

POLIMORFISMOS SSCP E A PUBERDADE EM NOVILHAS DA RAÇA NELORE¹

Maria Vanderly Andréa²; Flávio Vieira Meirelles³; Raysildo Barbosa Lôbo⁴;
Marcela Pecora Millazzotto³; Érica Perez Marson³; Reginaldo Aparecido Vila⁴;
Thereza Cristina Bório dos Santos Calmon de Bittencourt⁵; Cintia Righetti Marcondes⁶

²Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, CEP: 44.380-000, Cruz das Almas-BA. e-mail: mvander@ufba.br

³Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo, Rua Duque de Caxias Norte, 225, CEP: 13635-900, Pirassununga-SP. e-mail: meirellf@usp.br

⁴Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Avenida Bandeirantes, 3900, CEP: 14049-900, Ribeirão Preto-SP. e-mail: rrblobo@genbov.fmrp.usp.br

⁵Escola de Medicina Veterinária - Universidade Federal da Bahia Campus de Ondina, Av. Ademar de Barros, 500, CEP: 40170-110, Salvador-BA. e-mail: calmon@ufba.br

⁶Embrapa Amazônia Oriental – Tv. Dr. Enéas Pinheiro s/n, CEP: 66095-780, Marco, Belém-PA. e-mail: cimarcon@cpatu.embrapa.br

RESUMO: Amostras de DNA de 130 novilhas da raça Nelore foram analisadas para detecção de polimorfismos SSCP (*Single Strand Conformation Polimorphism*) nos genes da enzima P450 *Side Chain Cleavage* (Scc) e da Prolactina. Verificar possíveis relações entre o polimorfismo destes genes com características de precocidade sexual foi objetivo do trabalho. A idade ao primeiro parto foi utilizada como característica indicadora da precocidade. A técnica molecular utilizada permitiu caracterizar seis padrões de bandas no gene Scc, e para os dois fragmentos da Prolactina. O Qui-quadrado (χ^2) simplificado, foi utilizado como teste ($\alpha = 0,05$). As análises estatísticas realizadas mostraram que os padrões SSCP não estão associados à classe de precocidade sexual utilizada.

Palavras-chave: marcador molecular, bovinos, precocidade sexual

POLYMORPHISM SSCP AND PUBERTY IN NELORE BREED HEIFERS

ABSTRACT: Samples of DNA of 130 heifers of the Nelore breed were analyzed for detection of SSCP polymorphisms (*Single Strand Conformation Polimorphism*) in the genes of the enzyme P450 *Side Chain Cleavage* (Scc) and Prolactin. The objective of the present work was to verify possible relationships between the polymorphism of these genes with characteristics of sexual precocity. The age until the first parturition was used as a characteristic for indicating precocities. This molecular technique enabled the characterization of 6 SSCP patterns for the Scc gene, and for the two fragments of Prolactin. The Qui-square (χ^2) simplified test was used as a test ($\alpha = 0,05$). Statistical analyses showed that SSCP standards are not associated to the class of sexual precocity used.

Key words: molecular marker, bovines, sexual precocity

INTRODUÇÃO

O Brasil situa-se como detentor do maior rebanho bovino comercial do mundo, porém a produção brasileira é baseada em animais zebuínos (puros e mestiços), em sua maioria de baixo potencial produtivo, especialmente quanto aos caracteres reprodutivos, limitando o crescimento econômico por meio da produtividade e qualidade dos animais (Chenoweth, 1991).

Diante desta situação, um dos grandes desafios dos criadores brasileiros de zebu seria a busca pela precocidade sexual de novilhas e novilhos. Rebanhos com elevada fertilidade e precocidade sexual possuem maior disponibilidade de animais, condição esta que propicia uma redução no tempo dos animais na propriedade, substituição mais rápida do material genético por redução do intervalo de gerações, permitindo progressos genéticos mais elevados com maior lucratividade (Val, 2000).

¹Trabalho financiado pela FAPESP (Bolsa de Pós-Doutorado) e CNPq.

A precocidade sexual de fêmeas bovinas, avaliada por meio da idade à puberdade ou idade ao primeiro parto, constitui-se um dos parâmetros mais confiáveis quando se deseja mensurar e elevar a eficiência reprodutiva do rebanho (Marson et al. 2004). Segundo Thibault et al. (1993), a manifestação da puberdade ocorre, basicamente, em virtude do ajustamento gradual entre o aumento da atividade dos hormônios gonadotróficos hipofisários, somado à habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroidogênese e a gametogênese.

Nos ovários, a regulação da esteroidogênese é mantida pelos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH), bem como por outros fatores, pelo menos em parte, envolvidos na expressão de genes que codificam as enzimas esteroidogênicas (Lauber et al. 1993). Todos os esteróides são sintetizados a partir de um precursor comum, o colesterol, sendo que duas categorias de enzimas estão envolvidas nesta reação: a citocromo P450 (CYP) e a hidroxisteróide desidrogenase (HSD). O primeiro passo na biossíntese dos esteróides em mamíferos é a conversão, na mitocôndria, do colesterol a pregnenolona (P5), reação catalisada pela enzima mitocondrial citocromo P450 Side Chain Cleavage (P450 Scc). A P5 em progesterona (P4), hormônio que exerce função preponderante no desencadeamento da puberdade em fêmeas bovinas. A P450 Scc é enzima limitante na síntese de P4, portanto o estudo da expressão gênica desta enzima, associado à ocorrência de possíveis mutações nos genes que a codifica, pode fornecer informações valiosas sobre a manifestação precoce da puberdade em novilhas (Lauber et al., 1993).

Nolan (1990), investigando uma população F2 de camundongos de duas linhagens, de alta e de baixa produção de testosterona pelas células de Leydig, identificaram polimorfismos no gene da P450scc por PCR-RFLP, mostrando uma correlação significativa entre a quantidade de proteína P450scc e produção máxima de testosterona, presente em ambas as linhagens de indivíduos homocigotos. Bao et al. (1997) constataram que o recrutamento folicular em bovinos está associado à expressão de RNAm das enzimas P450scc e P450 aromatase e que o processo de seleção folicular está associado ao início da expressão de RNAm do receptor de LH, ambos dentro das células da granulosa.

A prolactina (Prl), hormônio gonadotrófico de função complementar à reprodução, em mamíferos, apresenta propriedades luteotróficas, com manutenção de corpo lúteo. Apresenta papel decisivo na preparação, manutenção e atividade secretora, bem como no crescimento da glândula mamária, agindo no sistema nervoso para induzir o comportamento materno. Estimula, ainda, a esteroidogênese nas gônadas e o crescimento dos folículos ovarianos.

Nas raças bovinas Ayrshire Russa e Gorbato

Red, foi estudada a distribuição de frequência dos alelos do gene da Prl localizados no sítio RsaI, exon 3 (Udina et al., 2001). Os autores observaram menor frequência de heterozigosidade na raça Gorbato Red, um tipo leiteiro com boas qualidades de carne e baixa produção de gordura no leite, quando comparado com outras raças de alta produção. Considerando-se a escassez de estudos de polimorfismos de genes sobre características reprodutivas, como a precocidade sexual, neste trabalho objetivou-se investigar a presença de polimorfismos nos genes da P450scc e Prl por SSCP (*Single Strand Conformation Polimorphism*) e avaliar possíveis associações destes polimorfismos com a precocidade sexual em novilhas Nelore, utilizando-se como característica indicadora deste evento a idade ao primeiro parto.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 130 novilhas da raça Nelore, pertencentes a duas propriedades participantes do Programa de Melhoramento Genético da Raça Nelore (PMGRN). As fêmeas, com idade média de 12 meses, foram divididas em quatro lotes de 50 fêmeas cada, sendo expostas a um touro jovem (de 2 anos de idade) por lote.

Processamento do material biológico: O DNA foi extraído de 5,0 ml de sangue periférico (veia jugular) empregando-se o método de extração e precipitação do DNA em NaCL descrito por Olerup e Zetterquist (1992). Na reação de amplificação foram usados: 10x PCR Buffer (10 mM Tris-HCl – pH 8.4, 50 mM KCl), 1,5 mM de MgCL₂, 0,2 μM de cada dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados), 0,5 unidades de Taq DNA polimerase e 100 ng de DNA genômico. A temperatura de anelamento (°C) e as condições de meio de reação, número de ciclos e temperaturas foram alteradas para a otimização da reação de amplificação de cada par de *primer* da seguinte maneira: 1)- 94 °C (4'); 2)- 94 °C (45"), 64 °C (30"), 72 °C (45") 8 ciclos ; 3)- 94 °C (45"), 62 °C (30"), 72 °C (45") 20 ciclos; 4)- 94 °C (45"), 60 °C (30"), 72 °C (45") 10 ciclos; 5) -72 °C (5') e 4º tempo indefinido, para a P450scc. Para a Prolactina foram usados os seguintes ciclos: 1) -94 °C (4') ; 2) -94 °C (45"), 60 °C (30"), 72 °C (45") 8 ciclos ; 2) -94 °C (45"), 58 °C (30"), 72 °C (45") 30 ciclos; 3) -72 °C (5') e 4º tempo indefinido.

As regiões de interesse dos genes candidatos P450scc e Prolactina (Prl1 e Prl2) foram amplificadas por meio da técnica de PCR (Polimerase Chain Reaction), utilizando-se os seguintes iniciadores: R-AGA TAAATG CAG CAA TAC CGG CC e F-GGC CTC TGG GGA CCT CGA TG, para Side Chain Cleavage

(AHLGREN et al. 1994). Para o fragmento Pr1 da Prolactina foram usados F1-CCA CAG GAT GAG AAT GAG AAG e R2-CTG CGC AGG CAG TGG AGC AG (WOLF et al. 1990), e para o Pr12, F2-GAA GAT GCA CGT TAT TCT GC e R1-CTT TCT CTC AAT CAT AAG GAA GG (CAROLL et al. 1990). Os fragmentos variaram de 288 a 520 pares de bases. Após amplificação os produtos da "PCR" foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida para verificação dos resultados.

Técnica *Single Strand Conformation Polimorphism* ("SSCP"): Para obtenção dos padrões de SSCP obedeceu-se a seguinte metodologia: 1 µl de produto de PCR foi misturado a 2 µl de solução tampão de SSCP (0,05% de xylene cyanol, 20 mM EDTA e 95% formamida); esta solução foi desnaturada a 95°C durante 10 minutos e colocada imediatamente no gelo; em seguida, as amostras foram colocadas em gel de poliacrilamida (9 por 8 cm, a 11%) não desnaturado em solução de Tris-Borato-EDTA (TBE) permanecendo a cuba na geladeira durante toda a corrida. O tamanho do fragmento determinou o tempo de corrida (8 a 14 horas) e a voltagem adequada (170 e 87, respectivamente). Após o tempo de corrida, o gel foi fixado em solução de metanol a 10%, onde se adicionou em solução de ácido nítrico (1,54% em 100 ml de água). Após várias lavagens, o gel foi impregnado com nitrato de prata (AgNO₃) por 20 minutos. Para a revelação, usou-se uma solução de carbonato de sódio (6 g 200 ml⁻¹ de água) acrescida de 108 µl de formaldeído para visualização das bandas. Os géis foram colocados em papéis celofanes e analisados quando estavam secos. Cada amostra obtida por "PCR" foi submetida à técnica de "SSCP". Visando facilitar a metodologia e identificar os padrões obtidos pelo "SSCP", cada amostra recebeu um número no laboratório (1 a 6).

Análise Estatística: Para avaliar a presença de alterações nos genes da P450scc e Prolactina (Pr1 e Pr12), os animais investigados foram classificados quanto à presença ou não do fenótipo precoce e não precoce, de acordo com a idade ao primeiro parto - IPP (informação do primeiro parto ocorrido para as novilhas em estudo, obtidas da base de dados do PMGRN-USP), sendo uma característica indicadora de precocidade sexual.

As hipóteses a serem testadas (para cada um dos três genes estudados, separadamente) são: H₀ = os padrões SSCP são homogêneos quanto à precocidade e H₁ = os padrões SSCP são heterogêneos quanto à precocidade.

Foi utilizado como teste o Qui-quadrado (²) simplificado com cinco graus de liberdade (²tabelado = 11,07 para α=0,05).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Várias metodologias têm sido empregadas na busca de genes marcadores da precocidade sexual. A técnica SSCP, aliada ao PCR para análise genética tem sido utilizada para detectar pontos de mutação e polimorfismos em vários genes (Milazzotto, 2001; Katsumata et al., 2002). A Figura 1 representa os produtos amplificados por PCR de 520, 350 e 340 pares de bases, resultantes da utilização dos pares de oligonucleotídeos específicos para os genes Side Chain Cleavage e Prolactina (Pr1 e Pr12) de algumas amostras do presente estudo. A utilização das duas técnicas se mostrou eficiente na identificação dos padrões de polimorfismos dos genes escolhidos. Dados semelhantes foram encontrados por Grompe (1993).

Para o gene da P450scc (Figura 2) foi possível identificar seis padrões de bandas, com possível indicação de troca de nucleotídeo nas regiões utilizadas. Milazzotto (2001), utilizando a mesma técnica para análise do exon 11 do gene do receptor do Hormônio Luteinizante (HL), identificou seis regiões onde houve troca de nucleotídeos. Constatou-se que em cinco dos seis fragmentos amplificados, os padrões de migração de bandas obtidas por SSCP foram compatíveis com aqueles observados nos sequenciamentos de DNA.

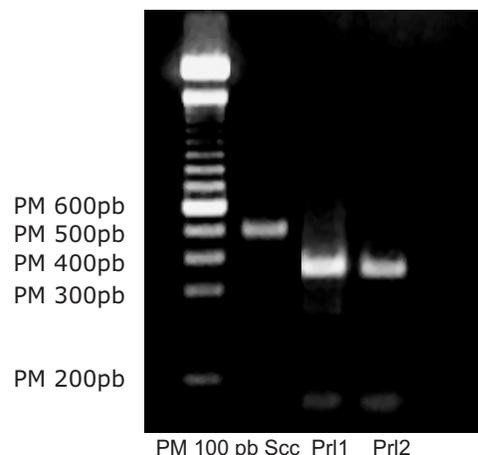


Figura 1 - PM 100 pb-Eletroforese em gel de agarose 2% durante uma hora a 84W em tampão TBE, corado com brometo de etídeo, analisados sobre luz ultravioleta. Peso molecular em escala de 100 Pares de Bases.

SCC- Produto amplificado por PCR (520 pb) resultante da utilização do par de oligonucleotídeos para o gene *Side Chain Cleavage*. Pr1- Produto amplificado por PCR (350 pb) resultante da utilização do par de oligonucleotídeos para o exon 5 do gene da Prolactina. Pr12- Produto amplificado por PCR (340 pb) resultante da utilização do par de oligonucleotídeos para o exon 5 do gene da Prolactina.

Para o gene Prl foram encontrados seis padrões para os fragmentos Prl1, porém a Figura 3 evidencia apenas cinco destes padrões. Já no fragmento Prl2 (Figura 4) foram observados 6 padrões de bancas de SSCP.

Udina et al. (2001) observaram altas taxas de polimorfismos no sítio RsaI do exon 3 do gene da Prl em três raças de bovinos leiteiros na Rússia. De acordo com estes autores, a raça Gorbato Red (de baixo teor de gordura no leite) apresentou baixa heterozigosidade para a Prl quando comparada às raças Ayrshire e Black Pied (de alta produção de gordura do leite). Machugh (1994) investigou 12 loci microssatélites em seis raças de bovinos europeus, relatando que a produção variava com o grau da heterozigosidade. Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg foram notados particularmente no microssatélite localizado no gene da Prl. Um grande número de animais apresentou o padrão 1 do gene P450 Scc. Já para o gene da Prl (Prl2) o padrão 4 envolveu maior número de animais, enquanto que o padrão 1 esteve mais presente entre as fêmeas precoces.

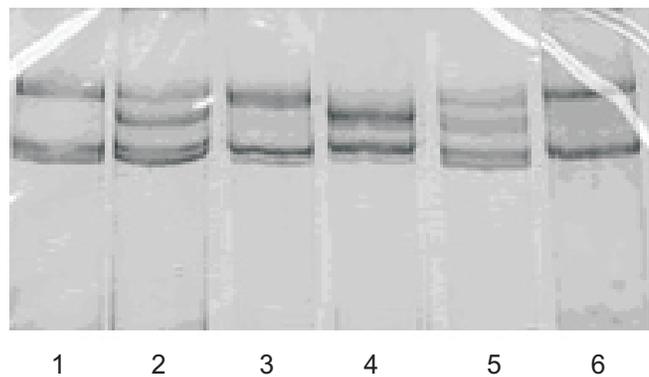
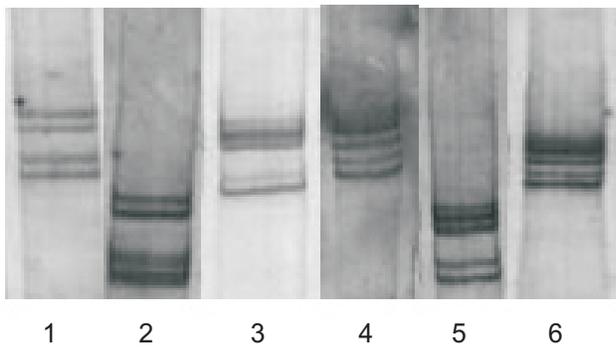


Figura 4 - Fragmentos de 340 pb amplificados por PCR gene Prolactina (Prl2) separados em gel de poliacrilamida a 11% não desnaturante e corados com nitrato de prata. Padrões de SSCP 1, 2, 3, 4, 5 e 6

Os diferentes polimorfismos do gene P450scc são semelhantes quanto à expressão da precocidade (Tabela1).



Figuras 2 – Fragmentos de 520 pb amplificados por PCR gene Side Chain Cleavage, separados em gel de poliacrilamida a 11% não desnaturante e corados com nitratos de prata. Padrões de SSCP 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Tabela 1 - Distribuição de uma amostra de 126 fêmeas bovinas da raça Nelore segundo o padrão SSCP do gene Side Chain Cleavage (P450scc) e a classe de precocidade.

Padrão SSCP	Precocidade (+) Número de fêmeas	Precocidade (-) Número de fêmeas	Total de fêmeas
1	20	65	85
2	5	19	24
3	0	7	7
4	1	5	6
5	0	2	2
6	0	2	2
Total	26	100	126

Os diferentes polimorfismos do gene Prl1 são semelhantes quanto à expressão da precocidade (Tabela 2).

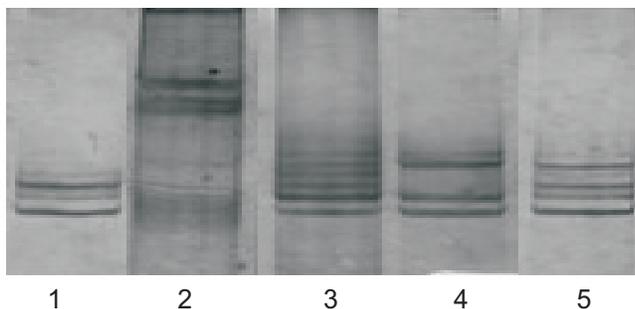


Figura 3 - Fragmentos de 350 pb amplificados por PCR gene Prolactina (Prl1), separados em gel de poliacrilamida a 11% não desnaturante e corados com nitratos de prata. Padrões de SSCP 1, 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2 - Distribuição de uma amostra de 129 fêmeas bovinas da raça Nelore segundo o padrão SSCP do gene da Prolactina (Prl1) e a classe de precocidade.

Padrão SSCP	Precocidade (+) Número de fêmeas	Precocidade (-) Número de fêmeas	Total de fêmeas
1	16	53	69
2	1	2	3
3	1	0	1
4	0	10	10
5	9	33	42
6	1	3	4
Total	28	101	129

Os diferentes polimorfismos do gene Prl2 são semelhantes quanto à expressão da precocidade (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição de uma amostra de 120 fêmeas bovinas da raça Nelore segundo o padrão SSCP do gene da Prolactina (Prl2) e a classe de precocidade.

Padrão SSCP	Precocidade (+) Número de fêmeas	Precocidade (-) Número de fêmeas	Total de fêmeas
1	0	4	4
2	7	25	32
3	2	11	13
4	11	33	44
5	2	3	5
6	6	16	22
Total	28	92	120

No trabalho a Idade ao Primeiro Parto foi definida como característica indicadora de precocidade. Assim, as análises mostraram que não há evidências de associação entre os polimorfismos genéticos estudados e a precocidade. A relação dos polimorfismos com outro caráter quantitativo que represente a precocidade reprodutiva, como Idade à Puberdade (estabelecida ao primeiro estro fértil) poderia ser mais adequada, pois a Idade ao Primeiro Parto depende do manejo reprodutivo da fazenda. No entanto, a mensuração da Idade à Puberdade costuma ser difícil e cara para ser feita em um grande número de fêmeas.

CONCLUSÕES

1. As variações encontradas pelos diferentes padrões de polimorfismos SSCP nos genes da P450 Scc e Prl não apresentaram associação com a precocidade sexual em novilhas da raça Nelore.

2. Estes resultados sugerem que a seleção de novilhas precoces, com base nesta informação genotípica para esta característica não é possível em programas de melhoramento genético.

3. Os resultados indicam a necessidade futura na busca de genes candidatos envolvidos em variação genética quantitativa em animais de interesse zootécnico, bem como considerar o uso de outro método de abordagem tal como o SNPs (Single Nucleotide Polymorphism).

AGRADECIMENTOS

Aos criadores Helvécio Argeu Alves – Fazenda São Dimas/GO e Luciano Borges Ribeiro – Rancho da Matinha/MG pelo apoio técnico recebido.

REFERÊNCIAS

AHLGREN, R.; SIMPSON, E. R.; WATERMAN, M. R.; LUND, J. Characterization of the promoter/ regulatory region of the bovine CYP11A (P-450 Scc) gene: Basal and camp dependent expression. **J. Biol. Chem.**, v. 265, p. 3313-3319, 1990.

BAO, B.; GAVERICK, H. A.; SMITH, G. W.; SMITH, M. F.; SALFEN, B. E.; YONGQUIST, S. Changes in messenger ribonucleic acid encoding luteinizing hormone receptor, cytochrome P450 Side Chain Cleavage, and Aromatase associated with recruitment and selection of bovine ovarian follicles. **Biology of Reproduction**, v. 56, p. 1158-1168, 1997.

BOVENHUIS, H.; VAN ARENDONK, J. A. M.; DAVIS, G.; ELSEN, J. M.; HALEY, C. S.; HILL, W. G.; BARET, P. V.; HETZEL, D. J. S.; NICHOLAS, F. W. Detection and mapping of quantitative trait loci in farm animals. **Livestock Production Science**, v. 52, p. 135-44, 1997.

CAROLL, S. M.; NARAYAN, P.; ROTTMAN, F. M. N-6 methyladenosine resides in an intron- specific region of bovine prolactin pre- mRNA. **Mol. Cell. Biol.**, 10, 4456-4465, 1990.

CHENOWETH, P. M. Bos indicus bulls- how different are they? Proceedings of the Annual Meeting of **Society of Theriogenology**, p. 117-22, 1991.

GROMPE, M. The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. **Nature Genetics**. v. 5, p. 111-117, 1993.

KATSUMATA, N.; OHTAKE, M.; HOJO, T.; OGAWA, E.; HARA, T.; SATO, N.; TANAKA, T. Compound heterozygous mutations in the cholesterol side chain cleavage enzyme gene (CYP11A) cause congenital adrenal insufficiency in humans. **J. Clin. Endocrinol. Metab.**, v. 87, n. 8, p. 3808-3813, 2002.

LAUBER, M. E.; KAGAWA, N.; WATERMAN, M. R. et al. cAMP-dependent and tissue-specific expression of genes encoding steroidogenic enzymes in bovine luteal

- and granulosa cells in primary culture. **Mol. Cell. Endocrinol.**, v. 93, n. 2, p. 227-233, 1993.
- MACHUGH, D. E.; LOFTUS, R. T.; BRADLEY, D. G.; SHARP, P. M.; CUNNINGHAM, P. Microsatellite DNA variation within and among european cattle breeds. **Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.**, v. 256, p. 25-31, 1994.
- MARSON, E. P.; GUIMARÃES, J. D.; NETO, T. M. Puberdade e maturidade sexual em novilhas de corte (artigo de revisão). **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, v. 28, n. 1, p. 3-12, 2004.
- MILAZZOTTO, M. P. **Mutações no gene receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. 2001. 85p. Dissertação de Mestrado, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho". Botucatu, SP.
- NOLAN, C. J.; PAYNE, A. H. Genotype at the P450 SCC locus determines differences in the amount of P450 SCC protein and maximal testosterone production in mouse Leydig cells. **Mol. Endocrinol.**, v. 4, n. 10, p. 1459-1464, 1990.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigen.**, v. 39, p. 225-235, 1992.
- THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; HUNTER, R. H. F. **Reproduction in mammals and man**. Paris: Aubin Imprimeur, 1993. 800p.
- UDINA, I. G.; TURKOVA, S. O.; KOSTIUCHENKO, M.; V., LEBEDEVA, L. A.; SULIMOA, G. E. Polymorphism of cattle prolactin gene: microsatellites, PSR – RFLP. **Genétika**, v. 37, n. 4, p. 511-516, 2001.
- VAL, J. E. **Desenvolvimento ponderal e desempenho produtivo em rebanhos leiteiros monitorados por sistemas informatizados**. 2000. 56p. Tese de Doutorado, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto, SP.
- VAN HAL, N. L. W.; VORST, O.; VAN HOUWELINGEN, A. M. M. L.; KOK, E. J.; PEIJNEBURG, A., AHARONI, A.; VAN TUNEN, A. J.; KREIJER, J. The application of DNA microarrays in gene expression analysis. **Journal of Biotechnology**. v. 78, p. 271-80, 2000.
- WANG, X.; FEUERSTEIN, G. Z. The use of mRNA differential display for discovery of novel therapeutic targets in cardiovascular disease. **Cardiovascular Research**. v. 3, p. 414-21, 1997.
- WOLF, J. B.; DAVID, V. A.; DEUTCH, A. H. Identification of a distal regulatory element in the 5' flanking region of the bovine prolactin gene. **Nucleic Acids Res.**, v. 18, n. 16, p. 4905-4912, 1990.

Recebido: 03/10/2006

Aceito: 03/01/2007