davoli R, et al. Investigation of allele frequencies of the growth hormone receptor (GHR) F279Y mutation in dairy and dual purpose cattle breeds. *Ital J Anim Sci*. 2007;6:415-20.
24. Leyva-Baca I, Schenkel F, Martin J, Karrow NA. Polymorphisms in the 5' upstream region of the CXCR1 chemokine receptor gene, and their association with somatic cell score in Holstein cattle in Canada. *Journal of dairy science*. 2008;91(1):407-17.
25. Cobanoglu O, Zaitoun I, Chang YM, Shook GE, Khatib H. Effects of the signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) gene on milk production traits in Holstein dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2006;89(11):4433-7.
26. Glantz M, Lindmark Mansson H, Stalhammar H, Paulsson M. Effect of polymorphisms in the leptin, leptin receptor and acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) genes and genetic polymorphism of milk proteins on bovine milk composition. *The Journal of dairy research*. 2012;79(1):110-8.

27. Matteis G, Scatà MC, Grandoni F, Petrera F, Abeni F, Catillo G, et al. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in the leptin and leptin receptor genes on milk and morphological traits in Holstein cows. *Journal of animal science*. 2012;2(3):174-82.
28. He Y, Chu Q, Ma P, Wang Y, Zhang Q, Sun D, et al. Association of bovine CD4 and STAT5b single nucleotide polymorphisms with somatic cell scores and milk production traits in Chinese Holsteins. *The Journal of dairy research*. 2011;78(2):242-9.
29. Bonakdar E, Rahmani HR, Edriss MA, Sayed Tabatabaei BE. IGF-I gene polymorphism, but not its blood concentration, is associated with milk fat and protein in Holstein dairy cows. *Genetics and molecular research : GMR*. 2010;9(3):1726-34.
30. Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Giblin L, et al. Single Nucleotide Polymorphisms in the Insulin-Like Growth Factor 1 (IGF-1) Gene are Associated with Performance in Holstein-Friesian Dairy Cattle. *Frontiers in genetics*. 2011;2:3.
31. Wang X, Penagaricano F, Tal-Stein R, Lipkin E, Khatib H. Short communication: Association of an OLR1 polymorphism with milk production traits in the Israeli Holstein population. *Journal of dairy science*. 2012;95(3):1565-7.
32. Ron M, Cohen-Zinder M, Peter C, Weller JI, Erhardt G. Short communication: a polymorphism in ABCG2 in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle breeds. *Journal of dairy science*. 2006;89(12):4921-3.
33. Visker MH, Dibbitts BW, Kinders SM, van Valenberg HJ, van Arendonk JA, Bovenhuis H. Association of bovine beta-casein protein variant I with milk production and milk protein composition. *Animal genetics*. 2011;42(2):212-8.
34. Huang W, Penagaricano F, Ahmad KR, Lucey JA, Weigel KA, Khatib H. Association between milk protein gene variants and protein composition traits in dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2012;95(1):440-9.
35. Sharma BS, Leyva I, Schenkel F, Karrow NA. Association of toll-like receptor 4 polymorphisms with somatic cell score and lactation persistency in Holstein bulls. *Journal of dairy science*. 2006;89(9):3626-35.
36. Jiang L, Liu J, Sun D, Ma P, Ding X, Yu Y, et al. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. *PloS one*. 2010;5(10):e13661.
37. Minozzi G, Nicolazzi EL, Stella A, Biffani S, Negrini R, Lazzari B, et al. Genome wide analysis of fertility and production traits in Italian Holstein cattle. *PloS one*. 2013;8(11):e80219.
38. Morris CA, Cullen NG, Glass BC, Hyndman DL, Manley TR, Hickey SM, et al. Fatty acid synthase effects on bovine adipose fat and milk fat. *Mamm Genome*. 2007;18(1):64-74.
39. Matsumoto H, Inada S, Kobayashi E, Abe T, Hasebe H, Sasazaki S, et al. Identification of SNPs in the FASN gene and their effect on fatty acid milk composition in Holstein cattle. *Livestock Science*. 2012;144:281-4.

40. Alim MA, Wang P, Wu XP, Li C, Cui XG, Zhang SL, et al. Effect of FASN gene on milk yield and milk composition in the Chinese Holstein dairy population. *Animal genetics*. 2014;45(1):111-3.
41. Signorelli F, Orrù L, Napolitano F, Matteis G, Scatà MC, Catillo G, et al. Exploring polymorphisms and effects on milk traits of the DGAT1, SCD1 and GHR genes in four cattle breeds. *Livestock Science*. 2009;125:74-9.
42. Mullen MP, Berry DP, Howard DJ, Diskin MG, Lynch CO, Berkowicz EW, et al. Associations between novel single nucleotide polymorphisms in the *Bos taurus* growth hormone gene and performance traits in Holstein-Friesian dairy cattle. *Journal of dairy science*. 2010;93(12):5959-69.
43. Nafikov RA, Schoonmaker JP, Korn KT, Noack K, Garrick DJ, Koehler KJ, et al. Sterol regulatory element binding transcription factor 1 (SREBF1) polymorphism and milk fatty acid composition. *Journal of dairy science*. 2013;96(4):2605-16.
44. Ma YN, He PJ, Zhu J, Lei ZM, Liu Z, Wu JP. [The effect of polymorphism F279Y of GHR gene on milk production trait in Chinese Holstein cattle]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2013;29(5):400-4.
45. Schennink A, Bovenhuis H, Leon-Kloosterziel KM, van Arendonk JA, Visker MH. Effect of polymorphisms in the FASN, OLR1, PPARGC1A, PRL and STAT5A genes on bovine milk-fat composition. *Animal genetics*. 2009;40(6):909-16.
46. Lu A, Hu X, Chen H, Dong Y, Pang Y. Single nucleotide polymorphisms of the prolactin receptor (PRLR) gene and its association with growth traits in Chinese cattle. *Molecular biology reports*. 2011;38(1):261-6.
47. Macciotta NPP, Mele M, Conte G, Serra A, Cassandro M, Dal Zotto R, et al. Association between a polymorphism at the stearoyl CoA desaturase locus and milk production traits in Italian Holsteins. *Journal of dairy science*. 2008;91(8):3184-9.
48. Alim MA, Fan YP, Wu XP, Xie Y, Zhang Y, Zhang SL, et al. Genetic effects of stearoyl-coenzyme A desaturase (SCD) polymorphism on milk production traits in the Chinese dairy population. *Molecular biology reports*. 2012;39(9):8733-40.
49. Wang C, Liu M, Li Q, Ju Z, Huang J, Li J, et al. Three novel single-nucleotide polymorphisms of MBL1 gene in Chinese native cattle and their associations with milk performance traits. *Veterinary immunology and immunopathology*. 2011;139(2-4):229-36.
50. Yuan Z, Li J, Li J, Gao X, Xu S. SNPs identification and its correlation analysis with milk somatic cell score in bovine MBL1 gene. *Molecular biology reports*. 2013;40(1):7-12.
51. Maj A, Strzalkowska N, Sloniewski K, Krzyzewski J, Oprzadek J, Zwierzchowski L. Single nucleotide polymorphism (SNP) in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene and its association with dairy production traits in Polish Black-and-White cattle. *Czech J Anim Sci*. 2004;49 (10):419-29.

52. Curi RA, Palmieri DA, Sugisawa L, Ferraz ALJ, de Oliveira HN, Furlan LR, et al. Effects of GHR gene polymorphisms on growth and carcass traits in Zebu and crossbred beef cattle. *Livestock Science*. 2006;101:94-100.
53. Schneider A, Correa MN, Butler WR. Association between growth hormone receptor AluI polymorphism and fertility of Holstein cows. *Theriogenology*. 2013;80(9):1061-6.
54. Frank SJ. Growth hormone signalling and its regulation: preventing too much of a good thing. *Growth hormone & IGF research : official journal of the Growth Hormone Research Society and the International IGF Research Society*. 2001;11(4):201-12.
55. Brooks AJ, Dai W, O'Mara ML, Abankwa D, Chhabra Y, Pelekanos RA, et al. Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor. *Science*. 2014;344(6185):1249783.
56. Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, et al. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuro endocrinology letters*. 2008;29(6):981-9.
57. Godowski PJ, Leung DW, Meacham LR, Galgani JP, Hellmiss R, Keret R, et al. Characterization of the human growth hormone receptor gene and demonstration of a partial gene deletion in two patients with Laron-type dwarfism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1989;86(20):8083-7.
58. Jiang H, Lucy MC. Variants of the 5'-untranslated region of the bovine growth hormone receptor mRNA: isolation, expression and effects on translational efficiency. *Gene*. 2001;265(1-2):45-53.
59. Kopchick JJ, Andry JM. Growth hormone (GH), GH receptor, and signal transduction. *Molecular genetics and metabolism*. 2000;71(1-2):293-314.
60. Etherton TD, Bauman DE. Biology of somatotropin in growth and lactation of domestic animals. *Physiological reviews*. 1998;78(3):745-61.
61. Laron Z. Insulin-like growth factor 1 (IGF-1): a growth hormone. *Molecular pathology : MP*. 2001;54(5):311-6.
62. McMahon CD, Radcliff RP, Lookingland KJ, Tucker HA. Neuroregulation of growth hormone secretion in domestic animals. *Domestic animal endocrinology*. 2001;20(2):65-87.
63. Correa-Silva SR, Sa LB, Lengyel AM. [Ghrelin and growth hormone secretagogues (GHS): modulation of growth hormone secretion and therapeutic applications]. *Arquivos brasileiros de endocrinologia e metabologia*. 2008;52(5):726-33.
64. Oliveira CR, Meneguz-Moreno RA, Aguiar-Oliveira MH, Barreto-Filho JA. Papel Emergente do Eixo GH/IGF-I no Controle Cardiometabólico. *Arquivos brasileiros de cardiologia*. 2011;97(5):434-9.

65. Bauer A, Lacorn M, Claus R. Effects of two levels of feed allocation on IGF-I concentrations and metabolic parameters in GnRH-immunized boars. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. 2009;93(6):744-53.
66. Bazan JF. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1990;87(18):6934-8.
67. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine reviews*. 1991;12(3):235-51.
68. Lupardus PJ, Skiniotis G, Rice AJ, Thomas C, Fischer S, Walz T, et al. Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6Ralpha cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex. *Structure*. 2011;19(1):45-55.
69. Szewczuk M. Association of a genetic marker at the bovine Janus kinase 2 locus (JAK2/RsaI) with milk production traits of four cattle breeds. *The Journal of dairy research*. 2015;82(3):287-92.
70. Herrington J, Carter-Su C. Signaling pathways activated by the growth hormone receptor. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*. 2001;12(6):252-7.
71. Carter-Su C, Schwartz J, Smit LS. Molecular mechanism of growth hormone action. *Annual review of physiology*. 1996;58:187-207.
72. Maskur, Rodiah, Arman C. Association of a novel single nucleotide polymorphism in growth hormone receptor gene With Production traits in Bali cattle. *Ital J Anim Sci*. 2014;13:841-4.
73. Tait RG, Jr., Shackelford SD, Wheeler TL, King DA, Casas E, Thallman RM, et al. mu-Calpain, calpastatin, and growth hormone receptor genetic effects on preweaning performance, carcass quality traits, and residual variance of tenderness in Angus cattle selected to increase minor haplotype and allele frequencies. *Journal of animal science*. 2014;92(2):456-66.
74. Viitala S, Szyda J, Blott S, Schulman N, Lidauer M, Maki-Tanila A, et al. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. *Genetics*. 2006;173(4):2151-64.
75. Blott S, Kim JJ, Moisio S, Schmidt-Kuntzel A, Cornet A, Berzi P, et al. Molecular dissection of a quantitative trait locus: a phenylalanine-to-tyrosine substitution in the transmembrane domain of the bovine growth hormone receptor is associated with a major effect on milk yield and composition. *Genetics*. 2003;163(1):253-66.
76. Maj A, Zwierzchowski L. Nucleotide sequence polymorphisms in the promoter region of bovine growth hormone receptor gene (GHR) have no effect on its expression level in liver. *Anim Science Papers and Reports*. 2008;26(1):5-15.
77. Maj A, Pareek CS, Klauzinska M, Zwierzchowski L. Polymorphism of 5'-region of the bovine growth hormone receptor gene. *Journal of animal breeding and genetics = Zeitschrift fur Tierzuchtung und Zuchtungsbiologie*. 2005;122(6):414-7.

78. Garrett AJ, Rincon G, Medrano JF, Elzo MA, Silver GA, Thomas MG. Promoter region of the bovine growth hormone receptor gene: single nucleotide polymorphism discovery in cattle and association with performance in Brangus bulls. *Journal of animal science*. 2008;86(12):3315-23.
79. Banos G, Woolliams JA, Woodward BW, Forbes AB, Coffey MP. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. *Journal of dairy science*. 2008;91(8):3190-200.
80. Sun D, Jia J, Ma Y, Zhang Y, Wang Y, Yu Y, et al. Effects of DGAT1 and GHR on milk yield and milk composition in the Chinese dairy population. *Animal genetics*. 2009;40(6):997-1000.
81. Jiang H, Lucy MC. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. *Molecular endocrinology*. 2001;15(6):1023-34.
82. Jiang H, Lucy MC, Crooker BA, Beal WE. Expression of growth hormone receptor 1A mRNA is decreased in dairy cows but not in beef cows at parturition. *Journal of dairy science*. 2005;88(4):1370-7.
83. Heap D, Lucy MC, Collier RJ, Boyd CK, Warren WC. Rapid communication: nucleotide sequence of the promoter and first exon of the somatotropin receptor gene in cattle. *Journal of animal science*. 1995;73(5):1529.
84. Zhou Y, Jiang H. Trait-associated sequence variation in the bovine growth hormone receptor 1A promoter does not affect promoter activity in vitro. *Animal genetics*. 2005;36(2):156-9.
85. Team RC. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2016 [20 fev 2016]. Available from: Disponível em: <http://www.R-project.org>.
86. Mense K, Meyerholz M, Gil Araujo M, Lietzau M, Knaack H, Wrenzycki C, et al. The somatotrophic axis during the physiological estrus cycle in dairy heifers--Effect on hepatic expression of GHR and SOCS2. *Journal of dairy science*. 2015;98(4):2409-18.
87. Maj A, Oprzadek J, Dymnicki E, Zwierzchowski L. Association of the polymorphism in the 5'-noncoding region of the bovine growth hormone receptor gene with meat production traits in Polish Black-and-White cattle. *Meat science*. 2006;72(3):539-44.

ANEXO A

PROTOCOLO PARA EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DO DNA SEGUNDO AS RECOMENDAÇÕES DO KIT *PureLink® Genomic DNA Kits* (Invitrogen®)

Lisagem a partir de amostra de sangue total:

1. Preparo de banho maria ou placa térmica a 55°C;
2. Adicionar 200l de sangue em um eppendorf autoclavado (se usar menos de 200l de sangue, ajustar o volume com PBS);
3. Adicionar 20l de Proteinase K na amostra;
4. Adicionar 20l RNase A a amostra, misturar bem usando vortex, e incubar a temperatura ambiente por 2 minutos;
5. Adicionar 200l PureLink Lysis/ Binding Buffer e misturar usando o vortex;
6. Incubar à 55°C por 10 minutos para promover a digestão proteica;
7. Adicionar 200l de etanol 96 – 100% para a lisagem. Misturar usando o vortex por 5 segundos até obter uma solução homogênea;

Binding DNA:

1. Transferir o lisado (~640l) para a coluna do Kit;
2. Centrifugar a coluna a 10.000G por 1 minuto a temperatura ambiente;
3. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo coletor limpo;

Lavagem do DNA:

1. Adicionar 500l de Wash buffer 1 preparado com etanol na coluna;
2. Centrifugar a coluna a 10.000G por 1 minuto a temperatura ambiente;
3. Descartar o tubo coletor e transferir a coluna para um tubo coletor limpo;
4. Adicionar 500l do Wash buffer 2 preparado com etanol na coluna;
5. Centrifugar a coluna na velocidade máxima por 3 minutos a temperatura ambiente;

Eluição do DNA

1. Transferir a coluna para um tubo eppendorf estéril de 1,5ml;
2. Adicionar 40l do PureLink Genomic Elution Buffer na coluna;
3. Incubar a temperatura ambiente por 20 minutos. Centrifugar na rotação máxima por 2 minutos e 10 segundos a temperatura ambiente;
4. Para recuperar mais DNA promover uma segunda eluição usando o mesmo buffer e volume em outro purificado a -20°C;
5. Armazenar a mostra final a -20°C.

ANEXO B

ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE A 2%

Os géis de agarose 2% foram utilizados apenas para visualização da amplificação dos fragmentos pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). A preparação do gel foi realizada imediatamente antes de cada corrida, para isso foi utilizada 2 g de agarose dissolvida em TBE 1X completando um volume final de 100ml, para dissolver a agarose foi utilizado micro-ondas na potência 100 até a completa dissolução (aspecto límpido), após o resfriamento foi adicionado 5 µl de brometo de etídeo, e antes da solidificação o gel é depositado sobre a forma da cuba e colocado os pentes para formação das canaletas. Para a realização da eletroforese foi utilizada uma voltagem de 80 mV por um tempo médio de 90 minutos em TBE 1X. Em cada canaleta foram depositados cerca de 9 µl da amostra amplificada pela PCR e 1 µl de tampão de corrida, em cada gel foi utilizado uma canaleta para deposição do marcador molecular de 100 pb para identificação das bandas reveladas. Para visualização das bandas o gel foi depositado sobre revelador do tipo Transluminador para visualização de gel com uso de luz ultravioleta, em seguida as imagens foram capturadas em câmera digital para análise da amplificação.

O brometo de etídeo é uma substância altamente mutagênica e carcinogênica. Por este motivo, para trabalhar com o gel de agarose com brometo de etídeo é necessário utilizar todos os procedimentos de segurança.

Soluções utilizadas:

TRIS-Borato de EDTA (TBE 1X)

- Tris Base 108 g
- Ácido Bórico P.A. 55 g
- EDTA 0,5 M (pH 8,0) 40 ml
- H₂O dd q.s.p. 1000 ml
- Diluir a solução mãe na proporção de 100 ml de solução em 900 ml de H₂O dd.

EDTA 0,5 M (pH 8,0)

- EDTA (p.m. 372,24) 186,12 g
- H₂O dd q.s.p. 1000 ml
- Controle o pH com NaOH (20 g de NaOH)

ANEXO C

ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA 12%

Os géis de poliacrilamida 12% foram utilizados para visualização das bandas formadas após a digestão enzimática dos fragmentos amplificados pela PCR. Os géis foram preparados como demonstrado na tabela XX. Para a utilização da eletroforese os géis foram submetidos a uma voltagem de 80 mV por um tempo médio de 3 horas em solução de TBE 1X. em cada canaleta do gel foi depositado 9 µl do produto da amplificação pela PCR e 1 µl de tampão de corrida, em uma das canaletas foi depositado 5 µl de um marcador molecular de 10 pb para identificação das bandas apresentadas. Após a corrida eletroforética, os géis foram corados utilizando a técnica de coloração rápida por Nitrato de Prata (AgNO_3) e em seguida as imagens foram capturadas em câmera digital para análise das bandas e dos possíveis polimorfismos apresentados.

A acrilamida é um monômero neurotóxico potente com ação cumulativa. Por isso, para trabalhar com acrilamida é necessário utilizar todos os procedimentos de segurança.

O gel de poliacrilamida é recomendado para o tamanho dos fragmentos esperados, pois permitem a separação de fragmentos de até 500 pb.

Protocolo de preparação do gel de poliacrilamida 12%

Reagentes	Volume
Acrilamida 40%*	4,5 ml
TBE 10X**	8 ml
H ₂ O dd	2,25 ml
APS 10%***	225 µl
TEMED	22,5 µl

* Para confecção da acrilamida 40% acrescenta-se 390 g de acrilamida e 10 g de bis-acrilamida e H₂O dd (q.s.p.) de 1000 ml.

** Para o preparo da solução de TBE 10X observar Anexo A.

*** Para confecção do APS 10% dilui-se 10 g de Perssulfato de Amônio P.A. em H₂O dd (q.s.p.) 100 ml.

ANEXO D

COLORAÇÃO DE GEL DE POLIACRILAMIDA PELO MÉTODO RÁPIDO POR NITRATO DE PRATA (AgNO_3)

PREPARO DE SOLUÇÕES

1. Solução de fixação 25:1 (preparo no momento do uso)

Reagentes	Volume (ml)
Álcool Etílico P.A.	50
Ácido Acético P.A.	02
Água Deionizada	248
Volume Final	300

2. Solução de Nitrato de Prata (AgNO_3) a 15%

Reagentes	Quantidade
Nitrato de Prata P.A.	7,5 g
Água Deionizada (q.s.p.)	50 ml
Volume Final	50 ml

3. Solução de revelação (preparo no momento do uso)

Reagentes	Volume (ml)
Hidróxido de Sódio (NaOH) 30%	4,5
Formaldeído a 37%*	3
Água Deionizada (q.s.p.)	200
Volume Final	200

* Adicionar o Formaldeído aos poucos no momento da revelação

PROCEDIMENTO PARA COLORAÇÃO RÁPIDA POR NITRATO DE PRATA

1. Depositar o gel sobre um recipiente limpo e seco, contendo 150 ml de solução de fixação;
2. Adicionar 2 ml da solução de Nitrato de Prata sobre a solução com o gel a agitar por 5 minutos;

3. Desprezar a solução de fixação e lavar o gel com água destilada 4 X, agitando o gel por 20 segundos cada lavagem;
4. Adicionar a solução de revelação com cuidado, colocar inicialmente a mistura de NaOH e Água Destilada, e pingar o Formaldeído sobre a parede do recipiente agitando o gel até obter a revelação desejada;
5. Aguardar a revelação por pelo menos 5 minutos;
6. Desprezar a solução de revelação e adicionar 150 ml de solução de fixação e armazenar o gel até a captura da imagem e/ou secagem do gel.