

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



Dissertação

Efeito de polimorfismos no receptor do hormônio do crescimento (GHR) e no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) no intervalo parto-concepção e produção de leite de vacas da raça Holandês

Lucas Teixeira Hax

Pelotas, 2013

Lucas Teixeira Hax

Efeito de polimorfismos no receptor do hormônio do crescimento (GHR) e no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) no intervalo parto-concepção e produção de leite de vacas da raça holandês

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do Conhecimento: Biotecnologia).

Orientador: Marcio Nunes Corrêa, Dr.

Professor Associado, UFPel

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB-10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

H411e	Hax, Lucas Teixeira Efeito de polimorfismos no receptor do hormônio do crescimento (GHR) e no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) no intervalo parto-concepção e produção de leite de vacas da raça Holandês / Lucas Teixeira Hax. – 34f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Universidade Federal de Pelotas. Centro de Desenvolvimento Tecnológico. Pelotas, 2013. – Orientador Marcio Nunes Corrêa ; co-orientador Augusto Schneider e Eduardo Schmitt. 1.Biotecnologia. 2.Polimorfismo. 3.Produção de leite. 4.SNP, 5.Fertilidade. 6.GHR. 7.IGF-I. I.Corrêa, Marcio Nunes. II.Schneider, Augusto. III.Schmit, Eduardo, IV.Título. CDD: 636.214
-------	---

Banca examinadora:

Augusto Schneider, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Carlos Castilho de Barros, Dr., Universidade Federal de Pelotas

Eduardo Schmitt, Dr., EMBRAPA – Centro de Pesquisa Agroflorestal de Rondônia

Marcio Nunes Corrêa, Dr., Universidade Federal de Pelotas (Orientador)

Agradecimentos

A Deus por todas as condições de chegar até aqui.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pela oportunidade da realização do mestrado.

Ao meu orientador Dr. Marcio Nunes Corrêa pelos ensinamentos, condições de trabalho, confiança depositada, incentivo e principalmente pelo exemplo.

Ao Dr. Augusto Schneider pelo desprendimento e auxílio durante todo o mestrado.

À doutoranda Carolina Bespalhok Jacometo pelo incansável auxílio nos períodos de trabalho intenso e, especialmente, pela amizade e apoio.

Aos mestrandos Pedro Augusto Silva Silveira e Marcio Erpen Lima pelo auxílio na parte de campo do experimento e constante disponibilidade.

Ao graduando em Medicina Veterinária Guilherme Nunes Bolzan pelo comprometimento e auxílio na execução do projeto.

Aos integrantes do Núcleo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Pecuária (NUPEEC) pelo auxílio na discussão e desenvolvimento do projeto.

Ao Laboratório de Bioquímica Clínica e ao Centro de Biotecnologia pela disponibilidade de infraestrutura para a condução das atividades.

À Dra. Priscila De Leon pelo auxílio nas análises laboratoriais.

A todos os amigos pelo apoio nos períodos críticos e alegria nos momentos de divertimento.

À minha família Mario e Vanda Hax pela compreensão, carinho e total apoio.

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Formulação do concentrado.....	24
Tabela 2 - Número de inseminações por prenhez, intervalo parto concepção e produção de leite aos 305 dias de vacas com os genótipos GHR <i>A/lul</i> (+/+) , <i>A/lul</i> (+/-) e <i>A/lul</i> (-/-).....	25
Tabela 3 - Número de inseminações por prenhez, intervalo parto concepção e produção de leite aos 305 dias de vacas com os genótipos IGF-I <i>SnaBI</i> (+/+) , <i>SnaBI</i> (+/-) e <i>SnaBI</i> (-/-).....	26

Resumo

HAX, LUCAS TEIXEIRA. **Efeito de polimorfismos no receptor do hormônio do crescimento (GHR) e no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) no intervalo parto-concepção e produção de leite de vacas da raça Holandês.** 2013. 34 f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. Os genes do eixo somatotrópico, que atuam na regulação do metabolismo e fisiologia dos mamíferos, apresentam polimorfismos associados a algumas características de interesse econômico, como desempenho reprodutivo e produção de leite. Tais fatores podem ser influenciados por mutações de apenas um nucleotídeo na sequência de bases do gene do receptor do hormônio do crescimento (GHR), que podem alterar a expressão do GHR no tecido hepático. Mudanças no acoplamento do hormônio do crescimento (GH) no tecido hepático alteram a concentração sérica de fator de crescimento semelhante à insulina tipo1 (IGF-I), visto que o IGF-I tem sua produção endócrina principalmente no fígado mediante estimulação do hormônio do crescimento. Diversos trabalhos têm estudado o efeito de polimorfismos no gene que codifica para IGF-I no desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas leiteiras de alta produção. Entre outras funções, o IGF-I atua como mediador dos efeitos das gonadotrofinas nas células foliculares, estimulando o crescimento e diferenciação das células da teca e da granulosa foliculares, apresentando também um importante papel no crescimento final e na maturação do folículo dominante. As altas concentrações sanguíneas de IGF-I estão também associadas a um retorno à ciclicidade mais precoce de vacas leiteiras pós-parto de alta produção. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a importância de mutações no GHR e IGF-I no desempenho zootécnico, IPC, número de inseminações por prenhez e produção de leite em vacas da raça Holandês. Foram avaliadas 155 vacas da raça Holandês em sistema semi extensivo submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e que conceberam até 250 dias em lactação no ano de 2011. Entre os animais analisados, 29% apresentaram o genótipo GHR *Alul*, (+/+), 57,5% *Alul* (+/-) e 13,5% *Alul* (-/-). Já para o IGF-I *SnaBI* 34,9% apresentaram o genótipo IGF-I *SnaBI* (+/+), 45,8% *SnaBI* (+/-) e 19,3% *SnaBI* (-/-). Não foi observada associação entre os genótipos GHR *Alul* e IGF-I *SnaBI* e o intervalo parto-concepção, número de inseminações por prenhez e produção de leite ($P>0,05$). Da mesma forma, não houve associação entre a interação dos genótipos de GHR *Alul* e IGF-I *SnaBI* e o intervalo parto-concepção, número de inseminações por prenhez e produção de leite ($P>0,05$). Finalmente, novos estudos avaliando uma maior população de animais são necessários para elucidar a importância dos genótipos de GHR *Alul* e IGF-I *SnaBI* no intervalo parto-concepção, número de inseminações por prenhez e produção de leite.

Palavras-chave: polimorfismo, fertilidade, Single Nucleotide Polymorphism, GHR, IGF-I, produção de leite

Abstract

HAX, LUCAS TEIXEIRA. **Effect of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor 1 (IGF-I) polymorphisms on calving conception interval and milk production of Holstein cows.** 2013. 34 f. Dissertation (Master). Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. The genes of the somatotropic axis, which act regulating the metabolism and physiology of the mammals, present polymorphism associated to some characteristics of economical interest, such as reproductive performance and milk production. Such factors may be influenced by the mutation on only one nucleotide in the base sequence of the gene of the growth hormone receptor (GHR), which may alter the density of GHR on the hepatic tissue. Changes in the coupling of the growth hormone (GH) in the hepatic tissue alter the serum concentration of the insulin-like growth factor 1 (IGF-I), as IGF-I is produced mainly by the liver when it is stimulated by the growth hormone. Different studies have evaluated the effect of polymorphisms in the gene responsible for encoding IGF-I on the reproductive performance and milk production of high production dairy cows. Among other functions, the IGF-I mediates the effects of gonadotropins on the follicular cells, stimulating the growth and differentiation of theca and granulosa follicular cells, playing also a significant role on the final growth and maturation of the dominant follicle. Furthermore, high serum IGF-I concentrations are associated with an earlier return to cyclicity post partum in high yield dairy cows. Thus, the objective of this study was to evaluate the relevance of the mutations in GHR and IGF-I on the calving conception interval, number of inseminations per pregnancy and milk production in Holstein cows. One hundred and fifty five Holstein cows, submitted to a semi extensive management system, subjected to fixed-time artificial insemination (TAI) that got pregnant up to 250 days in milk in 2011, were selected. Among the animals tested, 29% presented GHR Alul (+ / +), 57.5% Alul (+ / -) and 13.5% Alul (- / -) genotype. 34.9% presented IGF-I SnaBI (+ / +), 45.8% SnaBI (+ / -) and 19.3% SnaBI (- / -) genotype. No association was observed between GHR Alul and IGF-I SnaBI genotypes and calving conception interval, number of inseminations per pregnancy and milk yield ($P > 0.05$). Likewise, there was no association between the interaction of GHR Alul and IGF-I SnaBI genotypes and calving conception interval, number of inseminations per pregnancy and milk yield ($P > 0.05$). Finally, further studies are necessary to better understand the relevance of GHR Alul and IGF-I SnaBI genotypes to the calving conception interval number of inseminations per pregnancy and milk production in Holstein cows.

Key words: polymorphism, fertility, Single Nucleotide Polymorphism, GHR, IGFI, milk yield

Lista de Abreviaturas

Ácido clorídrico – HCL

Ácido desoxirribonucleico – DNA

Ácido ribonucleico mensageiro – RNAm

Balanço energético negativo - BEN

Cloreto de sódio – NaCL

Dias em lactação – DEL

Fator de crescimento semelhante à insulina 1 – IGF-I

Graus celsius - °C

Hormônio do crescimento – GH

Hormônio liberador de gonadotrofinas – GnRH

Inseminação artificial – IA

Inseminação artificial em tempo fixo – IATF

Intramuscular – i.m.

Intervalo parto-concepção – IPC

Microlitro - μ L

Milograma – mg

Milimolar – mM

Molar - M

Pares de base – PB

Potencial hidrogeniônico – pH

Prostaglandina F 2 alfa – PGF_{2 α}

Quilograma – kg

Reação em cadeia da polimerase – PCR

Receptor do hormônio do crescimento – GHR

Rotações por minuto – rpm

Single Nucleotide Polymorphism – SNP

Sumário

Banca Examinadora.....	1
Agradecimentos.....	2
Lista de Tabelas.....	3
Resumo.....	4
Abstract.....	5
Lista de abreviaturas.....	6
1 Introdução geral.....	8
2 Objetivos.....	11
3 Artigo.....	12
4 Conclusão geral.....	31
5 Referências.....	32

1 Introdução geral

A seleção genética nos últimos 50 anos proporcionou um exponencial crescimento na produção de leite por vaca (HANSEN, 2000; LUCY, 2001). Em contrapartida, a fertilidade da vaca de alta produção vem diminuindo, ocasionando elevadas perdas econômicas nas fazendas produtoras de leite (LUCY, 2001; BUTLER, 1998). Segundo Mackey et al (2007), o mérito genético para a produção de leite está negativamente associado com o desempenho reprodutivo.

O desempenho reprodutivo depende da retomada da atividade ovariana pós-parto (DARWASH et al, 1997). Em geral, folículos médios aparecem aos 5 dias pós-parto e folículos grandes 10 dias após o parto (SAVIO et al, 1990; SAVIO, et al 1990b). Em aproximadamente metade das vacas o folículo dominante da primeira onda folicular regide, atrasando a primeira ovulação. Somente a outra metade das vacas ovula com 3 semanas pós-parto (MCDOUGALL et al, 1995). Consequentemente, 50% das vacas se mantêm acíclicas nas primeiras semanas pós-parto (BALOGH et al, 2009).

Segundo alguns pesquisadores, em vacas de alta produção a ovulação com 3 semanas pós-parto apresenta uma correlação positiva com a recuperação da atividade ovariana normal, primeiro serviço e taxa de concepção (KAWASHIMA, et al 2006). Durante o período pós parto, vacas que ovulam precocemente apresentam maiores concentrações de Fator de Crescimento Semelhante à Insulina do tipo 1 (IGF-I) e menores de Hormônio do Crescimento (GH) do que vacas que ovulam tarde (KAWASHIMA, et al 2007a). A concentração plasmática de IGF-I em vacas que ovulam precocemente é maior na primeira onda folicular pós-parto do que em vacas que ovulam tarde (KAWASHIMA et al, 2007a). Em conjunto com a insulina, o IGF-I estimula a ovulação do folículo dominante da primeira onda folicular pós-parto em vacas multíparas (BEAM S.W.; BUTLER, W.R., 1999).

O IGF-I é fator essencial para o crescimento do folículo dominante (KAWASHIMA et al, 2007b). Na retomada da ciclicidade pós-parto, a dominância e maturação final do folículo dominante sofrem regulação através do IGF-I (KAWASHIMA et al, 2007b). Tanto o crescimento das células foliculares (SPICER et

al, 1993; SPICER et al, 1996) quanto a produção de estradiol nas células da granulosa (SPICER et al, 1993; SPICER et al, 1996) são estimulados pelo IGF-I.

No entanto, a concentração de IGF-I pós parto é reduzida em virtude do declínio da expressão do Receptor do Hormônio do Crescimento 1A (GHR 1A) no fígado no momento do parto (KOBAYASHI et al, 1999; RADCLIFF et al, 2003). A diminuição do IGF-I reduz o *feedback* negativo no GH (RADCLIFF et al, 2003; PUSHPAKUMARA et al, 2003). Consequentemente, a concentração de GH permanece alta após o parto, sustentando uma elevada produção de leite através do estímulo à lipólise no tecido adiposo (LEROITH et al, 2001; LUCY et al, 2004). Tal estado metabólico, em virtude da reduzida ingestão de matéria seca e elevada produção de leite pós-parto culmina em um balanço energético negativo e por consequência a um estado catabólico do animal (BEAM S.W., BUTLER, W.R., 1999; LUCY, 2001). No entanto, estudos têm demonstrado distintos padrões metabólicos e hormonais pós-parto que são traduzidos em diferentes desempenhos reprodutivos pós-parto.

Por tais razões, os estudos genômicos em animais de produção estão voltados para a identificação de marcadores moleculares preditores de características quantitativas. Um *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP), que é o polimorfismo de apenas um nucleotídeo, tem potencial para alterar a habilidade e certas funções dos genes (SAKAGUSHI et al, 2005; EDMONSON et al, 1989). A identificação desses marcadores possibilita a classificação de alelos favoráveis para seleção em nível de DNA, proporcionando uma seleção assistida por marcadores (AGGREY et al, 1999), cujo resultado pode ser um aumento na taxa anual de ganho genético dos animais de produção (KASHI et al, 1990).

No entanto, a associação entre mutações no GHR e IGF-I com o desempenho reprodutivo pós-parto de vacas leiteiras de alta produção ainda necessita ser melhor estudada. Tal observação justifica-se pela relação observada entre o genótipo de GHR e a expressão gênica e concentração plasmática de IGF-I, visto que a concentração de IGF-I é determinante da ovulação na primeira onda folicular pós-parto (KAWASHIMA et al, 2007a), contrastante com a não diferença na distribuição dos genótipos de GHR entre vacas ovulatórias e anovulatórias nas primeiras três semanas pós-parto observada por Shirasuna et al (2011).

Baseado nesses fatos, o presente trabalho investigou a hipótese de que polimorfismos nos genes que codificam para GHR e IGF-I são relevantes na fertilidade e produção de leite de vacas da raça Holandês.

2 Objetivos

Os objetivos desta dissertação foram:

- 1) Avaliar o efeito dos genótipos de GHR e IGF-I e sua interação no intervalo parto-concepção de vacas da raça Holandês submetidas à inseminação artificial em tempo fixo (IATF);
- 2) Avaliar o efeito dos genótipos de GHR e IGF-I e sua interação na produção de leite de vacas da raça Holandês;

3 Artigo

Efeito de polimorfismo nos genes GHR e IGF-I na fertilidade e produção de leite de vacas da raça Holandês

O artigo será formatado segundo as normas da revista *Theriogenology*

Resumo

O objetivo deste trabalho foi determinar o efeito do polimorfismo *AluI* no receptor do hormônio do crescimento (GHR) e *SnaBI* no fator de crescimento semelhante à insulina tipo 1 (IGF-I) no desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas da raça Holandês. Foram utilizadas 155 vacas da raça Holandês submetidas à protocolo de inseminação artificial em tempo fixo (IATF) e resincronização em caso de não prenhez detectada no diagnóstico por ultrassonografia transretal aos 30 e 60 dias pós IATF e que conceberam até 250 dias de lactação. Os dados de intervalo parto-concepção (IPC), número de inseminações por prenhez (nº IA) e produção de leite aos 305 dias de lactação foram obtidos através do programa de gerenciamento da fazenda ALPRO® (Herd Management System DeLaval). O sangue foi coletado da veia coccígea e estocado a -20°C até a extração do DNA. O DNA foi extraído de uma alíquota de 500 µL de sangue total. A determinação dos genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* foi realizada através de digestão enzimática do produto da reação em cadeia da polimerase (PCR) e os fragmentos foram separados por eletroforese em gel de agarose e visualizados em luz ultravioleta. Os dados foram analisados no programa SAS para o efeito polinomial da presença de nenhum, um ou dois alelos *AluI* (-) e *SnaBI* (-) utilizando o número de lactações como covariável. A interação entre os diferentes genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* foi analisada através do procedimento MIXED do programa SAS. Entre os animais analisados, 29%, 57,5% e 13,5% tiveram genótipo GHR *AluI* (+/+), *AluI* (+/-) e *AluI* (-/-)

respectivamente, e 34,9%, 45,8% e 19,3% tiveram genótipo IGF-I *SnaBI* (+/+), *SnaBI* (+/-), e *SnaBI* (-/-) respectivamente. Não foi observada associação entre os genótipos GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e o intervalo parto concepção, o número de inseminações por prenhez e a produção de leite aos 305 dias de lactação ($P>0,05$). Não houve associação entre a interação entre os genótipo GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e o intervalo parto concepção, o número de inseminações por prenhez e a produção de leite aos 305 dias de lactação ($P>0,05$). Por conseguinte, não foi confirmada a associação entre os genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e a fertilidade e produção de leite de vacas da raça Holandês de baixa produção criadas em regime semi extensivo.

Palavras-chave: polimorfismo, Single Nucleotide Polymorphism, fertilidade

Introdução

Os genes que codificam para proteínas do eixo somatotrópico têm sido estudados como marcadores para a seleção de animais de produção (Maj et al., 2008). Formado pelos genes que codificam para a síntese do hormônio do crescimento (GH), fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e seus receptores (GHR e IGF-IR), o eixo GH/IGF-I atua na regulação do metabolismo e fisiologia de mamíferos (Jones & Clemons, 1995). O polimorfismo desses genes tem sido associado à características de interesse econômico, como síntese e composição do leite (Maj et al., 2008), características de carcaça e produção de carne (Hale et al., 2000).

A maior parte do IGF-I sérico é sintetizada no fígado em resposta ao GH agindo através de seu receptor (Jiang et al., 1999; Jiang & Lucy, 2001). O IGF-I estimula a proliferação das células da teca e granulosa dos folículos ovarianos (Armstrong & Webb, 1997), inibindo a atresia folicular (el-Roeiy et al., 1994). Além disso o IGF-I estimula a

resposta das células foliculares a ação das gonadotrofinas (Armstrong & Webb, 1997). Assim, vacas de leite com atraso no retorno à ciclicidade possuem uma menor concentração sérica de IGF-I em comparação à vacas que ovulam mais precocemente (Kawashima et al., 2007). Da mesma maneira, em vacas de corte a concentração sérica de IGF-I aumenta linearmente até o momento da primeira ovulação pós-parto e tem uma correlação negativa com a duração do anestro pós-parto (Stagg et al., 1998; Roberts et al., 2005). O retorno precoce à ciclicidade no período pós-parto é essencial, pois quanto mais ciclos estrais antes do momento da primeira inseminação, maior será a taxa de prenhez (Thatcher & Wilcox, 1973).

Baseado nestas informações pode-se inferir que a variação genotípica dos genes que codificam para o GHR e IGF-I pode influenciar direta ou indiretamente o desempenho reprodutivo de vacas pós-parto. Neste sentido, Maj et al. (2008) observaram uma associação entre os polimorfismos *AluI* e *SnaBI* nos genes que codificam para o GHR e IGF-I, respectivamente, com a expressão hepática de RNAm para IGF-I e concentração plasmática de IGF-I em novilhos da raça Holandês. Dados ainda não publicados da nossa equipe confirmaram a associação do polimorfismo GHR *AluI* com uma maior concentração sérica de IGF-I, e além disso, com uma redução de 13-32 dias no intervalo parto concepção em vacas leiteiras da raça Holandês.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito de polimorfismos nos genes GHR e IGF-I no desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas da raça Holandês.

Material e Métodos

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pelotas. O experimento foi realizado com 155 vacas (88 primíparas e 67 multíparas) da raça Holandês de uma propriedade do sul do Brasil. Os dados de produção de leite ajustada para 305 dias, intervalo parto concepção (IPC) número de inseminações por prenhez (nº IA) foram obtidos do banco de dados da fazenda (ALPRO® Herd Management System DeLaval). Foram utilizadas neste experimento apenas vacas com IPC menor que 250 dias em lactação (DEL) no ano de 2011.

Os animais foram manejados em um sistema de criação semi-extensivo, no qual sua dieta foi baseada principalmente em pastagem cultivada, sendo esta de acordo com a estação do ano (azevém (*Lolium multiflorum*) no outono/inverno e sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*) na primavera/verão), e concentrado mais suplemento mineral para ajuste da exigência nutricional de acordo com cada categoria (NRC 2001). As vacas eram ordenhadas duas vezes por dia. Os animais receberam 11,6kg/vaca/dia de concentrado e suplementação mineral, conforme demonstrado na tabela 1, duas vezes por dia com acesso à água *ad libitum*.

Manejo reprodutivo

Os animais foram pré-sincronizados aos 47 ± 5 dias pós-parto com aplicação intramuscular (i.m.) de 25mg de PGF_{2α} (LUTALYSE®, Pfizer Saúde Animal, Brasil). Aos 60 ± 3 dias pós-parto os animais passaram por exame ginecológico e foram submetidas ao protocolo de IATF. Para realização do protocolo de IATF foi administrado 100 mg i.m. de um análogo de GnRH (Cystorelin®, Merial, USA) juntamente com a colocação de um dispositivo intravaginal liberador de progesterona (CIDR®; Pfizer Saúde Animal, Brasil). No dia 7 do protocolo o dispositivo intravaginal foi removido e foi administrado 25mg i.m. de um análogo de PGF_{2α} (LUTALYSE®, Pfizer Saúde Animal, Brasil). No dia 8 do protocolo os animais

receberam 1mg i.m. de cipionato de estradiol (ECP[®]; Pfizer Saúde Animal, Brasil). A IATF foi realizada 72h após a remoção do pessário por técnico treinado utilizando sêmen de diferentes touros comerciais de acordo com os critérios de seleção da fazenda. Vacas observadas em cio após o protocolo de sincronização foram inseminadas. O diagnóstico de gestação foi realizado 30 e 60 dias após a IA, sendo que vacas diagnosticadas como não prenhas foram imediatamente submetidas a re-sincronização e IATF. Vacas diagnosticadas como prenhas aos 30 dias e não prenhas aos 60 dias foram consideradas como perda gestacional.

Análise de polimorfismos de DNA

Para determinação de polimorfismo no gene do receptor do hormônio do crescimento (GHR) e fator de crescimento semelhante à insulina tipo I (IGF-I), foi coletada uma amostra de sangue de cada animal através de punção da veia coccígea em tubos de ensaio contendo EDTA. As amostras foram estocadas a -20°C até a extração do DNA.

O DNA foi extraído de uma alíquota de 500 µL de sangue total homogeneizada com 1000 µL de *red cell lysis buffer* (RBCL –Tris-HCL 0.01 M, sacarose 320 mM, MgCl₂ 5 mM, Triton 1% 100X), e centrifugada por 2 minutos à 7000 rpm. Após o descarte do sobrenadante, essas etapas foram repetidas quatro vezes. Em seguida, o *pellet* formado foi dissolvido com 400 µL de *nucleic lysis buffer* (NBL –Tris-HCL 0.01M, citrato de sódio 11.4 mM, EDTA 1 mM, Dodecil Sulfato de Sódio 1%, pH 8.0). Dissolvido o *pellet*, foi adicionado ao tubo 100 µL de NaCl 5M e 600 µL de clorofórmio, homogeneizado e centrifugado a 7000 rpm por 2 minutos. Logo após, foi removido para um novo tubo 400 µL do sobrenadante ao qual foi adicionado 800 µL de etanol absoluto a 4°C. Após homogeneizada, a amostra foi centrifugada a 14000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante foi descartado e a amostra foi seca em temperatura ambiente. Depois da secagem, a amostra foi eluída em 50 µL de solução de Tris com EDTA,

levada ao banho-maria a 37°C por 30 minutos e estocada à -20°C. A checagem da extração foi realizada com 2,5 µL da extração impregnadas com Gel Red e submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,5% e visualizadas em exposição à luz ultravioleta.

Para determinação dos alelos GHR *AluI* foi amplificado um fragmento de 836-pb utilizando os *primers*: *Forward*: TGCCTGCACAGCAGCTCAACC e *Reverse*: AGCAACCCCACTGCTGGGCAT. Para determinação dos alelos IGF-I *SnaBI* foi realizada uma PCR utilizando os *primers*: *Forward*: TTAAATAATTGGGTTGGAAGACTGC e *Reverse*: ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT. As reações de PCR foram efetuadas com um volume final de 20µL (Taka Ex Taq, Takara Bio Inc, Otsu, Japan). A temperatura de anelamento dos *primers* foi de 66°C para o GHR e 58°C para o IGF-I. Os fragmentos de GHR amplificados passaram por digestão em uma reação contendo 7µL do produto da PCR e 3 unidades da enzima de restrição *AluI* (New Egland Biolabs, UK). A mistura para digestão foi incubada em um termociclador a 37°C por três horas. Para a digestão dos fragmentos de IGF-I, foram adicionadas três unidade da enzima *SnaBI* (New Egland Biolabs, UK) em 8 µL do produto da PCR compondo um volume de 15 µL a 37°C por três horas. Após a digestão dos produtos amplificados, fragmentos de DNA foram impregnados com Gel Red e separados em gel de agarose a 1,5% para GHR e 2% para IGF-I juntamente com um padrão de peso molecular de 100-pb em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos digeridos e visualização por exposição à luz ultravioleta. O genótipo de cada animal foi determinado por meio da análise do tamanho dos fragmentos representado em pares de base. Os genótipos identificados para o GHR foram: *AluI* (+/+): 602pb, 145pb, 75pb; *AluI* (-/-): 747pb, 75pb; *AluI* (+/-): 747pb, 602pb, 145pb, 75pb (Aggrey et al., 1999). Os fragmentos identificados para o IGF-I foram: *SnaBI* (+/+): 226pb; *SnaBI* (+/-): 249pb, 226pb; *SnaBI* (-/-): 249pb (Ge et al., 2011).

Análises Estatísticas

Todas as análises estatísticas foram realizadas no programa SAS (Institute Inc. Cary, NC, USA, 2001). Os resultados são apresentados como média \pm erro padrão da média. Foi utilizado o modelo polinomial para verificar a presença de efeito linear de ausência, ter apenas um ou dois alelos GHR *AluI* (-) ou IGF-I *SnaBI* (-) no intervalo parto-concepção, produção de leite aos 305 dias de lactação e número de inseminações por prenhez. Foi utilizado o procedimento MIXED para avaliar a associação da interação entre os diferentes genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* com o intervalo parto-concepção, produção de leite aos 305 dias de lactação e número de inseminações por prenhez.

Resultados

Das 155 vacas analisadas para o polimorfismo *AluI* do GHR, 45 (29%) eram do genótipo *AluI* (+/+), 89 (57,5%) do genótipo *AluI* (+/-) e 21 (13,5%) do genótipo *AluI* (-/-). A frequência dos alelos *AluI* (+) e *AluI* (-) foi 0,58 e 0,42 respectivamente. Quando distribuídas de acordo com o número de partos, a frequência dos genótipos de GHR *AluI* foi de 28,4% de *AluI* (+/+), 57,9% de *AluI* (+/-) e 13,7% de *AluI* (-/-) nas vacas primíparas e 29,9% de *AluI* (+/+), 56,7% de *AluI* (+/-) e 13,4% de *AluI* (-/-) nas vacas multíparas.

Os dados de intervalo parto-concepção, número de inseminações e produção de leite se encontram sumarizados na tabela 2 para os efeitos lineares de não ter nenhum, ter um ou dois alelos GHR *AluI* (-), além do contraste entre ter um ou dois contra nenhum alelo GHR *AluI* (-).

Não houve diferença entre os genótipos de GHR *AluI* quanto à produção de leite ($P>0,05$). Igualmente, os genótipos de GHR *AluI* não diferiram quanto ao intervalo parto-concepção ($P>0,05$) e número de inseminações ($P>0,05$).

Já para o polimorfismo *SnaBI* do IGF-I, das 155 vacas avaliadas 54 (34,9%) eram do genótipo *SnaBI* (+/+), 71 (45,8%) do genótipo *SnaBI* (+/-) e 30 (19,3%) do genótipo *SnaBI* (-/-). A frequência dos alelos *SnaBI* (+) e *SnaBI* (-) foi 0,58 e 0,42 respectivamente. Quando alocadas conforme o número de parições, a frequência dos genótipos de IGF-I *SnaBI* foi de 32,9% de *SnaBI* (+/+), 48,9% de *SnaBI* (+/-) e 18,2% de *SnaBI* (-/-) nas vacas primíparas e 37,3% de *SnaBI* (+/+), 41,8% de *SnaBI* (+/-) e 20,9% de *SnaBI* (-/-) nas vacas multíparas.

Na tabela 3 podem ser observados os dados de intervalo parto-concepção, número de inseminações e produção de leite quanto ao efeito linear de não ter nenhum, ter um ou dois alelos IGF-I *SnaBI* (-), além do contraste entre ter um ou dois contra nenhum alelo IGF-I *SnaBI* (-).

Os genótipos de IGF-I *SnaBI* não diferiram quanto ao intervalo parto concepção ($P>0,05$) e número de inseminações ($P>0,05$). Da mesma forma, não houve diferença entre os genótipos de IGF-I *SnaBI* quanto à produção de leite ($P>0,05$).

Não foi observada associação entre a interação entre os genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e o intervalo parto-concepção, número de inseminações por prenhez e produção de leite ($P>0,05$).

Discussão

Alguns autores têm observado que uma transversão no promotor do GHR altera a concentração sanguínea de IGF-I (Maj et al., 2008). Essa mutação é a troca de uma adenina por uma timina, a qual ocorre *upstream* da região promotora na posição -1182 do GHR. Chamada de *AluI*, esse SNP altera a expressão de IGF-I no tecido hepático (Maj et al., 2008).

Esse polimorfismo pode afetar a expressão de GHR no fígado, consequentemente aumentando a expressão hepática de mRNA de IGF-I e IGF-I sérico (Maj et al., 2005).

Um aumento na concentração sérica de IGF-I está associado ao aumento da produção de estradiol do folículo ovulatório e antecipação da primeira ovulação pós-parto (Butler et al., 2004). Uma maior produção de estradiol pelo folículo dominante juntamente com o aumento do diâmetro do mesmo (Lopes et al., 2007) e uma ovulação precoce pós-parto (Kawashima et al., 2006) estão associados a um menor intervalo parto concepção. No entanto, os resultados do nosso estudo não demonstraram associação entre o genótipo de GHR *AluI* com a melhora do desempenho reprodutivo. Ademais, não foi observada associação entre a presença do alelo *AluI* (-) e um menor intervalo parto-concepção e menor número de inseminações por prenhez. Entretanto, diferentemente dos estudos citados, os animais desse trabalho foram manejados em sistema semi-extensivo. Dessa forma, o nível de produção desses animais foi menor do que o das vacas dos estudos que evidenciaram o efeito de mutações no gene que codifica para GHR no desempenho reprodutivo. Consequentemente, essa diferença pode explicar o fato desse efeito não ter sido observado no presente trabalho, visto que as diferenças no desempenho reprodutivo em virtude de alterações na expressão de GHR e concentração de IGF-I são dependentes do status metabólico do animal (Butler et al., 2003).

Além da importância no desempenho reprodutivo, o GHR media as ações do GH na regulação do metabolismo, as quais afetam, entre outros fatores, o crescimento, a saúde e a produção de leite (Argetsinger et al., 1996). Corroborando, touros com genótipo de GHR *AluI* (-/-) apresentam um menor percentual de incremento de gordura no leite em comparação aos outros genótipos avaliados (Aggrey et al., 1999). Além disso, dados ainda não publicados da nossa equipe observaram uma associação entre o genótipo de GHR *AluI* (+/+) e uma maior produção de leite em vacas de alta produção. Em nosso estudo não foi constatada associação entre o genótipo de GHR *AluI* e a produção de leite aos 305 dias de lactação.

No entanto, os estudos que associaram mutações no gene que codifica pra GHR utilizaram vacas de alta produção em regime intensivo. No presente trabalho, foram avaliados animais de baixa produção. Consequentemente, como a alteração na expressão hepática de GHR é resultado da diminuição da concentração sérica de insulina em virtude do balanço energético negativo (BEN) resultante da demanda de nutrientes para atender à elevada produção de leite (Butler et al., 2003), a associação entre os genótipos de GHR *AluI* pode não ter sido observada em virtude do reduzido desafio metabólico ao qual as vacas avaliadas foram submetidas.

Diferentemente de outros estudos (Maj et al, 2008), nossos resultados não evidenciaram uma associação entre os genótipos de IGF-I *SnaBI* e a fertilidade de vacas da raça Holandês. Por outro lado, a frequência genotípica de IGF-I *SnaBI* observada nesse trabalho foi semelhante à encontrada por Shirasuna et al (2011), cujo estudo constatou uma frequência de genótipos IGF-I *SnaBI* (+/+) de 32%, IGF-I *SnaBI* (+/-) de 44,7% e IGF-I *SnaBI* (-/-) de 21,3%. Somado a isso, Shirasuna et al (2011) não observaram diferença na frequência genotípica e alélica de IGF-I *SnaBI* entre vacas ovulatórias ou anovulatórias nas primeiras três semanas após o parto, concluindo que a mutação IGF-I *SnaBI* não apresenta efeito na fertilidade de vacas de alta produção. Embora o nível de produção dos animais avaliados tenha sido diferente, esses dados vão ao encontro dos nossos resultados.

Por outro lado, Maj et al (2008) observou uma concentração sérica de IGF-I 50% maior em genótipos IGF-I *SnaBI* (+/+) em relação ao genótipo IGF-I *SnaBI* (-/-) em animais da raça Holandês. Ge et al (2011) também observaram efeito da mutação IGF-I *SnaBI* na concentração sérica de IGF-I. Segundo Ge et al (2011), terneiros da raça Angus com alta concentração de IGF-I apresentaram frequência de 25% do alelo IGF-I *SnaBI* (-) enquanto a frequência do IGF-I *SnaBI* (+) foi de 75%. Já em terneiros da raça Angus com baixa

concentração de IGF-I no mesmo período, a frequência alélica de IGF-I *SnaBI* (-) foi de 48%, enquanto que a do alelo IGF-I *SnaBI* (+) foi de 52% (Ge et al 2011).

Por conseguinte, infere-se que os genótipos IGF-I *SnaBI* estão associados à fertilidade, visto que o IGF-I atua no folículo como modulador das gonadotrofinas, além de estimular a proliferação e diferenciação das células da teca e da granulosa (Armstrong and Webb, 1997). Somado a isso, vacas que ovulam na primeira onda folicular pós-parto apresentam uma maior concentração sérica de IGF-I em relação às vacas que não ovulam (Thatcher and Wilcox, 1973).

No entanto, nossos resultados e os de Shirasuna et al (2011) divergem dos achados de Maj et al (2008) e Ge et al (2011). Provavelmente, o fato de os animais utilizados nos diferentes estudos não se encontrarem em um mesmo status metabólico explique os diferentes resultados, visto que diferenças no desempenho reprodutivo causado por alterações no eixo somatotrópico são dependentes do balanço energético do animal (Butler et al., 2003). Tal fato sugere que o status metabólico do animal desempenha destacado papel na magnitude do efeito da mutação IGF-I *SnaBI* na concentração sérica de IGF-I e consequentemente desempenho reprodutivo.

Quanto à produção de leite, no presente trabalho não foi observada associação entre os genótipos IGF-I *SnaBI*. Da mesma forma, segundo Hines et al (1998) os genótipos de IGF-I *SnaBI* não apresentam associação com a produção de leite. Entretanto, Siadkowska et al (2006) observaram uma associação entre genótipos de IGF-I *SnaBI* e a composição do leite. No entanto, os estudos citados avaliaram animais com status energético diferente do status dos animais analisados nesse trabalho. Por consequência, a importância da mutação IGF-I *SnaBI* na produção de leite permanece necessitando de novos estudos.

Por outro lado, como a expressão hepática de mRNA de IGF-I está condicionada à expressão de GHR (Radcliff et al., 2003), foi avaliado o efeito da interação entre os fenótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* no desempenho reprodutivo e produção de leite. No entanto, não foi observado efeito da interação entre as mutações GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* no desempenho reprodutivo e produção de leite de vacas da raça Holandês. Todavia, Maj et al (2008) observaram associação entre a interação entre genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e características zootécnicas. No entanto, como os animais do presente estudo foram manejados em sistema semi-extensivo e apresentaram baixa produção de leite, o status energético dos animais avaliados nesse estudo é diferente do status dos animais utilizados por Maj et al (2008), fato que torna necessário maiores avaliações do efeito da interação entre os genótipos de GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* e o desempenho reprodutivo e produção de leite.

Conclusão

Esse estudo observou nenhuma associação entre os genótipos GHR *AluI* e IGF-I *SnaBI* avaliados e o desempenho produtivo e reprodutivo de vacas leiteiras criadas em regime semi-extensivo.

Lista de tabelas

Tabela 1 - Formulação do concentrado

Alimento	% de inclusão
Farelo de Trigo	20
Farelo de Soja	25
Farelo de Arroz	17
Milho Grão	16
Sorgo Grão	16,4
Lactobov Top	2,3
Uréia	0
Bicarbonato	1
Calcário Calcítico	1
MEGALAC-E	1,3
Total	100

Tabela 2 - Número de inseminações por prenhez, intervalo parto concepção e produção de leite aos 305 dias de vacas com os genótipos GHR *AluI* (+/+) e *AluI* (+/-) e *AluI* (-/-).

	Genótipo de GHR <i>AluI</i>			P
	(+/+)	(+/-)	(-/-)	Linear* (-/+ e +/+)*
Vacas (n)	45	89	21	
Nº Inseminações	2,13±0,19	2,26±0,14	2,52±0,33	0,2989
IPC (dias)	103,22±8,43	108,68±5,38	127,33±13,99	0,113
Produção de Leite (kg)	5851,53±175,48	5906,46±126,36	5792,19±318,02	0,9725
				0,8297

* Modelo polinomial para efeito linear de ter nenhum, um ou dois alelos GHR *AluI* (-) e contraste entre ter nenhum *AluI* (-) versus um ou dois alelos *AluI* (-).

Tabela 3 - Número de inseminações por prenhez, intervalo parto concepção e produção de leite aos 305 dias de vacas com os genótipos IGF-I *SnaBI* (+/+) e *SnaBI* (+/-) e *SnaBI* (-/-).

	Genótipo de IGF-I <i>SnaBI</i>			P	
	(+/+)	(+/-)	(-/-)	Linear [*]	
Vacas (n)	54	71	30	<i>SnaBI</i> (-/-) vs +/+ [*]	
Nº Inseminações	2,31±0,16	2,17±0,18	2,37±0,22	0,9145	0,8336
IPC (dias)	114,54±6,98	104,54±6,72	112,83±10,22	0,8461	0,5031
Produção de leite (kg)	5771,85±163,98	5829,28±144,34	6169,03±227,21	0,0858	0,1375

* Modelo polinomial para efeito linear de ter nenhum, um ou dois alelos IGF-I *SnaBI* (-) e contraste entre ter nenhum *SnaBI* (-) versus um ou dois alelos *SnaBI* (-).

Referências

- Aggrey S.E., Yao J., Sabour M.P., Lin C.Y., Zadworny D., Haynes J.F., Kuhnlein, U., 1999. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. *J Herd* 90, 148-151.
- Argetsinger, L.S., Carter-Su, C., 1996. Mechanism of signaling by growth hormone receptor. *Physiol Rev* 76, 1089-1107.
- Armstrong, D.G., Webb, R., 1997. Ovarian follicular dominance: the role of intraovarian growth factors and novel proteins. *Rev Reprod* 2, 139-146.
- Beam, S.W., Butler, W.R., 1999. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. *J Reprod Fertil Suppl* 54, 411-424.
- Butler, S.T., Marr, A.L., Pelton, S.H., Radcliff, R.P., Lucy, M.C., Butler, W.R., 2003. Insulin restores GH responsiveness during lactation-induced negative energy balance in dairy cattle: effects on expression of IGF-I and GH receptor 1A. *J Endocrinol* 176, 205-217.
- Butler, S. T.; Pelton, S. H.; Butler, W. R., 2004. Insulin increases 17b-estradiol production by the dominant follicle of the first postpartum follicle wave in dairy cows. *Reproduction* 127, 537-545.
- el-Roeiy, A., Chen, X., Roberts, V.J., Shimasakai, S., Ling, N., LeRoith, D., Roberts, C.T., Jr., Yen, S.S., 1994. Expression of the genes encoding the insulin-like growth factors (IGF-I and II), the IGF and insulin receptors, and IGF-binding proteins-1-6 and the localization of their gene products in normal and polycystic ovary syndrome ovaries. *J Clin Endocrinol Metab* 78, 1488-1496.

- Ge, W., Davis, M.E., Hines, H.C., Irvin, K.M., Simmen, R.C.M., 2011. Association of genetic marker with blood serum insulin-like growth factor – I concentration and growth traits in Angus cattle. *J Anim Sci* 79, 1757-1762.
- Hale, C.S., Herring, W.O., Shibuya, H., Lucy, M.C., Lubahn,D.B., Keisler, D.H., Johnson, G.S., 2000. Decreased growth in Angus steers with a short TG-microsatellite allele in the P1 promoter of growth hormone receptor gene. *J Anim Sci* 78, 2099– 2104.
- Hines, H.C., Ge, W., Zhao, Q., Davis M.E., 1998. Association of genetic markers in growth hormone and insulin-like growth factor 1 *loci* with lactation traits in Holsteins. *Anim Gent* 29 (1), 69.
- Jiang, H., Lucy, M.C., 2001. Involvement of hepatocyte nuclear factor-4 in the expression of the growth hormone receptor 1A messenger ribonucleic acid in bovine liver. *Mol.Endocrinol.* 15, 1023-1034.
- Jiang, H., Okamura, C.S., Lucy, M.C., 1999. Isolation and characterization of a novel promoter for the bovine growth hormone receptor gene. *J.Biol.Chem* 274, 7893-7900.
- Jones, J.I., Clemmons, D.R., 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions. *Endocr Rev* 16, 3-34.
- Kawashima, C., Fukihara, S., Maeda, M., Kaneko, E., Montoya, C.A., Matsui, M., Shimizu, T., Matsunaga, N., Kida, K., Miyake, Y., Miyamoto, A., 2007. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. *Reproduction* 133, 155-163.
- Kawashima, C., Kaneko, E., Amaya Montoya, C., Matsui, M., Yamagishi, N., Matsunaga N., Ishi, M., Kida, K., Miyake, Y., Miyamoto, A., 2006. Relationship between the first ovulation

within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows. J Repro Dev 52, 479-486.

Lopes, A.S., Butler, S.T., Gilbert, R.O., Butler, W.R., 2007. Relationship of pre-ovulatory follicle size, estradiol concentrations and season to pregnancy outcome in dairy cows. Anim Reprod Sci 99, 34-43.

Maj, A., Pareek, C.S., Klavzinska, M., Zwierzchowski, L., 2005. Polymorphism of 5'- region of the bovine growth hormone receptor gene. J Anim Breed Genet 122, 414-417.

Maj, A., Snochowski, M., Siadkowska, E., Rowinska, B., Lisowski, P., Robakowska-Hyzorek, D., Oprzadek, J., Grochowska, R., Kochman, K., Zwierzchowski, L., 2008. Polymorphism in genes of groth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression liver and its level in blood in Polish Holstein – Fresian cattle. Neuroendocrinology Letters 29, 6, 981-989.

National Research Council (NRC). Nutrient requirement of dairy cattle 2001. 7 ed. National Academy Press. Waschington. D.C. p. 381.

Radcliff, R.P., MacCormack, B.L., Crooker, B.A., Lucy, M.C., 2003. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. J Dairy Sci 86, 3920-3926.

Roberts, A.J., Klindt, J., Jenkins, T.G., 2005. Effects of varying energy intake and sire breed on duration of postpartum anestrus, insulin like growth factor-1, and growth hormone in mature crossbred cows. J Anim Sci 83, 1705-1714.

SAS. Statistical Analysis System. SAS/STAT Users Guide, Release 9.1 Edition 2002. Cary, NC, USA, SAS Inst, Inc.

- Shirasuna, K., Kawashima, C., Murayama, C., Aoki, Y., Masuda, Y., Kida, K., Matsui, M., Shimizut, T., Miyamoto A., 2011. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. *J Reprod Dev* 57, 135-142.
- Stagg, K., Spicer, L.J., Sreenan, J.M., Roche, J.F., Diskin, M.G., 1998. Effect of calf isolation on follicular wave dynamics, gonadotropin and metabolic hormone changes, and interval to first ovulation in beef cows fed either of two energy levels postpartum. *Biol Reprod* 59, 777-783.
- Szymanowska M., Malewski T., Zwierzchowski L. 2004. Transcription factor binding to variable nucleotide sequences in 5'- flanking regions of the bovine casein genes. *Int Dairy J.* 14 (2), 103-115.
- Thatcher, W.W., Wilcox, C.J., 1973. Postpartum estrus as an indicator of reproductive status in the dairy cow. *J Dairy Sci* 56, 608-610.

4 Conclusão Geral

A associação entre os genótipos de GHR *A1ul* e IGF-I *SnaBI* e o desempenho reprodutivo e produção de leite apontada por alguns autores não foi observada nesse trabalho. No entanto, por se tratarem de genes que atuam no metabolismo, o controle individual de ingestão juntamente com parâmetros hormonais e metabólicos poderão melhor elucidar a associação dessas mutações com o desempenho zootécnico de vacas da raça Holandês.

5 Referências

- AGGREY S.E., YAO J., SABOUR M.P., LIN C.Y., ZADWORNY D., HAYNES J.F., KUHNLEIN. Markers within the regulatory region of the growth hormone receptor gene and their association with milk-related traits in Holsteins. **J Herd**, n. 90, p. 148-151, 1999.
- BALOGH O., KOVÁCS K., KLUCSÁR M., GÁSPÁRDY A., ZSOLNAI A., KÁTAI L., PÉCSI A., FÉSÜA L., BUTLER W.R., HUSZEICZA GY. *Alu* polymorphism of the bovine growth hormone (GH) gene, resumption of ovarian cyclicity, Milk production and loss of body condition at the onset of lactation in dairy cows. **Theriogenology**, n. 71, p. 553-559, 2009.
- BEAM S.W., BUTLER W.R. Effects of energy balance on follicular development and first ovulation in postpartum dairy cows. **J Reprod Fertil Suppl**, n. 54, p. 411-424, 1999.
- BUTLER W.R. Review: effect of protein nutrition on ovarian and uterine physiology in dairy cattle. **J Dairy Sci**, n. 81, p. 2533-2539, 1998.
- DARWASH A.O., LAMMING G.E., WOOLLIAMS J.A. Estimation of genetic variation in the interval from calving to postpartum ovulation of dairy cows. **J Dairy Sci**, n. 80, p. 1227-1234, 1997.
- EDMONSON A., LEAN J., WEAVER L.D., FARVER T., WEBSTER G. A body condition scoring chart for Holstein cows. **J Dairy Sci**, n. 72, p. 68-78, 1989.
- HANSEN L.B. Consequences of selection for milk yield from a geneticist's viewpoint. **J Dairy Sci**, n. 83, p. 1145-1150, 2000.
- KASHI Y., HALLERMAN E., SOLLER M. Marked-assisted selection of candidate bulls for progeny testing program. **Anim Prod**, n. 51, p. 63-74, 1990.
- KAWASHIMA C., FUKIHARA S., MAEDA M., KANEKO E., MONTOYA C.A., MATSUI M., SHIMIZU T., MATSUNAGA N., KIDA K., MIYAKE Y., MIYAMOTO A. Relationship between metabolic hormones and ovulation of dominant follicle during the first follicular wave post-partum in high-producing dairy cows. **Reproduction**, n. 133, p. 155-163, 2007a.
- KAWASHIMA C., KANEKO E., AMAYA MONTOYA C., MATSUI M., YAMAGISHI N., MATSUNAGA N., ISHI M., KIDA K., MIYAKE Y., MIYAMOTO A. Relationship between the first ovulation within three weeks postpartum and subsequent ovarian cycles and fertility in high producing dairy cows. **J Repro Dev**, n. 52, p. 479-486, 2006.
- KAWASHIMA C., SAKAGUCHI M., SUZUKI T., SASAMOTO Y., TAKAHASHI Y., MATSUI M., MIYAMOTO A. Metabolic profiles in ovulatory and anovulatory primiparous dairy cows during the first follicular wave postpartum. **J Repro and Develop**, n. 53, p. 113-120, 2007b.
- KOBAYASHI Y., BOID C.K., BRACKEN C.J., LAMBERSON W.R., KEISLER D.H., LUCY M.C. Reduced growth hormone receptor (GHR) messenger ribonucleic acid in

liver of periparturient cattle is caused by a specific down-regulation of GHR 1A that is associated with decreased insulin-like growth factor I. **Endocrinology**, n. 140, p. 3947-3954, 1999.

LEROITH D., SCAVO L., BUTLER A. The somatomedin hypothesis. **Endocr Rev**, n. 22, p. 53-74, 2001.

LUCY M.C., MACDOUGALL S., NATION D.P. The use of hormonal treatments to improve the reproductive performance of lactating dairy cows in feedlot or pasture-based management systems. **Anim Reprod Sci**, n. 82-83, p. 495-512, 2004.

LUCY M.C. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **J Dairy Sci**, n. 84, p. 1277-1293, 2001.

MACDOUGALL S., BURKE C.R., MACMILLAN K.L., WILLIAMSON N.B. Patterns of follicular development during periods of anovulation in pasture-fed dairy cows after calving. **Res Vet Sci**, n. 58, p. 212-216, 1995.

MACKEY D.R., GORDON A.W., MECCOY M.A., VERNER M., MAYNE CS. Association between genetic merit for milk production and animal parameters and the fertility performance of dairy cows. **Animal**, n. 1, p. 29-43, 2007.

PUSHPAKUMARA P.G., GARDNER N.H., REYNOLDS C.K., BEEVER D.E., WATHES D.C. Relationships between transition period diet, metabolic parameters and fertility in lactating dairy cows. **Theriogenology**, n. 60, p. 1165-1185, 2003.

RADCLIFF R.P., MACCORMACK B.L., CROOKER B.A., LUCY M.C. Plasma hormones and expression of growth hormone receptor and insulin-like growth factor I mRNA in hepatic tissue of periparturient dairy cows. **J Dairy Sci**, n. 86, p. 3920-3926, 2003.

SAKAGUSHI M., SUZUKI T., SASAMOTO Y., TAKAHASHI y., NISHIURA A., AOKI M. Effects of first breeding age on the production and reproduction of Holstein heifers up to the third lactation. **Anim Sci J**, n. 76, p. 419-426, 2005.

SAVIO J.D., BOLAND M.P., HYNES N., ROCHE J.F. Resumption of follicular activity in the early post-partum period of dairy cows. **J Reprod Fertil**, n. 88, p. 569-579, 1990a.

SAVIO J.D., BOLAND M.P., ROCHE J.F. Development of dominant follicles and length of ovarian cycles in post-partum dairy cows. **J Repro Fertil**, n. 88, p. 581-591, 1990b.

SHIRASUNA K., KAWASHIMA C., MURAYAMA C., AOKI Y., MASUDA Y., KIDA K., MATSUI M., SHIMIZUT T., MIYAMOTO A. Relationships between the first ovulation postpartum and polymorphism in genes relating to function of immunity, metabolism and reproduction in high-producing dairy cows. **J Reprod Dev**, n. 57, p. 135-142, 2011.

SPICER LJ., ALPIZAR E., ECHTERNKAMP SE. Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulose cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production *in vitro*. **J Anim Sci**, n. 71, p. 1232-1241, 1993.

SPICER LJ, STEWART RE. Interaction among basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell numbers and steroidogenesis of bovine thecal cells: role of IGF-I receptors. **Biol Reprod**, n. 54, p. 255-263, 1996.