

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE *PIT1* COM  
CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE CARNE EM BOVINOS DA  
RAÇA CANCHIM**

Sônia Mara Carrijo

São Carlos-SP  
2004

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMO DO GENE *PIT1* COM  
CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO DE CARNE EM BOVINOS DA  
RAÇA CANCHIM**

Sônia Mara Carrijo

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em *Genética e Evolução* do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências (Ciências Biológicas), área de concentração: *Genética e Evolução*.

São Carlos-SP  
2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da  
Biblioteca Comunitária/UFSCar**

C316ap

Carrijo, Sônia Mara.

Associação de polimorfismo do gene *PIT1* com características de produção de carne em bovinos da raça Canchim / Sônia Mara Carrijo. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

98 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Genética animal. 2. Marcador molecular. 3. Bovinos de corte. 4. RFLP. 5. Animais - melhoramento genético. I. Título.

CDD: 591.15 (20<sup>a</sup>)

Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

- Orientadora -

Dedico

aos meus queridos pais

Alaor e Eurides

e ao meu esposo Mauro,

a quem muito estimo.

## **AGRADECIMENTOS**

À pesquisadora Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pela orientação e oportunidade de desenvolver a pesquisa no laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa - Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste.

À Embrapa - Centro de Pesquisa Pecuária Sudeste por viabilizar a execução deste projeto de pesquisa.

Ao pesquisador Dr. Maurício Mello de Alencar pela inestimável colaboração técnica e científica, fundamental para a realização desta pesquisa.

Ao colega Fábio Luiz Buranelo Toral pela valiosa contribuição prestada para a realização deste trabalho.

Ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade de São Carlos e aos funcionários, colegas e especialmente aos professores, cujos ensinamentos muito contribuíram para a minha formação profissional.

Um especial agradecimento ao Mauro pelo apoio, carinho e dedicação em cada momento, e aos meus pais pelo amor, carinho e inestimáveis ensinamentos, imprescindíveis para o meu desenvolvimento pessoal e profissional.

## SUMÁRIO

	<b>Página</b>
Lista de Tabelas	iii
Lista de Figuras	iv
Resumo	vi
Abstract	vii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 O gado Canchim	2
1.2 Mecanismo da herança quantitativa	6
1.3 Marcadores moleculares	10
1.4 <i>Quantitative traits loci</i> (QTL)	16
1.5 Genes candidatos	21
1.6 Regulação do desenvolvimento em animais	27
1.6.1 Fator de transcrição pituitário específico Pit-1	29
1.7 Seleção assistida por marcadores (MAS)	36
2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	40
3 OBJETIVO DA PESQUISA	41
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1 Material	42
4.1.1 Amostra	42
4.1.2 Marcador molecular	43

4.1.3 Reagentes	47
4.2 Métodos	47
4.2.1 Identificação dos genótipos de <i>PIT1</i>	47
4.2.1.1 Amplificação do DNA	47
4.2.1.2 Restrição dos produtos amplificado por PCR	48
4.2.2 Análises estatísticas dos dados	49
4.2.2.1 Estimativas de parâmetros populacionais	49
4.2.2.2 Estimativa do efeito de <i>PIT1</i>	50
4.2.2.3 Média do efeito de substituição de alelos	53
4.2.2.4 Desvios atribuídos à dominância	54
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Polimorfismo <i>PIT1</i>	56
5.2 Estatística descritiva da amostra	58
5.2.1 Parâmetros populacionais do gene <i>PIT1</i>	58
5.2.2 Efeitos do polimorfismo <i>PIT1</i> sobre a produção	63
5.2.2.1 Comparações de médias	63
5.2.2.2 Médias dos efeitos de substituição de alelos	77
5.2.2.3 Desvios devidos à dominância	78
6 CONCLUSÕES	86
7 REFERÊNCIAS	88



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Métodos para estimar os valores genéticos, genotípicos e de desvios de dominância, como desvios da média da população. 55
- Tabela 2. Valores das frequências alélicas e respectivos erros padrões no *locus PIT1*, estimados nos grupos genéticos *GG1* e *GG2*. 58
- Tabela 3. Valores de probabilidade obtidos para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg, verificados em *GG1* e em *GG2*. 60
- Tabela 4. Valores da estatística de Shapiro-Wilk (*W*) com seus respectivos valores de probabilidade, referentes aos caracteres *PN*, *P<sub>240</sub>* e *P<sub>365</sub>*. 64
- Tabela 5. Valores de *F* com seus respectivos valores de probabilidade para o teste de Levene, referentes aos caracteres *PN*, *P<sub>240</sub>* e *P<sub>365</sub>*. 64
- Tabela 6. Resumo das análises de variância para pesos ao nascimento (*PN*), pesos padronizados à desmama (*P<sub>240</sub>*) e aos 12 meses de idade (*P<sub>365</sub>*), ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (*GMND*) e da desmama aos 12 meses de idade (*GMD12*), obtidos da população total, para os efeitos de *PIT1*. 67
- Tabela 7. Número de observações (*N*) e médias estimadas do peso padronizado à desmama (*P<sub>240</sub>*) (kg) e do ganho médio diário de peso do nascimento à desmama (*GMND*) (kg) e respectivos erros padrões entre parêntesis, dos genótipos de *PIT1*, em *GG1* e *GG2*. 69
- Tabela 8. Valores genotípicos (*G*), valores genéticos (*A*) e valores dos desvios devidos à dominância (*D*), para pesos padronizados à desmama (*P<sub>240</sub>*) (kg) e para ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (*GMND*) (kg), em relação a *PIT1*, no grupo genético *GG2*. 80

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Esquemas de cruzamentos utilizados para a formação das duas linhagens de animais da raça Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste. 5
- Figura 2. Exemplar do sexo masculino, da raça Canchim. 6
- Figura 3. Representação esquemática do Domínio funcional de Pit-1. 31
- Figura 4. Mapa de ligação do cromossomo 1 de bovinos mostrando a posição relativa do loco marcador *PIT1* (*POU1F1*). 44
- Figura 5. Seqüência de bases nitrogenadas da região analisada do gene *PIT1*. 45
- Figura 6. Esquema referente ao polimorfismo *HinfI* do gene *PIT1*. 46
- Figura 7. Padrão de fragmentos do produto amplificado do gene *PIT1* digerido com a enzima *HinfI*. 57
- Figura 8. Distribuição de freqüências dos alelos *HinfI* (+) e *HinfI* (-) referentes ao gene *PIT1*, em cada grupo genético (*GG1* e *GG2*). 59
- Figura 9. Distribuição de freqüências dos genótipos *HinfI* (+/+), (+/-) e (-/-) referentes ao gene *PIT1*, em cada grupo genético (*GG1* e *GG2*). 61
- Figura 10. Curvas de distribuição normal apresentadas pelos valores de pesos ao nascimento (PN), padronizados à desmama ( $P_{240}$ ) e padronizados aos 12 meses de idade ( $P_{365}$ ), na população total. 65
- Figura 11. Efeito de interação entre grupo genético (*GG*) e *PIT1*, observado para o caráter peso padronizado à desmama ( $P_{240}$ ) (kg) em animais da raça Canchim. 71
- Figura 12. Efeito de interação entre grupo genético e genótipos de *PIT1*, observado para o caráter ganho médio diário de peso do nascimento à desmama (GMND) (kg/dia) em animais da raça Canchim. 72

Figura 13. Representação esquemática dos valores genotípicos, genéticos e de desvios devidos à dominância (kg) dos genótipos de *PIT1* para  $P_{240}$ , estimados como desvios da média da população. 81

Figura 14. Representação esquemática dos valores genotípicos, genéticos e de desvios devidos à dominância (kg/dia) dos genótipos de *PIT1* para *GMND*, estimados como desvios da média da população. 82

## RESUMO

O gene *PIT1* codifica o fator de transcrição pituitário Pit-1, crítico para ativar a expressão dos genes da prolactina e do hormônio de crescimento, além de participar na ativação do próprio *PIT1*. Esta pesquisa teve por objetivo investigar o efeito do polimorfismo *HinfI* desse gene sobre caracteres de produção de carne em um rebanho da raça Canchim. A amostra foi constituída por 509 animais nascidos entre os anos de 1998 e 2000. A amostra incluiu uma linhagem tradicional (GG1) com média de 5/8 de genoma da raça Charolês e 3/8 das raças zebuínas Nelore, Guzerá e Indubrasil, e uma linhagem nova (GG2) com média de 21/32 de genoma de Charolês e 11/32 da raça Nelore. Os genótipos para o gene *PIT1* foram identificados mediante técnica PCR-RFLP empregando a enzima *HinfI*. Os efeitos dos genótipos sobre valores fenotípicos para pesos ao nascimento (PN) e pesos padronizados à desmama ( $P_{240}$ ) e ao ano ( $P_{365}$ ), e sobre os valores de ganhos de peso médios diários do nascimento à desmama (GMND) e da desmama aos 12 meses de idade (GMD12) foram analisados pelo método dos quadrados mínimos. Os resultados revelaram efeitos significativos da interação entre grupo genético do animal e genótipo de *PIT1* sobre  $P_{240}$ , GMND e GMD12 ( $P < 0,05$ ). As diferenças nas médias dos quadrados mínimos entre o genótipo (-/-) e os genótipos (+/+) e (+/-) para  $P_{240}$  e para GMND foram significativas em GG2 ( $P < 0,01$  e  $p < 0,05$ , respectivamente), revelando superioridade do genótipo (-/-). As médias dos genótipos (+/+) e (+/-), referentes a  $P_{240}$  e GMND, não diferiram entre si, indicando efeito de dominância do alelo *HinfI* (+). As médias dos efeitos do alelo *HinfI* (-) apontaram para efeito positivo deste alelo sobre  $P_{240}$  e GMND, e as estimativas de desvios atribuídos à dominância mostraram efeito favorável do alelo *HinfI* (-), sobre  $P_{240}$  e GMND dos animais do grupo GG2, quando presente em homozigose nos genótipos dos indivíduos. Não houve diferenças significativas entre as médias dos três genótipos no grupo genético GG1. A diferença de comportamento de *PIT1* observada nos dois grupos genéticos, entretanto, pode sugerir a ação de um QTL (*Quantitative Trait Locus*) ligado ao gene *PIT1* segregando apenas em GG2 da população estudada e não efeito direto de *PIT1*.

## ABSTRACT

The *PIT1* gene codes for the pituitary transcription factor Pit-1, which is critical for the activation of the expression of prolactin and growth hormone genes, in addition to participating in the activation of *PIT1* itself. The objective of the present study was to investigate the effect of *HinfI* polymorphism of this gene on meat production traits. The sample consisted of 509 Canchim animals born between 1998 and 2000. The sample included a traditional line (*GG1*) consisting of 5/8 Charolais genome breed and 3/8 of the Zebu breeds, Nelore, Guzará and Indubrasil, and a new line (*GG2*) with 21/32 Charolais genome and 11/32 of the Nelore breed. The genotypes for the *PIT1* gene were identified by PCR-RFLP. Genotype effect on phenotypic values for birth weight (BW), standardized weaning weight ( $W_{240}$ ) and at 12 month of age weight ( $W_{365}$ ), and on average daily weight gain to the born at weaning (GMND) and to the weaning at 12 month of age (GMD12), were analyzed by the least squares method. The results revealed significant effects of the interaction between genetic animal group and *PIT1* genotype on  $W_{240}$ , GMND and GMD12 ( $P < 0.05$ ). The differences in mean least squares between genotype (-/-) and genotypes (+/+) and (+/-) for  $W_{240}$  and GMND were significant in *GG2* ( $P < 0,01$  and  $p < 0,05$ , respectively), revealing superiority of the (-/-) genotype on that characters. The means for genotypes (+/+) and (+/-), respectively at the  $W_{240}$  and GMND, did not differ from one another, suggesting a dominance effect of the *HinfI* (+) allele. The means effects of the *HinfI* (-) allele indicated a positive effect of this allele on  $W_{240}$  and GMND, and the deviation estimates attributed to dominance showed a favorable effect of the *HinfI* (-) allele on  $W_{240}$  and GMND of *GG2* animals, when present in homozygosis in the genotypes of the individuals. The means of the genotypes in *GG1* did not differ from one another. The difference in *PIT1* behavior observed in the two genetic groups, however, may suggest the action of a quantitative trait locus linked to *PIT1* segregating only in *GG2* of the population studied, and not a direct effect of *PIT1*.

## 1. INTRODUÇÃO

A eficiência de produção de carne resulta da combinação entre os efeitos de fatores de origem genética e de fatores de natureza ambiental. Os altos níveis de produção e os altos índices de produtividade, portanto, dependem de melhorias tanto da composição genética dos animais quanto das condições ambientais de criação, sendo a constituição genética dos animais, entretanto, fator determinante para o estabelecimento de programas efetivos de melhoramento animal.

A maioria dos caracteres econômicos é condicionada por poligenes atuando em conjunto na determinação dos fenótipos dos animais e muito vulnerável a variações de natureza ambiental, dificultando a identificação dos melhores genótipos. Assim, os progressos genéticos em populações dependem de metodologias desenvolvidas com o objetivo de compreender como as propriedades observadas em populações são influenciadas pelas propriedades dos genes envolvidos e pelas circunstâncias não genéticas influenciando um caráter métrico (FALCONER; MACKAY, 1996).

O avanço da tecnologia genômica com o desenvolvimento de marcadores genéticos distribuídos ao longo do genoma dos bovinos vem permitindo a identificação de genes com efeitos sobre características de produção, favorecendo a maior eficiência de seleção, tendo em vista que tais marcadores podem fornecer maior quantidade de informações sobre os valores genéticos dos animais.

### 1.1. O gado Canchim

A exploração racional de espécies animais de interesse econômico em países de clima tropical, utiliza-se dos cruzamentos com o objetivo de explorar as diferenças genéticas entre raças, num fenômeno denominado heterose, que se manifesta pelo maior vigor dos animais quanto aos caracteres de produção, beneficiando-se também do fenômeno de complementação, isto é, da combinação de diferentes qualidades de cada raça. No Brasil, os cruzamentos entre raças européias (*Bos taurus*) e indianas (*Bos indicus*), constituem-se uma alternativa freqüentemente utilizada, visando reunir nos produtos desses cruzamentos, a produtividade de uma raça européia especializada para corte, pouco adaptada ao clima tropical, e a rusticidade de uma raça zebuína, porém, menos produtiva.

A capacidade de adaptação do zebuíno ao clima tropical caracteriza-se, principalmente, pela maior habilidade no aproveitamento de forragens e à maior tolerância às altas temperaturas e doenças parasitárias, próprias de regiões tropicais, refletindo diretamente sobre o desempenho reprodutivo e produtivo desses animais.

A formação da raça Canchim no Brasil teve início em 1940 pelo médico veterinário e zootecnista Dr. Antônio Teixeira Vianna na Fazenda de Criação de São Carlos, hoje Fazenda Canchim, a partir de cruzamentos entre animais das raças Charolês, de origem européia, e zebuínas, de origem indiana, com o propósito de produzir animais que reunissem a capacidade de se adaptarem aos trópicos, mostrada pelos zebuínos, e o excelente potencial genético de produção dos europeus.

A partir desses animais cruzados Charolês-Zebu foram obtidos dois grupos genéticos distintos, um com uma constituição genética de 5/8 Charolês e 3/8 Zebu e outro de 5/8 Zebu e 3/8 Charolês, os quais foram submetidos a avaliações quanto a características importantes na produção. A comparação resultou na escolha do grupo genético 5/8 Charolês e 3/8 Zebu devido ao seu melhor desempenho em relação ao 3/8 Charolês e 5/8 Zebu (VIANNA et al., 1978).

O gado Canchim apresenta bom desenvolvimento, ótima conformação para corte, precocidade e rusticidade. De acordo com Vianna et al., (1978), as vacas produzem leite em abundância e parem bezerros pesados e resistentes às doenças mais comuns.

A raça Charolês foi escolhida para esses cruzamentos por se tratar de uma raça de grande rendimento na produção de carne e por apresentar condições satisfatórias de adaptação às condições naturais do Brasil Central (VIANNA et al., 1978). Participaram da formação do rebanho Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste em São Carlos, 53 touros Charolês, 8 touros Indubrasil, 4 touros Guzerá, 127 vacas Indubrasil, 9 vacas Guzerá e 9 vacas Nelore (ALENCAR, 1988). Atualmente, dentre as raças zebuínas, a Nelore é a mais utilizada nos cruzamentos. Esta raça vem ganhando destaque entre as raças zebuínas criadas no Brasil, no que se refere a desempenho em produção de carne, resultado, principalmente, de esforços intensos voltados para o melhoramento genético dos rebanhos.

Até 1977, a eliminação de fêmeas do rebanho era feita, principalmente, por motivo de doença ou acidente. A partir daí, para a seleção de fêmeas foram adotados critérios tais como a exigência quanto a



registro genealógico, aprovação em exame ginecológico e peso mínimo de 310 kg por ocasião da primeira estação de monta, além de diagnóstico positivo de gestação em duas estações de monta consecutivas (ALENCAR; BARBOSA, 1981). Os critérios de seleção para os machos, além do padrão racial, foram os pesos aos 12 e, ou 18 meses, a circunferência escrotal aos 12 meses de idade (BARBOSA, 1997) e aprovação em exame andrológico.

Em 1984 deu-se o início do desenvolvimento de uma nova linhagem de Canchim, com a obtenção de fêmeas cruzadas Canchim X Nelore. Essas fêmeas, acasaladas com touros da raça Charolês resultaram em animais que, quando acasalados entre si, originaram o novo grupo genético. Em 1993, nasceram os primeiros animais da nova linhagem (BARBOSA, 2000). Conforme o autor, esse esquema tem contribuído para a ampliação da base genética da raça Canchim, aspecto fundamental para o sucesso do programa de melhoramento genético.

Hoje, na Fazenda Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste, são mantidas duas populações da raça Canchim. A população tradicional, formada a partir de 1953 é composta de 20/32 ou 62,5% do genoma da raça Charolês e mantida fechada desde então. A atual tem composição de 21/32 ou 65,6% do genoma de Charolês. Esse rebanho vem sendo submetido a intensa seleção e melhoramento genético ao longo desses anos, para caracteres de interesse econômico em gado de corte. As Figuras 1 e 2 apresentam, respectivamente, os esquemas de cruzamentos utilizados para a formação das duas populações e um exemplar do sexo masculino, da raça Canchim.

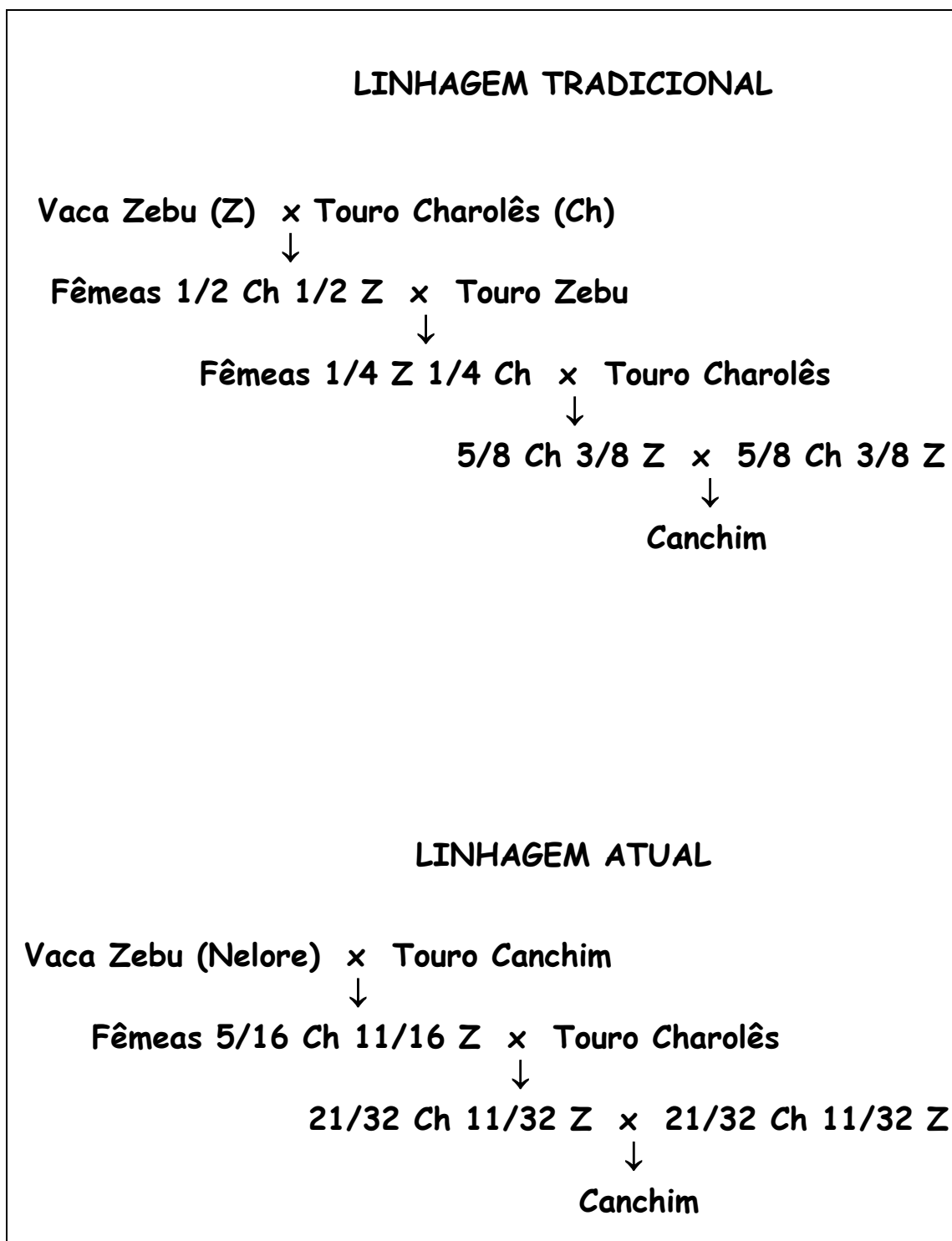


Figura 1. Esquemas de cruzamentos utilizados para a formação das duas linhagens de animais da raça Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste.



Figura 2. Exemprar do sexo masculino, da raça Canchim.

### **1.2. Mecanismo da herança quantitativa**

Os caracteres quantitativos caracterizam-se por apresentarem, em uma determinada população, uma infinidade de diferentes valores, cuja variação distribui-se conforme um padrão contínuo, sem uma separação nítida entre as classes. São também conhecidos como caracteres contínuos ou métricos e suas avaliações são dependentes de mensurações.

Os caracteres de interesse econômico em animais domésticos, em geral, apresentam-se como quantitativos e são transmitidos às gerações subsequentes conforme um padrão de herança poligênico, cujos princípios genéticos envolvidos são os de segregação mendeliana simples. Como a

segregação desses genes não pode ser acompanhada individualmente, houve a necessidade do desenvolvimento de metodologias essencialmente estatísticas para o estudo desses caracteres métricos, as quais requerem avaliações realizadas em populações, utilizando-se de valores de médias, variâncias e covariâncias.

O padrão de herança poligênico apresenta dois modos distintos de ação gênica, o aditivo e o não aditivo, associados a efeitos de fatores de natureza ambiental. Na ação gênica aditiva, admite-se que os efeitos de cada um dos genes responsáveis pela expressão de um determinado caráter somam-se, determinando um efeito médio total, ou o fenótipo do indivíduo. Assim, considerando-se apenas os fatores genéticos, espera-se que a descendência de qualquer indivíduo tenha média igual ao seu valor fenotípico.

A ação gênica não aditiva inclui efeitos de dominância e de epistasia. A dominância resulta de interações não aditivas entre os efeitos de alelos de modo que, na presença de um alelo dominante, o alelo recessivo não se manifesta. Assim, os indivíduos homocigotos para o alelo dominante e os heterocigotos apresentarão o mesmo fenótipo, dificultando a identificação de genótipos. A epistasia é caracterizada por interações entre os efeitos de alelos de outro ou de outros genes, as quais podem influenciar a expressão fenotípica de um determinado caráter.

O mecanismo genético da transmissão de caracteres às gerações sucessoras admite que um par de alelos separa-se durante a gametogênese, distribuindo-se aleatoriamente entre os gametas. Como os pais contribuem com seus gametas, eles transmitem um alelo de cada gene à

sua progênie. Nesse contexto, é fundamental o conhecimento das médias dos efeitos dos alelos de diferentes locos, para a determinação do valor genotípico médio da progênie de um genitor.

A soma das médias dos efeitos de alelos de todos os seus genes, permite determinar o valor genético de um indivíduo. Considerando-se um único loco, o valor genotípico poderá ser determinado conhecendo-se apenas o valor genético e o desvio causado pela dominância. Porém, quando se considera mais do que um loco, o valor genotípico poderá conter ainda, um desvio ocasionado pela epistasia.

A variação observada em populações em relação a um caráter quantitativo qualquer, depende sobremaneira da variação devida à diferenças de ordem ambiental influenciando aquele caráter, e quanto mais o ambiente influencia as ações dos genes, menos exata poderá ser a estimativa do valor genotípico do indivíduo. Como a seleção de caracteres quantitativos economicamente importantes depende da precisão com que os valores genotípicos dos animais são estimados, torna-se necessário reconhecer o quanto da variação observada pode ser atribuída às diferenças genotípicas e o quanto pode ser atribuída às diferenças ambientais presentes entre os indivíduos. Conforme Lasley (1978), a fração da variância fenotípica total de uma determinada característica numa população, atribuída à hereditariedade é denominada herdabilidade.

O coeficiente de herdabilidade pode ser estimado tanto no seu sentido restrito, considerando-se apenas a variância devida aos efeitos genéticos aditivos, como no sentido amplo, em que se considera ainda, a variação de natureza genética não aditiva.

A variância devida aos efeitos genéticos aditivos, identificada e quantificada com certa facilidade por meio de métodos estatísticos, é utilizada com freqüência em melhoramento animal e vem possibilitando resultados efetivos na seleção de animais de interesse econômico. De outro lado, a determinação da magnitude dos efeitos genéticos não aditivos é aspecto de fundamental importância para a produção animal, principalmente se o objetivo é a produção de linhagens endogâmicas ou a utilização da exogamia (KEARSEY; POONI, 1996).

A mudança na média de uma população em relação a um dado caráter quantitativo, produzida por seleção, é denominada resposta à seleção (FALCONER; MACKAY, 1996), e pode ser calculada pela diferença entre o valor fenotípico médio dos descendentes de indivíduos selecionados para pais da próxima geração e a média da geração paterna antes da seleção. Assim, a resposta à seleção é função da superioridade média dos indivíduos selecionados para pais da próxima geração, expressa como um desvio da média da população antes da aplicação da seleção, e do coeficiente de herdabilidade do caráter em questão, o qual permite estimar a magnitude da porção herdável da superioridade dos indivíduos selecionados para pais da geração seguinte.

A avaliação do progresso genético pode ser mais efetiva quando se considera o intervalo de tempo decorrido entre as gerações antes e após a seleção. Este intervalo de tempo é denominado intervalo médio entre gerações e pode ser definido como a média de idade dos pais por ocasião do nascimento de seus filhos. A relação entre o progresso genético e o intervalo médio entre gerações permite uma previsão do progresso que pode

ser esperado por unidade de tempo. Em animais esta medida torna-se um pouco mais complexa pela sobreposição de gerações e endogamia.

Atualmente, o desenvolvimento das técnicas de análise dos marcadores moleculares vem possibilitando os estudos e a detecção de locos com efeitos importantes sobre a variação de caracteres quantitativos. Essas novas técnicas deverão otimizar os resultados de programas de melhoramento animal por propiciarem maior precisão nas estimativas de valores genéticos de animais destinados à reprodução, além de permitirem a identificação do potencial de genótipos mesmo antes de suas expressões fenotípicas em animais.

### **1.3. Marcadores moleculares**

Marcador molecular refere-se a todo e qualquer fenótipo molecular resultante de um gene expresso, ou de um segmento específico de DNA correspondente a regiões não codificadoras do genoma (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996), o qual, comportando-se conforme as leis mendelianas, pode ser considerado um marcador genético. Regiões polimórficas de DNA podem ser utilizadas como marcadores genéticos ao longo dos cromossomos permitindo a localização relativa de segmentos cromossômicos ou de genes responsáveis por alguma variação fenotípica observada em características de importância zootécnica.

Os recentes progressos das pesquisas com a tecnologia genômica possibilitaram o desenvolvimento de métodos que permitem a detecção de polimorfismo no DNA. O Polimorfismo de Comprimento de

Fragmentos de Restrição (RFLP), por exemplo, utiliza-se da clivagem da molécula de DNA por enzimas de restrição, que pode resultar em fragmentos de diferentes comprimentos. Qualquer mutação que possa alterar uma determinada seqüência de reconhecimento para uma dada enzima de restrição, pode ser detectada como um RFLP. Esse tipo de marcador está distribuído ao longo de todo o genoma, e apresenta baixo nível de polimorfismo.

O desenvolvimento da técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) (MULLIS; FALOONA, 1987) permitiu o surgimento de novas classes de marcadores. Os Microssatélites (LITT; LUTY, 1989) são seqüências curtas (em torno de 300 pares de bases) compostas de repetições em tandem de um a seis nucleotídeos, encontradas com freqüência e distribuídas ao acaso no genoma de plantas e animais. O polimorfismo é baseado nas diferenças no número de repetições das regiões amplificadas. Os Microssatélites constituem a classe de marcadores com o maior grau de polimorfismo entre os marcadores disponíveis (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996) e vêm sendo utilizados na construção de mapas de ligação e na identificação de locos que controlam características quantitativas (QTL-*Quantitative Traits Loci*) de interesse econômico em animais domésticos. O Polimorfismo de DNA Arbitrariamente Amplificado (RAPD) (WELSH; McCLELLAND, 1990; WILLIANS et al., 1990) é um método que consiste na utilização de *primers* curtos e únicos (em torno de 10 nucleotídeos), permitindo gerar um grande número de fragmentos aleatoriamente amplificados e com diferentes pesos moleculares, porém, não possibilita a detecção de heterozigotos. Dentre as aplicações para os



RAPDs destaca-se a caracterização genética de populações naturais que ainda não possuem mapas genéticos saturados.

A técnica da PCR constitui-se em uma reação enzimática *in vitro*, a partir de uma seqüência genômica específica de DNA, catalisada pela ação de uma DNA polimerase termo resistente, usando dois oligonucleotídeos de RNA iniciadores (*primers*) flanqueando a região de interesse. Os passos envolvidos em um ciclo da reação incluem a desnaturação das moléculas de DNA, a hibridação dos *primers* às regiões homólogas do genoma e a polimerização das novas fitas da molécula de DNA, a temperaturas específicas, resultando em um acúmulo exponencial de um fragmento específico a partir da extremidade 5' dos *primers*. O número de cópias da seqüência alvo, específica, pode ser dobrado a cada ciclo e, ao final de 30 ciclos, milhões de cópias da seqüência alvo podem ser obtidas.

Os marcadores moleculares permitem determinar genótipos de indivíduos em vários locos em muitas espécies (O'BRIEN; GRAVES, 1991), possibilitando estimativas de parâmetros populacionais tais como freqüências alélicas e genotípicas, usadas para comparações entre populações e estimativas de variação genética no DNA, as quais podem revelar diferenças genéticas que contribuem para gerar variabilidade fenotípica em populações (MOODY et al., 1996). Se o marcador é neutro, ele pode permitir a determinação do grau de heterozigose, de endogamia ou da distância genética em estudos populacionais (MATTOS, 2000).

Os esquemas de seleção que utilizam as técnicas de marcadores moleculares podem ser mais eficientes do que aqueles que usam a seleção massal para o caráter de interesse (SOLLER; BECKMANN, 1983).

As diferenças nas seqüências de moléculas de DNA, podem ser responsáveis diretas por diferenças no fenótipo ou estarem ligadas, no mesmo cromossomo, ao polimorfismo que afeta o fenótipo dos animais (GODDARD; HAYES, 2002).

Quando se mostram associados a características de produção ou a alguma doença genética podem se constituir em poderosa ferramenta no processo de melhoramento genético animal. Dentre os marcadores associados a caracteres produtivos já identificados e estudados em bovinos, estão os genes das proteínas do leite como a k-caseína com duas formas alélicas A e B, estando a variante B associada ao aumento no rendimento de produção de queijos (MARIANI et al., 1976) e o gene da  $\beta$ -lactoglobulina, importante proteína do soro do leite, relacionado com deposição de proteína, porcentagem de gordura e a produção total de leite em bovinos (BOVENHUIS et al., 1992). Rocha et al. (1992) observaram um efeito do polimorfismo do gene do hormônio da paratireóide (PTH-*Msp*I) sobre o peso à desmama como uma característica maternal. McPherron e Lee (1997) identificaram uma mutação no gene da miostatina em bovinos da raça Piedmontese, conhecida por apresentar musculatura dupla.

A utilização dos marcadores moleculares em seleção animal pode ainda, permitir a identificação de animais heterozigotos portadores de alelos recessivos responsáveis pela manifestação de doenças genéticas tais como a BLAD (Bovine Leucocyte Adhesion Deficiency), em bovinos (SHUSTER et al., 1992), na qual os animais afetados morrem com poucos dias de vida apresentando sintomas de infecção generalizada.

A utilização de marcadores moleculares para identificar genótipos desejáveis na produção animal tem como base o mecanismo da herança de genes ligados no mesmo cromossomo. Considerando, por exemplo, dois genes com dois alelos ligados num mesmo cromossomo, durante a formação de gametas, poderão resultar duas combinações de alelos com o mesmo arranjo de ligação dos cromossomos parentais, cada uma com uma frequência superior a 25%, e duas classes representando os arranjos recombinantes, ocorrendo com uma frequência inferior a 25%. Esses arranjos recombinantes, resultam de eventos de *crossing over* durante a divisão celular e são dependentes da distância entre os genes no cromossomo. Entretanto, no caso de ligação absoluta, serão produzidos apenas gametas com as combinações parentais, a uma frequência de 50% cada.

O desequilíbrio de ligação ocorre em função da restrição aos eventos de recombinação entre os locos que pode ser decorrente de ligação física dos genes em um cromossomo, ou de outros fatores capazes de produzir associações não aleatórias entre alelos de locos não ligados, como por exemplo, a subdivisão da população, o efeito fundador ou a seleção de uma combinação alélica multilocal favorável (AVISE, 1994). Conforme o autor, em populações que se reproduzem ao acaso, qualquer desequilíbrio inicial entre alelos neutros tende a zero com o passar do tempo.

Em síntese, associações entre marcadores polimórficos e caracteres produtivos podem ser estabelecidas quando o próprio marcador é o responsável pelos diferentes fenótipos, ou pelo desequilíbrio de ligação, quando estão ligados no mesmo cromossomo o marcador e a região cromossômica responsável pela variação fenotípica observada na população,

podendo gerar efeitos quantitativos associados ao marcador que podem ser detectados e estimados. Entretanto, a ligação entre os locos marcador e o que controla o caráter produtivo não deve ser necessariamente de caráter absoluto. A ocorrência de recombinação poderá se levar em consideração e, nesse contexto, vários métodos estatísticos, além de delineamentos genéticos apropriados foram propostos para se investigarem associações dessa natureza.

No desequilíbrio de ligação, a combinação observada entre alelos de vários locos pode diferir significativamente daquela esperada pelo acaso. Mesmo que o marcador esteja dentro do próprio gene que controla a característica em questão, se a mutação responsável pela variação localizar-se num sítio polimórfico diferente do sítio marcador, haverá possibilidade de recombinação intragênica entre os dois sítios polimórficos (MATTOS, 2000).

Diversos fatores, entretanto, podem contribuir para que um marcador, associado à produção, identificado em uma dada população não tenha o mesmo efeito em outra população. Os procedimentos de detecção de tais associações podem apresentar o poder, a precisão e a acurácia em diferentes níveis. A origem do rebanho e da raça, fluxo gênico, mestiçagem, seleção artificial e o tamanho efetivo da população foram citados por Mattos (2000) como fatores influenciando o comportamento de marcadores em diferentes populações. Segundo a autora, a ocorrência de um marcador está intimamente relacionada à história evolutiva e contemporânea daquela população. Assim, a utilização de marcadores em programas de melhoramento genético requer que o mesmo seja, antes, testado para que seja verificado o seu comportamento naquela população.

#### 1.4. *Quantitative traits loci* ( QTLs )

Os locos que controlam a maioria dos caracteres economicamente importantes em bovinos, de natureza poligênica, são denominados QTL (*Quantitative Traits Loci*) e se constituem em regiões cromossômicas associadas à variação fenotípica observada em populações. São identificados como associações estatísticas entre dados relativos a uma região genômica e a variabilidade fenotípica existente entre populações segregantes (LIU, 1998).

Uma abordagem para a detecção de QTLs consiste na localização de genes de interesse usando associações entre marcadores e QTL cobrindo todo o genoma. Os marcadores são avaliados em estudos de correlação com características de interesse econômico e utilizados na identificação de regiões cromossômicas contendo QTL de interesse. Em seguida, novos marcadores são analisados e utilizados objetivando o estreitamento progressivo da região cromossômica que contém o possível QTL de interesse e a identificação de marcadores firmemente ligados ao QTL, até que sejam identificados os genes responsáveis pela variação da característica, ou genes candidatos (PARMENTIER et al., 1999), potencialmente importantes por representarem o QTL nesta região. O posicionamento genético baseia-se em mapas de ligação, construídos utilizando-se marcadores altamente polimórficos. Em bovinos, mapas genéticos publicados por Barendse et al. (1997) e Kappes et al. (1997) fornecem um número suficiente de marcadores moleculares.

A hipótese empregada para a localização de um QTL é de que estes marcadores moleculares polimórficos, estejam próximos e

suficientemente ligados ao QTL, de forma que, na maioria da progênie de um indivíduo heterozigoto para o marcador, seja possível associar a variação na característica quantitativa de interesse com o genótipo do marcador, que será indicativo do genótipo do QTL. A frequência de ocorrência de recombinação causada por *crossing over* dos cromossomos dos indivíduos parentais permitirá estabelecer a estimativa da distância genética entre o marcador e o QTL. Como a localização do marcador é conhecida, desta forma será possível conhecer a estimativa da localização do QTL (MOTA et al., 2000).

Uma das abordagens com grande poder de detecção de um gene de efeito principal que afeta uma característica quantitativa, baseia-se na construção de populações formadas a partir do cruzamento entre linhagens puras, gerando uma população de indivíduos ( $F_1$ ), teoricamente heterozigotos para os locos do QTL e do marcador, a partir da qual, duas possibilidades podem ser consideradas. O retrocruzamento, cruzando-se a geração  $F_1$  com os parentais, e cruzamentos de  $F_1$  entre si, produzindo uma geração  $F_2$  (SOLLER; BECKMANN, 1983; KNAPP et al., 1990).

Em alguns tipos de organismos é possível a construção dessas populações, utilizando-se linhagens isogênicas geneticamente distintas em relação ao loco marcador e à característica quantitativa de interesse, as quais possibilitariam a produção de indivíduos  $F_1$  heterozigotos em ambos os locos (QTL e marcador). Entretanto, nem sempre isso é possível. Em bovinos, por exemplo, são longos os intervalos entre as gerações, o que implicaria em longo tempo para obtenção de linhagens, isso sem considerar os problemas que resultariam da manifestação da carga genética das populações. Nessa espécie, os delineamentos experimentais utilizam-se de

grandes famílias de meios irmãos, avaliados em testes de progênie. Dois delineamentos são mais utilizados, tanto em bovinos de corte como em bovinos de leite, o delineamento de filhos e o delineamento de netos.

O delineamento de filhos está baseado na expectativa de que, se um indivíduo é heterozigoto para o marcador e QTL, e se eles estão ligados, a progênie que receber determinado alelo do marcador, também receberá o alelo do QTL a ele associado (MARTINEZ, 1998), de forma que se as progênies forem agrupadas de acordo com o alelo marcador que receberam do pai heterozigoto, a presença de alelos alternativos do QTL pode promover diferença na média da característica dos dois grupos de progênie. Assim, uma diferença significativa entre estas médias é uma indicação de que o marcador e o QTL estão ligados. Este tipo de delineamento pode ser utilizado em populações em que um touro é acasalado com várias vacas, produzindo um grande número de progênies. Neste delineamento todos os animais são genotipados para o marcador sendo coletadas as informações da produção da característica de interesse nos filhos.

No delineamento de netos a análise pode ser realizada obtendo-se o genótipo dos filhos de um touro (avô) heterozigoto para o marcador e avaliando-se nos netos (filhos de meios irmãos) a característica de interesse (WELLER et al., 1990). De acordo com os autores, o número de genotipagens necessárias no delineamento de netos é inferior ao necessário no delineamento de filhos, mantendo-se o mesmo poder do teste, sendo este delineamento, mais apropriado em rebanhos nos quais os touros classificados como elite possuam filhos também utilizados em programas de inseminação artificial. Segundo Martinez (1998) o delineamento de netos

tem maior poder para se detectar ligação entre marcador e QTL do que o delineamento de filhos e o poder é maior quando se têm mais indivíduos por família do que muitas famílias com poucos indivíduos.

Com relação à escolha do QTL a ser utilizado em um programa de seleção é importante que o mesmo apresente efeito aditivo suficientemente grande em pelo menos um caráter produtivo e não influencie negativamente o desempenho (SMITH; SIMPSON, 1986). Churchill e Doerge (1998) incluem, entre os problemas relacionados ao mapeamento de QTLs, a dificuldade na detecção correta de todos os fatores genéticos que possuem efeitos sobre a característica e estão segregando independentemente na população, a localização do QTL em relação ao marcador genômico empregado e a correta estimação dos efeitos do QTL e suas interações.

A identificação de QTLs, poderá auxiliar na distinção entre os efeitos de ligação e de pleiotropia, na determinação do tipo de ação gênica de cada loco individualmente e a avaliação da extensão da dominância. Além disso, possibilita o processo de seleção assistida por marcadores, principalmente para o melhoramento de caracteres de baixa herdabilidade, ou de caracteres que somente se manifestam em um sexo como por exemplo a produção de leite ou de ovos, ou daqueles que somente podem ser medidos após a morte do animal como algumas características de carcaça, ou ainda quando se pretende a realização de seleção precoce. O uso de informações QTL em programas de seleção conforme Parmentier et al. (1999), pode permitir o aumento da acurácia da seleção fornecendo mais informações sobre o valor genético do animal, as quais poderão ser identificadas nos



primeiros estágios da vida e então serem usadas, possibilitando a redução do intervalo médio entre gerações.

Diversos QTLs têm sido detectados em diversas regiões do genoma bovino e de outras espécies animais de interesse econômico. Arranz et al. (1998), observaram um QTL do cromossomo 20 afetando a produção e a composição do leite, segregando em uma população de gado de leite da raça Holstein-Friesian. O estudo evidenciou um alelo causando aumento no volume de leite, acompanhado por diluição nas concentrações de gordura e proteína do leite. Em um rabanho da raça Holandesa, Kalm et al. (1998) detectaram QTLs para produção de leite nos cromossomos 2, 5, 18 e 23, para produção de gordura nos cromossomos 2, 5 e 16 e para produção de proteínas nos cromossomos 10,16 e 23.

O peso vivo em animais é altamente herdável, variável e responde bem à seleção. Entretanto, pesos a várias idades apresentam correlação genética positiva, de forma que a seleção para aumentar pesos à desmama ou à maturidade pode resultar em aumento nos pesos ao nascer e dificuldades de partos. Conforme Davis e Taylor (1998), há genes em bovinos influenciando pesos à desmama e à maturidade sem, no entanto, afetar peso ao nascer.

Em uma população bovina resultante de cruzamentos *Bos taurus* X *Bos indicus*, Hetzel et al. (1998) evidenciaram QTLs nos cromossomos 18, 21 e 5 para peso ao nascimento (crescimento pré-natal), nos cromossomos 6 e 14 para variação de crescimento em todas as idades e nos cromossomos 9 e 19 para crescimento pós-natal.

Casas et al. (2000) detectaram no cromossomo 5, um QTL próximo ao loco IGF-1 afetando a deposição de gordura, rendimento no corte e maciez da carne. No cromossomo 6, identificaram QTL para peso ao nascimento e para peso ao ano. Nos cromossomos 17 e 27 um QTL para marmoreio e no 29, um QTL para maciez da carne.

Em um estudo utilizando genótipos de 238 marcadores microsatélites da progênie de um touro *Bos taurus* X *Bos indicus* acasalado com vacas *Bos taurus*, Stone et al. (1999) evidenciaram efeitos de QTLs afetando a área do músculo *longissimus* no cromossomo 14, os ossos da costela no cromossomo 5 e o peso ao nascimento no cromossomo 1. Os autores verificaram que o alelo proveniente de *Bos indicus* aumenta o peso de osso da costela e diminui a porcentagem de carne em relação ao alelo *Bos taurus* na progênie estudada. Kappes et al. (2000) detectaram QTL afetando a taxa de ovulação no cromossomo 5, em um rebanho selecionado experimentalmente para aumentar a taxa de gemelaridade.

Resultados de análises de uma região do cromossomo 5 de bovinos, obtidos por Machado et al., (2003), indicaram a presença de um QTL controlando o peso ao nascimento e de um QTL influenciando o valor genético para peso ao ano, em uma população de animais da raça Canchim.

### 1.5. Genes candidatos

Genes candidatos são genes estruturais ou reguladores em uma via bioquímica afetando a expressão de um caráter. São genes já clonados, seqüenciados, com suas funções biológicas conhecidas, envolvidos nos

processos de desenvolvimento ou fisiológicos e diretamente relacionados com caracteres quantitativos de produção (ROTHSCHILD; SOLLER, 1999).

Os efeitos de genes candidatos podem ser investigados em qualquer população que disponha de recursos para avaliação quanto aos fenótipos e aos genótipos dos indivíduos. Associações entre polimorfismo nesses genes e os valores de produção de caracteres de interesse econômico em gado de corte podem ser convenientemente usadas na seleção assistida por marcadores. Essa abordagem apresenta alto poder estatístico, ampla aplicabilidade, baixo custo e simplicidade operacional.

O estudo dos genes candidatos envolve, basicamente, a escolha dos genes, que pode ser baseada no conhecimento do sistema biológico que se pretende estudar, a construção dos *primers* para a amplificação da seqüência alvo e a procura por polimorfismo. Qualquer polimorfismo encontrado dentro do gene e em suas seqüências reguladoras poderá ser útil para a análise de genes candidatos, independentes de serem sítios funcionais ou não. Em seguida são realizadas as análises objetivando o estabelecimento de associações entre os genes e os caracteres de interesse econômico.

As associações entre o gene candidato e a expressão da característica podem ser feitas com um único sítio polimórfico ou, para maximizar sua utilidade, as análises do gene candidato podem ser baseadas na identificação de haplótipos intragênicos, com três a cinco sítios polimórficos intragênicos, prontamente identificados em uma análise dentro de geração, não requerendo informação de pedigree ou de família.

Embora os padrões de expressão de genes envolvidos no crescimento de animais possam ser investigados quanto às suas associações a variações em caracteres relacionados à produção animal, as interações epistáticas e pleiotrópicas que podem envolver esses genes e que a tecnologia genômica ainda não possui meios para detectar, quantificar e minimizar ou neutralizar os seus efeitos, podem limitar o uso desses genes candidatos em seleção assistida por marcadores.

Entre os genes candidatos conhecidos, podem ser citados os genes do hormônio de crescimento, da proteína do leite k-caseína, do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I e do fator de transcrição pituitário Pit-1, sobre os quais a seguir, serão abordadas algumas evidências quanto aos seus efeitos sobre a produção em bovinos.

O gene do hormônio de crescimento de bovinos está localizado no cromossomo 19 (WOMACK et al., 1989). Lucy et al. (1993) identificaram dois alelos em bovinos, diferentes entre si, pela presença de uma leucina ou de uma valina na posição 127 do polipeptídeo. As frequências alélicas desse gene têm sido estimadas em várias populações de bovinos e associadas a fatores de crescimento.

Eppard et al. (1992) evidenciaram que a variante do hormônio de crescimento (GH) com valina (V) possui uma potência galactopoiética maior do que a da variante com Leucina (L) em vacas leiteiras, promovendo uma resposta maior na produção de leite.

Animais homocigotos para o alelo L apresentaram uma concentração maior de hormônio de crescimento (GH) do que os heterocigotos, entretanto, a concentração de fator de crescimento

semelhante à insulina tipo I (IGF-I) foi maior em heterozigotos do que em homozigotos LL (SCHLEE et al., 1994a). Em um estudo com animais da raça Simmental (SCHLEE et al., 1994b), o genótipo LV foi associado com maior ganho de peso por dia, tendo sido os homozigotos para o alelo V superiores para escore de carcaça. Moody et al. (1996) associaram o alelo V com significativo aumento em ganho do nascimento à desmama (180-d), explicando 5% da variabilidade observada na diferença esperada na progênie (DEP).

Analisando o polimorfismo do gene do hormônio de crescimento (*GH-MspI*) em bovinos, Mattos (2000) observou superioridade do alelo responsável pela porcentagem de gordura do leite, em uma amostragem de touros da raça Gir. De acordo com a autora, no genoma da raça Gir foi preservado um conjunto gênico favorecendo o teor de gordura no leite.

Pereira (2002) encontrou efeito significativo do gene do hormônio de crescimento sobre os pesos aos 12 meses de idade em uma população de um rebanho da raça Canchim. Entretanto, o comportamento desse gene foi diferente em uma outra população pertencente ao mesmo rebanho, que apresentou um efeito menor desse gene, reforçando, segundo a autora, a necessidade de se testarem os efeitos dos genes candidatos na população antes de sua aplicação na seleção assistida por marcadores.

Moody et al. (1996), encontraram frequências alélicas diferentes entre três diferentes populações de gado Hereford, usando diferentes polimorfismos de DNA, indicando diferenças genéticas existentes entre populações dentro de raças. Os autores observaram que um polimorfismo no gene k-caseína foi responsável por 15% e 8% da

variabilidade na diferença esperada na progênie (DEP) para peso ao nascer e ganho do nascimento à desmama (180-d), respectivamente, sugerindo um efeito direto do gene k-caseína ou de um gene muito estreitamente ligado.

O gene do fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I) tem sido investigado quanto às suas associações com características de produção em razão de seu papel mediador da função de crescimento, e sugerido como um marcador para a seleção em bovinos. Efeitos significativos da substituição de alelos do gene IGF-I sobre os valores de DEPs direta e materna para ganho de peso do nascimento à desmama e na DEP direta para ganho de peso da desmama aos 12 meses, foram observados por Moody et al. (1996).

Analisando um polimorfismo no gene IGF-I em uma população de animais de raça Canchim, Pereira (2002) verificou que um dos alelos nesse loco, aquele com 229 pares de bases, mostrou-se favorável já que aumentou o peso aos 12 meses de idade sem alterar o peso ao nascer, não comprometendo assim, a facilidade de parto.

O gene *PIT1* pertence a um grupo de genes que codificam proteínas envolvidas no desenvolvimento, dentre elas o fator de transcrição pituitário Pit-1. Há fortes evidências da participação desse gene na ativação de outros genes pituitários relacionados ao crescimento de animais, como os genes do hormônio de crescimento (GH), da prolactina (PRL), da sub unidade  $\beta$  do hormônio que estimula a tireóide (TSH $\beta$ ), além de sua ação na ativação do próprio gene *PIT1* (PARMENTIER et al., 1999).

O DNA de *PIT1*, complementar ao RNA mensageiro de Pit-1 (PIT1cDNA) e/ou seqüências gênicas foram clonadas em diversas espécies

animais, inclusive em bovinos (BODNER et al., 1988). Em todas as espécies testadas o gene *PIT1* mostrou 6 exons e 5 introns, medindo em torno de 1,6 a 2,0 kb e comportou-se como um loco único no genoma de vertebrados (INGRAHAM et al., 1988; OHTA et al., 1992). Conforme Moody et al. (1995), o gene *PIT1* está localizado no cromossomo 1 de bovinos.

O gene *PIT1* é polimórfico em raças de corte e de leite (WOOLARD et al., 1994; MOODY et al., 1995). Estudos recentes mostraram polimorfismo no gene *PIT1* e associações destas variações com características economicamente importantes de produção. Diferenças genéticas no loco *PIT1* de bovinos foram associadas com diversas medidas de características de carcaça, incluindo tamanho da costela, camada de gordura e peso dos ossos (TANK et al., 1994). Em suínos, significativas associações foram encontradas entre um genótipo *PIT1* específico (CC) e diversas características relacionadas ao crescimento (YU et al., 1995).

A substituição de alelos no loco *PIT1*, mostrou efeito significativo sobre a DEP direta para o caráter peso ao nascer em um estudo com animais da raça Hereford, conduzido por Moody et al. (1996). Em um estudo de associações entre polimorfismos *PIT1-HinfI* e características de produção de leite em touros das raça Holstein-Friesian, Renaville et al. (1997) evidenciaram que o padrão *PIT1* explicou 7% da produção de leite, 13% da porcentagem de gordura, 1% da produção de gordura, 1% da porcentagem de proteína e 9% da produção de proteína, da variância total das estimativas de valores genéticos.

Em um rebanho de animais mestiços *Bos taurus* X *Bos indicus* com aptidão leiteira, Mattos (2000) observou, quanto ao loco *PIT1*, que o

alelo *HinfI* (-) em homozigose esteve associado com maior produção de leite, gordura, proteína e quanto à porcentagem de gordura do leite, comportando-se com um efeito semelhante ao de um alelo recessivo com dominância completa do alelo *HinfI* (+). A frequência do alelo *HinfI* (-) nessa pesquisa, foi maior nos touros superiores tanto para produção leiteira como para a produção de gordura.

### **1.6. Regulação do desenvolvimento em animais**

O desenvolvimento de animais está sob a ação de um integrado e organizado sistema hormonal, o eixo somatotrófico, influenciando o crescimento de tecidos orgânicos.

A regulação do crescimento pode resultar da ação direta do hormônio de crescimento (*GH*), também denominado somatotropina, através da ação do receptor do hormônio de crescimento (*GHR*), assim como da ação mediada por fatores tais como os de crescimento semelhantes à insulina (*IGF*) tipo I e tipo II, controlando os processos envolvidos no desenvolvimento de animais por sua ação mitogênica.

A expressão do hormônio de crescimento é regulada em três níveis. O nível basal, baixo nível de expressão, verificado em células não pituitárias (THEILL; KARIN, 1993), é controlado por diversos fatores tissulares agindo positiva e negativamente. O nível somatotrófico específico, alto nível de expressão, está controlado principalmente por uma proteína, o fator pituitário específico Pit-1, que desempenha importante papel na ativação do gene do *GH* e no desenvolvimento da pituitária. O nível



ambiental, ou controle hormonal, envolve interações entre os diferentes hormônios do eixo somatotrófico, determinando o desenvolvimento dos animais. A redução na taxa de crescimento após a destruição do hipotálamo em ratos jovens foi a primeira evidência do controle neuroendócrino da secreção de GH (REICHLIN, 1960).

A regulação da secreção do hormônio de crescimento em animais processa-se conforme um padrão pulsátil, através da ação de um sistema neuroendócrino envolvendo dois hormônios hipotalâmicos e seus receptores. O fator de liberação do hormônio de crescimento (GHRH), que estimula a liberação de GH e a proliferação somatotrófica, e o hormônio somatostatina (SRIH), que tem efeito inibitório sobre a liberação basal ou estimulada, pelos receptores de GH. A ação desses dois hormônios hipotalâmicos é modulada por outros fatores hipotalâmicos, neurotransmissores e hormônios circulantes.

A transecção cirúrgica da base hipofisária em bovino (ANDERSON et al., 1982) e a desconexão hipotálamo pituitária em ovelha (FLETCHER et al., 1994) aboliu o padrão de secreção de GH, evidenciando o papel dos hormônios hipotalâmicos (GHRH e SRIH) no controle do padrão de secreção de GH. Formas precursoras de ambos hormônios foram encontradas na pituitária (RAUCH et al., 1995), indicando que a síntese desses liberadores de hormônios ocorre na pituitária.

Embora a seqüência de aminoácidos de GHRH não seja altamente conservada em espécies de mamíferos (BUONOMO; BAILE, 1990), a porção ativa do peptídeo, uma estrutura entre os resíduos 1 e 27, constitui-se numa região conservada (TUGGLE; TRENKLE, 1996). Conforme

os autores, a seqüência de aminoácidos do SRIH é altamente conservada entre as espécies de mamíferos.

Há evidências na literatura de que o hormônio de crescimento exerça um efeito galactopoiético. Conforme Breier et al. (1991), esse efeito pode ser explicado pela sua relação com o nível de eficiência na conversão alimentar e participação no metabolismo lipídico e de carboidratos. Os autores encontraram correlação positiva entre concentração de IGF-I e produção leiteira.

O IGF-I é sintetizado em vários tecidos do organismo e a ação local do GH promovendo o crescimento dos tecidos é feita através da produção local de IGF-I (BREIER, 1999), estimulando o metabolismo de proteínas, sendo, portanto, considerado um fator de proliferação e de diferenciação celular.

#### **1.6.1. Fator de transcrição pituitário específico Pit-1**

Pit-1 é um fator de transcrição pituitário específico restrito à porção anterior da glândula pituitária. Os transcritos mRNA de Pit-1 podem ser observados em todos os tipos celulares pituitários, porém a expressão da proteína Pit-1 limita-se à tireótrofos, somatótrofos e lactótrofos (SIMMONS et al., 1990).

Pit-1 foi inicialmente proposto por Nelson et al., (1986) como um fator tecido específico relacionado com a ontogenia da pituitária anterior. Estudos posteriores revelaram que a ligação de uma proteína, restrita às linhagens celulares expressando os genes GH e PRL, à regiões de

DNA desses genes promoveu o início da transcrição dos mesmos. Experimentos envolvendo mutação no loco *PIT1* resultaram em deficiências de hormônios GH, PRL e TSH, assim como hipoplasia pituitária, sugerindo o envolvimento de Pit-1 no desenvolvimento desses tipos celulares pituitários (LI et al., 1990; RADOVICK et al., 1992; PFAFFLE et al., 1992). Posteriormente, experimentos evidenciaram que a proteína Pit-1 apresentou-se envolvida na manutenção da expressão do gene  $TSH\beta$  (LIN et al., 1994), além de ativar o hormônio do receptor pituitário  $\beta 2$ -tireóide (WOOD et al., 1994).

O fator de transcrição pituitário específico Pit-1, pertencente à família homeodomínio POU, é uma proteína com 291 aminoácidos com um domínio de transativação  $NH_2$ -terminal e um domínio POU de ligação ao DNA (Figura 3). O domínio POU é constituído por uma seqüência consenso de 155-162 aminoácidos presente nos fatores de transcrição Pit-1, oct-1 e oct-2 em mamíferos (STURM; HERR, 1988). Em espécies de mamíferos a proteína Pit-1 é altamente conservada, com 97 a 99% de identidade na região domínio POU (TUGGLE; TRENKLE, 1996).

O domínio POU de Pit-1 está dividido em duas regiões bem conservadas, um domínio POU-homeobox ( $POU_{HD}$ ), porção C-terminal, com 60 aminoácidos e um domínio POU-específico ( $POU_S$ ), metade N-terminal, uma seqüência com 75 aminoácidos, separadas por uma região pobremente conservada com 15 aminoácidos. O domínio POU-homeobox constitui-se num domínio de baixa afinidade para ligação de DNA, enquanto que o domínio POU-específico, é sítio específico e confere alta afinidade ao domínio POU. Essas duas regiões, ( $POU_{HD}$  e  $POU_S$ ), trabalham juntas para conferir a alta afinidade à ligação ao DNA. O domínio  $POU_S$  serve para aumentar a

afinidade para ligação ao DNA além de participar especificamente no reconhecimento de DNA (INGRAHAM et al., 1990). Conforme os autores, as interações cooperativas proteína-proteína, importantes para os eventos de transativação, são mediadas, provavelmente, pelo domínio POU<sub>S</sub>.

O maior domínio transcricional de Pit-1 está localizado no N-terminal, especificamente nos resíduos 10-40, região rica em Ser e Thr (INGRAHAM et al., 1990). Os autores sugerem a possibilidade de mais do que um domínio transcricional para Pit-1 contribuindo diferentemente em vários contextos promotores.

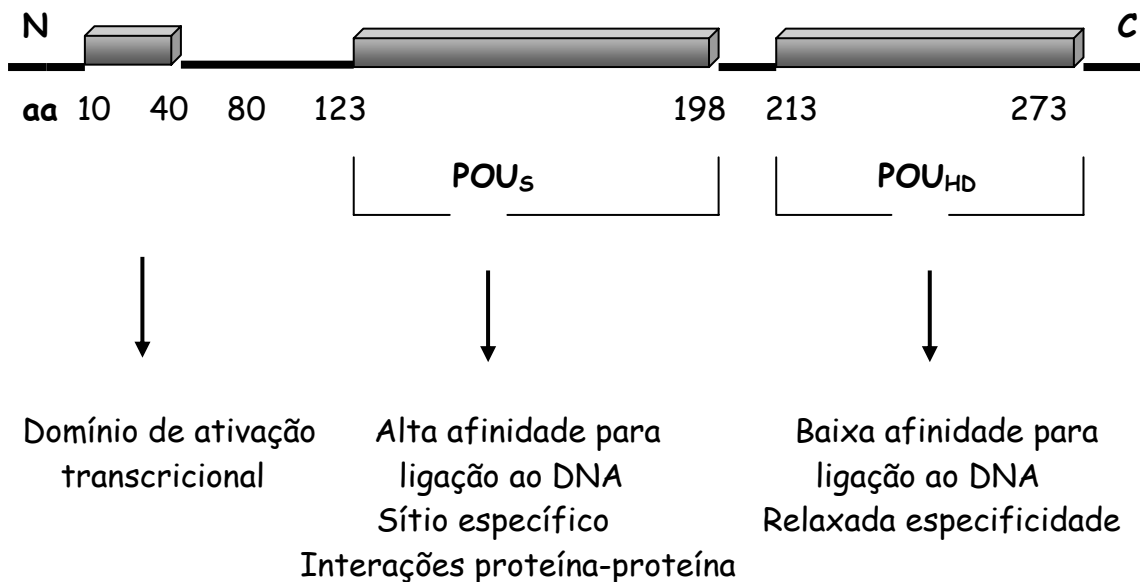


Figura 3. Representação esquemática do domínio funcional de Pit-1.

Adaptado de Ingraham et al. (1990).

A presença de um sítio de ligação Pit-1 flanqueando o gene *PIT1*, mostrando-se necessário para a transcrição a partir de promotor *PIT1*, evidenciaram que *PIT1* pode ativar seu próprio promotor (McCORMICK et al., 1990; CHEN et al., 1990). Outro sítio Pit-1, também flanqueando o gene *PIT1*, foi identificado mostrando ação negativa sobre *PIT1* (CHEN et al., 1990).

Análises de seqüenciamento do gene receptor de GHRH (GHRH-R) mostram dois sítios potenciais de ligação Pit-1, sugerindo ação direta do gene *PIT1* na ativação desse gene. Na linhagem de camundongos anões, Snell *dwarf*, portadora de severa hipoplasia pituitária, há uma mutação recessiva (*dw*), provavelmente no loco *PIT1*. Em animais (*dw/dw*), hormônio de crescimento assim como transcritos de receptores do fator liberador do hormônio de crescimento não puderam ser detectados durante o desenvolvimento embrionário, sugerindo que Pit-1 seja requerida para a ativação inicial do gene *GH* e ainda, que *PIT1* direta ou indiretamente ativa a expressão do gene para receptores do fator liberador do hormônio de crescimento (LIN et al., 1992).

Nelson et al. (1988) sugeriram ser o fator Pit-1 requerido para a ativação do gene PRL. A proteína Pit-1 expressa-se em lactótrofos e somatótrofos e interage com outros fatores reguladores para ativar o promotor do gene PRL (DAY et al., 1990; VOSS et al., 1991), e sua função sobre o gene PRL apresenta-se conservada entre as espécies de vertebrados (ELSHOLTZ et al., 1992).

A ação do hormônio da tireóide (TH) no controle da síntese de GH em ratos foi demonstrada por Spindler et al. (1982), e resultados de

pesquisas têm evidenciado o envolvimento de Pit-1 na regulação da expressão do gene que codifica para a sub unidade  $\beta$  do hormônio que estimula a tireóide (TSH $\beta$ ). A expressão de Pit-1 após o aparecimento de células expressando TSH $\beta$ , sugere que Pit-1 não esteja envolvida na ativação inicial da expressão de TSH $\beta$  (VOSS; ROSENFELD, 1992). Entretanto, camundongos anões da linhagem *Snell*, defeituosos na função de *PIT1*, sugerem que Pit-1 seja necessária para a diferenciação de células tireotróficas (LIN et al., 1994). Gordon et al. (1993), observaram a proteína Pit-1 ligada à região do promotor do gene de TSH $\beta$  de camundongos, e sugeriram ser o gene TSH $\beta$  um alvo direto para Pit-1.

Os altos níveis de expressão de mRNA PIT1 limitam-se à pituitária anterior e, embora somatotrófos, lactotrófos, tireotrófos, gonadotrófos e corticotrófos, expressem mRNA PIT1, a proteína Pit-1 é encontrada somente em somatotrófos, lactotrófos e tireotrófos (SIMMONS et al., 1990). Esta observação sugere a regulação pós-transcricional de Pit-1, como uma função do tipo celular (TUGGLE; TRENKLE, 1996).

A expressão da proteína Pit-1 limita-se aos somatotrófos, lactotrófos e tireotrófos, entretanto, as linhagens de lactotrófos ou tireotrófos, não expressam GH, sugerindo que a proteína Pit-1 não seja suficiente para a síntese de GH. Experimentos com transgenes contendo somente sítios de ligação a Pit-1 próximos ao promotor do gene GH de ratos, mostraram que GH expressa-se na pituitária em baixos níveis (LIRA et al., 1993), sugerindo que mesmo dentro de somatotrófos, a função de Pit-1 sozinha não é suficiente para a expressão de GH (TUGGLE; TRENKLE, 1996). Lipkin et al. (1993) identificaram uma região importante na regulação

de GH, (Z-box), localizada entre dois sítios Pit-1 sobre o gene GH de ratos, necessária para a expressão de altos níveis em pituitárias de camundongos transgênicos.

O mecanismo pelo qual o sítio de ligação altera a habilidade de Pit-1 para transativar pode envolver interações entre proteínas acessórias ou alteração na estrutura de Pit-1 pelo sítio de ligação, modulando a habilidade de Pit-1 para interagir com o maquinário transcricional básico (ANDERSEN; ROSENFELD, 1994). Conforme os autores, a literatura tem mostrado alto nível de conservação dos elementos reguladores da síntese de GH do tipo celular específico, em diferentes espécies.

O mRNA PIT1 produz duas proteínas (Pit-1 $\alpha$ ), de 33 e 31 kDa, encontradas na pituitária anterior, capazes de se ligarem a elementos reguladores. Essas duas proteínas distintas resultam do uso alternativo de dois sítios de iniciação da transcrição dentro do exon 1 do transcrito de Pit-1 (VOSS et al., 1991), embora nenhuma diferença funcional entre as duas proteínas tenha sido detectada.

Diferentes formas de *splicing* alternativos para o mRNA PIT1 foram identificadas, resultando proteínas com propriedades alteradas. A proteína Pit-1 $\beta$ , por exemplo, com 26 aminoácidos adicionais inseridos no início do exon 2, no domínio de ativação do gene, resulta de uma forma alternativa de *splicing* (THEILL et al., 1992; KONZAK; MOORE, 1992). Em sistemas de culturas celulares, esta proteína ativou o promotor do gene GH mais fortemente do que ativou os promotores dos genes PRL (KONZAK; MOORE, 1992), *PIT1* (THEILL et al., 1992) ou TSH $\beta$  (HAUGEN et al., 1994), porém, sua expressão mostra-se com uma frequência

substancialmente menor do que a que ocorre para a proteína Pit-1 $\alpha$ , sugerindo maior instabilidade de Pit-1 $\beta$  (KONZAK; MOORE, 1992). Pit-1 $\beta$  e Pit-1 $\alpha$  apresentam padrões de expressão similares, com afinidades de ligação a DNA para os genes *GH*, *PRL* e *PIT1* também similares, sugerindo que a forma Pit-1 $\beta$  possa contribuir para a total ativação de *PIT1* (THEILL et al., 1992).

De acordo com Haugen et al. (1993), uma variante de Pit-1, denominada Pit-1T, resulta da adição de 14 aminoácidos ao exon 2, no domínio de transativação. O mRNA e a expressão da proteína está limitada a tireótrofos e linhagens celulares derivadas de tireótrofos. Há evidências de que Pit-1 $\alpha$  e Pit-1T interagem para ativar a transcrição do gene TSH $\beta$ , sendo esta interação, necessária e específica para o promotor do gene TSH $\beta$  (HAUGEN et al., 1994).

Uma outra forma de transcrito, resultante da excisão de uma seqüência correspondente ao exon 4, codificando uma proteína com ausência de 54 aminoácidos do domínio POU<sub>5</sub>, mostrou-se envolvida em interações de DNA de alta afinidade (DAY; DAY, 1994). Em estudos com transferência de genes demonstraram que essa forma alternativa de Pit-1 inibe a atividade promotora do gene *PRL*, sendo possível, segundo os autores, que interfira com interações proteína-proteína, funcionando como um potencial mediador da repressão da expressão do gene *PRL*.

Ensaio de ligação proteína-DNA conduzidos por Yu et al. (2001), mostraram que Pit-1 $\Delta$ 3 de suínos, uma forma alternativa de transcrito *PIT1* resultante da remoção total do exon 3, expressa em



bactérias, não reconheceu as regiões reguladoras dos promotores dos genes GH e PRL de ratos.

Os genes que operam no eixo somatotrófico são importantes para o desenvolvimento e o crescimento de animais, e as evidências apontadas pela literatura reforçam um importante papel da ação da proteína Pit-1 sobre esses genes do eixo somatotrófico.

### **1.7. Seleção assistida por marcadores (MAS)**

Os programas de seleção em gado de corte são freqüentemente baseados em informações fenotípicas do próprio animal e/ou de seus parentes, analisadas por métodos estatísticos para gerar as estimativas de valores genéticos de animais candidatos a reprodutores. Entretanto, o avanço da biologia molecular e o desenvolvimento dos marcadores genéticos vêm permitindo inferir quanto a genótipos afetando caracteres economicamente importantes e assim, complementar os métodos tradicionais de melhoramento genético, através da seleção assistida por marcadores (*MAS-Marker Assisted Selection*), visando a maximização da resposta à seleção.

As aplicações da seleção assistida por marcadores compreendem desde o uso de um marcador ligado para selecionar para uma única característica, ao uso de vários marcadores para selecionar múltiplas características ou para características controladas por mais do que um gene (WALTON; HOLM, 1998).

O uso de MAS é particularmente interessante na seleção de caracteres de baixa herdabilidade, onde os fenótipos não oferecem indicativo seguro da capacidade genética dos animais, como por exemplo, os funcionais, tais como resistência a doenças ou fertilidade. Diversos caracteres de interesse econômico são limitados pelo sexo, como a produção de leite ou os caracteres de fertilidade em fêmeas. Na seleção em gado de leite, por exemplo, os touros são geralmente testados com base nas informações de produção de suas filhas e isso tende a alongar os intervalos médios entre gerações, desfavorecendo o uso da seleção clássica. O MAS pode ainda ser útil, na seleção de caracteres expressos tardiamente na vida do animal, ou na seleção de caracteres de carcaça que não podem ser medidos em animais vivos, como o potencial para deposição de gordura ou a produção de tecidos magros, rendimento e maciez da carne.

O uso de marcadores moleculares em projetos de seleção pode aumentar a eficiência de seleção pois, fornece maior quantidade de informações sobre os valores genéticos, identificadas em estágios iniciais da vida, possibilitando a seleção precoce de animais destinados à reprodução, o que conduz a menores intervalos entre gerações e, conseqüentemente, maiores taxas de ganho genético por unidade de tempo. Além disso, pode favorecer o aumento do diferencial de seleção pela pré seleção entre grande número de candidatos para seleção posterior, levando a melhores respostas à seleção, além de possibilitar a seleção de um maior número de características simultaneamente.

A resposta adicional a partir de MAS é proporcional à variância genética explicada pelo QTL marcador (SPELMAN et al., 1999). Essa resposta adicional pode ser maximizada com o uso de mais do que um único

marcador. Conforme Meuwissen e Goddard (1996), utilizando-se 1 QTL que explique 33% da variância genética conduz a 28% de ganho na resposta, enquanto que a utilização de 3 QTLs explicando coletivamente 47% da variância, conduz a 46% de aumento na resposta à seleção. Boichard et al. (2002) sugerem o uso de diversos QTLs em um programa de MAS, contribuindo com alta fração da variância genética.

A variância genética atribuída a um gene com dois alelos é muito grande quando a frequência alélica está em torno de 50%. Porém, a seleção leva ao aumento da frequência do alelo desejável e isso pode conduzir à redução da variância genética. Assim, a resposta à seleção poderá ser maior se o alelo favorável for inicialmente raro (SPELMAN; GARRICK, 1997) ou no caso da presença de muitos alelos, conforme Spelman e Bovenhuis (1998).

A resposta adicional à seleção devida aos marcadores, declina com as gerações múltiplas de seleção porque a variância do QTL marcador declina conforme a frequência do alelo favorável aumenta em direção à fixação (MEUWISSEN; GODDARD, 1996). A longo prazo, a resposta à seleção realizada pelos métodos convencionais de melhoramento genético também tende a declinar em função da redução na variância do componente aditivo do valor genético.

A disponibilidade de marcadores moleculares pode aumentar a acurácia de seleção, especialmente a idades mais jovens, conduzindo a uma redução do intervalo ótimo entre gerações e um aumento na taxa de ganho genético (GODDARD; HAYES, 2002). Entretanto, conforme os autores, esse benefício adicional depende fundamentalmente de quatro fatores: 1)

Precisão com que são estimados os valores genéticos dos animais; 2) Quantidade de variância explicada pelo marcador QTL, dentro do objetivo da seleção; 3) Acurácia com que os efeitos dos alelos QTL são estimados; e 4) Custo de genotipagem. Embora a proporção da variância explicada pelos marcadores aumenta conforme se aumenta o número de marcadores usados, em função do alto custo de genotipagem, a utilização do número ótimo de marcadores poderá não ser compensado para QTLs de pequenos efeitos.

Os estudos com tecnologia genômica já identificaram grande número de QTLs e suas possíveis vantagens sobre a seleção de animais de interesse econômico. Entretanto, o seu uso imediato em MAS deve ser cauteloso, tendo em vista as evidências, muitas vezes contraditórias, a respeito de seus comportamentos em diferentes populações de animais, gerando dúvidas quanto aos seus verdadeiros efeitos, ou mesmo quanto a estarem ou não segregando nessas populações de animais. Assim, torna-se evidente a necessidade de maior quantidade de pesquisas que permitam máximo poder de detecção e de avaliação dos efeitos desses locos de características quantitativas, antes de usá-los de forma efetiva em melhoramento genético animal.

## 2. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O eixo somatotrófico contém genes envolvidos efetivamente nos processos de crescimento dos tecidos no organismo de animais. Dentre eles, o gene *PIT1*, que codifica a proteína Pit-1, um fator de transcrição pituitário tecido específico.

As evidências da literatura sugerem um papel crítico dessa proteína na ativação e manutenção da expressão de genes responsáveis pela elaboração de fatores influenciando o desenvolvimento de animais, tais como os genes dos hormônios de crescimento e da prolactina, da sub unidade  $\beta$  do hormônio que estimula a tireóide, além de sua ação na ativação do próprio gene *PIT1*.

O gene *PIT1* foi escolhido para a realização desta pesquisa em razão das evidências da ação de seu produto, a proteína Pit-1, sobre a regulação do desenvolvimento em animais e de sua influência sobre caracteres de interesse econômico. Estudos recentes mostraram diferenças genéticas no loco *PIT1* de bovinos associadas com medidas de características de carcaça e com o peso ao nascimento, e em suínos, com características relacionadas ao crescimento e com níveis plasmáticos dos hormônios de crescimento e de prolactina. Efeitos desse gene também foram verificados sobre caracteres relacionados à produção de leite em bovinos.

### 3. OBJETIVO DA PESQUISA

Esta pesquisa teve o propósito de analisar a distribuição do polimorfismo de DNA PIT1-*Hinf*I e investigar seu comportamento em relação a caracteres de interesse econômico em duas populações de animais pertencentes a um rebanho de bovinos de corte da raça Canchim. A hipótese a ser testada é de que esse gene exerça alguma ação sobre a variação de pesos ao nascimento, à desmama e aos 12 meses de idade, bem como sobre os ganhos de peso médios diários do nascimento à desmama e da desmama aos 12 meses de idade.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material

#### 4.1.1. Amostra

Esta pesquisa utilizou amostras de DNA de 509 animais de um rebanho da raça Canchim, nascidos entre os anos de 1998 e 2000 e mantidos em regime de pastagem com suplementação mineral, pertencentes à Embrapa Pecuária Sudeste, situada em São Carlos-SP.

Os animais compõem duas populações distintas, uma tradicional com 232 animais distribuídos em 17 famílias, com média de 14 filhos por progênie, e uma outra, desenvolvida mais recentemente, com 277 animais distribuídos em 11 famílias, com média de 25 filhos cada. A população tradicional, ou grupo genético 1 (GG1), é constituída por animais Canchim com média de 5/8 do genoma da raça européia Charolês e 3/8 de raças zebuínas, dentre elas as raças Guzerá, Nelore e Indubrasil (ALENCAR, 1988). Essa população foi formada a partir de 1953 e vem sendo mantida como um rebanho fechado e sob pressão de seleção, porém, submetida a um rigoroso controle com o objetivo de se evitarem os acasalamentos endogâmicos. A população mais nova, ou grupo genético 2 (GG2), teve o início de seu desenvolvimento em 1984, com a obtenção de fêmeas resultantes de cruzamentos Canchim X Nelore. Essas fêmeas, acasaladas com touros da raça Charolês, resultaram em animais que, quando acasalados entre si, originaram o grupo genético GG2. Em 1993, nasceram os primeiros animais da nova linhagem (BARBOSA, 2000), com média de 21/32 do genoma de Charolês e 11/32 de Nelore. Os animais utilizados nos cruzamentos para a

formação desta população resultaram de intensa seleção e melhoramento genético ao longo desses anos.

As amostras de DNA pertenciam ao banco de DNA do laboratório de Biotecnologia Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, tendo sido obtidas pela extração do DNA de leucócitos, utilizando-se o método descrito por Regitano (2001).

Os caracteres fenotípicos considerados nas análises foram os pesos ao nascimento (PN), à desmama (PD) e aos 12 meses de idade (P12), e os ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (GMND) e da desmama aos 12 meses de idade (GMD12), fornecidos pelo programa de melhoramento genético da raça Canchim da Embrapa Pecuária Sudeste.

#### 4.1.2. Marcador molecular

O marcador molecular empregado neste estudo foi o polimorfismo *PIT1* *HinfI* do tipo PCR-RFLP. O gene *PIT1* foi mapeado no cromossomo 1 dos bovinos (MOODY et al., 1995). A Figura 4 refere-se ao mapa de ligação do cromossomo 1 de bovinos (Arkdb) e mostra a posição relativa do marcador *PIT1*, também conhecido como POU1F1.

A região do gene *PIT1* referente a esse polimorfismo envolve um fragmento de 1301 pares de bases (pb), incluindo parte do exon 5, o intron 5 e parte do exon 6 do gene *PIT1* (Figura 5) (DIERKES et al., 1998).



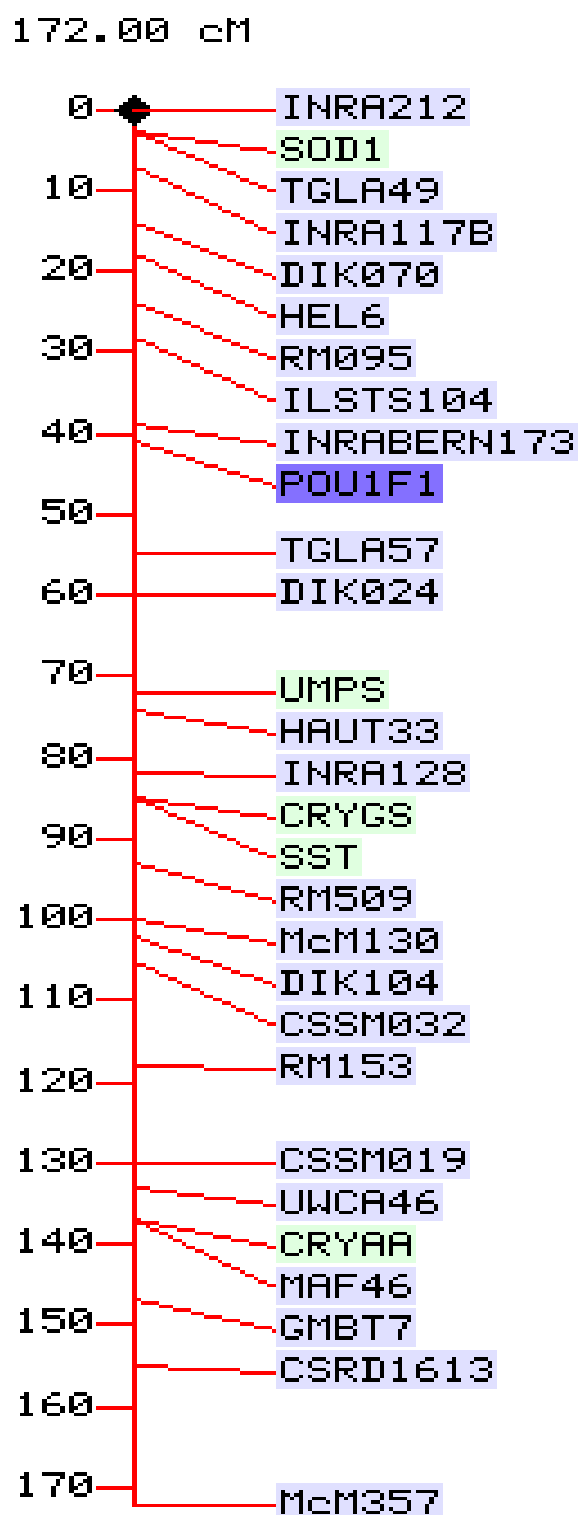


Figura 4. Mapa de ligação do cromossomo 1 de bovinos mostrando a posição relativa do loco marcador *PIT1* (POU1F1) (Arkdb). A extremidade superior do cromossomo corresponde ao centrômero.

1	caatgagaaa	gttggtgcaa	atgaaagaaa	aaggaaacgg	agaacaacaa	aagctttgaa	tcaggtatac	ttaagagtta	gtggagaaga
	aaatgatatt	ttacaaatgg	aatgaacatt	atagtttcaa	atagtttcaa	tataacataa	aaatgaatag	agccaattga	gaaaataggt
181	gaaaaagcac	aacattcaat	aaattacttc	tgagaaacag	tgagaaacag	aaaatttgat	ggaaaaatat	gtattgtttg	attcaagaac
	agttttgctc	tgcaagtttt	ggataaaaca	gaagctgtac	aatcacagct	aaaaagaatg	actgtttcta	ctgtgtcata	atgtgttgat
361	ttatgtttag	acataaatct	tgctccggga	aagagcccat	ggactgtagc	ctacaggttc	ctctgtccat	gggattttcc	aggcaagaat
	aatggagtgg	gttgccatth	ccttctccag	gagatcttcc	cgaccagggg	attgaaccgg	gatctcctac	attgtaggca	gatgctttac
541	catctgagcc	acaaggggaag	tcacctatct	atattatthc	aaattaacaa	aactggtcac	tagtattthta	gttgctthaa	gthcaaaatg
	acttctagca	thtcaagcca	gattgttcat	ttatctthth	gtagthtccg	tgaggctcat	ggaggaattg	ctaatataca	ggtthtgtht
721	tggttggtta	gthgtacact	aaacatctca	ataacctgag	thctggggga	catttagaaa	tgcatacaga	attatthtct	tctcagtaag
	tcagtgccct	cttgtggcag	aaagtggata	aacaatgtcg	gggttccctc	cttaatthct	tcctgtgact	ctggtaaaag	gagcctacat
901	gagacaagca	tctaaatgth	tctaaatgth	tcacatthtat	tattgttgaa	aagctthgaa	ggtgththca	gcgtctthtag	gthtccthth
	tacgtthaatg	thtagtactaa	tatthtaggaa	atgtaaccta	acttgatthth	gatgggccta	aacctcatc	tccctctth	cctgccaact
1081	ccccacctcc	cagtattgct	gctaaagacg	ccctggagag	acactthgga	gaacagaata	tgagggthtg	gththgtaac	cgaaggcaga
	ctgaagaact	aaacctggag	aaagaagtgg	tgagggthtg	gththgtaac	cgaaggcaga	gagaaaaacg	ggtgaagaca	agcctgaatc
1201	tgagggthtg	gththgtaac	cgaaggcaga	gagaaaaacg	ggtgaagaca	agcctgaatc	agagththatt	tactatthtct	aaggagcatc
	tcgaatgcag	a							

Figura 5. Seqüência de bases nitrogenadas da região analisada do gene *PIT1* (Dierkes et al., 1998).



Os *primers* utilizados, descritos por Moody et al. (1995), foram:

*PIT1 Forward*: 5' -CAATGAGAAAGTTGGTGC-3'

*PIT1 Reverse*: 5' -TCTGCATTCGAGATGCTC-3'.

### 4.1.3. Reagentes

As enzimas *Hinf*I e a *Taq* polimerase bem como os reagentes utilizados nas reações de amplificação e de restrição do fragmento de DNA foram das marcas Gibco e Amersham-Pharmacia. Os oligonucleotídeos foram sintetizados pela Gibco BRL.

## 4.2. Métodos

### 4.2.1. Identificação dos genótipos de *PIT1*

#### 4.2.1.1. Amplificação do DNA

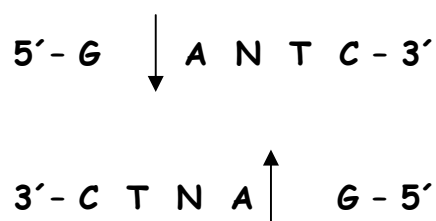
Os *primers* foram utilizados numa reação em cadeia da polimerase (PCR) para amplificar um fragmento genômico do gene *PIT1* de bovino em um volume de reação de 25  $\mu$ l, contendo 50 ng de DNA genômico, 0,4  $\mu$ M de cada *primer*, 200  $\mu$ M de cada dNTP, 0,5 unidades de *Taq* polimerase, Tampão de PCR (KCl 50 mM; MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM; Tris-HCl 10 mM pH 8,3) e BSA (soro albumina bovina) 0,01%, em um equipamento termociclador modelo GeneAmp PCR System 2400 (Applied Biosystems).

A reação de amplificação constituiu-se de uma desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, um ciclo com três diferentes temperaturas, 94°C por dois minutos para desnaturação do DNA, 55°C por um minuto para hibridação dos *primers* e 72°C por dois minutos para a extensão das moléculas, seguido de 29 repetições de um ciclo constituído por três níveis de temperaturas, 94°C por 1 minuto para desnaturação do DNA, 55°C por 1 minuto para hibridação dos *primers* e 72°C por 1 minuto e 20 segundos para a extensão. A reação foi concluída com extensão final dos produtos de PCR a 72°C por 9 minutos seguido pelo resfriamento a 4°C. Em cada bloco de amplificações foi utilizado um controle negativo (sem DNA) para confirmar ausência de contaminação dos componentes da reação.

#### 4.2.1.2. Restrição dos produtos amplificados por PCR

Os produtos de PCR foram tratados com a enzima de restrição *HinfI* e incubados a 37°C por 4 horas em equipamento Thermomixer 5436 (Eppendorf). O volume final da reação foi de 13 µl, constituindo-se de 10mM de Tris acetato (pH 7,5), 10 mM acetato de magnésio, 50 mM acetato de potássio, *HinfI* (0,1 unidades) e 10 µl de DNA amplificado.

A seqüência de bases nitrogenadas reconhecida pela enzima de restrição *HinfI* pode ser observada a seguir:



Após o tratamento com a enzima de restrição, os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose a 3% corado com 0,45 µg/ml de brometo de etídio. Os fragmentos foram visualizados e fotografados sob luz ultravioleta. Para a análise do tamanho dos fragmentos foi utilizado o padrão de tamanho de DNA dupla fita  $\phi$ X174/*Hae*III.

#### **4.2.2. Análises estatísticas dos dados**

##### **4.2.2.1. Estimativas de parâmetros populacionais**

As frequências alélicas e genóticas de *PIT1* foram estimadas em cada grupo genético. As frequências alélicas foram determinadas na população por contagem direta, sendo dadas pela razão entre o número de cada alelo detectado na população e o número de cromossomos analisados. Foi utilizado o teste de qui-quadrado (SNEDECOR; COCHRAN, 1967) para comparação de suas proporções nos dois grupos genéticos (*GG1* e *GG2*). As frequências genóticas em cada grupo genético foram calculadas por contagem dos diferentes genótipos, e foram dadas pela razão entre o número de indivíduos observados em cada classe de genótipos e o número total de indivíduos na população.

Os desvios das frequências observadas em relação às esperadas para o equilíbrio de Hardy-Weinberg, foram analisados pelo teste exato de probabilidade, sendo a hipótese nula ( $H_0$ ), baseada na união aleatória de gametas, conforme Guo e Thompson (1992). O software utilizado para o cálculo de *P* foi o *Genepop* versão 3.1b (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

#### 4.2.2.2. Estimativa do efeito de *PIT1*

O efeito do gene candidato *PIT1* foi analisado utilizando-se os registros de valores para os caracteres pesos ao nascimento (PN), à desmama (PD) e aos 12 meses de idade (P12), e os ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (GMND) e da desmama aos 12 meses de idade (GMD12). Os valores de PD e P12 foram padronizados para 240 ( $P_{240}$ ) e 365 ( $P_{365}$ ) dias de idade, respectivamente, conforme as fórmulas a seguir:

$$P_{240} = [(PDO - PN/IDD) 240] + PN$$

e

$$P_{365} = [(P12 - PDO/I12 - IDD) (365 - IDD)] + PDO$$

em que

$P_{240}$  = peso padronizado para 240 dias de idade

$PDO$  = peso observado à desmama

$PN$  = peso observado ao nascimento

$IDD$  = idade em dias à desmama

$P_{365}$  = peso padronizado aos 365 dias de idade

$P12$  = peso observado aos 12 meses de idade

$I12$  = idade em dias, observada aos 12 meses de idade

Antes das análises, os dados referentes a PN, P<sub>240</sub> e P<sub>365</sub> foram investigados quanto à distribuição normal por meio do teste de Shapiro-Wilk, segundo procedimento *univariate* (SAS, 2000). A estatística de Shapiro-Wilk (W) permite verificar se a verdadeira distribuição  $F_0(y)$  da amostra de valores  $y_i$  ( $i = 1, 2, \dots, n$ ) concorda com a distribuição normal  $F(y)$ , segundo a hipótese:

$$H_0: F_0(y) = F(y)$$

contra

$$H_a: F_0(y) \neq F(y)$$

A estatística  $W$  é maior do que zero e menor ou igual a um ( $0 < W \leq 1$ ), sendo que à medida em que os valores de  $W$  aproximam-se de zero, aumenta-se a probabilidade de que os dados não sejam provenientes de uma amostra com distribuição normal, rejeitando-se a hipótese  $H_0$ .

Os dados foram também analisados quanto à homogeneidade das variâncias usando-se o teste de Levene, conforme procedimento *GLM* (SAS, 2000).

As médias dos valores fenotípicos dos animais atribuídas a cada classe genotípica foram comparadas por meio de análise de variância pelo método dos quadrados mínimos, usando o procedimento *GLM* (SAS, 2000). O modelo linear utilizado foi:



$$Y_{ijkl} = \mu + GG_i + GF_j + GP_k + GG*PIT1_l + e_{ijkl}$$

em que

$Y_{ijkl}$  = valor fenotípico do indivíduo para o caráter

$\mu$  = média geral da população

$GG_i$  = efeito do  $i^{\text{ésimo}}$  grupo genético

$GF_j$  = efeito do  $j^{\text{ésimo}}$  grupo de efeitos fixos (grupo de contemporâneos, sexo e idade da mãe como efeito linear e quadrático)

$GP_k$  = efeito fixo do  $k^{\text{ésimo}}$  genótipo do gene candidato *PIT1*

$GG*PIT1_l$  = efeito de interação entre grupo genético e genótipos de *PIT1*

$e_{ijkl}$  = efeito aleatório do resíduo

O efeito de touro não foi incluído no modelo matemático pelo fato de os touros estarem separados em dois grupos genéticos distintos, o que acabou por não permitir distinguir entre os efeitos de touro e de grupo genético. Além disso, o reduzido número de filhos dentro de algumas famílias não foi considerado adequado para esse tipo de análise.

Havendo efeitos significativos de *PIT1*, as diferenças entre os valores das médias dos três genótipos no loco *PIT1* foram testadas por meio do teste estatístico de Scheffé (CHEW, 1976). Testou-se, também, pelo teste F, o contraste entre as médias dos dois homozigotos e a média dos heterozigotos, o qual permitiu investigar o tipo de ação gênica nesse loco.

#### 4.2.2.3. Média do efeito de substituição de alelos

A média da população em função das frequências alélicas, o efeito de cada alelo e a média do efeito de substituição de alelos, com relação ao loco *PIT1*, foram estimadas por metodologia descrita por Falconer e Mackay (1996) e apresentada a seguir:

$$M = a(p - q) + 2pqd$$

em que

**M** = média fenotípica da população em função das frequências alélicas

**a** = diferença entre cada homozigoto e o ponto médio entre os dois homozigotos

**d** = diferença entre o valor do heterozigoto e o ponto médio entre os dois homozigotos

**p** e **q** = frequências dos alelos *HinfI* (-) e *HinfI* (+), respectivamente.

A diferença entre a média da população e a média ponderada de cada homozigoto com o heterozigoto fornece a média do efeito de cada alelo. Assim, as médias dos efeitos dos alelos *HinfI* (-) e *HinfI* (+) foram estimadas, respectivamente, por:

$$\alpha_1 = q [a + d(q - p)]$$

e

$$\alpha_2 = - p [a + d(q - p)]$$

sendo a média do efeito de substituição de alelos ( $\alpha$ ) igual a:

$$\alpha = a + d(q - p)$$

#### 4.2.2.4. Desvios atribuídos à dominância

Os desvios causados pela dominância foram investigados conforme metodologia apresentada por Falconer e Mackay (1996). Segundo os autores, os desvios causados pela dominância resultam da propriedade de dominância entre os alelos de um loco e dependem da frequência alélica na população. A diferença entre o valor genotípico (**G**) e o valor genético (**A**) de um genótipo particular é conhecido como desvio em virtude da dominância (**D**) de modo que:

$$\mathbf{G} = \mathbf{A} + \mathbf{D}$$

Os desvios atribuídos à dominância representam o efeito não explicado pelos efeitos dos dois alelos tomados separadamente. Na ausência de dominância os valores genéticos são coincidentes com os valores genotípicos. O desvio da dominância pode ser expresso em termos dos valores genotípicos designados arbitrariamente como "a" e "d", subtraindo-se do valor genotípico, o valor genético.

Definido, em termos de média de efeitos, conforme os autores, o valor genético de um indivíduo é igual à soma das médias de efeitos dos genes que ele possui, sendo a soma feita para o par de alelos de cada loco e para todos os locos, sendo convenientemente expressos em forma de desvio da média da população. Os valores genotípicos devem ser estimados em termos de desvio da média da população, pois assim como os valores genéticos e os valores devidos à dominância, também são propriedade dos indivíduos e da população.

A Tabela 1 apresenta as expressões usadas para as estimativas dos valores genéticos, dos valores genotípicos e dos desvios de dominância, estimados como desvios da média da população (FALCONER; MACKAY, 1996):

Tabela 1. Métodos para estimar os valores genéticos, genotípicos e de desvios de dominância, como desvios da média da população (FALCONER; MACKAY, 1996).

Genótipos <i>PIT1</i>	Valor Genético	Valor Genotípico	Desvios devidos à Dominância
<i>HinfI</i> (-/-)	$2q\alpha$	$2q(\alpha - qd)$	$- 2q^2d$
<i>HinfI</i> (+/-)	$(q - p)\alpha$	$(q - p)\alpha + 2pqd$	$2pqd$
<i>HinfI</i> (+/+)	$- 2p\alpha$	$- 2p(\alpha + pd)$	$- 2p^2d$

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Polimorfismo *PIT1*

A identificação dos alelos *Hinf*I (+) e *Hinf*I (-) no loco *PIT1* foi realizada utilizando-se um fragmento de 1301 pares de bases (pb), amplificado pela técnica de PCR e em seguida digerido com a enzima de restrição *Hinf*I. As amostras de DNA foram amplificadas conforme condições preconizadas pela literatura (MOODY et al., 1995).

A reação de amplificação do fragmento do gene *PIT1* resultou em um único produto de 1,301 kb. O tratamento do produto de amplificação com a enzima de restrição *Hinf*I revelou os alelos *Hinf*I (+) com fragmentos com comprimentos de 260, 617, 379 e 45 pares de bases (pb) e *Hinf*I (-) com fragmentos de 260, 617 e 424 pb. A Figura 7 mostra o padrão de bandas dos três genótipos do polimorfismo do gene *PIT1*, após eletroforese em gel de agarose a 3% corado com brometo de etídio.

Os homozigotos para o alelo *Hinf*I (+) mostraram três bandas. A primeira, na posição de 617 pb, a segunda, correspondente ao fragmento de 379 pb e a terceira, referente ao fragmento de 260 pb. O fragmento de 45 pb não foi visualizado no gel. Os homozigotos para o alelo *Hinf*I (-) mostraram três bandas, de 617, 424 e de 260 pb, e os heterozigotos apresentaram um padrão de bandas caracterizado pela presença dos dois alelos.

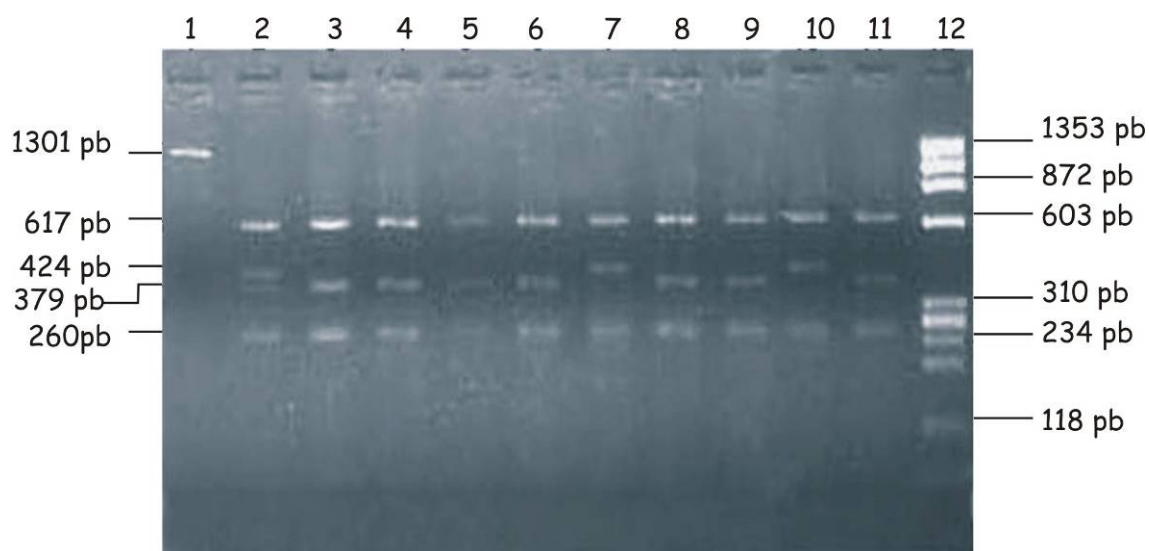


Figura 7. Padrão de fragmentos do produto amplificado do gene *PIT1* digerido com a enzima *HinfI*. Coluna 1: produto de PCR não digerido; Colunas 2, 4 e 7: produtos de PCR digeridos mostrando os genótipos *HinfI* (+/-), (+/+) e (-/-), respectivamente; Coluna 12: marcador de tamanho de fragmentos de DNA, o  $\phi$ X174/*HaeIII*.

## 5.2. Estatística descritiva da amostra

### 5.2.1. Parâmetros populacionais do gene *PIT1*

As frequências alélicas no loco *PIT1*, foram estimadas em cada grupo genético (*GG1* e *GG2*) e seus valores estão mostrados na Tabela 2. A variação das diferenças, observada entre os dois grupos genéticos foi analisada pelo teste de independência para tabelas de contingência. O valor de qui-quadrado obtido mostrou que as proporções dos alelos *HinfI* (+) e *HinfI* (-), encontradas nos dois grupos genéticos foram significativamente distintas ( $p < 0,01$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores das frequências alélicas e respectivos erros padrões no loco *PIT1*, estimados nos grupos genéticos *GG1* e *GG2*.

Alelos	<i>GG1</i>	<i>GG2</i>
	Frequência $\pm$ Erro padrão	Frequência $\pm$ Erro padrão
<i>HinfI</i> (+)	0,87 $\pm$ 0,0156	0,73 $\pm$ 0,0188
<i>HinfI</i> (-)	0,13 $\pm$ 0,0156	0,27 $\pm$ 0,0188
$\chi^2$ 1 GL	29,539**	$p < 0,01$

p = probabilidade associada ao teste de  $\chi^2$  de independência.

As distribuições das frequências alélicas nesse loco nas populações *GG1* e *GG2* estão ilustradas na Figura 8.

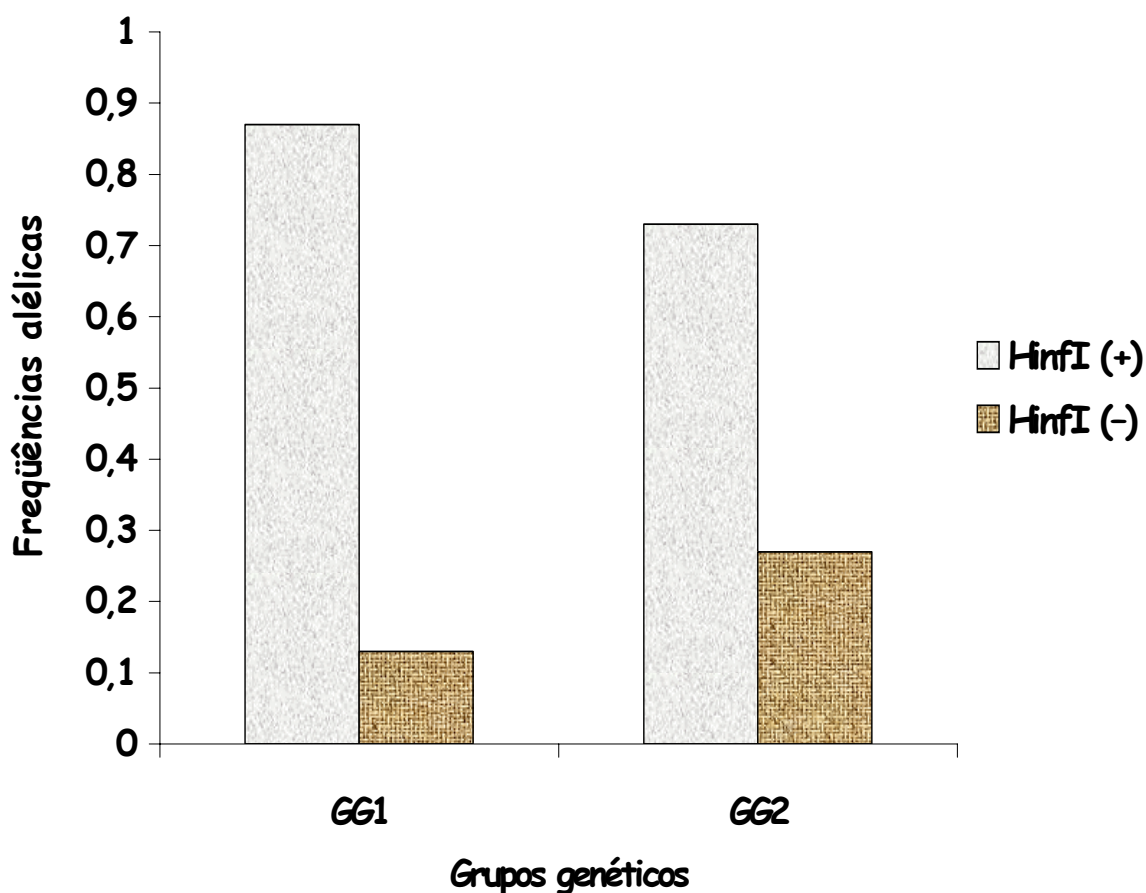


Figura 8. Distribuição de freqüências dos alelos *HinfI* (+) e *HinfI* (-) referentes ao gene *PIT1*, em cada grupo genético (GG1 e GG2).

O alelo *HinfI* (-) foi o menos freqüente nos dois grupos genéticos. Menores freqüências desse alelo em relação ao alelo *HinfI* (+) também foram verificadas em outras populações de bovinos. Moody et al. (1995) verificaram média de freqüência de 0,25 para o alelo *HinfI* (-) em animais de diferentes raças européias de bovinos e Mattos (2000) encontrou freqüências para este alelo de 0,05 e 0,19 em touros da raça Gir e em touros mestiços leiteiros *Bos indicus* X *Bos taurus*, respectivamente.

A freqüência do alelo *HinfI* (-) foi maior em GG2 do que em GG1, o que pode ter decorrido de diferenças genéticas nas populações



bases desses dois grupos de animais. O grupo genético *GG2*, a linhagem mais nova, teve seu início utilizando-se animais geneticamente superiores quanto a caracteres de produção, tanto da raça Nelore quanto das raças Charolês e Canchim, o que pode ter conduzido à diferenciação genética entre as populações fundadoras de *GG1* e de *GG2*. A deriva genética pode ser considerada outro fator a contribuir para a diferenciação dessas duas populações, principalmente se considerarmos o pequeno número de indivíduos *HinfI* (-/-) observado em *GG1*.

As distribuições das frequências dos genótipos em cada grupo genético nesse loco podem ser vistas na Figura 9. Os valores de probabilidade para o teste de equilíbrio indicaram desequilíbrio de Hardy-Weinberg em *GG1* ( $p < 0,05$ ) (Tabela 3), com deficiência de heterozigotos.

Tabela 3. Valores de probabilidade obtidos para o teste exato de equilíbrio de Hardy-Weinberg, verificados em *GG1* e em *GG2*.

Teste exato de Hardy-Weinberg	
Grupo genético	Valor de probabilidade
<i>GG1</i>	0,0186*
<i>GG2</i>	0,6511
Teste de Hardy-Weinberg para $H_1$ = Deficiência de heterozigotos	
<i>GG1</i>	0,0322*
<i>GG2</i>	0,3748

\* $p < 0,05$ .

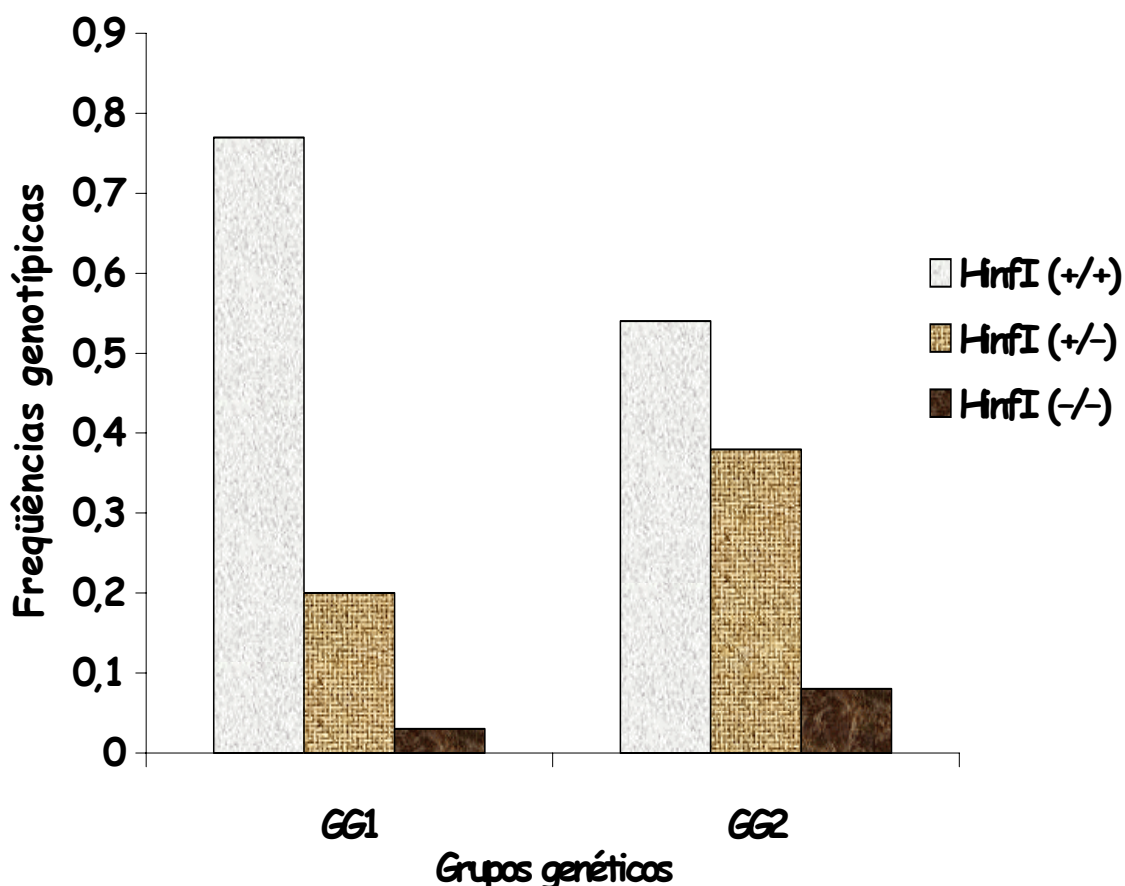


Figura 9. Distribuição de freqüências dos genótipos *HinfI* (+/+), (+/-) e (-/-) referentes ao gene *PIT1*, em cada grupo genético (GG1 e GG2).

O valor encontrado para o número observado de animais com o genótipo *HinfI* (-/-), em GG1, foi quase duas vezes o valor para o número esperado, considerando-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg, sugerindo um excesso de homozigotos *HinfI* (-/-) nessa população. Esse desequilíbrio em GG1 pode ter resultado de deriva genética, como função da pequena quantidade de indivíduos *HinfI* (-/-) nessa população, ou pode ter decorrido de pressão de seleção sobre outro loco com alguma vantagem seletiva, ligado ao *PIT1*, conduzindo a um aumento desses homozigotos.

Esse excesso de homozigotos *HinfI* (-/-) poderia ser explicado por efeitos de pressão de seleção, já que o rebanho vem sendo selecionado para caracteres de produção há vários anos, entretanto, vale ressaltar que as fêmeas na linhagem tradicional desse rebanho, até 1977, eram eliminadas do rebanho por motivo de doença ou acidente, exclusivamente.

Embora a linhagem tradicional constitua um grupo fechado, há esforços para se evitarem os acasalamentos endogâmicos, e manter o grau de endogamia em níveis mínimos, o que possibilitaria afastar efeito de endogamia a alterar o equilíbrio de Hardy-Weinberg em *GG1*. Regitano (1996) estimou o coeficiente de endogamia com base em sete marcadores moleculares e encontrou valor médio de 0,020 para a linhagem tradicional. Conforme Alencar\*, a estimativa do coeficiente médio de endogamia nessa linhagem de animais, utilizando-se informações de pedigree, é igual a 0,024.

Em *GG2*, no entanto, o equilíbrio de Hardy-Weinberg foi verificado, sugerindo a não existência de efeitos de seleção sobre esse polimorfismo nessa população, embora esses animais venham sofrendo pressão de seleção para caracteres de produção desde a formação desta nova linhagem. Considerando-se que na espécie bovina é grande o intervalo de tempo decorrido entre uma geração e outra, e que essa população tenha sido formada mais recentemente, é possível que os efeitos de seleção aplicada sobre os caracteres de produção ainda não tenham sido notados.

A diferença de comportamento observada nos dois grupos genéticos, quanto ao equilíbrio de Hardy-Weinberg, poderia ser decorrente de diferenças genéticas nas populações bases desses grupos de animais.

---

\* Alencar, M. M., pela Embrapa Pecuária Sudeste, 2004. Comunicação pessoal.

## 5.2.2. Efeitos do polimorfismo *PIT1* sobre a produção

### 5.2.2.1. Comparações de médias

Os dados na população total, referentes a pesos ao nascimento, pesos padronizados à desmama e aos 12 meses de idade, foram testados quanto à hipótese de que representem uma população com distribuição normal, por meio da estatística de Shapiro-Wilk ( $W$ ). Os valores encontrados para a estatística de Shapiro-Wilk ( $W$ ) bem como os respectivos valores de probabilidade ( $Pr < W$ ) estão mostrados na Tabela 4. Os valores de  $W$  encontrados foram 0,9964 para PN, 0,9967 para  $P_{240}$  e 0,9956 para  $P_{365}$ , e significaram a rejeição da hipótese de não normalidade ao nível de significância de 5%.

Os testes de Levene para avaliar a homogeneidade das variâncias mostraram valores de  $F$  iguais a 0,67 para PN, 0,54 para  $P_{240}$  e 0,77 para  $P_{365}$  (Tabela 5), indicando que as variâncias verificadas para os diferentes tratamentos não diferiram entre si ao nível de significância de 5%. A distribuição normal dos dados, assim como a homogeneidade das variâncias entre os tratamentos constituem-se condições fundamentais para o uso da análise de variância bem como dos demais procedimentos utilizados nesta pesquisa. A Figura 10 mostra as curvas das distribuições normais dos dados na população total, referentes aos pesos ao nascimento e aos pesos padronizados à desmama e aos 12 meses de idade.

Tabela 4. Valores da estatística de Shapiro-Wilk (W) com seus respectivos valores de probabilidade, referentes aos caracteres PN, P<sub>240</sub> e P<sub>365</sub>.

Caráter	Estatística de Shapiro-Wilk (W)	Pr < W
PN	0,9964	0,3265 <sup>ns</sup>
P <sub>240</sub>	0,9967	0,4659 <sup>ns</sup>
P <sub>365</sub>	0,9956	0,2726 <sup>ns</sup>

Nível de significância ( $\alpha$ ) = 5%.

Tabela 5. Valores de F com seus respectivos valores de probabilidade para o teste de Levene, referentes aos caracteres PN, P<sub>240</sub> e P<sub>365</sub>.

Caráter	Valores de F	Pr > F
PN	0,67	0,5128 <sup>ns</sup>
P <sub>240</sub>	0,54	0,5839 <sup>ns</sup>
P <sub>365</sub>	0,77	0,4658 <sup>ns</sup>

Nível de significância ( $\alpha$ ) = 5%.

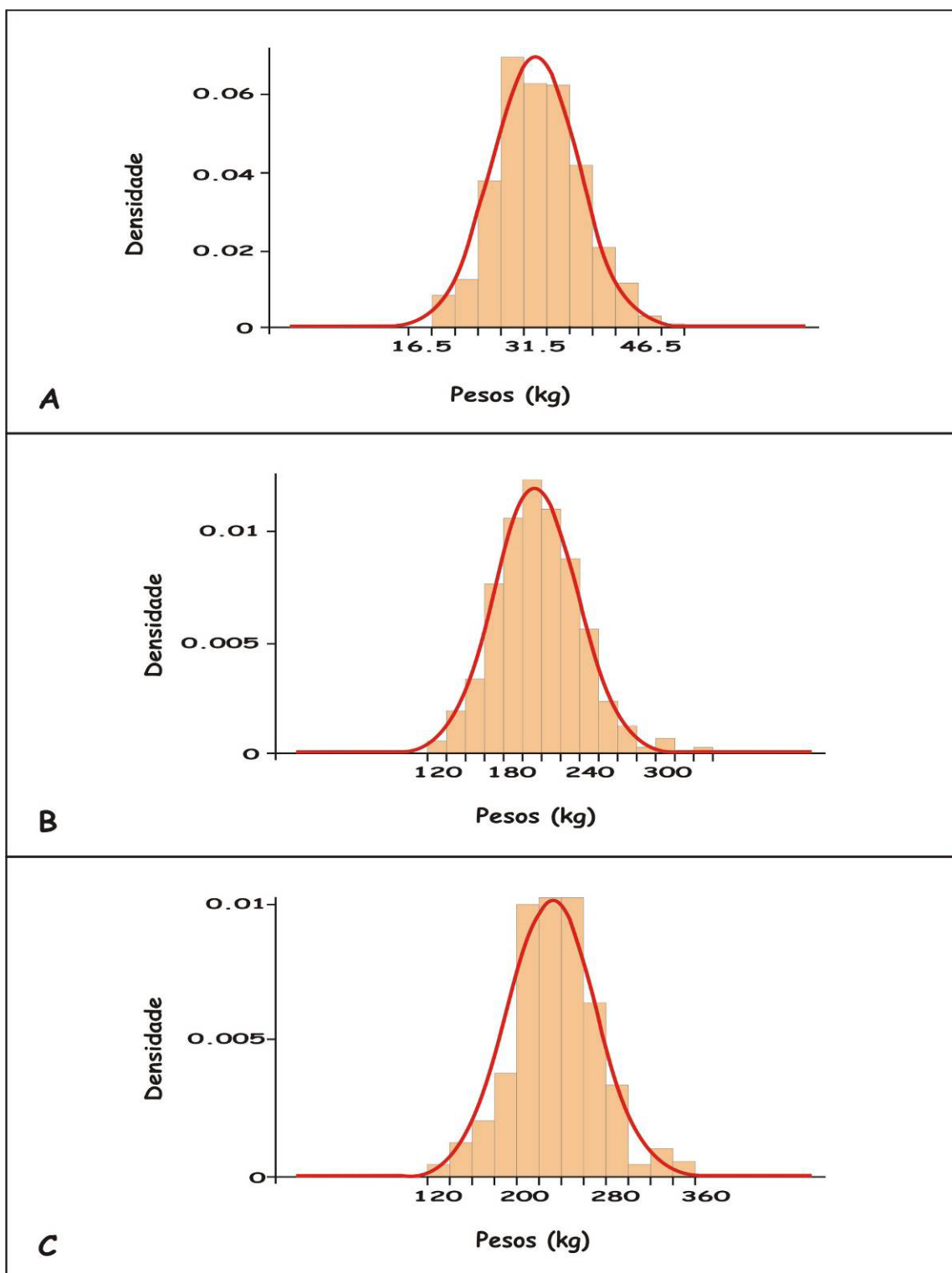


Figura 10. Curvas de distribuição normal apresentadas pelos valores de pesos na população total (kg). A. Pesos ao nascimento; B. Pesos padronizados à desmama; C. Pesos padronizados aos 12 meses de idade.

Os dados foram investigados quanto à presença de interação entre grupo genético (*GG*) e genótipos de *PITI* (*GG\*PITI*). Os resultados das análises variância de dados da população total para *PN*, *P<sub>240</sub>*, *P<sub>365</sub>*, *GMND* e *GMD12* estão resumidos na Tabela 6. Esses resultados revelaram efeitos significativos ( $p < 0,05$ ) de interação entre grupo genético e genótipos de *PITI* para os caracteres *P<sub>240</sub>*, *GMND* e *GMD12*, evidenciando comportamento diferente de *PITI* nos dois grupos genéticos. Com relação aos caracteres *PN* e *P<sub>365</sub>*, não foram verificados efeitos significativos de interação entre grupo genético e o efeito principal de *PITI*.

O mês de nascimento constitui-se um fator importante a considerar na avaliação do desempenho dos animais, cujos efeitos decorrem de flutuações, principalmente na quantidade e na qualidade das pastagens. Da mesma forma, o ano de nascimento pode gerar variações nos valores de produção, resultantes de diferenças relativas ao manejo em geral e às condições climáticas e suas implicações sobre o desempenho dos animais, observadas de um ano para o outro. O sexo é outro fator importante capaz de gerar variações nos valores de produção dos animais, tendo em vista que animais do sexo masculino tendem a ser mais pesados do que as fêmeas. No que se refere à idade da vaca, sabe-se que novilhas tendem a parir bezerros mais leves e que podem ser menos habilidosas para criá-los, do que vacas com idades intermediárias. Assim, esse fator pode exercer sua influência principalmente sobre o período que se estende do nascimento à desmama. Em função dos reconhecidos efeitos de todos esses fatores sobre os pesos dos animais, os mesmos foram considerados nas análises para que os dados fossem corrigidos para seus efeitos.

Tabela 6. Resumo das análises de variância para pesos ao nascimento (PN), pesos padronizados à desmama (P<sub>240</sub>) e aos 12 meses de idade (P<sub>365</sub>), ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (GMND) e da desmama aos 12 meses de idade (GMD12), obtidos da população total, para os efeitos de *PI T1*.

Fontes de Variação	Graus de Liberdade	Quadrados Médios				
		PN (N = 509)	P <sub>240</sub> (N = 478)	P <sub>365</sub> (N = 430)	GMND (N = 478)	GMD12 (N = 430)
Grupo Genético	1	68,20 <sup>ns</sup>	9673,44 <sup>**</sup>	8516,69 <sup>**</sup>	0,1388 <sup>**</sup>	0,0075 <sup>ns</sup>
Grupo de Contemporâneos	11	108,46 <sup>**</sup>	13301,45 <sup>**</sup>	21640,95 <sup>**</sup>	0,2171 <sup>**</sup>	0,3335 <sup>**</sup>
Sexo	1	548,41 <sup>**</sup>	33666,38 <sup>**</sup>	11155,76 <sup>**</sup>	0,4525 <sup>**</sup>	0,0960 <sup>*</sup>
Idade da Vaca (linear)	1	215,11 <sup>**</sup>	14073,46 <sup>**</sup>	3021,81 <sup>ns</sup>	0,1955 <sup>**</sup>	0,1013 <sup>*</sup>
Idade da Vaca (quadrático)	1	140,82 <sup>*</sup>	10648,49 <sup>**</sup>	2022,92 <sup>ns</sup>	0,1505 <sup>**</sup>	0,0680 <sup>ns</sup>
<i>PI T1</i>	2	16,94 <sup>ns</sup>	1026,31 <sup>ns</sup>	761,44 <sup>ns</sup>	0,0145 <sup>ns</sup>	0,0105 <sup>ns</sup>
GG* <i>PI T1</i>	2	36,54 <sup>ns</sup>	2438,06 <sup>*</sup>	1372,85 <sup>ns</sup>	0,0325 <sup>*</sup>	0,0677 <sup>*</sup>
R <sup>2</sup>		0,15	0,40	0,40	0,41	0,33

\* p < 0,05; \*\* p < 0,01.

<sup>ns</sup> não significativo



Os resultados das análises de variância mostraram a presença de efeitos significativos de grupo genético para os caracteres  $P_{240}$ ,  $P_{365}$  e  $GMND$  ( $p < 0,01$ ). Efeitos importantes de grupo de contemporâneos foram observados para os caracteres  $PN$ ,  $P_{240}$ ,  $P_{365}$ ,  $GMND$  e  $GMD12$  ( $p < 0,01$ ). Os efeitos de sexo foram significativos ( $p < 0,01$ ) para  $PN$ ,  $P_{240}$ ,  $P_{365}$  e  $GMND$ , e para  $GMD12$  ( $p < 0,05$ ). A idade da vaca exerceu efeitos linear e quadrático sobre  $P_{240}$  e  $GMND$  ( $p < 0,01$ ). Efeitos significativos de idade da vaca, como efeito linear ( $p < 0,01$ ) e quadrático ( $p < 0,05$ ) foram verificados sobre o caráter  $PN$  e linear ( $p < 0,05$ ) sobre  $GMD12$ .

As médias de  $P_{240}$  e  $GMND$ , estimadas pelo método dos quadrados mínimos para os genótipos de  $PIT1$  em  $GG1$  e  $GG2$ , estão mostradas na Tabela 7. Observa-se que as médias dos três genótipos referentes a  $P_{240}$  e  $GMND$  em  $GG1$ , não diferiram entre si, assim como não foram diferentes as médias de cada um dos três genótipos nos dois grupos genéticos.

Em  $GG2$ , as médias dos genótipos (-/-) foram significativamente distintas ( $p < 0,05$ ) das médias dos genótipos (+/-) e (+/+), indicando superioridade deste genótipo em relação aos demais, para  $P_{240}$  e  $GMND$ , nessa população. Não pode ser afastada, no entanto, a hipótese de que essa superioridade possa ser atribuída a efeito de touro, o qual não foi considerado no modelo matemático pelo fato de os touros estarem separados em duas populações distintas, não permitindo distinguir entre os efeitos de touro e de grupo genético. Além disso, o reduzido número de filhos dentro de algumas famílias não foi considerado adequado para a inclusão do efeito de touro no modelo.

Tabela 7. Número de observações (N) e médias estimadas do peso padronizado à desmama (P<sub>240</sub>) (kg) e do ganho médio diário de peso do nascimento à desmama (GMND) (kg) e respectivos erros padrões entre parêntesis, dos genótipos de *PI T1*, em GG1 e GG2.

Genótipos de <i>PI T1</i>	Pesos (Kg)				Ganho médio diário de peso (Kg)			
	N	Média em GG1	N	Média em GG2	N	Média em GG1	N	Média em GG2
<i>Hinf1</i> (+/+)	169	212,87 (2,34) <sup>a</sup>	142	217,46 (2,73) <sup>a</sup>	169	0,7450 (0,0090) <sup>a</sup>	142	0,7638 (0,0105) <sup>a</sup>
<i>Hinf1</i> (+/-)	42	209,72 (4,27) <sup>a</sup>	96	217,57 (3,14) <sup>a</sup>	42	0,7342 (0,0164) <sup>a</sup>	96	0,7653 (0,0121) <sup>a</sup>
<i>Hinf1</i> (-/-)	8	206,37 (9,64) <sup>a</sup>	21	241,83 (5,99) <sup>b</sup>	8	0,7231 (0,0371) <sup>a</sup>	21	0,8546 (0,0231) <sup>b</sup>

Médias com letras diferentes na coluna diferem estatisticamente ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Scheffé.

Antes de se considerar a discussão a seguir, referente à diferença de comportamento do gene *PIT1* nas duas populações analisadas, é fundamental considerar alguns fatores que podem interferir na autenticidade dessa diferença. Há a possibilidade de que a ocorrência de um pequeno número de animais com genótipo *HinfI* (-/-) em GG1, possa ter contribuído para que o efeito de *PIT1* não tenha sido detectado nesse grupo de animais, pela simples ação do acaso. Nesse contexto, não se deve negligenciar que em GG2, embora o número de famílias tenha sido menor, essas famílias foram mais numerosas do que em GG1, o que poderia proporcionar melhores estimativas quanto ao efeito de *PIT1* no grupo GG2.

As médias dos quadrados mínimos estimadas para o caráter  $P_{240}$ , considerando o efeito de interação entre grupo genético e genótipos de *PIT1*, apresentadas na Tabela 7, estão ilustradas na Figura 11. Os indivíduos homocigotos para o alelo *HinfI* (-) foram superiores em relação aos homocigotos (+/+) e aos heterocigotos (+/-), em 24,37 e 24,26 kg, respectivamente, para  $P_{240}$  ( $p < 0,05$ ). Esses resultados sugerem o genótipo *HinfI* (-/-) como o mais interessante do ponto de vista produtivo, podendo estar relacionado a maiores pesos à desmama sem um concomitante aumento em pesos ao nascimento.

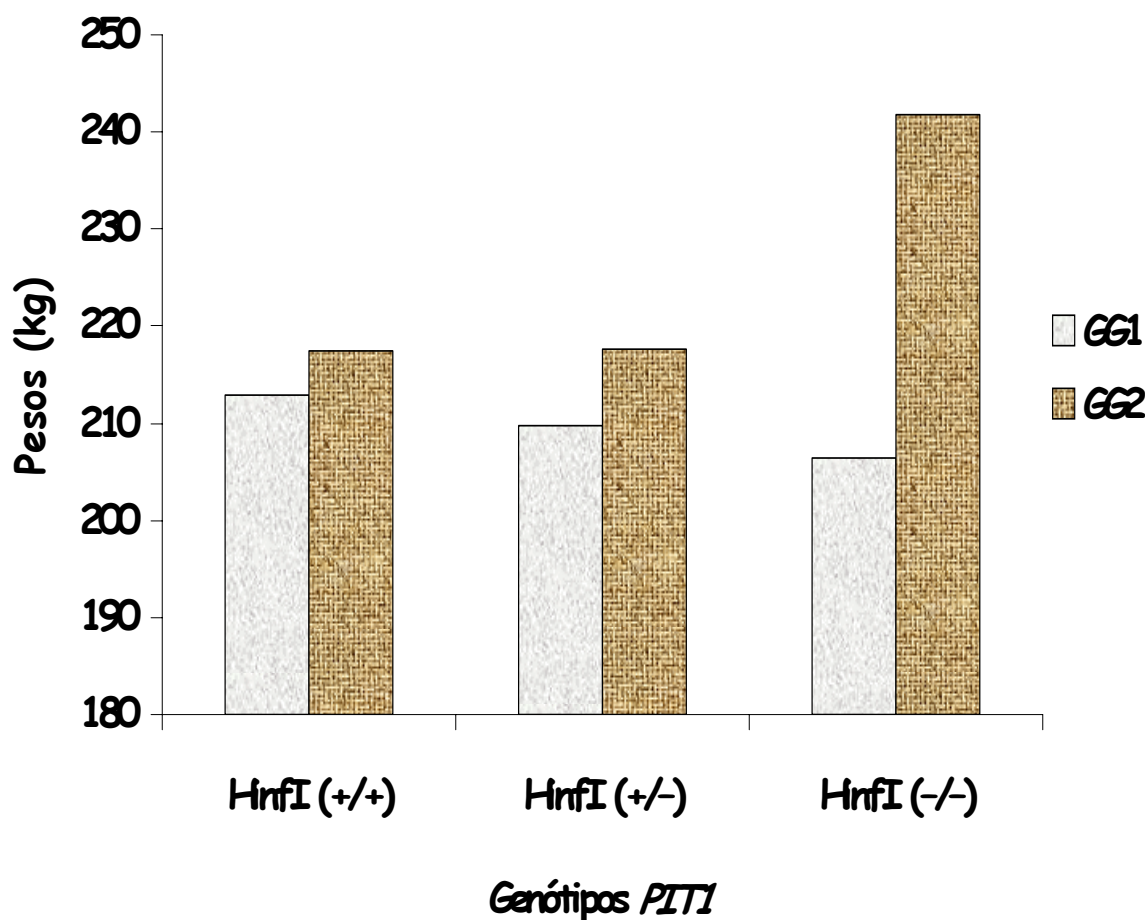


Figura 11. Efeito de interação entre grupo genético e *PIT1*, observado para o caráter peso padronizado à desmama ( $P_{240}$ ) (kg) em animais da raça Canchim.

A Figura 12 mostra o efeito de interação entre grupo genético e genótipos de *PIT1* com relação ao caráter *GMND*. As médias dos quadrados mínimos estimadas evidenciam que os animais homocigotos *HinfI* (-/-) foram mais eficientes para ganhar peso do nascimento à desmama do que os homocigotos *HinfI* (+/+) e os heterocigotos *HinfI* (+/-). Esta maior eficiência traduz-se por 90,8 g/dia e 89,3 g/dia, respectivamente.

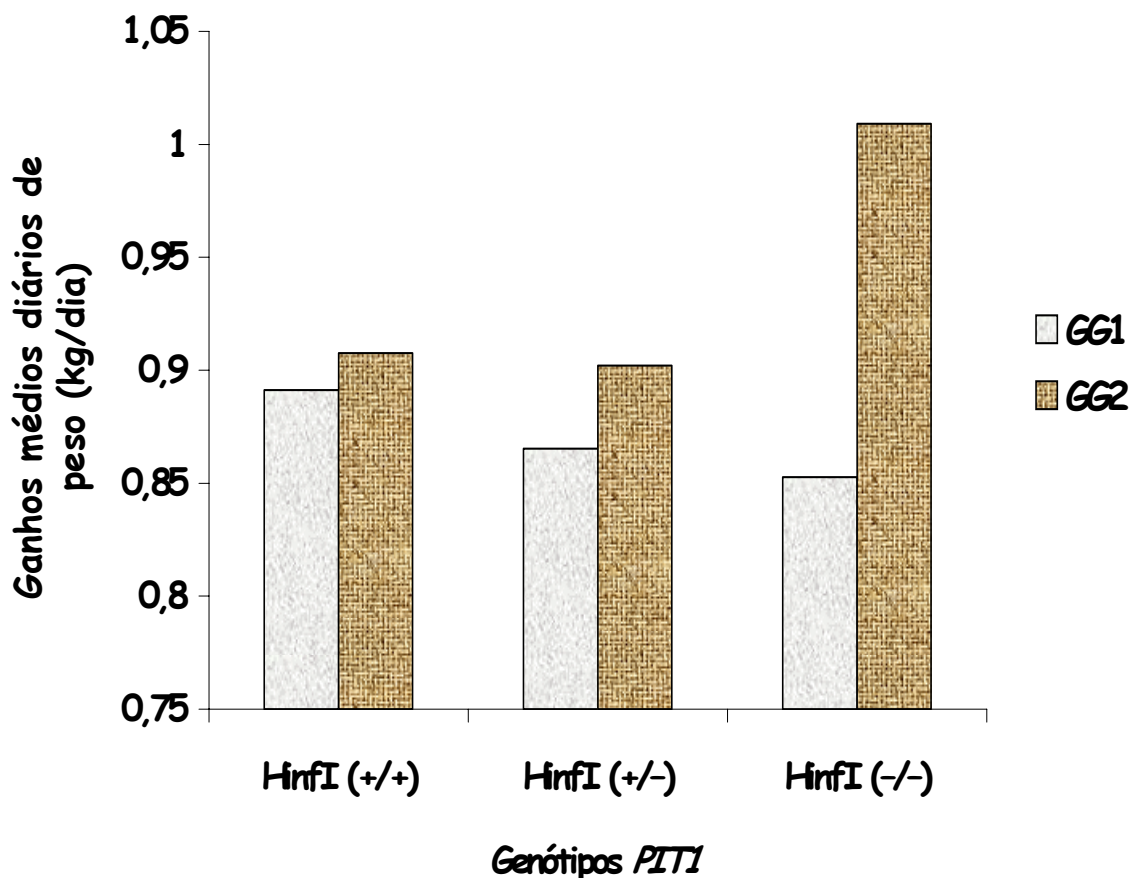


Figura 12. Efeito de interação entre grupo genético e genótipos de *PIT1*, observado para o caráter ganho médio diário de peso do nascimento à desmama (GMND) (kg/dia) em animais da raça Canchim.

As médias de GMD12, estimadas pelo método dos quadrados mínimos para os genótipos de *PIT1* em cada grupo genético, não diferiram entre si. O efeito da interação observado nesse caso, foi atribuído a uma diferença significativa ( $p < 0,10$ ) entre as médias do genótipo *HinfI* (+/+) nos dois grupos genéticos.

As diferenças observadas entre os valores referentes aos genótipos homocigotos (+/+) e aos heterocigotos (+/-), para os caracteres

$P_{240}$  e  $GMND$  não se mostraram significativas, sugerindo que o alelo *HinfI* (+) expressa-se de modo dominante em relação ao alelo *HinfI* (-).

O efeito favorável de genótipos *HinfI* (-/-) na linhagem  $GG2$ , observado para  $P_{240}$  e também para  $GMND$  justifica-se, na medida em que os pesos à desmama ajustados para a idade padrão e ganho médio diário de peso na fase de aleitamento durante o desenvolvimento de animais, são caracteres que apresentam alta correlação genética, sendo, segundo Packer (1977), equivalentes para a avaliação do valor genético dos indivíduos. Entretanto, os ganhos médios diários podem refletir mais convenientemente o desenvolvimento de animais, já que mesmo que animais alcancem o mesmo peso à desmama, deve-se considerar que os mesmos possam ter pesos diferentes ao nascimento. Assim, esses resultados podem significar evidências importantes quanto ao efeito de *PIT1* sobre a produção em gado de corte.

As evidências quanto aos efeitos de *PIT1* sobre os caracteres  $P_{240}$  e  $GMND$ , entretanto, merecem ser analisados com certa prudência, tendo em vista que nessa fase, o desenvolvimento dos bezerros sofre grande influência dos valores genéticos de suas mães, quanto à habilidade materna, principalmente no que se refere, dentre outros, à capacidade leiteira dessas mães, cujos efeitos não foram considerados nas análises.

O fato de não se ter observado algum efeito desse polimorfismo sobre os caracteres  $P_{365}$  e  $GMD12$  nesta pesquisa, pode limitar o seu uso em seleção assistida por marcadores, tendo em vista que qualquer efeito favorável deva estar presente não somente à desmama, mas sim durante todo o desenvolvimento, culminando com melhor performance também por

ocasião do abate. Assim, antes de se sugerir o uso de *PIT1* como um recurso auxiliar à seleção, torna-se fundamental a realização de investigações quanto ao efeito do polimorfismo em período que decorre do pós desmame até o momento da terminação dos animais. Além disso, seria interessante o desenvolvimento de novas pesquisas, envolvendo número maior de marcadores para que se possam avaliar possíveis interações entre diferentes marcadores e suas associações com os caracteres de interesse econômico em gado de corte.

Os efeitos de *PIT1* sobre os caracteres de produção  $P_{240}$  e *GMND* encontrados na linhagem *GG2*, podem ser o resultado de sua influência sobre a expressão dos genes do hormônio de crescimento e da prolactina, igualmente importantes na fase do crescimento que se estende do nascimento até à desmama. Nesse período, os animais sofrem grande influência dos efeitos maternos, traduzidos, principalmente, pela capacidade de produção de leite das mães. Estudos conduzidos em suínos por Sun et al. (1998) mostraram níveis similares de hormônio de crescimento pituitário e mRNA Pit-1 $\beta$ , indicando influência direta de mRNA Pit-1 $\beta$  sobre a expressão do gene do hormônio de crescimento. Sun et al. (2002) encontraram efeito significativo de genótipos *PIT1* sobre os níveis plasmáticos do hormônio de crescimento e de prolactina em suínos, sugerindo associação de genótipos *PIT1* com a expressão dos genes desses dois hormônios pituitários.

Nesse contexto, é importante notar que o sítio polimórfico deste marcador encontra-se no exon 6 do gene *PIT1*, como pode ser observado através da Figura 5, portanto, em região codificadora do genoma

para o fator de transcrição pituitário Pit-1, o que poderia reforçar a hipótese de um efeito direto de *PIT1* sobre o peso à desmama ou ao ganho médio diário do nascimento à desmama, cujas evidências foram verificadas na população GG2. Por outro lado, a mutação que caracteriza o polimorfismo é neutra, não altera o aminoácido na seqüência da cadeia polipeptídica da proteína Pit-1. Nesse caso, as diferenças nas médias dos diferentes genótipos de *PIT1* poderiam estar relacionados com outras mutações funcionais em desequilíbrio de ligação nesse mesmo gene, associadas ao polimorfismo *HinfI*-*PIT1*, ou poderiam ser o resultado do efeito de outro loco, de característica quantitativa (QTL), estreitamente ligado a *PIT1*, segregando nesse grupo de animais.

Os diferentes resultados verificados em GG1 e GG2, quanto à magnitude dos efeitos de *PIT1*, reforçam a sugestão da presença de um loco de característica quantitativa (QTL) ligado ao gene *PIT1* em desequilíbrio de ligação apenas em GG2 e não o efeito direto desse gene sobre a produção. Essa hipótese de efeito de QTL ligado a *PIT1*, no entanto, não pôde ser testada em razão de restrições encontradas, quanto ao tamanho da amostra.

Poderia ser proposto, ainda, para explicar essas evidências, uma forma diferente de processamento do transcrito primário do gene *PIT1* em função de outras mutações neste mesmo gene, presente apenas em GG2, resultando em produto que se liga mais efetivamente à região promotora dos genes do hormônio de crescimento (GH) e/ou da prolactina (PRL), ou à regiões específicas de outros genes sobre os quais o gene *PIT1* pode exercer sua ação reguladora.



O mRNA PIT1 produz proteínas que se ligam a elementos reguladores do desenvolvimento de organismos. Entretanto, formas resultantes de *splicing* alternativos podem produzir proteínas com propriedades alteradas. A proteína Pit-1 $\beta$ , por exemplo, em sistemas de culturas celulares de camundongos, ativa o promotor GH mais fortemente do que ativa os promotores dos genes PRL (KONZAK; MOORE, 1992), *PIT1* (THEILL et al., 1992) ou TSH $\beta$  (HAUGEN et al., 1994), porém, é uma proteína instável (KONZAK; MOORE, 1992). Resultados obtidos por Sun et al. (2002) quanto à ativação do gene GH em suínos, mostraram maior influência de Pit-1 $\alpha$  mRNA sobre a expressão de GH do que Pit-1 $\beta$ . Haugen et al. (1993) sugeriram, ainda, que as proteínas Pit-1 $\alpha$  e Pit-1T interagem para ativar a transcrição TSH $\beta$ , sendo esta interação, necessária e específica para o promotor TSH $\beta$  (HAUGEN et al., 1994).

Outras formas alternativas de Pit-1 tais como a Pit-1 $\Delta$ 4, observada em suínos, aparece nos momentos de maior expressão de PRL (DAY; DAY, 1994) e a forma Pit-1 $\Delta$ 3 (YU et al., 2001), expressa em bactérias, foi incapaz de reconhecer os elementos promotores de GH, enquanto que Pit-1 $\alpha$ , foi ativa. Conforme os autores, o PIT1cDNA e a seqüência de sua proteína deduzida em suínos apresenta aproximadamente de 90 a 95% de identidade, respectivamente, com o PIT1cDNA e proteína de humanos, bovinos, ovelhas e roedores.

Outro modelo para explicar o comportamento diferente de *PIT1* nos dois grupos genéticos avaliados, poderia ser a presença de interação entre os efeitos do gene *PIT1* e os efeitos de outras seqüências reguladoras do desenvolvimento de animais. De acordo com Pomp (1994),

locos de características quantitativas influenciando uma característica em uma população podem apresentar efeito diferente, ou nenhum efeito, em outra população, em virtude de interações epistáticas entre o QTL e o genoma. Assim, poderia ser proposto que seqüências reguladoras específicas do desenvolvimento, permitindo uma ligação mais efetiva dos produtos gênicos de *PIT1* relativos ao alelo *HinfI* (-), estariam presentes nos animais da linhagem *GG2* e ausentes, ou em menor quantidade, nos animais em *GG1*.

A diferença de comportamento de *PIT1* sobre o desempenho de animais, verificada em *GG1* e *GG2*, evidencia que antes de se propor o uso desse polimorfismo em seleção assistida por marcadores, deve-se testá-lo nas diferentes populações, para que seu uso nos projetos de melhoramento genético possa resultar em respostas mais efetivas à seleção, quanto aos caracteres economicamente importantes em gado de corte.

#### **5.2.2.2. Médias dos efeitos de substituição de alelos**

Os pais transmitem os seus alelos e não os seus genótipos para a geração seguinte. Torna-se necessário, então, uma medida que se refira a alelos e não a genótipos, possibilitando designar um valor associado com os alelos possuídos pelo indivíduo e transmitidos a seus descendentes. Essa medida é designada como a média do efeito de um alelo na população (FALCONER; MACKAY, 1996). Conforme esses autores, a média do efeito de um alelo é o desvio em relação à média da população de indivíduos que receberam aquele alelo de um parental, considerando o alelo recebido do outro parental, vindo ao acaso da população.

A estimativa da média da população em função das frequências alélicas para  $P_{240}$  em GG2, foi igual a 219,27 kg. As estimativas das médias dos efeitos dos alelos *HinfI* (-) e *HinfI* (+) foram iguais a 4,84 e -1,79 kg, respectivamente, sendo a média do efeito de substituição alélica igual a 6,63 kg. Esse valor verificado para a média do efeito de *HinfI* (-) indicou um efeito positivo desse alelo sobre o caráter  $P_{240}$  em GG2, sendo o mesmo responsável por 2,21% da média do valor de  $P_{240}$  nesse grupo de animais. Os resultados sugerem que a substituição de um alelo *HinfI* (+) por um alelo *HinfI* (-) pode conduzir a um aumento de 6,63 kg para  $P_{240}$  nessa população de animais.

Com relação ao caráter GMND, a estimativa da média da população como função de frequências alélicas em GG2, foi igual a 771 g/dia, sendo as estimativas das médias dos efeitos dos alelos *HinfI* (-) e *HinfI* (+) iguais a 18,42 e -6,81 g/dia, respectivamente, e a média do efeito de substituição alélica igual a 25,23 g/dia.

A média do efeito de *HinfI* (-) mostrou-se favorável sobre o caráter GMND, podendo estar contribuindo com 2,38% da média do valor de GMND nesse grupo de animais. Os resultados evidenciam ainda, que a substituição de um alelo *HinfI* (+) por um alelo *HinfI* (-) poderá conduzir a um aumento de 25,23 g/dia para GMND nessa população.

### 5.2.2.3. Desvios devidos à dominância

Os desvios causados pelos efeitos de dominância podem ser definidos como a diferença entre o valor genotípico e o valor genético,

estimados como desvios da média da população (FALCONER; MACKAY, 1996). A Tabela 8 apresenta os valores genotípicos, os valores genéticos e os valores devidos aos desvios causados pelos efeitos de dominância, para os caracteres  $P_{240}$  e GMND, com relação aos genótipos de *PIT1* em GG2.

Os valores genéticos para  $P_{240}$  de homozigotos *HinfI* (-/-), foram superiores em 6,64 kg em relação aos heterozigotos e em 13,27 kg em relação aos *HinfI* (+/+). Quanto ao caráter GMND, os indivíduos homozigotos *HinfI* (-/-) apresentaram valores genéticos 25,2 e 50,4 g/dia maiores do que os valores dos heterozigotos e dos *HinfI* (+/+), respectivamente. Esses resultados evidenciam que o alelo *HinfI* (-) expressa-se favoravelmente quando presente em homozigose nos genótipos dos animais, podendo ser responsável pela superioridade dos valores fenotípicos de pesos padronizados à desmama e de ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama, verificada nesse grupo de animais.

As Figuras 13 e 14 representam esquematicamente os valores genotípicos, genéticos e dos desvios devidos à dominância para ( $P_{240}$ ) (kg) e para GMND (g/dia), respectivamente, dos genótipos de *PIT1*, estimados como desvios da média da população.

Tabela 8. Valores genotípicos (G), valores genéticos (A) e valores dos desvios devidos à dominância (D), para pesos padronizados à desmama (P<sub>240</sub>) (kg) e para ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama (GMND) (kg), em relação *PI T1*, no grupo genético GG2.

Genótipos de <i>PI T1</i>	P <sub>240</sub>			GMND		
	G	A	D	G	A	D
<i>Hinf1</i> (-/-)	22,55	9,69	12,86	0,0835	0,0368	0,0467
<i>Hinf1</i> (+/-)	-1,70	3,05	-4,75	-0,0057	0,0116	-0,0173
<i>Hinf1</i> (+/+)	-1,82	-3,58	1,75	-0,0072	-0,0136	0,0064

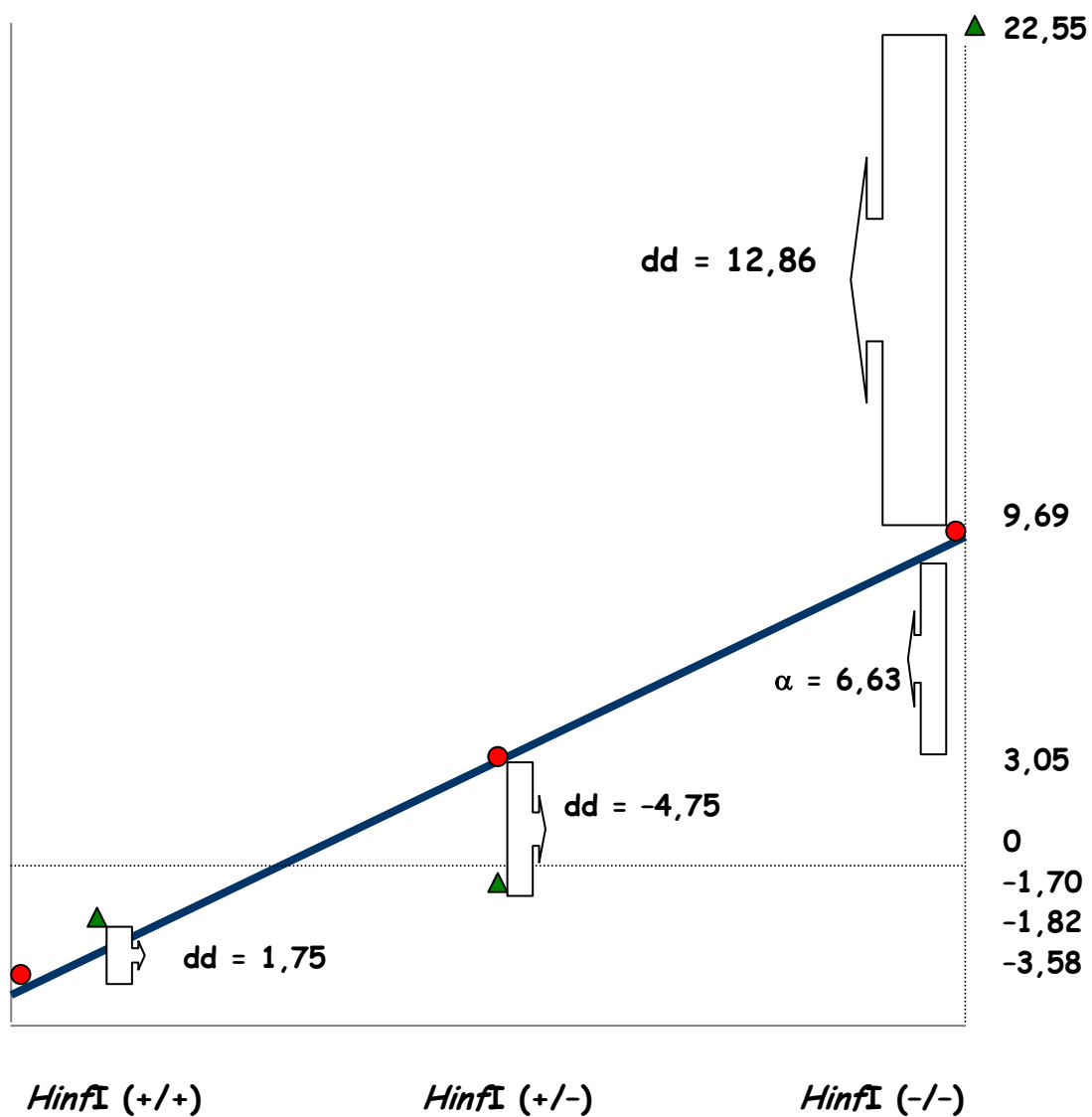


Figura 13. Representação esquemática dos valores genotípicos ( ▲ ), genéticos ( ● ) e de desvios devidos à dominância (dd) (kg) dos genótipos de *PIT1* para  $P_{240}$ , estimados como desvios da média da população.

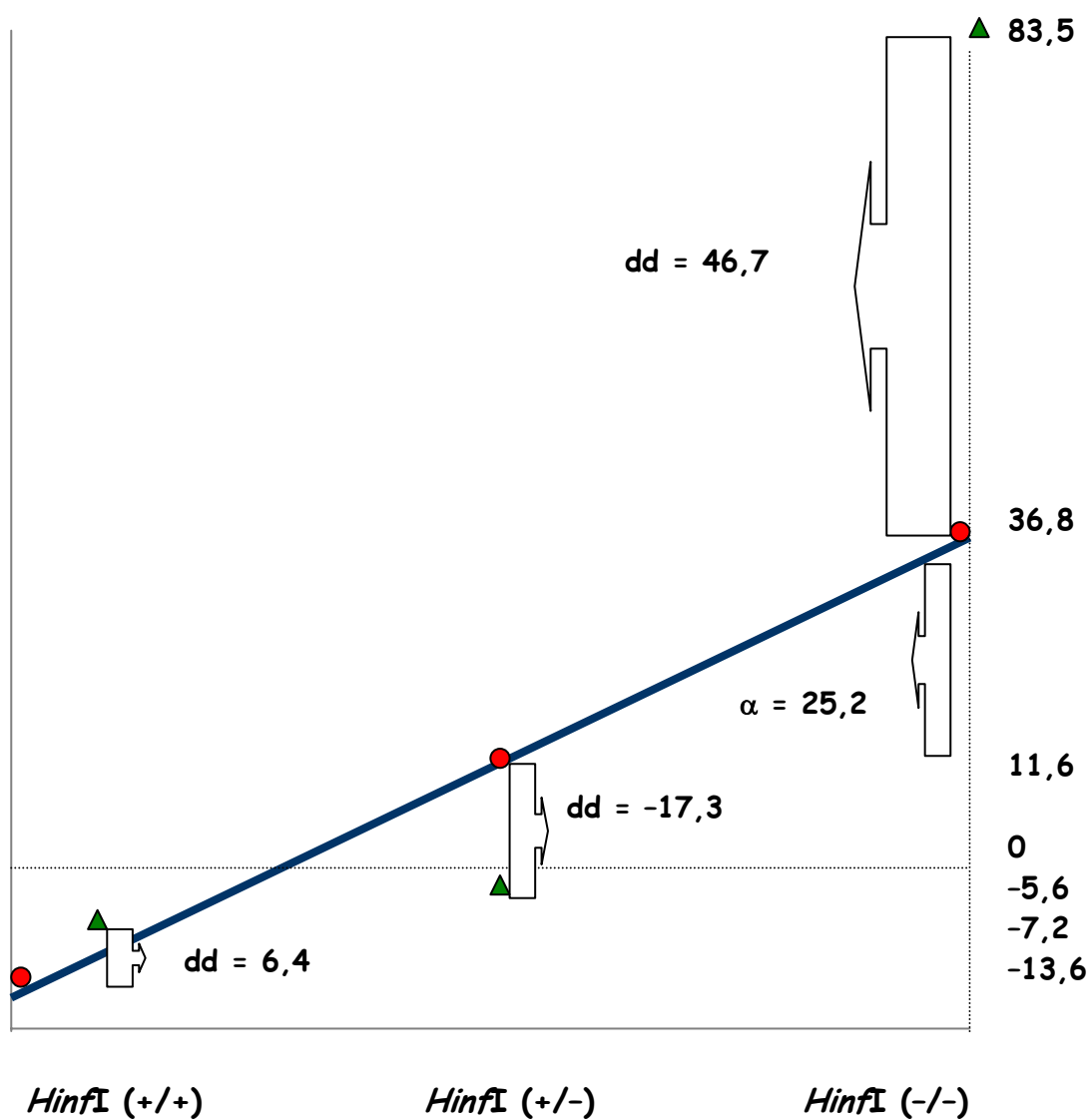


Figura 14. Representação esquemática dos valores genéticos ( ▲ ), genéticos ( ● ) e de desvios devidos à dominância (dd) (g/dia) dos genótipos de *PIT1* para GMND, estimados como desvios da média da população.

As maiores frequências do alelo *Hinf*I (+) e do genótipo (+/+) do gene *PIT1* encontradas nesta pesquisa, a despeito de não apresentarem efeitos positivos sobre a produção, podem sugerir que *PIT1* esteja ligado a um loco com alguma vantagem adaptativa, a uma distância suficiente para gerar recombinação entre eles. Ou, podem refletir a história evolutiva dessa mutação, se consideramos o alelo *Hinf*I (+) como selvagem em que a mutação tenha surgido como um evento raro.

O valor genotípico referente ao genótipo *Hinf*I (-/-), 22,55 kg, mostrou-se superior em relação aos demais genótipos para o caráter ( $P_{240}$ ) em GG2. Parte desse valor é atribuída ao desvio de dominância, cujo valor foi igual a 12,86 kg para este caráter. Da mesma forma, para o caráter GMND, a porção do valor genotípico, 83,5 g/dia, atribuído ao desvio devido à dominância foi igual a 46,7 g/dia. Como pode ser observado, os desvios de dominância mostraram-se mais importantes do que os valores genéticos quanto aos genótipos *Hinf*I (-/-) e *Hinf*I (+/-). Essas evidências implicam em vantagem no uso de seleção, neste caso em favor do alelo *Hinf*I (-), para aumentar pesos à desmama e ganhos médios diários de peso do nascimento à desmama nessa população de animais. Visto que o favorável alelo *Hinf*I (-) é recessivo em relação ao alelo *Hinf*I (+), o uso de cruzamento de animais, visando explorar a heterozigose para aumentar peso à desmama e os ganhos diários de peso do nascimento à desmama, poderá ser desvantajoso. O melhor procedimento seria a seleção com o objetivo de aumentar a homozigose do alelo *Hinf*I (-), nessa população.

Os resultados desta pesquisa, entretanto, devem ser vistos com cautela em razão do pequeno número de animais considerados nas



análises, e da distribuição de genótipos *HinfI* (-/-), principalmente no que se refere ao grupo genético *GG1*. A realização de novos testes nessas populações, levando-se em conta maior número de animais, poderia proporcionar maior confiabilidade às evidências da influência desse polimorfismo sobre a produção dos animais.

Esses testes poderiam ser baseados no delineamento de filhos proposto por Weller et al. (1990), onde os filhos de touros heterozigotos teriam os seus genótipos identificados, permitindo investigações quanto a possíveis associações entre os genótipos *PIT1* e as características de produção. Esse delineamento poderá permitir aumentar o poder de detecção do efeito de *PIT1* sobre a produção dos animais. Além disso, essa abordagem poderá permitir a detecção de taxas de recombinação entre esse polimorfismo e outros no mesmo loco ou em outros locos, possibilitando maior estreitamento de sua posição relativa no cromossomo 1 de bovinos.

Novas investigações quanto ao efeito desse polimorfismo em populações de gado de corte, poderiam se basear em análises que possam permitir o estabelecimento de associações entre os genótipos *PIT1* e os níveis plasmáticos dos hormônios de crescimento e de prolactina, ou de outros hormônios igualmente importantes sobre o desenvolvimento dos animais, como por exemplo, os hormônios tireoideanos T3 e T4, sobre os quais *PIT1* pode exercer sua atividade reguladora.

Em um estudo conduzido por Moody et al. (1996) em animais da raça Hereford, a substituição de alelos quanto ao polimorfismo *PIT1*, mostrou efeito significativo sobre o caráter peso ao nascer. Renaville et al. (1997) evidenciaram efeito superior do alelo *HinfI* (-) para a produção de

leite e de proteína em animais da raça Holandês. Mattos (2000) demonstrou a superioridade do genótipo (-/-) do gene *PIT1*, em que o genótipo esteve associado com maior produção de leite, gordura, proteína e quanto à porcentagem de gordura do leite em animais mestiços com aptidão leiteira. A autora constatou efeito de dominância do alelo *HinfI* (+) na população estudada.

A natureza recessiva do alelo *HinfI* (-) sobre a produção, observada nesta pesquisa, pode sugerir que este alelo tenha menor afinidade pela região promotora do gene do hormônio de crescimento ou outros genes do eixo somatotrófico sobre os quais *PIT1* pode exercer sua ação, porém resultaria em um melhor padrão de expressão. Estudos sobre a afinidade das diferentes formas de Pit-1 pelos promotores envolvidos no desenvolvimento de animais poderiam elucidar esta questão.

As evidências mostradas nessa pesquisa encorajam novas investigações quanto aos efeitos desse polimorfismo sobre a produção de bovinos de corte, nas diferentes fases do desenvolvimento dos animais e também quanto à melhor compreensão dos mecanismos genéticos e fisiológicos relacionados ao fator de transcrição pituitário Pit-1, envolvidos nos processos de produção de carne em bovinos.

## 6. CONCLUSÕES

O polimorfismo *HinfI* do gene *PIT1* nesse rebanho caracterizou-se pela presença de duas formas alélicas, *HinfI* (-) e *HinfI* (+). As estimativas de frequências alélicas mostraram que o alelo *HinfI* (-) foi o menos freqüente nas populações estudadas. A proporção desse alelo, no entanto, foi maior em GG2 do que em GG1, sugerindo diferenças genéticas nas populações bases desses dois grupos de animais.

O alelo *HinfI* (-) comportou-se como recessivo e interessante do ponto de vista zootécnico. Os animais com genótipos *HinfI* (-/-) foram superiores aos *HinfI* (+/+) e aos heterozigotos, quanto ao peso padronizado aos 240 dias de idade ( $P_{240}$ ) e ao ganho de peso médio diário do nascimento à desmama (GMND) na linhagem nova de Canchim (GG2). Essas observações permitem sugerir o uso de *PIT1* em seleção assistida por marcadores nessa população, tendo em vista que a seleção favorecendo o alelo *HinfI* (-) pode conduzir a aumento no peso à desmama sem elevar o peso ao nascimento, condição satisfatória em criação de bovinos de corte. No entanto, a distinta influência desse polimorfismo nas duas populações estudadas evidencia a necessidade de se testarem os efeitos desse marcador em diferentes populações antes de sua utilização na seleção assistida por marcadores.

A diferença de comportamento de *PIT1* observada nos dois grupos genéticos, pode decorrer de diferenças na ação de *PIT1* sobre os genes do hormônio de crescimento e/ou da prolactina, ou de outros genes do eixo somatotrófico sobre os quais *PIT1* pode exercer sua influência. A ação

de um QTL ligado ao gene *PIT1*, segregando apenas no grupo genético GG2, do rebanho estudado também pode ser considerada para explicar esse comportamento distinto nas duas populações. Essas hipóteses merecem ser testadas.

Antes do uso efetivo desse polimorfismo em programas de melhoramento genético, é fundamental que novas investigações sejam conduzidas com o objetivo de se buscarem mais evidências quanto ao estabelecimento de associações entre esse polimorfismo e o desempenho dos animais durante o seu desenvolvimento como um todo, desde os estágios iniciais até a fase de terminação, bem como no que se refere às características de carcaça.

## 7. REFERÊNCIAS

ALENCAR, M. M. **Bovino - Raça Canchim: origem e desenvolvimento.** Brasília: EMBRAPA-DPU, 1988. 102 p.

ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F. Fertilidade de um rebanho Canchim criado em regime exclusivo de pasto. **Rev. Soc. Bras. Zoot.**, v. 10, p. 88-102, 1981.

ANDERSEN, B.; ROSENFELD, M. G. Pit-1 determines cell types during development of the anterior pituitary gland. **J. Biol. Chem.**, v. 269, p. 29335-29338, 1994.

ANDERSON, L. L. et al. Effect of seasonal changes on growth in hypophyseal stalk-transected and sham-operated beef calves. **J. Anim. Sci.**, v. 55 (Suppl. 1), p. 213, 1982.

ARRANZ, J.-J. et al. A QTL affecting milk yield and composition maps to bovine chromosome 20: a confirmation. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 107-115, 1998.

AVISE, J. C. **Molecular markers, natural history and evolution.** New York: Chapman & Hall, 1994. 506 p.

BARBOSA, P. F. Critérios de seleção para a raça Canchim. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 3., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa-CPPSE/São Paulo: ABCCAN, 1997. p. 47-75.

BARBOSA, P. F. O Canchim na embrapa pecuária sudeste. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 4., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: Embrapa-CPPSE/São Paulo: ABCCAN, 2000. p. 55-68.

BARENDSE, W. et al. A medium-density genetic linkage map of the bovine genome. **Mamm. Genome**, v. 8, p. 21-28, 1997.

BODNER, M. et al. The pituitary-specific transcription factor GHF-1 is a homeobox-containing protein. **Cell**, v. 55, p. 505-518, 1988.

BOICHARD, D. et al. Implementation of marker-assisted selection in french dairy cattle. In: THE WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7., 2002, Montpellier. **Anais...** Montpellier: Institut National de la Recherche Agronomique, 2002. CD-ROM.

BREIER, B. H. Regulation of protein and energy metabolism by the somatotropic axis. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 209-218, 1999.

BREIER, B. H. et al. Physiological responses to somatotropin in the ruminant. **J. Dairy Sci.**, v. 74 (Suppl. 2), p. 20-34, 1991.

BOVENHUIS, H.; van ARENDONK, J. A. M.; KORVER, S. Associations between milk protein polymorphisms and milk production traits. **J. Dairy Sci**, v. 75, p. 2549-2559, 1992.

BUONOMO, F. C.; BAILE, C. A. The neurophysiological regulation of growth hormone secretion. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 7, p. 435-450, 1990.

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 560-569, 2000.

CHEN, R. et al. Autoregulation of pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. **Nature**, v. 346, p. 583-586, 1990.

CHEW, V. Comparing treatment means: a compendium. **HortScience**, v. 11, p. 348-357, 1976.

CHURCHILL, G. A.; DOERGE, R. W. Mapping quantitative trait loci in experimental populations. In: PATERSON, A. H. (Ed). **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press, 1998. p. 31-41.

DAVIS, S. K.; TAYLOR, J. F. Interval mapping and positional cloning of growth ETLs in cattle. **Anim. Genet.**, v. 29 (Suppl. 1), p. 1-7, 1998.

DAY, R. N. et al. Both pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. **Mol. Endocrinol.**, v. 4, p. 1964-1971, 1990.

DAY, R. N.; DAY, K. H. An alternatively spliced form of Pit-1 represses prolactin gene expression. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 374-381, 1994.

DIERKES, B. et al. Partial genomic structure of the bovine *PIT1* gene and characterization of a *HinfI* transition polymorphism in exon 6. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 405, 1998.

ELSHOLTZ, H. P. et al. Phylogenetic specificity of prolactin gene expression with conservation of Pit-1 function. **Mol. Endocrinol.**, v. 6, p. 515-522, 1992.

EPPARD, P. J. et al. Comparison of the galactopoietic response to pituitary-derived and recombinant-derived variants of bovine growth hormone. **J. Endocrinol.**, v. 132, p. 47-56, 1992.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4<sup>th</sup> ed. Edinburg: Longman, 1996. 464 p.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 2. ed. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1996. 219 p.

FLETCHER, T. P. et al. Constitutive growth hormone secretion in sheep after hypothalamopituitary disconnection and the direct *in vivo* pituitary effect of growth hormone releasing peptide 6. **Neuroendocrinology**, v. 60, p. 76-86, 1994.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Optimisation of response using molecular data. In: THE WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 7., 2002, Montpellier. **Anais...** Montpellier: Institut National de la Recherche Agronomique, 2002. CD-ROM.

GORDON, D. F. et al. Analysis of Pit-1 in regulating mouse TSH $\beta$  promoter activity in thyrotropes. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 96, p. 75-84, 1993.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometris**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HAUGEN, B. R. et al. A thyrotrope-specific variant of Pit-1 transactivates the thyrotropin  $\beta$  promoter. **J. Biol. Chem.**, v. 268, p. 20818-20824, 1993.

HAUGEN, B. R. et al. The combination of Pit-1 and Pit-1T have a synergistic stimulatory effect on the thyrotropin  $\beta$ -subunit promoter but not the growth hormone or prolactin promoters. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 1574-1582, 1994.

HETZEL, D. J. S. et al. Quantitative trait loci (QTL) with differential effects on pre- and post-natal growth in *Bos indicus* X *Bos taurus* cattle. **Anim. Genet.**, v. 29 (Suppl. 1), p. 60-74, 1998.

INGRAHAM, H. A. et al. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. **Cell**, v. 55, p. 519-529, 1988.

INGRAHAM, H. A. et al. The POU-specific domain of Pit-1 is essential for sequence-specific, high affinity DNA binding and DNA-dependent Pit-1-Pit-1 interactions. **Cell**, v. 61, p. 1021-1033, 1990.

KALM, E. et al. Mapping quantitative trait loci on cattle chromosome 2, 5, 10, 16, 18 and 23. **Anim. Genet.**, v. 29 (Suppl. 1), p. 62, 1998.

KAPPES, S. M. et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Res.**, v. 7, p. 235-249, 1997.

KAPPES, S. M. et al. Initial results of genomic scans for ovulation rate in a cattle population select for increased twinning rate. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 3053-3059, 2000.

KEARSEY, M. J.; POONI, H. S. **The genetical analysis of quantitative traits**. London: Chapman & Hall, 1996. 381p.

KNAPP, S. J.; BRIDGES Jr, W. C.; BIKERS, D. Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps. **Theoret. Appl. Genet.**, v. 79, p. 583-592, 1990.

KONZAK, K. E.; MOORE, D. D. Functional isoforms of Pit-1 generated by alternative messenger RNA splicing. **Mol. Endocrinol.**, v. 6, p. 241-247, 1992.



LASLEY, J. F. **Genetics of livestock improvement**. 3<sup>th</sup>. New Jersey: Prentice Hall, 1978. 490 p.

LI, S. et al. Dwarf locus mutants lacking three pituitary cell types result from mutations in the POU-domain gene Pit-1. **Nature**, v. 347, p. 528-533, 1990.

LIN, C. et al. Pit-1-dependent expression of the receptor for growth hormone releasing factor mediates pituitary cell growth. **Nature**, v. 360, p. 765-768, 1992.

LIN, S-C. et al. Pituitary ontogeny of the snell dwarf mouse reveals pit-1-independent and pit-1-dependent origins of the thyrotrope. **Development**, v. 120, p. 515-522, 1994.

LIPKIN, S. M. et al. Identification of a novel zinc finger protein binding a conserved element critical for Pit-1-dependent growth hormone gene expression. **Genes Dev.**, v. 7, p. 1674-1687, 1993.

LIRA, S. A. et al. Synergistic interactions between Pit-1 and other elements are required for effective somatotroph rat growth hormone gene expression in transgenic mice. **Mol. Endocrinol.**, v. 7, p. 694-701, 1993.

LITT, M.; LUTY, J. A. A hipervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **Am. J. Hum. Genetic.**, v. 44, p. 398-401, 1989.

LIU, B. H. Computacional tools for study of complex traits. In: PATERSON, A. H. (Ed). **Molecular dissection of complex traits**. New York: CRC Press, 1998. p. 43-80.

LUCY, M. C. et al. Variants of somatotropin in cattle: gene frequencies in major dairy breeds and associated milk production. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 10, p. 325-333, 1993.

MACHADO, M. B. B. et al. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genet. Molec. Biol.**, v. 26, p. 259-265, 2003.

McCORMICK, A. et al. Regulation of the pituitary-specific homeobox gene *GHF1* by cell-autonomous and environmental cues. **Nature**, v. 345, p. 829-832, 1990.

McPHERRON, A. C.; LEE, S-J. Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 12457-12461, 1997.

MARIANI, P. et al. Caseification tests made with milk characterized by variants A and B of k-casein in the production of Parmigiano-Reggiano cheese. **Scienza e Tecnica Lattiero-Casearia**, v. 27, p. 208-227, 1976.

MARTINEZ, M. L. Eficiência dos delineamentos de filhas e netas para detectar ligação entre marcador e loci de característica quantitativa. **Rev. Bras. Zootec.**, v. 27, p. 707-714, 1998.

MATTOS, K. K. Polimorfismos de DNA nos genes *BGH* e *PIT1* em populações zebuínas e mestiças com aptidão leiteira e sua associação com características de produção. 2000. 92 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

MEUWISSEN, T. H. E.; GODDARD, M. E. The use of marker haplotypes in animal breeding schemes. **Genet. Sel. Evol.**, v. 28, p. 161-176, 1996.

MOODY, D. E.; POMP, D.; BARENDSE, W. Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine *PIT1* gene and assignment of *PIT1* to bovine chromosome 1. **Anim. Genet.**, v. 26, p. 45-47, 1995.

MOODY, D. E. et al. Characterization of DNA polymorphisms in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line 1 Herefords. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

MOTA, A. F.; MARTINEZ, M. L.; COUTINHO, L. L. Localização de locos gênicos de características quantitativas (QTLs) em gado de leite. Premissas e estratégias. **Multiciência**, v. 4, p. 18-37, 2000.

MULLIS, K.; FALOONA, F. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. **Methods Enzymol.**, v. 55, p. 335-350, 1987.

NELSON, C. et al. Discrete cis-active genomic sequences dictate the pituitary cell type-specific expression of rat prolactin and growth hormone genes. **Nature**, v. 322, p. 557-562, 1986.

NELSON, C. et al. Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. **Science**, v. 239, p. 1400-1405, 1988.

O' BRIEN, S. J.; GRAVES, J. A. M. Report of the committee on comparative gene mapping. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 58, p. 1124-1151, 1991.

OHTA, K. et al. Characterization of the gene encoding human pituitary-specific transcription factor, Pit-1. **Gene**, v. 122, p. 387-388, 1992.

PACKER, I. U. **Análise genética do crescimento até a desmama de bezerros Canchim**. 1977. 173 p. Tese (Livre Docência em Melhoramento Animal) - Departamento de Zootecnia, Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" da Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PARMENTIER, I. et al. Candidate gene markers associated with somatotropic axis and milk selection. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 17, p. 139-148, 1999.

PEREIRA, A. P. **Avaliação da influência dos genótipos de GH e IGF-1 no desempenho de bovinos da raça Canchim**. 2002. 54 p. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas), Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

PFÄFFLE, R. W. et al. Mutation of the POU-specific domain of PIT-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. **Science**, v. 257, p. 1118-1121, 1992.

POMP, D. Biotechnology and beef cattle improvement: myths and realities. In: RESEARCH SYMPOSIUM AND ANNUAL MEETING, 26., 1994, Des Moines, IA. **Proceedings...** Des Moines, IA: Beef Improvement Fed., 1994. p. 236-241.

RADOVICK, S. et al. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. **Science**, v. 257, p. 1115-1118, 1992.

RAUCH, C. et al. Characterization and localization of an immunoreactive growth hormone-releasing hormone precursor form in normal and tumoral human anterior pituitaries. **Endocrinology**, v. 136, p. 2594-2601, 1995.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP, version 3.1b: a population genetics software for exact tests and ecumenism, 1995. **J. Heredity**, v. 86, p. 248-249, 1995.

REICHLIN, S. Growth and the hypothalamus. **Endocrinology**, v. 67, p. 760-773, 1960.

REGITANO, L. C. A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. (Ed). **Biologia Molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

REGITANO, L. C. A. **Polimorfismo molecular em gerações de bovinos da raça Canchim**. 1996. 132 p. Tese (Doutorado em Agronomia). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RENAVILLE, R. et al. Pit-1 gene polymorphism, milk yield, and conformation traits for Italian Holstein Friesian bulls. **J. Dairy Sci.**, v. 80, p. 3431-3438, 1997.

ROCHA, J. L. et al. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 70, p. 3360-3370, 1992.

ROTHSCHILD, M. F.; SOLLER, M. Candidate gene analysis to detect genes controlling traits of economic importance in domestic livestock. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANIMAL BREEDING AND GENETICS, 1999, Viçosa. **Proceedings...** Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 219-242.

SAS Institute. **SAS/Stat. User's guide: statistics**. Cary, USA, 2000.

SCHLEE, P. et al. Growth hormone and insulin-like growth factor I concentrations in bulls of various growth hormone genotypes. **Theor. Appl. Genet.**, v. 88, p. 497-500, 1994a.

SCHLEE, P. et al. Influence of growth hormone genotypes on breeding values of Simmental bulls. **J. Anim. Breed. Genet.**, v. 111, p. 253-256, 1994b.

SHUSTER, D. E. et al. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. **Proc. Natl. Acad. Sci., USA**, v. 89, p. 9225-9229, 1992.

SIMMONS, D. M. et al. Pituitary cell phenotypes involve cell-specific Pit-1 mRNA translation and synergistic interactions with other classes of transcription factors. **Gene Dev.**, v. 4, p. 695-711, 1990.

SMITH, C.; SIMPSON, S. P. The use of genetic polymorphism in livestock improvement. **J. Anim. Breed. Genetis.**, v. 103, p. 205-217, 1986.

SNEDECOR, G. W.; COCHRAN, W. G. **Statistical methods**. 6<sup>th</sup> ed. Ames: The Iowa State University Press, 1967. 593 p.

SOLLER, M.; BECKMANN, J. S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement. **Theor. App. Genet.**, v. 67, p. 25-33, 1983.

SPELMAN, R. J.; BOVENHUIS, H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. **Anim. Genet.**, v. 29, p. 77-84, 1998.

SPELMAN, R.; GARRICK, D. Utilization of marker assisted selection in a commercial dairy cow population. **Livest. Prod. Sci.**, v. 47, p. 139-147, 1997.

SPELMAN, R. J.; GARRICK, D. J.; van ARENDONK, J. A. M. Utilization of genetic variation by marker assisted selection in commercial dairy cattle populations. **Livest. Prod. Sci.**, v. 59, p. 51-60, 1999.

SPINDLER, S. R.; MELLON, S. H.; BAXTER, J. D. Growth hormone gene transcription is regulated by thyroid and glucocorticoid hormones in cultured rat pituitary tumor cells. **J. Biol. Chem.**, v. 257, p. 11627-11632, 1982.

STONE, R. T. et al. A primary screen of the bovine genome for quantitative trait loci affecting carcass and growth traits. **J. Anim. Sci.**, v. 77, p. 1379-1384, 1999.

STURM, R. A.; HERR, W. The POU domain is a bipartite DNA-binding structure. **Nature**, v. 336, p. 601-604, 1988.

SUN, H. S. et al. Quantitative measurement of PIT1, GH and PRL mRNA and circulating hormone levels in pig families segregating *PIT1* genotypes. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON ANIMAL GENETICS, 26., Auckland, 1998. **Proceedings...** Auckland: International Society of Animal Genetics, 1998. p. 85.

SUN, H. S. et al. Neonatal Meishan pigs show POU1F1 genotype effects on plasma GH and PRL concentration. **Anim. Reprod. Sci.**, v. 69, p. 223-237, 2002.

TANK, P. A. et al. DNA marker evaluation of beef calves sired by high or low marbling EPD bulls. **J. Anim. Sci.**, v. 72 (Suppl. 1), p. 249, 1994.

THEILL, L. E. et al. Differential splicing of the *GHF1* primary transcript gives rise to two functionally distinct homeodomain proteins. **EMBO J.**, v. 11, p. 2261-2269, 1992.

THEILL, L. E.; KARIN, M. Transcriptional control of GH expression and anterior pituitary development. **Endocrinol. Rev.**, v. 14, p. 670-689, 1993.

TUGGLE, C. K.; TRENKLE, A. Control of growth hormone synthesis. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 13, p. 1-33, 1996.

VIANNA, A. T.; GOMES, F. P.; SANTIAGO, M. **Formação do gado Canchim pelo cruzamento Charolês-Zebu**. 2. ed. São Paulo: Nobel, 1978. 193 p.

VOSS, J. W.; ROSENFELD, M. G. Anterior pituitary development: short tales from dwarf mice. **Cell**, v. 70, p. 527-530, 1992.

VOSS, J. W.; YAO, T-P.; ROSENFELD, M. G. Alternative translation initiation site usage results in two structurally distinct forms of Pit-1. **J. Biol. Chem.**, v. 266, P. 12832-12835, 1991.

WALTON, M.; HOLM, T. Marker-assisted breeding to improve animal performance. **Anim. Genet.**, v. 29 (Suppl. 1), p. 1-7, 1998.

WELLER, J. I.; KASHI, Y.; SOLLER, M. Power of daughter and granddaughter designs for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci in dairy cattle. **J. Dairy Sci.**, v. 73, p. 2525-2537, 1990.

WELSH, J.; McCLELLAND, M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. **Nucleic Acid. Res.**, v. 18, p. 7213-7218, 1990.

WILLIAMS, J. G. et al. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. **Nucleic Acid. Res.**, v. 18, p. 6531-6535, 1990.

WOMACK, J. E. et al. Syntenic mapping of 37 loci in cattle. **Cytogenet. Cell Genet.**, v. 51, p. 1109, 1989.

WOOD, W. M. et al. Structural and functional characterization of the genomic locus encoding the murine beta 2 thyroid hormone receptor. **Mol. Endocrinol.**, v. 8, p. 1605-1617, 1994.

WOOLLARD, J. et al. Rapid communication: *Hinf*I polymorphism at the bovine *PIT1* locus. **J. Anim. Sci.**, v. 72, p. 3267, 1994.

YU, T-P. et al. Association of PIT1 polymorphisms with growth and carcass traits in pigs. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1282-1288, 1995.

YU, T-P. et al. Cloning of the full length pig PIT1 (POU1F1) CDNA and a novel alternative PIT1 transcript, and functional studies of their encoded proteins. **Anim. Biotechnol.**, v. 12, p. 1-19, 2001.