

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Estudo de Marcadores Moleculares (Microsatélites) em Vacas Doadoras
de Embriões com diferentes Respostas Superovulatórias**

Paulo Ricardo Loss Aguiar

Orientador: Dr. José Carlos Ferrugem Moraes

PORTO ALEGRE
2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**Estudo de Marcadores Moleculares (Microsatélites) em Vacas Doadoras
de Embriões com diferentes Respostas Superovulatórias**

Autor: Paulo Ricardo Loss Aguiar
Tese apresentada como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutor em Ciências
Veterinárias na área de Reprodução Animal.
Orientador: Dr. José Carlos Ferrugem Moraes

PORTO ALEGRE
Abril/2008

AGRADECIMENTOS

As contribuições diretas e indiretas para a realização deste trabalho foram de muitas pessoas a quais muito as agradeço.

Ao meu orientador Dr. José Carlos Ferrugem Moraes, por ter abraçado mais este desafio, pela orientação e oportunidade de termos discutido, além dos assuntos inerentes a Tese outros aspectos filosóficos da educação universitária e da agropecuária.

A Dra. Tânia de Azevedo Weimer por oportunizar a utilização de seu laboratório para a análise de PCR.

Agradeço ao Biólogo Juliano Coelho da Silva, MSc e ao acadêmico de Veterinária da ULBRA Werner Giehl Glanzner por terem realizado as PCRs das amostras, sem vocês seria este trabalho se tornaria muito mais difícil. A contribuição e amizade de vocês foram imprescindíveis.

Agradeço fortemente ao amigo de anos Juliano Kummer Msc, por ter mediado as conversas para obtermos as amostras das doadoras da raça Nelore, junto a uma Central de Reprodução do Estado do Mato Grosso do Sul.

Ao Dr. João Batista Borges por ter-nos cedido e fornecido algumas das amostras da raça A. Angus.

Ao curso de Curso de Veterinária da Universidade Luterana do Brasil que pelos anos de docência a ele dedicado, me incentivaram a realizar esta qualificação.

Aos meus Pais pelo exemplo de companheirismo, dedicação e doação em tudo aquilo ao qual se propuseram a fazer juntos.

Agradeço a minha dedicada e amada mulher Consuelo Garrastazu Paixão Côrtes e a meus queridos filhos Bárbara, Maria Eduarda e Diego por existirem, vocês são o incentivo para o crescimento de todos nós.

RESUMO

Embora a Transferência de embriões venha sendo empregada há mais de 30 anos e inúmeras pesquisas atuais realizadas, a variabilidade da resposta à superovulação (SOV) continua sendo o principal fator que limita o emprego mais amplo desta tecnologia, existindo a necessidade de procedimentos ou um melhor conhecimento dos fatores que interferem na resposta a SOV e desta forma possibilitar um aumento no número médio de embriões viáveis por coleta. A investigação de marcadores moleculares pode ser uma ferramenta útil para identificar precocemente algumas características reprodutivas que somente irão se expressar quando o indivíduo atingir a maturidade sexual ou ainda após o primeiro parto. Para tanto, foram investigados, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), marcadores moleculares (repetições curtas em tandem e polimorfismos de um único nucleotídeo), localizados nos mesmos cromossomos e próximos aos genes envolvidos com o recrutamento e crescimento folicular, a saber: LH β , FSH β , IGF-IR e Leptina, que em estudos anteriores, mostraram estar associados a um melhor desempenho reprodutivo. Adicionalmente, foi investigado o gene do receptor do FSH. Foram estudados 60 fêmeas da raça Nelore (N) e 59 da Aberdeen Angus (AA), sendo divididas em dois grupos, conforme a sua produção de embriões viáveis, em três coletas consecutivas, de baixa produção (30 N e 29 AA), com até 6 embriões e de alta, acima de seis (30 N e 30 AA).

A variação observada do número de alelos detectados nas raças Nelore e Angus foi de 2 a 8 e 1 a 10, respectivamente. As duas raças não apresentaram frequências alélicas semelhantes em nenhum dos sistemas estudados e alguns alelos foram observados somente em uma das raças, como para a raça Angus

*BMS3004*129, HEL5*161, e para o Nelore BMS3004*132, *138, HEL5*149 e AFZ*111.*

Foram encontradas algumas associações, para a raça Nelore; no sistema BMS4325, a presença do alelo *97 não foi favorável à produção de embriões, ao contrário do alelo *105. Para o sistema IDVGA51 o alelo *175 permitiu que as doadoras carreadoras deste alelo produzissem mais embriões, enquanto que o alelo *181 foi desvantajoso. No marcador ILSTS002 a presença do alelo *135, nas doadoras, levou-as a serem incluídas na classe de baixa produção embrionária. Já para o sistema AFZ1 as vacas possuidoras do alelo *119 produziram acima de 6 embriões. Os alelos *151 e *153 do sistema HEL5 permitiram que suas carreadoras produzissem um menor e um maior número de embriões viáveis, respectivamente. Os animais homozigotos da raça A. Angus para o sistema LEP*Sau3A1*(A/B) produziram mais embriões quando comparado aos heterozigotos. Em conclusão, é possível sugerir a utilização de alguns dos sistemas estudados para selecionar, previamente, a produção de embriões em doadoras, principalmente em raças em evolução, como a Nelore, mas esta tecnologia não seria apropriada para rebanhos seletivamente estáveis, como o A. Angus, aqui investigado.

ABSTRACT

The embryo transfer in cattle have been used for over thirty years and several studies have been undertaken in this period. The variability in the superovulatory (SOV) response of donor cows remains the major constraint for a more widespread use of this technique.

The development of new procedures and/or better knowledge of the factors interfering in SOV methodologies was needed, to increase the number of viable embryos obtained per superovulated cow. The Study of molecular markers could be useful to identify early in life the cows with better responses to SOV procedures. Studies were made to accomplish this objective employing molecular markers (tandem repeated sequences and single nucleotide polymorphism) located on the same chromosomes and near to genes involved with follicular development an selection, such as: LH β , FSH β , IGF-IR and Leptin, which were found associated with increased reproductive traits in previous studies. Additionally, the gene of FSH receptor was investigated. Sixty Nellore (N) cows and fifty nine Aberdeen Angus (AA) cows were stratified in two groups in accordance their production of viable embryos after at least three SOV procedures. The low production group includes 30 N and 29 AA cows with a embryo recovery rate up to six embryos and the high production group with embryo recover rate higher than six.

The observed variation in the total number of alleles was 2-8 in Nellore and 1-10 in Aberdeen Angus cows. Both breeds did not present similarity in the allele frequencies of the studied systems, and some alleles were restricted to

only in one breed, such as BMS3004*129, HEL5*161, only found in Angus and BMS3004*132,*138, HEL5*149 e AFZ*111 in Nellore.

For the Nellore breed some associations were found: on system BMS4325, when the presence of the allele *97 did not favor embryo production, contrasting with the allele *105; on system IDVGA51, the allele *175 favored embryo production, contrasting with the allele *181; on system ILSTS002, in which the presence of the allele *135 was only found in the cows in the low production group; on the system AFZ1, the presence of the allele *119 agrees with the inclusion of the cows in high production group; on system HEL5, the alleles *151 e *153 agrees with the classification of the cows respectively in the groups of low and higher number of embryo recovery. In Aberdeen Angus breed homozygous cows for system LEPSau3A1(A/B) produces more embryos than heterozygous ones.

In conclusion, it is possible to suggest that employing the studied systems would contribute to early selection of donor cows of the Nellore breed, but it should not be useful for more stable breeds such as A. Angus.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Médias e valores médios dos embriões recolhidos das doadoras da raça A.Angus e Nelore separados nas classes baixa e alta.....51
- Figura 2: Médias de estruturas embrionárias viáveis em função dos sistemas que apresentaram diferença estatística para a ANOVA na raça Aberdeen Angus e Nelore.....53
- Figura 3: Número de doadoras agrupadas em baixa e alta produção de embriões viáveis em função dos alelos onde foram detectadas diferenças estatísticas nos seus respectivos sistemas para a raça Nelore.57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resumo das associações observadas em bovinos do Rio Grande do Sul.....	36
Tabela 2: Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo, seqüências dos primers, tamanhos esperados dos produtos de amplificação em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (TA) e referências.....	41
Tabela 3: Classificação dos alelos de cada sistema, conforme o tamanho.	43
Tabela 4: Freqüências alélicas do BM4325 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	45
Tabela 5: Freqüências alélicas do BMS3004 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	45
Tabela 6: Freqüências alélicas do ILSTS002 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	46
Tabela 7: Freqüências alélicas do IDVGA51 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	47
Tabela 8: Freqüências alélicas do HEL5 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	48
Tabela 9: Freqüências alélicas do AFZ1 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	49
Tabela 10: Freqüências alélicas do FSHR nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	49
Tabela 11: Freqüências alélicas do LEP $sau3A1(A/B)$ nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	50

Tabela 12: Freqüências alélicas do LEP <i>sau3A1</i> (1/2) nas raças Aberdeen Angus e Nelore.	50
Tabela 13: Tamanho dos genótipos, números de animais, médias de estruturas embrionárias viáveis obtidas e valores estatísticos para os distintos sistemas que apresentaram diferenças estatísticas.....	53
Tabela 14: Análises de associação dos microssatélites e as classes de doadoras da raça Nelore.....	56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Geral.....	19
2.2 Específicos:.....	19
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	21
3.1 Processo de Seleção dos Rebanhos Aberdeen Angus e Nelore.....	21
3.1.1 Origem e seleção do gado Nelore.....	21
3.1.2 Origem e seleção do gado Aberdeen Angus.....	22
3.2 Variabilidade na Resposta à Superovulação.....	22
3.3 Diferenças na Fisiologia da Reprodução em <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i>	29
3.4 Seleção Animal por Marcadores Moleculares.....	30
3.4.1 Marcadores moleculares.....	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	38
4.1 Animais.....	38
4.2 Coleta de Amostras e Extração de DNA.....	39
4.3 Determinação dos Genótipos.....	40
4.4 Métodos Estatísticos.....	42
5. RESULTADOS.....	44
6. DISCUSSÃO.....	58
CONCLUSÕES.....	70
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	72

1. INTRODUÇÃO

Em 2005, o rebanho bovino brasileiro atingiu 207,2 milhões de animais, o que representou um aumento de 1,3% em relação a 2004 (IBGE, 2008). O resultado confirma a desaceleração do crescimento verificado entre os anos 2000 e 2003. A migração da pecuária para outras atividades agrícolas, como cana-de-açúcar e soja, é uma das razões para esta taxa. Mesmo assim, o Brasil manteve sua posição de maior rebanho de bovinos do mundo, seguido por Índia e China, segundo a Food and Agriculture Organization (FAO, 2006), a qual estima que a população mundial de bovinos esteja em torno de em 1,4 bilhões. Os bovinos representam um dos maiores componentes da economia pastoril mundial e sua evolução tem sofrido a influência humana por muitas gerações, com seleção de diversas características, conforme a necessidade e a importância econômica (GIANNONI e GIANNONI, 1987).

Os principais tipos de bovinos criados em todo o mundo são os zebuínos (*Bos primigenius indicus*) e os taurinos (*Bos primigenius taurus*; INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, 2003), os primeiros de origem indiana e os outros procedentes da Europa, e devido a sua completa interfertilidade, devem ser considerados como variações geográficas de uma mesma espécie (EPSTEIN, 1971; EPSTEIN e MASON, 1984; PAYNE, 1991; LOFTUS et al., 1994).

Estudos das análises de polimorfismos nas regiões microssatélites e de seqüências do DNA mitocondrial revelaram que os ancestrais dos zebuínos e

taurinos divergiram algumas centenas de milhares de anos atrás e, que resultam de eventos independentes de domesticação (LOFTUS et al., 1994; MACHUGH et al., 1997).

Taurinos e zebuínos possuem diferenças morfológicas e fisiológicas que refletem não só as mudanças ambientais onde estes animais se adaptaram, como diferentes seleções genéticas aplicadas ao longo do tempo. Os animais foram submetidos, historicamente, a seleção para a produção de leite e/ou carne, e em seguida, para ausência de aspás, e cor de pelagem, resistência a doenças, docilidade e fertilidade.

Na pecuária brasileira, várias técnicas têm sido introduzidas visando aumentar a eficiência da produção de animais puros, na tentativa de atender à grande demanda de seus descendentes, e, principalmente, permitir uma expansão do mercado consumidor ávido por um produto de melhor qualidade a um menor custo. Entre estas técnicas, destaca-se a transferência de embriões (TE), que tem mostrado não somente ser um instrumento capaz de melhorar a performance produtiva, mas também possuir grande importância no campo de investigação científica. De acordo com Land e Hill (1975) o emprego da Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET) aumenta em quase duas vezes a taxa de ganho genético obtida em comparação com as estratégias de programas de reprodução tradicionais.

A TE torna-se uma importante ferramenta de trabalho com o objetivo de acelerar e auxiliar no processo seletivo dos animais de melhor performance de certas características em determinadas condições ambientais. Para tanto é importante salientar que a TE esteja acoplada a um programa de seleção e melhoramento genético. Betteridge (2006) indicou que no ano de 2000, no Canadá, dos 1754 touros jovens selecionados para programas de melhoramento genético 80% eram oriundos de TE e Hasler (2001) indicou que aproximadamente 5% dos animais registrados nos anos 90 na Associação Americana do Gado Holandês, são provenientes da técnica de transferência de embriões. Esta técnica pode ser usada para aumentar a intensidade e a precisão da seleção, e também permite que os embriões sejam examinados para a presença de alelos específicos desejáveis antes da transferência (HANSEN e BLOCK, 2004).

O objetivo da transferência de embriões é obter, a partir dos genitores, de alto valor genético, maior número de descendentes, utilizando o útero de receptoras de menor valor econômico para levar a gestação a termo. Anderson (1983) divide a história dessa técnica em duas etapas. A primeira como sendo a elaboração da metodologia, realizada em um ambiente ligado à pesquisa, e a segunda, a de aplicação e comercialização. Esta última teve seu início, segundo Coelho (1988), quando os processos ainda eram imperfeitos e os resultados bastante variados.

A primeira TE, com sucesso, foi relatada por Heape (1890), citado por Willett et al. (1951), que trabalhou com embriões de coelhos. Na espécie bovina, a primeira descrição foi feita por Willett et al. (1951) sendo a colheita realizada após o abate da doadora e o soro sangüíneo homólogo utilizado como meio de lavagem dos cornos uterinos. No Brasil, o primeiro nascimento de um bovino, pela TE, foi datada de 1980.

No ano de 2005 foram produzidos no mundo, por MOET, 789.972 embriões bovinos viáveis e 330.647 pela técnica da fertilização *in vitro* (FIV) (VIANA, 2006). A participação do Brasil neste levantamento é de suma importância pelo fato de ter transferido no mesmo período 107.217 embriões, tornando-se o líder no Continente Sul Americano e no ranking dos países fora do eixo Estados Unidos Canadá. Viana (2006) comenta ainda que esta estatística esteja subestimada em virtude da falta de comunicação das coletas e transferências embrionárias por alguns países, podendo então, o número real de embriões produzidos no ano de 2005 chegar a próximo de um milhão.

Para alcançar o objetivo de multiplicação do material genético de uma fêmea, é necessário, em primeira instância, contar com um número elevado de embriões transferíveis. Por tanto, deve-se provocar na fêmea doadora, uma estimulação ovárica – tratamento superovulatório (PS) – mediante a administração de gonodotrofinas. Isto deve completar-se com um ótimo regime de inseminação artificial e com sêmen de boa qualidade.

A indústria da reprodução animal movimentada, no mundo, valores em torno de 5 bilhões de dólares. Dentro deste contexto a transferência de embriões e a fertilização *in vitro* são instrumentos que possibilitam aumentar o potencial reprodutivo de fêmeas consideradas zootecnicamente superiores,

principalmente com o objetivo de acelerar o processo de melhoramento genético e de programas de seleção animal (RODRIGUES, 2001).

Apesar de serem implementadas outras técnicas de produção de embriões, segundo Reinchenbach (2003), a transferência de embriões continua sendo um dos métodos mais econômicos e práticos para a obtenção do aumento nas taxas de reprodução de fêmeas com alto valor genético, tanto em rebanhos de leite como de corte.

Embora a MOET venha sendo empregada há mais de 30 anos e inúmeras pesquisas atuais realizadas, a variabilidade da resposta a superovulação continua sendo o principal fator que limita o emprego mais amplo desta tecnologia, havendo a necessidade de procedimentos ou um melhor conhecimento dos fatores que interferem na resposta a superovulação (SOV), e desta forma, possibilitar um aumento no número médio de embriões viáveis por coleta. Mesmo conhecendo-se algumas das variáveis envolvidas no processo de TE, a média de 6,2 embriões por doadora, contabilizada por Looney (1986) pouco evoluiu até os dias de hoje. Entretanto, estas limitações impostas pela repetibilidade da TE, associadas à resposta irregular aos tratamentos de SOV, com alta variação no número de estruturas viáveis pós-colheita, aliada ainda à crescente demanda e necessidade de embriões para fins de pesquisa, contribuíram para a investigação de outros caminhos voltados à produção de embriões em larga escala. Estes percentuais, com algumas variações, se repetem cada vez que se analisa a produção de embriões de um número significativo de doadoras superovuladas, o que afeta, logicamente, o custo da TE.

A variabilidade da resposta a SOV já foi relacionada a diferentes protocolos como, tipos de gonodotrofinas (MAPLETOFT e PIERSON, 1993), dosagem das gonodotrofinas (GONZALEZ et al., 1990, BARUSELLI et al., 2003), local e forma de aplicação das gonodotrofinas (BÓ et al., 1994; ÁLVARES et al., 2006), duração dos tratamentos superovulatórios (GARCIA et al. 1982), adição de outros hormônios no protocolo (SAVAGE et al., 1987); métodos de sincronização da onda de crescimento folicular e o momento do ciclo estral são fatores que mais podem alterar a SOV (CHUPIN et al., 1985; LINDSELL et al., 1986; BÓ et al. 2003; BARUSELLI et al., 2003, NASSER, 2006).

A maior limitação em um programa de TE é a resposta desuniforme de cada vaca doadora aos tratamentos hormonais para a superovulação. Mapletoft et al. (2002) comentam que a variabilidade da resposta à superovulação continua sendo o problema mais frustrante em relação à transferência de embriões de bovinos limitando, desta forma, a aplicação comercial mais ampla da TE (BOLAND, et al. 1991; MAPLETOFT et al. 2002, KANITZ et al. 2002; HASLER, 2003; SINGH et al.2004; BURNS et al. 2005; BETTERIDGE, 2006, IRELAND et al. 2007, BÓ et al. 2008). A ausência de resposta a SOV pode ocorrer, geralmente, em 20-30% dos animais, enquanto outros 20-30% respondem apenas modestamente e com baixas taxas de fertilização (RIECHENBACH, 2003). Uma resposta aceitável de, no mínimo, 6 embriões viáveis, por coleta, tem sido obtida de apenas um terço das doadoras, na dependência de uma série de fatores, dentre eles, destacam-se aqueles relacionados ao embrião, ao meio ambiente (nutrição, estabulação, eficiência e exatidão da observação de estros, manejo dentre outros), ao organismo materno, e à sua predisposição individual (idade, sensibilidade ao estresse, níveis de produção leiteira, genética) bem como a interação destes fatores (LUCY, 2001). Outros fatores como o tipo e o grau de pureza da gonadotrofina utilizada, o protocolo e a dose utilizada, o status fisiológico no momento do início da SOV (presença de folículo dominante) e a nutrição das doadoras também podem alterar, grandemente, a resposta aos tratamentos (BOLAND et al, 1991; BOLAND et al, 2001). Ainda, Chenoweth (2007) comenta a influência do macho na qualidade dos embriões, implantação e desenvolvimento embrionário, e, possivelmente, comprometendo a sobrevivência fetal.

O entendimento da fisiologia da dinâmica folicular permitiu que técnicas, como a TE, pudessem ser utilizadas e implementadas. O crescimento e o desenvolvimento folicular são processos que adquirem um número seqüencial de características essenciais para a ovulação, sendo espécie específico. No entanto, muitos mecanismos, durante o seu processo de desenvolvimento, ainda não estão completamente esclarecidos, onde se podem incluir fatores que regulam o início do crescimento do folículo primordial, o controle da formação do antro, mecanismos que controlam o recrutamento folicular,

seleção e dominância e ainda o processo de atresia folicular (BURATINI Jr., 2007).

A incorporação de técnicas para controle da dinâmica das ondas foliculares, como ablação do folículo dominante, uso de progestágenos, pré-recrutamento de folículos pré antrais, com uso do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) ou 17β estradiol, com o objetivo de diminuir a variabilidade das respostas de vacas tratadas com hormônios superovulatórios em diferentes estágios de desenvolvimento folicular, não proporcionaram o meio de minimizar adequadamente a variabilidade na resposta ovariana à superestimulação (MAPLETOFT et al., 2002; BÓ et al., 2003; BÓ et al., 2004; BARUSELLI et al., 2006; LIMA et al. 2007).

Apesar dos esforços para diminuir a variabilidade nas respostas superovulatórias entre as vacas e, conseqüentemente, aumentar as médias de estruturas colhidas por doadora, permanece sendo um sério impedimento para o sucesso desta biotécnica.

Abordagens mais específicas que permitam o conhecimento de parâmetros genéticos relativos a características da variabilidade das respostas das vacas doadoras de embriões aos programas de superovulação são necessidades inerentes à aplicabilidade desta biotécnica.

Com o aumento do conhecimento sobre o genoma animal e, conseqüentemente, da posição e efeito de locos principais para características quantitativas, tornou-se possível, utilizando-se marcadores moleculares, modificar-se as técnicas tradicionais de seleção, baseadas exclusivamente no aspecto fenotípico (DENTINE, 1999).

Para Garcia e Porto-Neto (2006) os marcadores moleculares, além de serem empregados para caracterizarem geneticamente populações, raças, espécies, para estudos de genealogias e controle de paternidade, podem ajudar a eliminar os inconvenientes da seleção baseada em análises exclusivas de fenótipo.

As primeiras aplicações de marcadores moleculares na produção animal envolveram a identificação de características condicionadas por um loco principal. Estas, devido ao padrão de herança mais simples, são mais fáceis de detectar, e por isso, já existem muitos exemplos de marcadores empregados para identificar, corretamente, animais portadores de características

monogênicas. Para características quantitativas, quando marcadores moleculares são mapeados e ligados a genes de interesse, podem ser utilizados em programas de melhoramento animal, como ferramentas auxiliares de seleção em uma metodologia conhecida como Seleção Assistida por Marcadores (MAS).

Davis e DeNise (1998) comentam que os marcadores moleculares podem auxiliar técnicas reprodutivas avançadas como ovulações múltiplas, transferência de embriões, cultura de células primordiais, maturação e fertilização *in vitro*, pois permitem a identificação de genes específicos introduzidos no rebanho ou raças de interesse.

Pesquisas anteriores identificaram marcadores associados aos genes Leptina, LH β , FSH β , FSHR e IGF-IR que podem permitir selecionar animais com maior potencial para ganho de peso ou para um melhor desempenho reprodutivo. O estudo de marcadores moleculares pode fornecer apoio para a detecção de genes candidatos cujos produtos desempenham efeitos sobre a eficácia produtiva e conseqüentemente, obter um benefício, como identificar as melhores vacas doadoras de embriões. Um importante aspecto para este tipo de estudo é o conhecimento prévio da variabilidade genética das populações alvo, permitindo compreender as diferentes respostas aos estímulos endógenos e exógenos. Adicionalmente, a utilização de marcadores moleculares como auxiliares da seleção clássica pode trazer uma grande contribuição à pecuária já que possibilita a identificação precoce dos bons produtores e é facilitada pela utilização de marcadores já identificados que estejam associados a locos de características quantitativas, assim com procurar entender a variabilidade da resposta à superovulação não somente nos aspectos fenotípicos, como já identificado por diversos autores.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar a segunda fase da MAS, através da validação dos achados prévios de associação entre os marcadores BM4325, BM3004, ILSTS002, IDVGA51, *LepSau3A1+/-*, *LepSau3A1A/B*, HEL5 e AZF1 sobre o desempenho reprodutivo, visando assim identificar precocemente, por técnicas moleculares, vacas potencialmente doadoras de embriões e colaborando com as técnicas seletivas

2.2 Específicos:

1. Organizar um banco de dados de respostas à superovulação de vacas das raças britânicas e zebuínas, principalmente, com concentração nas raças Aberdeen Angus e Nelore, incluindo aspectos relacionados à resposta aos tratamentos superovulatórios, para determinação dos critérios de classificação dos animais.
2. Confirmar a associação previamente verificada entre os marcadores moleculares BM4325, BM3004, ILSTS002, IDVGA51, *LepSau3A1+/-*, *LepSau3A1A/B*, HEL5 e AZF1 e eficiência na produção de estruturas embrionárias viáveis em vacas doadoras.

3. Realizar a primeira fase da MAS em relação ao marcador FSHRAlu1 mapeado próximo ao gene do receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR)
4. Uma vez confirmado os achados de associação entre marcadores e reprodução, repassá-los aos técnicos, o que permitirá a implementação da terceira fase da MAS.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Processo de Seleção dos Rebanhos Aberdeen Angus e Nelore

3.1.1 Origem e seleção do gado Nelore

A origem do gado Nelore está nas tribos arianas que invadiram a Índia, desde 5.000 a.C., deixando muitas raças diferentes de gado por onde passavam. No roteiro das migrações daquelas tribos, encontram-se diversas raças branco-cinza do norte indiano que foram surgindo no correr dos milênios, tais como a Nagon, a Rath, a Gaolao e a raça-mãe: a Hariana. A Índia chegou a ter mais de 500 "reinos", comandados por marajás e eles apreciavam diferenciar até o gado que possuíam daquele dos vizinhos. O livro "Nelore: a vitória brasileira" (1994) mostra que o Nelore moderno é fruto da influência de 14 outras raças.

As primeiras de importações de animais da raça Nelore datam de 1874, adquiridos de um zoológico de Londres. Com uma importação maior no ano de 1930, o Nelore ganhou um impulso, chegando à caracterização racial que seria homologada pelo Registro Genealógico em 1938. Também nesse tempo, o Nelore brasileiro consolidava uma fisionomia um pouco diferente do original. Atualmente existem 3.100 associados praticando o registro genealógico. Desde 1939 já foram registrados 6.556.703 animais, sendo do total dos zebuínos

registrados 74,82% é para o Nelore padrão e 7,52% Nelore mocho (ABZC, 2008).

3.1.2 Origem e seleção do gado Aberdeen Angus

A origem do gado Angus tem praticamente três séculos de melhoramento genético, sendo que a seleção teve início em torno de 1800. Surgida na Escócia a sua denominação vem dos condados onde se desenvolveu que já eram famosos pela qualidade da carne, rapidez na engorda, rusticidade e habilidade materna. Em 1862 foi criado o primeiro "Herd Book of Angus". O Aberdeen Angus chegou aos Estados Unidos em 1873 e a produtividade e a qualidade de sua carne foi tão surpreendente que a raça logo se espalhou por todo o país. Em 1879 animais Aberdeen Angus puros registrados no "Herd Book" inglês foram importados pela Argentina, ingressando pela primeira vez na América Latina.

Em 1906, chega o primeiro reprodutor Aberdeen Angus no Brasil, oriundo do Uruguai. Em 1914, ocorreu a importação de cinco matrizes da Inglaterra, registrando o primeiro produto nacional. Com influência do desenvolvimento atingido nos países do Prata, a raça Angus se expandiu rapidamente no Rio Grande do Sul, como demonstram os registros puros de origem (PO) e puros por cruzamento (PPC).

3.2 Variabilidade na Resposta à Superovulação

A MOET tem sido amplamente utilizada em vários continentes, tanto em centrais de reprodução quanto em propriedades adaptadas para este fim. Segundo os dados da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões (SBTE), desde 1995 houve um aumento de 20% e 60% respectivamente para os números de transferências e embriões congelados. Os programas de superovulação são realizados em diversas partes do mundo, tendo, cada região, a sua peculiaridade, sendo necessário observar fatores de influência na resposta a superovulação. Lerner et al. (1986); Kanitz et al., (2002); Mapletoft et al., (2002); Hasler, (2003) citam que as distintas respostas aos programas de superovulação são em decorrência de fatores intrínsecos e

extrínsecos às doadoras. Estes fatores podem ser em decorrência da idade das doadoras, sendo que as jovens possuem melhor poder de responder aos protocolos de SOV. Em adição, os resultados de SOV podem ser influenciados por efeitos da fase do ciclo estral, condições ovarianas, período de lactação, perfil hormonal, tratamento superovulatório, método de colheita, ano e estação do ano no tratamento, condições nutricionais, número de SOV consecutivas, intervalo entre as consecutivas SOV, e a saúde da doadora durante o programa. Bastidas e Randel (1987) indicaram uma redução no número de embriões viáveis no período de inverno, na raça Nelore, enquanto Callesen et. al. (1995); Hansen et al. (2002); Chebel (2008), observaram esta mesma redução no período de verão, na raça Holandesa.

As raças Nelore (Indiana) e Aberdeen Angus (Européia) são, segundo a Associação Brasileira de Criadores de Zebu e Associação Nacional de Criadores – Herd Book Collares, respectivamente, as raças com maior número de registros nestas associações. Segundo estas mesmas associações foram coletados no ano de 2006, no Nelore padrão PO, 53.016 embriões, transferidos 48.542 e congelados 4474, e para o Nelore mocho foram coletados 2237, transferidos 1980 e congelados 257. Ainda foram realizadas 474 coletas de embriões, 453 transferências e 21 embriões congelados de fêmeas puras por cruz. A Associação Nacional de Criadores - ANC (2008) informou que, na raça Aberdeen Angus, de janeiro a dezembro do ano de 2005, foram coletados 4.674 embriões, sendo 3.492 viáveis e 2.357 implantados e, ainda nesse ano, foram congelados 1.036 embriões. No ano de 2006 ocorreu uma pequena queda nos números, sendo 3.811 coletados, 2.830 viáveis, 1.830 implantados e 996 congelados.

A regulação do desenvolvimento folicular é complexa e envolvem fatores endócrinos, parácrinos e autócrinos, que são orquestrados de maneira estágio-específica a fim de controlar vários processos incluindo proliferação e diferenciação de células foliculares, esteroidogênese, angiogênese/vascularização, remodelagem da membrana basal e matriz extracelular e atresia/apoptose (SILVA e PRICE et. al., 2002; WEBB et al., 2003; FORTUNE et. al., 2004).

Fortune (1994); Ginther et al. (1996) citam que o padrão de onda de desenvolvimento folicular se refere ao período do crescimento sincronizado de um grupo de folículos antrais.

O padrão de ondas de desenvolvimento folicular tem sido demonstrado em todas as espécies e raças nas quais tem sido examinado (GINTHER et al., 1989; RHODES et al., 1995; FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000). No bovino, a emergência de uma onda folicular é caracterizada por um repentino crescimento (dentro de 1 a 2 dias) de mais de 20 pequenos folículos que são inicialmente detectados, por ultra-sonografia, com diâmetros de 3 a 4mm (SAVIO et al., 1988; GINTHER et al., 1989; CARVALHO et al., 2007). Por cerca de 2 dias, a taxa de crescimento é similar entre os folículos da onda. Em espécies monovulatórias como a bovina, um folículo é selecionado do grupo de recrutados e adquire a capacidade ovulatória, enquanto os folículos subordinados entram em atresia. O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e desempenha um papel ativo na supressão do crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (FORTUNE, 1994; GINTHER et al. 1996). Uma elevação nas concentrações plasmáticas de FSH estimula o recrutamento folicular e a emergência da onda folicular (MAPLETOFT et al. 2002). Em bovinos, os folículos podem atingir o diâmetro de 8mm, independentemente do suporte de LH, mas o crescimento além de 9mm requer LH endógeno ou FSH exógeno (GONG et al., 1996). Baseado nestas informações, Fortune et.al. (2001); Ginther et al. (2001), consideraram que os folículos são dependentes de FSH até a ocorrência da dominância e após se tornam dependentes do hormônio luteinizante.

Os folículos podem crescer de tamanho na ausência de gonadotrofinas ou na presença de muito pouca concentração (CAMPBELL e WEBB; 1995; WEBB e ARMSTRONG, 1998). Entretanto, estudos do crescimento folicular utilizando ultra-sonografia têm demonstrado que pequenos folículos de 2,0 mm exibem ondas de crescimento, sugerindo que estes são sensíveis à resposta as gonadotrofinas (GINTHER et al. 1996). Estas observações foram confirmadas por Singh et al. (2004) ao verificarem que a resposta a superovulação foi duas vezes mais alta nas vacas que apresentavam um maior número total de folículos ≥ 2.0 mm.

Em ciclos estrais de duas ou três ondas, a emergência da primeira onda folicular ocorre consistentemente no dia da ovulação (dia 0). A emergência da segunda onda ocorre no dia 9 ou 10 para ciclos de duas ondas, e no dia 8 ou 9 para ciclos de três ondas (ou seja, 1 ou 2 dias mais cedo). Em ciclos de três ondas, uma terceira emerge no dia 15 ou 16. Sucessivas ondas foliculares permanecerão anovulatórias até que a luteólise ocorra (BERGFELT et al., 1991). O folículo dominante presente no início da luteólise se tornará o folículo ovulatório, e a emergência da próxima onda é atrasada até o dia da ovulação subsequente. O corpo lúteo começa a regredir mais cedo nos ciclos de duas ondas (dia 16) que nos ciclos de três ondas (dia 19) resultando conseqüentemente num ciclo estral mais curto (20 dias vs 23 dias respectivamente). Portanto, para Mapletoft et. al. (2000), a duração do ciclo estral pode fornecer uma idéia do número de ondas foliculares que uma determinada vaca tem, dentro de cada ciclo.

Monniaux et al. (1983); Burns et al. (2005) estudando a evidência de variações no número de folículos em crescimento, por onda, observaram uma alta variação na reserva destas estruturas ovarianas individuais, possuindo ainda grandes diferenças no número de folículos não ovulatórios, por ciclo estral. Estas observações foram evidenciadas por Ireland et al. (2007), que verificaram a correlação entre o número de folículos antrais por onda de crescimento com a resposta a superovulação. Os estudos destes pesquisadores mostraram que vacas com alto número de folículos durante as ondas de crescimento folicular respondem melhor a superovulação e produzem mais embriões capazes de se desenvolverem até blastocistos, comparados àqueles com relativo número baixo de folículos.

Assim, o começo do processo de tratamento superovulatório deve ser coincidente com o início do crescimento da segunda onda folicular a qual ocorre entre o 8º e 12º dia após o estro (BÓ et.al., 2004).

Anteriormente, Singh et al. (2004) observaram pelo uso da ultrasonografia diferenças entre animais no número de folículos por onda de crescimento. Encontraram, também, assim como confirmado por Ireland et al. (2007), uma repetibilidade deste comportamento nas ondas subsequentes. Singh et al. (2004) também correlacionaram o número de folículos com a capacidade de responder à SOV.

A superovulação está diretamente relacionada à capacidade dos ovários responderem aos estímulos exógenos do Hormônio Folículo Estimulante (FSH). Para tanto, segundo Monniaux et al. (1983); Cushman et al. (1999); Roover et al. (2005); Burns et al. (2005); Ireland et al. (2007) a resposta ao estímulo hormonal está diretamente ligada ao número de folículos primários e terciários. Segundo estes autores as vacas podem ser classificadas em baixa, média e alta, conforme a capacidade de estimular o crescimento de folículos.

Os ovários de bovinos contêm um grande conjunto de folículos primordiais ao nascer, porém, menos de 0,1% destes folículos amadurecem durante a vida reprodutiva da vaca (ERICKSON et al., 1976), em consequência de muitos destes folículos, que entram conjuntamente em crescimento, são destinados ao processo de atresia. Com o tratamento com gonodotropinas, em um curto período, podem-se estimular os folículos antrais a crescer, a atingir o tamanho ovulatório e a ovular. Neste caso, ocorre uma variabilidade significativa em termos de resposta ao tratamento superovulatório. Rouillier et al. (1996) observaram taxas de ovulação em folículos entre 0 e 40 após 4 ou 5 dias de SOV. Monniaux et al. (1983) sugeriram que o número de folículos responsivos ao tratamento superovulatório com FSH fica em torno de 70% do conjunto que iniciou a fase de recrutamento e seleção. Esta resposta é similar em ambos os ovários, segundo Cushman et al. (1999). Monniaux et al. (1983) observaram, por cortes histológicos nos ovários, uma grande diferença no número de células germinativas entre os indivíduos, sugerindo que a capacidade reprodutiva e a resposta à superovulação podem ser explicadas por estes achados.

Roover et al. (2005) caracterizaram vacas conforme a população de folículos pré-antrais em, baixa, média e alta, prévio à estimulação com FSH exógeno, com o objetivo de fazer uma associação à resposta provocada por este hormônio e a punção folicular. Concluíram que vacas que produziram um maior número de oócitos repetiram este fato nas punções subseqüentes, da mesma forma vacas que tiveram insucesso. Das 23 vacas classificadas como de baixa eficiência, ou seja, produzindo cinco ou menos folículos por punção, 21 foram incluídas, já na primeira punção e todas as 23 após a segunda. Da mesma forma, em relação à qualidade dos oócitos e à capacidade de se desenvolverem até blastocistos, após o processo da fertilização *in vitro*, as

vacas classificadas como de alta produção de folículos apresentaram, também, uma maior taxa de blastocistos transferíveis.

Fato interessante observado por estes e outros autores foi a repetibilidade do número de folículos durante as ondas de crescimento folicular, dentro do ciclo e nos ciclos subseqüentes, permanecendo como características individuais por pelo menos um ano. Adicionalmente, Katska e Somorag (1984) acreditam que o crescimento de folículos pré-antrais e antrais permanece constante até a idade de 7 a 9 anos.

Para Peixoto (2004), há um importante efeito genético sobre as variações das respostas superovulatórias em doadoras Nelore e, para confirmar esta hipótese, Peixoto et al. (2006) analisaram o efeito de repetições de coletas embrionárias, em zebuínos, sobre o número de estruturas recolhidas. Observaram que a média das estruturas, na segunda e terceira superovulações, não foi diferente daquelas obtidas na primeira estimulação ovariana.

O papel do FSH nos folículos pré-antrais e no início do crescimento do folículo antral não estão claramente definidos, mas parecem dependentes de receptores do hormônio folículo estimulante (FSHR) que estão localizados, especificamente, nas células da granulosa e seu RNA mensageiro pode ser detectado dentro do folículo, com somente uma ou duas camadas de células da granulosa (XU et al. 1995). No entanto, gonodotrofinas não têm sido observadas no requerimento para a ativação dos folículos primordiais, em bovinos, durante a cultura de cortes ovarianos (WANDJI et al. 1992). Em contraste, folículos pré antrais apresentaram em cultura, aumento de crescimento em resposta ao FSH (RALPH et al. 1995). Gutierrez et al. (2000); Webb et. al. (2003), em seus estudos, desenvolveram técnicas que puderam sustentar os folículos pré-antrais por longo período em cultura, assim como o desenvolvimento do antro. Estes sistemas foliculares foram responsivos aos efeitos dos estímulos do FSH e a um numero de fatores de crescimento, incluindo o IGF-I. Estudos realizados por Fortune et al.(2004) demonstraram a importância do fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) no mecanismo de dominância. Durante o desenvolvimento folicular, parte das ações do IGF-I está envolvida na estimulação da célula da granulosa, na

proliferação da teca e na esteroidogênese, responsável pela biodisponibilidade de receptores de FSH.

Os receptores de LH (LHR) das células da granulosa parecem estar relacionados à dominância folicular. A comparação dos padrões gênicos observados por hibridização *in situ* em folículos antrais bovinos recrutados e selecionados indicou que a seleção está associada ao início da expressão do gene LHR em células da granulosa (BAO e GARVERICH, 1998). O RNAm do LHR foi detectado por RT-PCR em células da granulosa de folículos com diâmetros entre 7 e 8mm por Beg et al. (2002) e nas mesmas células de folículos menores de 5mm por Robert et al. (2003), porém Xu et al. (1995) não detectou LHR antes dos 9mm de diâmetro, pela técnica de hibridização *in situ*. Nogueira et al. (2006) observaram a expressão do LHR em células da granulosa de folículos antrais maiores ou iguais a 8mm na raça Nelore. Os autores consideraram que a expressão do LHR ocorreu depois da seleção do folículo dominante que, nesta raça, ocorre após 6mm de diâmetro.

Fortune et al. (2004) sugeriram que há fortes evidências de que o sistema IGF desempenha um papel crítico na seleção dos folículos. Os IGFs são sinérgicos ao FSH na promoção de crescimento folicular e produção de estradiol. Spicer (2004) observou que os IGF I e II ativam os receptores de IGF tipo I e II, ambos presentes em células da granulosa e da teca. Verificou também que os níveis de IGF total não foram diferentes no fluido folicular de folículos dominantes em relação a folículos subordinados, mas os níveis de IGF-I livre foram maiores no fluido folicular do maior folículo comparado ao segundo maior da mesma onda, antes mesmo da observação de diferenças na concentração de estradiol ou do diâmetro (BEG et al. 2002).

Fetni et al. (2002) buscando entender o processo de crescimento e regressões foliculares compararam a expressão gênica das células da granulosa de folículos de diferentes tamanhos (folículos menores que 4 mm, folículos dominantes e folículos pré-ovulatórios) e observaram que os cDNAs identificados nos diferentes folículos correspondem a proteínas distintas. Os autores concluíram que a dominância folicular e a ovulação envolvem a expressão diferencial de genes específicos.

Xu et al. (1995) e Bao et al. (1997) sugeriram, em bovinos, a ocorrência de iniciação simultânea de expressão dos genes P450ssc e P450arom nas

células da granulosa em folículos com mais de 4-6mm de diâmetro está associada com o recrutamento folicular em bovinos. Posteriormente os folículos com 6-9mm de diâmetro expressam estes genes nas células da granulosa, enquanto que alguns folículos de 4-6mm, aparentemente recrutados, mas não expressaram os genes P450ssc e P450arom. O número de folículos que expressam estes genes durante os estágios iniciais de recrutamento é similar ao número de folículos que continuam o crescimento em estágios mais avançados.

3.3 Diferenças na Fisiologia da Reprodução em *Bos indicus* e *Bos taurus*

O número de ondas, por ciclo, o crescimento folicular e a dominância são semelhantes entre as fêmeas *Bos indicus* e *B. taurus* (BÓ et al. 1993; BARROS et al. 1995; FIGUEREDO et al. 1997; BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al. 2007). No entanto, Randel (1989) sugeriu a ocorrência de diferenças morfológicas e endócrinas mesmo que o padrão de crescimento folicular seja semelhante. Diâmetros máximos para o folículo dominante de 10 a 12 mm foram encontrados em fêmeas *Bos indicus* e para o corpo lúteo 17 a 21 mm, valores menores aos observados nas fêmeas *Bos taurus*. Para estes, foram relatados diâmetros de 14 a 20 mm e 20 a 30 mm, respectivamente, para os folículos dominantes e corpo lúteo (GINTHER et al. 1989, BÓ et al., 1993; FIGUEREDO et al. 1997). Randel (1989) indicou que o menor tamanho do corpo lúteo observado nas vacas *Bos indicus* seria em detrimento da menor resposta ao estrógeno, menor pico pré-ovulatório de LH, e diferenças endócrinas relacionadas aos eventos que induzem a ovulação. Concentrações de insulina ovariana e do fator de crescimento semelhante a insulina foram detectados em níveis diferentes nas duas subespécies. Buratini Jr. et al. (2000) induziram o aumento de concentração de IGF-I no plasma e o número de pequenos folículos menores que 5 mm, após o tratamento com somatotrofina bovina (bST) em novilhas *Bos indicus*. Estes achados correspondem aos observados por Gong et al. (1991) em animais *Bos taurus*. Segerson et al. (1994) sugeriram que a população folicular na subespécie *Bos indicus*

apresenta-se com maior número de folículos menores de 5 mm emergindo no início da onda de crescimento folicular em relação aos animais *Bos taurus*.

Alvarez et al. (2000) concluíram que o elevado nível de IGF-I, associado à baixa concentração de FSH, permite a formação de folículo dominante menos persistente, levando a uma maior quantidade de ondas foliculares entre os ciclos estrais. Simpson et al. (1994) observaram uma maior concentração plasmática de IGF-I e menor concentração de FSH em vacas da raça Brahman do que em fêmeas da raça A. Angus. Neste caso, segundo estes autores, poderia ser explicado porque animais *Bos indicus* são mais sensíveis ao FSH exógeno, podendo-se utilizar 50% da dose recomendada para *Bos taurus* (BARUSELLI et al. 2006).

3.4 Seleção Animal por Marcadores Moleculares

3.4.1 Marcadores moleculares

Os programas de seleção animal comumente são baseados no fenótipo individual, sendo na maioria dos casos, uma indicação não precisa do genótipo. Na maioria dos programas de avaliação genética, os critérios de seleção que são estabelecidos estão relacionados às características de desempenho ponderal, em detrimento às de natureza reprodutiva, mesmo sendo a eficiência reprodutiva um índice de peso na avaliação do sistema produtivo, segundo Fries (1999). Isto se deve ao fato de que a variação genética depende da variação alélica em um grande número de locos e a expressão gênica destes locos é altamente afetada por fatores do meio ambiente. Neste caso, a variação da característica ou a variação genética é de natureza quantitativa, sendo os locos individuais que afetam a expressão, denominados QTLs (locos para característica quantitativa) (GELDERMANN, 1975).

Baixas herdabilidades para a maioria das características de fertilidade, como taxa de parição (0,19); dificuldade ao parto (0,18); idade ao primeiro parto (0,19) e duração da gestação (0,26) foram verificadas por Splan et al. (1998) e Pereira et al. (2002).

Os marcadores moleculares podem fornecer subsídios para a detecção de genes candidatos, cujos produtos tenham efeito sobre a eficiência produtiva e reprodutiva, desta forma permitir a seleção precoce, momentos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante a fase embrionária pré-implantação, podendo ser inclusive incorporada em programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética e produção animal (GARCIA, 2001).

Estes marcadores segregam de modo mendeliano e estão relacionados a características monogênicas ou apresentam distribuição compatível com as esperadas em características poligênicas, como as ligadas à reprodução, podendo ser protéicos (antígenos e isoenzimas) ou seqüências de DNA de genes conhecidos ou de fragmentos de seqüência com função desconhecida (FERREIRA e GRATTAPALIA, 1998; DAVIS e DeNISE, 1998).

Os marcadores de DNA apresentam maiores níveis de polimorfismos que os protéicos, pois permitem a obtenção de dados de regiões não transcritas e a identificação de mutações silenciosas (AITTOMAKI et al., 1995). Contam ainda, com a facilidade de manipulação e a maior estabilidade do DNA, transformando-os em material de eleição para comparações biológicas e como marcadores para caracteres de produção. A utilização dos marcadores moleculares no melhoramento animal diminui os inconvenientes da seleção baseada em análises exclusivas de fenótipo, permite a identificação e caracterização genética de populações, raças e espécies, e possibilita estudos de genealogias e controle de filiação (MACHUGH, 1996).

A utilização da Seleção Assistida por Marcadores (MAS) permite a eliminação de genótipos desfavoráveis em uma única geração, reduzindo os custos dos testes de progênie, facilitando os esquemas de acasalamento, maximizando os efeitos heteróticos e possibilitando a identificação de efeitos transgressivos em raças sintéticas. A MAS é particularmente útil para a seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração, na seleção de indivíduos, cujo sexo não permite a expressão da característica, ou para aquelas expressas tardiamente na vida do animal (WEIMER, 2003).

A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo, sendo conseqüentemente controlado por vários genes, cujos efeitos se somam para construir o fenótipo final. Entretanto,

alguns genes apresentam papel majoritário na expressão dessas características por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados assim, como genes principais (MONTALDO e MEZA-HERRERA, 1998).

As duas principais metodologias utilizadas para a identificação de marcadores relacionados à manifestação da característica de interesse em programas de seleção são a abordagem do gene principal (ou gene candidato) e a identificação de QTL através do mapeamento genético (GARCIA, 2006). Essas metodologias apresentam como desvantagem a necessidade de conhecimento científico prévio acerca do gene de interesse, pois sem isso torna-se um trabalho oneroso e demorado.

Os estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo ou em elementos regulatórios flanqueadores a estas regiões (FITZSIMMONS et al., 1998; LIEFERS et al., 2002; ALMEIDA, 2003). A técnica de identificação de marcadores moleculares, combinados a locos para características quantitativas, possibilita a identificação, pelo genótipo do marcador molecular, do fenótipo da característica produtiva (Davis e DeNise, 1998). Por se tratar de uma ferramenta mais específica, a abordagem do gene candidato, quando possível de ser realizada, pode fornecer resultados mais satisfatórios do que o uso de QTLs. Em ambos os casos, os resultados obtidos, na abordagem do gene candidato e no uso de QTLs, podem ser utilizados na seleção assistida por marcadores (MAS).

Segundo Dekkers et al. (2001) a MAS é mais eficaz quando está baseada em marcadores que estejam em desequilíbrio de ligação com o QTL. Isto inclui tanto marcadores dentro do QTL, quanto aqueles com forte ligação ao QTL, pois, desta forma, as associações encontradas entre os genótipos dos marcadores moleculares e a característica de interesse, estarão segregando para as gerações seguintes como se fosse uma única unidade molecular e não ao acaso como o esperado para duas unidades separadas.

Estes programas consistem de três fases, a primeira, de detecção, procura detectar marcadores moleculares associados a um gene candidato ou a um loco quantitativo, e os efeitos dos alelos do marcador na característica desejada são mensurados; a segunda, de validação, os marcadores

previamente detectados são re-avaliados em outras populações; e a terceira, de implementação, os marcadores identificados como associados à característica de interesse são utilizados para prever o mérito de indivíduos, na população (DAVIS e DENISE 1998).

Na produção animal, as decisões sobre as características a serem selecionadas devem ser baseadas nos aspectos econômicos, para que o produto genético possa ser usado comercialmente e, assim, o procedimento de seleção, certamente será uma combinação da seleção assistida por marcadores envolvendo diferentes QTLs que possam afetar uma mesma característica (SPELMAN e BOVENHUIS, 1998).

Dentre os diversos marcadores de DNA, dois tipos têm tido ampla utilização, os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) e os microssatélites, ou STRs (repetições curtas em "tandem"). Os primeiros são variações de seqüências de DNA que ocorrem quando um nucleotídeo é alterado na seqüência genômica. Existem em grande quantidade e, normalmente, consistem de dois alelos que se diferenciam por um par de bases. Essa diferença pode ser detectada através de amplificação por PCR e o uso de uma enzima de restrição específica, no caso da mutação criar ou eliminar um sítio para esta enzima, ou pela introdução de um sítio de restrição forçado, através do seqüenciamento e pela técnica de micro-arranjos.

Os STRs são pequenas seqüências não codificadoras, de 1 a 6 pares de bases, repetidas em "tandem" e cujo polimorfismo resulta do número variável de elementos repetitivos, normalmente inferiores a 100 repetições (TAUTZ, 1993). Por apresentarem alto polimorfismo, co-dominância, facilidade de detecção e de identificação dos genótipos e alelos, por PCR, e por ocorrerem com grande freqüência ao longo do genoma da maioria dos organismos eucarióticos, tem sido usado extensivamente para caracterização de raças, estudos de evolução e filogenias, mapeamento genético, e no auxílio de programas de melhoramento.

Os STRs podem localizar-se em diferentes regiões genômicas (exons, introns, 5' UTR, 3' UTR) atuando na organização da cromatina, na regulação da atividade gênica, no mecanismo de recombinação, na replicação do DNA, no controle do ciclo celular e no reparo de bases mal pareadas (LI et al., 2004) e de acordo com Comings (1998), aqueles em regiões promotoras favorecem a

conformação DNA-Z, possibilitando o acesso de fatores de transcrição. Este autor propôs que microssatélites exerçam efeito sobre a expressão dos genes aos quais eles estão associados, sendo esta ação dependente do tamanho da repetição. Isso se baseia na observação de que seqüências ricas em purinas e pirimidinas alternadas, (CA)_n, como os microssatélites, apresentam a capacidade de formar o DNA-Z em condições fisiológicas. Para Schroth et al. (1992) a formação de DNA-Z pode influenciar a expressão do gene por facilitar o contato com fatores de transcrição, pois esta conformação expõe as bases da molécula. Como há uma tendência para as seqüências de DNA-Z não se distribuírem ao acaso, e sim, se concentrarem nas regiões de iniciação da transcrição, os microssatélites por se localizarem também nestas regiões, teriam um papel potencial na regulação gênica.

Marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento, em bovinos, foram descritos em genes de diversos hormônios e receptores hormonais (PRINGLE et al., 1997; CAMPAGNARI, 2002; LIEFERS et al., 2002; OLIVEIRA et al. 2002; ALMEIDA, 2003; LI et al., 2004; CURTI et al., 2005; DISTASIO et al., 2005; DUARTE et al. 2005; MARSON, 2005; WEIMER et al. 2007) e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas, como calpaína e calpastatina relacionadas à maciez da carne (BARENDSE, 1997; PAGE et al., 2002; GRISART et al., 2004, CASAS et al., 2005).

A validação dos efeitos desses marcadores, nas distintas populações de bovinos e/ou nos rebanhos existentes no Brasil, faz-se necessária, objetivando a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos com essas manifestações, que ainda estão longe de serem simples e diretamente explicados. Entretanto as pesquisas destinadas ao estudo dos genes em animais domésticos, viabilizada por diferentes técnicas de biologia molecular, vem permitindo avaliar, através de diferentes marcadores moleculares, as propriedades genéticas de populações e identificar genes importantes na determinação das características de interesse, agregando informações aos processos tradicionais de seleção animal e desta forma incrementando o ganho genético das próximas gerações (GARCIA, 2006).

Trabalhos anteriores, coordenado pela Professora Dra Weimer, verificaram, na fase de detecção da MAS, a associação de vários marcadores moleculares com a eficiência reprodutiva, em rebanhos do Rio Grande do Sul.

Para tanto foram analisados microssatélites e/ou SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) ligados aos genes LH β (BM3004, ILSTS002, TGLA227), FSH β (ILSTS027, BM4325, MBO22), ESTR (MM12, ETH225) IGF1R (HEL5, TGLA122, AFZ1), Inibina α (BMS1824), GABA R (UW53), NPYR (URB002), GH (HEL10), Leptina (Lep*Sau3A1A/B*, Lep*Sau3A11/2*, Lep*Kpn2I*, Lep*BsaAI*, Lep*HphI*, LepT945M, BM1500, IDVGA-51, RM088, BM1074, BM6315, BMS3013) e LEPR (BM7225, BMS694, BM2145). O resumo das associações observadas encontra-se na Tabela 1 abaixo.

Tabela 1: Resumo das associações observadas em bovinos do Rio Grande do Sul.

Gene	Raça	Marcador	Referência
IGF 1 R	B. Ibagé	Homozigoto alelos longos HEL5 > IEP	OLIVEIRA et al., 2005
IGF 1 R	B. Ibagé	Homozigoto alelos curtos AFZ1 > IEP	OLIVEIRA et al., 2005
LH β	B. Ibagé	<i>ILSTS002*135</i> > IEP	WEIMER et al., 2007
LH β	B. Ibagé	Heterozigotos <i>BMS3004</i> < IEP	WEIMER et al., 2007
FSH β	B. Ibagé	<i>BM4325*101</i> < IEP	DUARTE et al., 2005
Leptina	B. Ibagé	<i>IDVGA-51*181</i> > IEP	ALMEIDA et al., 2003
Leptina	B. Ibagé	<i>LEPSau3AI*+</i> > IEP	ALMEIDA et al., 2003
Leptina	B. Ibagé	<i>LEPSau3AI</i> +/- heterozigotos > Peso ao 1º parto	ALMEIDA et al., 2003
Leptina	G Geral	<i>IDVGA-51*181</i> + freq vacas sub-férteis <i>IDVGA51*173</i> e <i>IDVGA51*177</i> + freq vacas férteis Alelos curtos (173-177 pb) + freq em vacas férteis	SILVEIRA, 2007
LH β	G Geral	<i>ILSTS002*137</i> + freq vacas sub-férteis	SILVEIRA, 2007

Assim, Weimer et al. (2007) para o gene LH β , detectaram associação positiva entre os marcadores ILSTS002 e BMS3004 e o intervalo entre partos (IEP). Animais portadores de um alelo *ILSTS002*135* apresentaram um IEP de 39 dias maior, em relação aos outros animais. Os heterozigotos, no loco BMS3004, apresentaram um IEP em torno de 35 dias menor, observações semelhantes as de Machado (1999). Em relação ao gene FSH β , Duarte et al. (2005), demonstraram que animais portadores do alelo *BM4325*101* apresentavam IEP mais curto. No caso do gene IGF1R, Oliveira et al. (2002), observaram maior IEP nos homozigotos para alelos longos, no loco HEL5 e menor IEP nos homozigotos para alelos curtos no AFZ1. No gene da Leptina, Almeida et al. (2003) verificaram que os alelos *IDVGA51*181* e *LepSau3A1*2* aumentaram o IEP.

Silveira (2007) executou a segunda fase da MAS, ou seja, realizou a validação das mesmas em outras populações. Para tanto trabalhou com uma população híbrida e outra Aberdeen Angus PO em um rebanho altamente selecionado para a fertilidade. Este autor não encontrou associação para o IEP nos sistemas estudados para o rebanho Aberdeen Angus, sendo, segundo o autor, devido ao alto processo seletivo sofrido por este rebanho, retirando desta forma os alelos deletérios. Já para o rebanho híbrido, houve associações, porém em alguns alelos distintos encontrados por outros autores.

Passos et al. (2007) avaliando, na raça Brangus- Ibagé, a expressão do gene LEP na gordura do tecido subcutâneo, em animais previamente descritos como tendo genótipos favoráveis ou desfavoráveis em diferentes marcadores, verificaram que os portadores do alelo *IDVGA51*181* apresentaram um alto nível de LEP mRNA e um maior IEP. Chehab et al., (2002) e Moschos et al., (2002) também concluíram que a leptina está associada com os eventos reprodutivos.

As pesquisas vêm buscando o entendimento da dinâmica e dominância folicular, e fatores bioquímicos envolvidos nestes importantes processos reprodutivos. O estudo de genes, vinculados a reprodução, vem agregar conhecimentos e procurar responder alguns dos porquês das diferenças individuais na fertilidade e nas respostas aos tratamentos hormonais para a indução da ovulação e superovulação.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram analisadas as respostas à superovulação de 59 doadoras de embrião da raça Aberdeen Angus e 60 da raça Nelore, sendo todos estes animais puros de origem e registrados nas suas respectivas associações. A seleção das doadoras foi baseada nas suas características morfológicas e por genealogia. Foram utilizados animais que participaram em, pelo menos, três programas de coleta de embriões, tendo-se obtido a média das estruturas viáveis recolhidas. Os animais foram divididos em dois grupos, conforme o número médio de estruturas colhidas, sendo denominados: “Grupo Alta Resposta”, constituído por 30 fêmeas doadoras, de cada raça, que tiveram estruturas recolhidas acima da média mundial (6,0 estruturas viáveis por coleta), conforme os dados estatísticos da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS, 2005); e “Grupo Baixa Resposta”, formado por 30 animais da raça Nelore e 29 da raça Angus que tiveram as suas médias de estruturas viáveis recolhidas iguais ou inferiores a média mundial. Os dados obtidos das médias das estruturas recolhidas foram adquiridos junto a profissionais da área e que possuíam pelo menos 10 anos de experiência em programas de transferência de embriões, dando-se preferência para que os dados de coleta de embriões fossem oriundos do mesmo técnico ou do mesmo grupo de trabalho. As decisões em relação à sincronização da onda de

crescimento folicular, protocolos de superovulação, dose hormonal, tipo de hormônios utilizados, foram de critério do Veterinário, o qual indicou o tratamento para aquele momento, podendo ou não ter sido repetido nas coletas subseqüentes. Havendo resposta ao tratamento, o protocolo era mantido, caso contrário, o mesmo era modificado. Vacas com repostas muito diferentes de uma coleta para outra não foram incluídas no trabalho.

Os animais da raça Nelore foram obtidos de uma única central de transferência de embriões, localizada no Estado do Mato Grosso do Sul, enquanto que as amostras de Aberdeen Angus foram oriundas de 05 diferentes propriedades localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

4.2 Coleta de Amostras e Extração de DNA

Os DNAs foram preparados a partir de células sangüíneas; as amostras de sangue foram recolhidas em tubos contendo anticoagulante à base de Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA), refrigeradas à temperatura de -5°C e remetidas ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Veterinária da ULBRA, localizada no município de Canoas/RS, região metropolitana de Porto Alegre. Ao chegar no laboratório, foram processadas as extrações dos DNAs, utilizando-se a técnica descrita por Miller et al. (1992) como metodologia padrão.

Foram investigados, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), marcadores moleculares microssatélites e/ou polimorfismos de um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphisms, SNPs), localizados nos mesmos cromossomos e próximos aos genes envolvidos com o recrutamento e crescimento folicular, a saber: LH β , FSH β , IGF-IR e Leptina, que em estudos anteriores, mostraram estar associados a um melhor desempenho em vacas da raça Brangus ou ainda em outras britânicas, no Estado do Rio Grande do Sul (STEIGLEDER et al. 2004; BASTOS et al. 2003; DUARTE et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2005; ALMEIDA et al., 2003; WEIMER et al., 2007).

Adicionalmente investigou-se o gene FSHR, relatado como associado a melhor performance produtiva em animais da raça (MARSON, 2005).

4.3 Determinação dos Genótipos

Os microssatélites estudados foram investigados através da amplificação do DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR), com técnica padrão e com “primers” e temperaturas de anelamento específicas (Tabela 2). As reações tiveram um volume final de 25µl e contiveram 50ng de DNA.

Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10,5 %, não desnaturante, com tampão de TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) pH 8,3, 300 V, 10 mA por aproximadamente 24 hs (Lahiri et al., 1997). Os fragmentos foram analisados, após a coloração com nitrato de prata, usando para comparação o marcador de peso molecular de 25 pb (Promega).

Para a análise do SNP *LepSau3A1* o produto de amplificação, que apresenta dois fragmentos (400 e de 690 pares de bases, pb) foi clivado com a endonuclease *Sau3A1* (Promega), conforme o protocolo do fabricante. A endonuclease cliva os dois fragmentos permitindo a identificação de dois polimorfismos: no fragmento de 400 bp, a ausência do sítio de restrição corresponde ao alelo A, enquanto no alelo B, a *Sau3A1* gera dois produtos, de 310 e 90pb. O fragmento de 690 pb é clivado nos portadores do alelo 2, produzindo produtos de 470 e 220 bp, sendo o alelo 1 correspondente à ausência de sítio de restrição. Para o estudo do SNP FSHR o amplicon de 306 pb foi clivado com a enzima *Alu I* (New England), conforme protocolo do fabricante, gerando fragmentos de 243 e 63 pb nos portadores do alelo C e de 193, 63 e 50 pb naqueles do alelo G.

Os produtos de clivagem foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10,5 %, não desnaturante, com tampão de TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) pH 8,3, 300 V, 10 mA por aproximadamente 24 hs (LAHIRI et al., 1997).

Tabela 2: Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo, seqüências dos primers, tamanhos esperados dos produtos de amplificação em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (TA) e referências.

Marcadores	Cromossomo.	Gene Alvo	Seqüência do Primers	Produtos (pb)	TA	Referências
BM4325	15	FSH β	F- 5'AGA GTC AGA CAG GAC TGA GCG 3' R- 5'CTG TAA CTT GCA AAT GCA AAT GTC TCG 3'	97-117	64-54°C ^a	KAPPES et al., 1997 STONE et al., 1997
ILSTS002	18	LH β	F- 5'TCT ATA CAC ATG TGC TGT GC 3' R- 5'CTT AGG GGT GAA GTG ACA CG 3'	123-137	54°C	KEMP et al., 1992
BMS3004	18	LH β	F- 5'GGA CAG AGG AGC CTG GTT G 3' R- 5'AGT TGC GTT GTT CAT CAT TCC 3'	129-138	56°C	STONE et al., 1996 KAPPES et al., 1997
LepSau3A1	4	Leptina	F- 5'GTC ACC AGG ATC AAT GAC AT 3' R- 5'AGC CCA GGA ATG AAG TCC AA 3'	A/B :400 1/2: 690	54°C	POMP et al., 1997 WILKINS e DAVEY., 1997
IDVGA51	4	Leptina	F- 5'ATG GCA ATA TTT TGT TCT TTT TC 3' R- 5'ATT CCT TGA TGG TCT AAT GGT TA 3'	175-183	50°C	KAPPES et al., 1997
HEL5	21	IGF-IR	F- 5'GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA 3' R- 5'AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC 3'	147-169	58°C	BISHOP et al., 1994
AFZ1	21	IGF-IR	F- 5'TTG GAC GAC AAA ACT CAC GG 3' R- 5'GTG GCT GGA CTG GTC TGG TT 3'	151-129	50°C	JORGENSEN et al., 1996
FSHR	11	FSHR	F- 5' CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC 3' R- 5' AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGG 3'	306	58°C	HOUDE et al., 1994

^a PCR com "touchdown".

4.4 Métodos Estatísticos

A análise de associação entre o número de estruturas e os genótipos de cada marcador foi realizada por análise univariada do modelo linear geral (General Linear model), de acordo com o desenho:

$$A = \mu + B + C + BC \text{ sendo:}$$

A= número de estruturas

μ = média de estruturas da população

B= raça

C= genótipo

BC= interação raça x genótipo

Posteriormente as raças foram testadas separadamente para verificar o efeito dos genótipos agrupados em longos e curtos, conforme o tamanho (Tabela 3). Para este caso utilizou-se o método estatístico de análise de variância simples (one-way ANOVA) segundo o modelo:

$$A = \mu + B \text{ sendo:}$$

A= número de estruturas

μ = média de estruturas da população

B= genótipo agrupado

Adicionalmente, animais classificados nos grupo de alta e baixa resposta em relação à média de estruturas viáveis recolhidas, foram comparados pelo teste clássico do qui-quadrado, realizando-se a análise de resíduos. Caso o resíduo apresentasse resultado estatístico significativo ($p < 0,05$) o alelo correspondente era comparado com todos os demais.

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa SPSS® para Windows™ (SPSS Inc, Chicago – Illinois, USA), versão 10.0.

Tabela 3: Classificação dos alelos de cada sistema, conforme o tamanho.

Sistema	Tamanho em pb	
	Curto	Longo
BM4325	<103	≥ 103
ILSTS002	*	*
BMS3004	*	*
LepSau3A1	*	*
IDVGA51	≤ 177	≥ 179
HEL5	≤ 151	> 151
AFZ1	*	*
FSHR	*	*

* não realizada

5. RESULTADOS

As frequências alélicas dos STRs e SNPs analisados nas amostras de doadoras de embrião das raças Nelore e Aberdeen Angus, estão apresentadas nas Tabelas de 1 a 6. As caselas vazias indicam que a frequência deste alelo foi zero.

A variação observada do número de alelos detectados nas raças Nelore e Angus foi de 2 a 8 e 1 a 10, respectivamente. As duas raças não apresentaram frequências alélicas semelhantes em nenhum dos sistemas estudados e alguns alelos foram observados somente em uma das raças, como, para a raça Angus, *BMS3004*129*; *HEL5*161*, e para a Nelore, *BMS3004*132* e **138*; *HEL5*149*; *AFZ*111*.

Na Tabela 4 verifica-se que as doadoras de embriões da raça Aberdeen Angus, quando comparadas com as Nelores, apresentaram uma maior frequência dos alelos **103* e **105* para o STR BM4325, sendo os mesmos observados em frequências semelhantes nas vacas de baixa e alta produção de embriões. Da mesma forma, para o rebanho de doadoras da raça Nelore, os dados da Tabela mostram uma maior frequência para o alelo **101*, tendo uma distribuição semelhante para as vacas de alta e baixa produção de embriões.

Tabela 4: Freqüências alélicas do BM4325 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
97	0,01	0,02		0,08	0,13	0,03
99	0,04	0,05	0,03	0,16	0,20	0,11
101	0,12	0,10	0,13	0,45	0,48	0,42
103	0,33	0,35	0,30	0,20	0,15	0,26
105	0,41	0,38	0,46	0,10	0,04	0,16
107	0,09	0,10	0,08	0,01		0,02

A Tabela 5 indica, para o sistema BMS3004, que a amostra de Aberdeen Angus mostrou-se monomórfica, para um alelo distinto dos observados em Nelore. Para a raça Nelore o alelo *132 foi mais freqüente, porém, apresentando uma proporcionalidade entre as vacas de alta e baixa produção de embriões.

Tabela 5: Freqüências alélicas do BMS3004 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
129	1,0	1,0	1,0			
132				0,76	0,78	0,75
138				0,24	0,22	0,25

A Tabela 6 exibe que os alelos *133 e *135 foram os mais incidentes para a raça Aberdeen Angus, no marcador molecular ILSTS002 mantendo-se em uma freqüência semelhante entre as classes de produção de embriões. No entanto, para a raça Nelore as maiores freqüências ficaram com os alelos *135 e *137, que, adicionalmente tiveram um percentual maior nas fêmeas que produziram baixo número de estruturas viáveis. Apesar de se observar também uma

proporcionalidade diferente em alguns outros alelos, a freqüência total dos mesmos, dentro da raça, foi muito baixa.

Tabela 6: Freqüências alélicas do ILSTS002 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
127	0,11	0,12	0,14	0,03	0,05	
129	0,01		0,02	0,05	0,02	0,08
131	0,07	0,11	0,05	0,10	0,05	0,15
133	0,30	0,29	0,31	0,17	0,11	0,21
135	0,30	0,32	0,26	0,19	0,27	0,12
137	0,13	0,16	0,12	0,41	0,47	0,37
139	0,06	0,07	0,08	0,04	0,02	0,07
141	0,02	0,05	0,02	0,01	0,01	

As freqüências alélicas do sistema IDVGA51 observadas na Tabela 7 indicam que para a raça Aberdeen Angus o alelo *175 foi altamente incidente seguido pelo *183, mantendo-se para estes dois alelos uma freqüência semelhante quando observados nas classes alta e baixa produtoras de embriões. O marcador molecular IDVGA-51 para a raça Nelore comportou-se de forma adversa quando comparado à raça Aberdeen Angus. Podemos observar que o alelo *177 foi o mais freqüente, seguido de *175 e *181. Estes dois últimos alelos apresentaram freqüência distinta entre os grupos de produção de embriões. Para o alelo *175 observamos uma freqüência maior nas vacas de alta produção de embriões e enquanto o alelo *181 comportou-se de maneira inversa tendo uma maior freqüência nas vacas de baixa produção de embriões.

Tabela 7: Freqüências alélicas do IDVGA51 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
173	0,01	0,04		0,01		0,03
175	0,58	0,56	0,60	0,20	0,14	0,28
177	0,11	0,12	0,10	0,49	0,48	0,51
179	0,04	0,02	0,07	0,10	0,11	0,06
181	0,07	0,09	0,07	0,15	0,22	0,07
183	0,17	0,17	0,16	0,05	0,05	0,05

Problemas na amplificação de algumas amostras da raça Nelore, para o marcador HEL5, provocaram uma variação no número de indivíduos analisados neste sistema, sendo o total estudado foi de 52 doadoras com 26 animais para cada classe. A Tabela 8 mostra na raça Aberdeen Angus uma freqüência maior para os alelos *153,*165 e *167. A distribuição destes alelos para vacas de alta e baixa produção embrionária foi semelhante. Na raça Nelore houve uma alta freqüência do alelo *151 seguido do alelo *153. Neste caso as vacas de alta produção embrionária tiveram uma freqüência menor para o alelo *151 e em contrapartida maior para o alelo *153. O alelo 149 não foi observado na raça A. Angus, enquanto que o mesmo ocorreu para o alelo *161 nas vacas Nelore.

Tabela 8: Frequências alélicas do HEL5 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
149				0,02	0,02	0,02
151	0,05	0,05	0,05	0,50	0,60	0,40
153	0,19	0,17	0,21	0,20	0,10	0,30
155	0,10	0,07	0,13	0,15	0,14	0,16
157	0,06	0,05	0,07	0,07	0,10	0,04
159	0,02	0,02	0,02	0,01		0,02
161	0,04	0,07	0,02			
163	0,12	0,12	0,12	0,01		0,02
165	0,20	0,22	0,16	0,01		0,02
167	0,15	0,16	0,15	0,02	0,02	0,02
169	0,07	0,07	0,07	0,01	0,02	

A Tabela 9 apresenta os valores observados para as frequências alélicas do marcador AFZ-1. As vacas Aberdeen Angus tiveram um percentual maior para o alelo *123, seguido dos alelos *117 e *125. Novamente nesta raça a proporção destes alelos foi semelhante entre as doadoras de alta ou baixa produção de embriões. Na raça Nelore o destaque deu-se para o alelo *121, sendo que os alelos *113 e *123 também foram freqüentes, embora com um menor percentual. Nesta raça para estes alelos mais freqüentes as proporções dos mesmos foram semelhantes entre as classes de doadoras.

Tabela 9: Freqüências alélicas do AFZ1 nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
111				0,04	0,01	0,07
113	0,10	0,12	0,08	0,21	0,22	0,20
115	0,03	0,05	0,02	0,02	0,05	
117	0,15	0,20	0,10	0,01	0,02	
119	0,07	0,03	0,10	0,06		0,12
121	0,10	0,11	0,10	0,43	0,42	0,45
123	0,40	0,33	0,45	0,22	0,27	0,16
125	0,15	0,16	0,15	0,01	0,01	

No marcador FSHR, conforme indica a Tabela 10, para a raça Aberdeen Angus ocorreu uma homogeneidade para os alelos C e G. Enquanto que na raça Nelore ao alelo G foi superior em freqüência em relação ao alelo C. Saliente-se que o alelo G teve maior freqüência nos animais de baixa e o alelo C nos de alta produção de embriões.

Tabela 10: Freqüências alélicas do FSHR nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
C	0,50	0,50	0,50	0,25	0,15	0,36
G	0,50	0,50	0,50	0,75	0,85	0,64

As Tabelas 11 e 12 apresentam as freqüências alélicas para os sistemas LEP_{sau3A1}(A/B) e LEP_{sau3A1}(1/2) para as raças Aberdeen Angus e Nelore. Observamos que o comportamento dos percentuais dos alelos destes sistemas foi

semelhante, tanto entre as raças como nas classes alta e baixa produtoras de embriões.

Tabela 11: Freqüências alélicas do LEP*sau3A1*(A/B) nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
A	0,72	0,65	0,78	0,90	0,91	0,88
B	0,28	0,35	0,22	0,10	0,09	0,12

Tabela 12: Freqüências alélicas do LEP*sau3A1*(1/2) nas raças Aberdeen Angus e Nelore.

ALELO	ABERDEEN ANGUS			NELORE		
	TOTAL	BAIXA	ALTA	TOTAL	BAIXA	ALTA
1	0,81	0,89	0,74	0,99	0,96	1,0
2	0,19	0,11	0,26	0,01	0,04	

O modelo ANOVA, utilizado na análise da interação entre os fatores raças e classe para a variável média de número de estruturas, foi idêntico para todos os sistemas. Foram constados, como mostra a Figura 1, valores médios diferentes entre as classes baixa e alta de embriões recolhidos em ambas raças, sendo observada uma média de 2,5 e 12,05, respectivamente. No entanto, a interação foi significativa, tendo sido observadas médias distintas entre as raças somente para a classe alta ($p < 0,05$), como mostra a figura 1. O poder de observação da análise para todas as interações foi de 1,0 indicando, assim, que o modelo aplicado nos experimentos é confiável.

Posteriormente, todos os sistemas foram analisados individualmente para cada raça, devido às diferenças alélicas entre raças, anteriormente apresentadas.

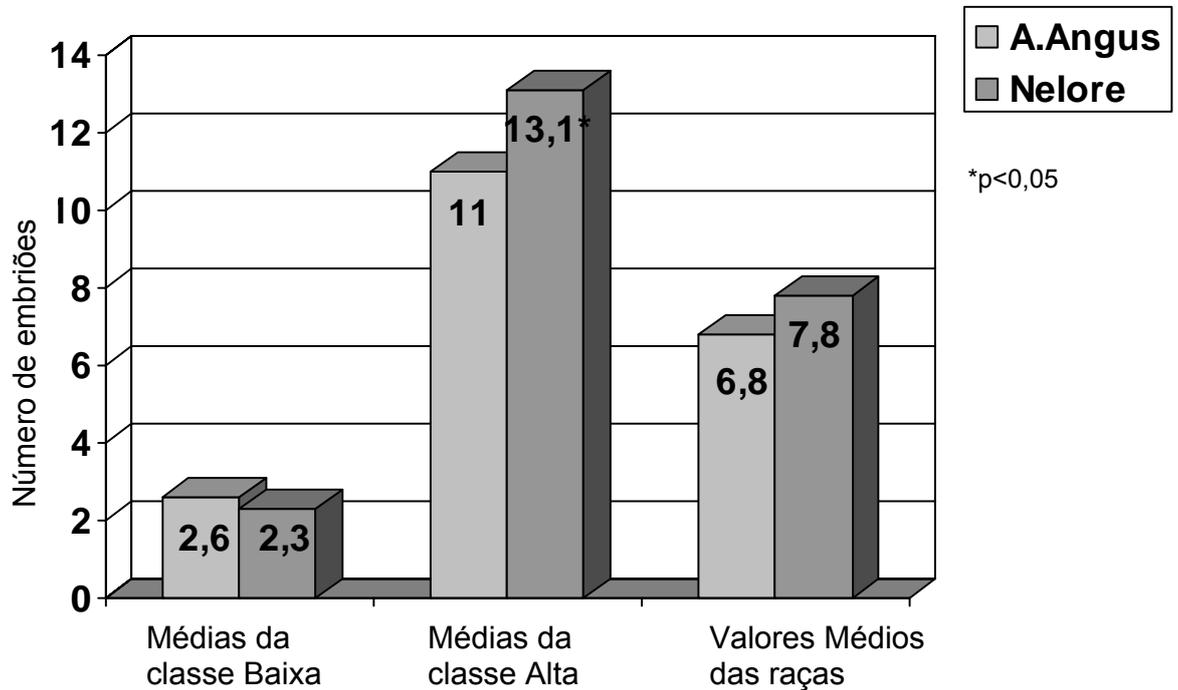


Figura 1: Médias e valores médios dos embriões viáveis recolhidos das doadoras da raça A. Angus e Nelore separados nas classes baixa e alta.

Na raça Aberdeen Angus foi observada uma única associação positiva entre os marcadores moleculares e a média de estruturas embrionárias viáveis (Tabela 11). No sistema LEP*Sau3A1* (A/B) verificou-se que animais homocigotos (AA e BB) apresentaram média de embriões viáveis estatisticamente superior em relação aos heterocigotos AB ($p=0,02$). Esta associação não foi observada na raça Nelore.

Para a raça Nelore foram observadas diferenças significativas para os marcadores BM4325, IDVGA51 e FSHR. Estas associações envolveram mais de um alelo, que foram assim reunidos em dois grupos: alelos curtos e alelos longos, conforme o tamanho, em pares de bases, ou ainda Heterocigotos e Homocigotos, como apresentado a seguir e na Tabela 13 e Figura 2 que mostram os resultados das análises estatísticas das médias das estruturas embrionárias viáveis observadas quando consideramos os alelos curtos e longos, heterocigotos ou

homozigotos dentro dos diferentes sistemas que apresentaram diferenças significativas no teste de ANOVA.

Para o marcador BM4325 alelos curtos foram àqueles genótipos que possuíam tamanho inferior a 103 pb, enquanto que os longos foram considerados aqueles que possuíam tamanho igual ou maior que 103 pb. Neste caso houve uma associação indicando que aquelas fêmeas da raça Nelore homozigotas para alelos longos produziram uma média de estruturas embrionárias viáveis, estatisticamente superior, em comparação às fêmeas possuidoras do alelo curto, para um $p=0,01$.

Adicionalmente, ainda neste sistema, as fêmeas Nelores que apresentaram o alelo *105 no genótipo, obtiveram uma média de estruturas embrionárias viáveis recolhidas de 11,7 contra 6,8 para os demais alelos, sendo observada uma diferença estatística para um $p=0,01$.

De forma oposta, em relação aos alelos curtos e longos, pode-se observar para o STR IDVGA51, que os animais portadores de alelos curtos, ou seja, um alelo menor ou igual a 177 pb, apresentaram uma média de produção de embriões significativamente superior ($p=0,02$) comparadas àquelas doadoras com alelos longos, maiores ou iguais a 179 pb. Ainda neste sistema verificamos que os animais portadores do alelo *181 no seu genótipo tiveram uma média de estruturas viáveis inferior estatisticamente ($p=0,02$) em relação àquelas doadoras livres deste alelo, onde obtiveram, respectivamente, para genótipos com e sem este alelo uma média de 4,9 e 8,7 estruturas viáveis.

Para o marcador FHSR, verificou-se que doadoras da raça Nelore heterozigotas (CG) obtiveram uma média de embriões viáveis superior em relação às homozigotas ($p < 0,01$).

Tabela 13: Tamanho dos genótipos, números de animais, médias de estruturas embrionárias viáveis obtidas e valores estatísticos para os distintos sistemas que apresentaram diferenças estatísticas.

	Sistemas							
	LEP _{sau3A1} A/B (A. Angus)		BM4325 (Nelore)		IDVGA51 (Nelore)		FSHR (Nelore)	
Tamanho ou tipo de genótipos	HT	HM	<103	≥103	≤177	≥179	HT	HM
Nr. de animais	22	37	47	12	33	27	31	29
Média de embriões	4,9	8,2	6,6	11,6	9,2	5,8	9,7	5,7
Valor de F	5,3		4,0		5,3		8,8	
Valor de p	0,02		0,02		0,02		<0,01	

HT= Heterozigotos; HM= Homozigotos

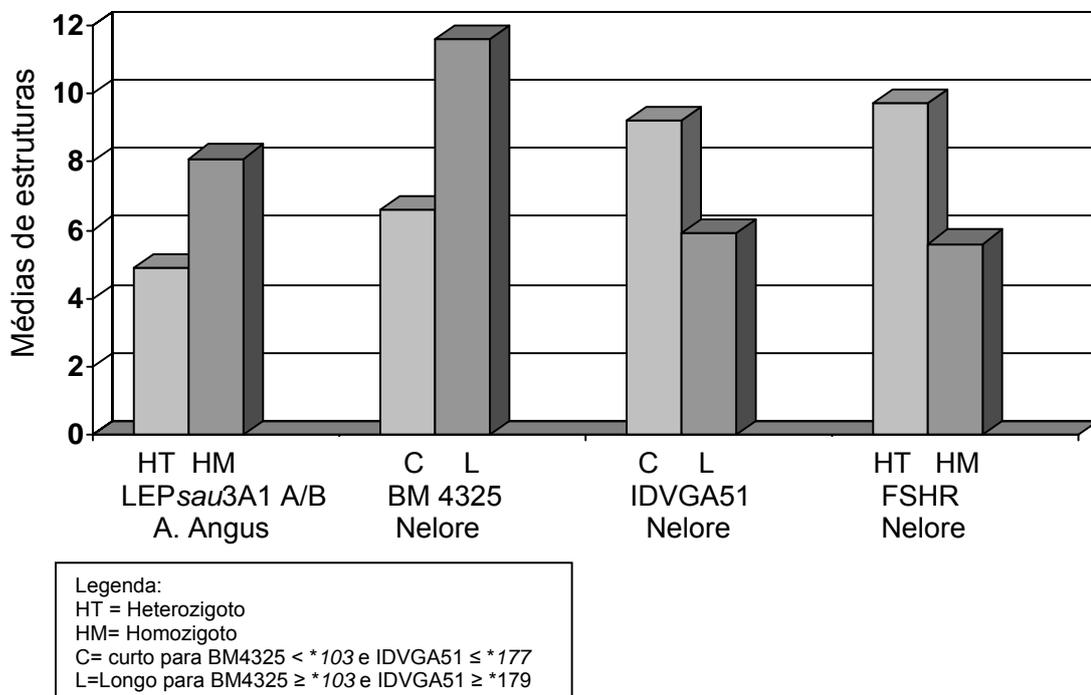


Figura 2: Médias de estruturas embrionárias viáveis em função dos sistemas que apresentaram diferença estatística para a ANOVA na raça Aberdeen Angus e Nelore.

Outra abordagem estatística efetuada foi comparar os animais divididos em classes baixa e alta produção de embriões, pelo teste de qui-quadrado, com o objetivo de verificar a influência dos alelos nesta classificação fenotípica, a qual foi baseada na média mundial de obtenção de seis estruturas embrionárias viáveis após a SOV. Simultaneamente ao teste do qui-quadrado, foi realizada a análise de resíduos e o alelo cujo resíduo apresentou resultado significativo foi comparado com todos os demais reunidos. Os alelos que apresentaram diferenças estatísticas entre indivíduos de baixa ou alta produção de embriões, dentro dos sistemas, estão representados na Tabela 14 e Figura 4.

As análises foram feitas para cada sistema investigado e por cada raça. Para a raça Aberdeen Angus não foram encontradas diferenças estatísticas entre alelos e grupo de doadora, em nenhum dos sistemas analisados.

No caso da raça Nelore foram encontradas diferenças estatísticas significantes nas frequências alélicas de alguns marcadores que parecem, assim, influir na resposta à superovulação. Analisando o marcador BM4325 observou-se haver uma diferença significativa entre os alelos para um $p=0,02$. Dois alelos destacaram-se entre os demais apresentando um resíduo estatisticamente significativo, sendo estes alelos o *97 e *105. Ao confrontarmos cada alelo com os demais, como mostra a Tabela 14, foi constatado que o alelo *97 apresentou-se em maior frequência nos animais classificados como de baixa produção embrionária, sendo estatisticamente diferente dos demais para um $p=0,04$. Ao contrário deste alelo, o *105 mostrou-se favorável aparecendo em maior frequência nas vacas classificadas como de alta produção embrionária para um $p=0,01$.

O sistema IDVGA-51, na raça Nelore, ao serem analisados todos os alelos conjuntamente, apresentou no teste estatístico uma diferença significativa para um $p=0,05$. Destacaram-se na análise de resíduos dois alelos: *175 e *181. Para o alelo *175 foi verificada uma maior frequência nas doadoras classificadas com número de estruturas acima da média mundial para um $p=0,04$. De forma contrária o alelo *181 teve uma maior participação nas vacas classificadas como de baixa

produção de estruturas viáveis recolhidas para um $p=0,02$, como indicado na Tabela 14.

A análise geral do sistema ILSTS002 demonstrou uma diferença estatística entre os alelos estudados para um $p=0,01$, tendo o alelo *135 apresentado um resíduo estatisticamente significativo. Ao comparar este alelo com os demais foi observado que os animais possuidores do mesmo tiveram uma média de estruturas viáveis recolhidas menor do que aqueles sem a presença deste alelo para um $p=0,04$, estando estes animais incluídos na classe de baixa produção, estas observações estão demonstradas na Tabela 14.

Para o HEL5 a análise total do sistema não apresentou diferença estatística tendo um $p=0,12$, porém, em dois alelos, o *151 e *153, foram observados resíduos estatisticamente significantes. A Tabela 14 informa a análise individual do alelo *151 o qual apresentou-se altamente incidente nas vacas de baixa produção de embriões para um $p=0,02$. Já para os animais portadores do alelo *153 apresentaram uma média de estrutura embrionária viável que as incluíram na classe de alta produtoras de embriões para um $p=0,01$.

O sistema AFZ1 indicou uma diferença estatística para $p=0,03$ na análise geral. O alelo *119 foi o único que apresentou resíduo significativo. Ao observarmos a Tabela 14, na comparação deste alelo com os demais, este apresentou-se favorável à produção de embriões incluindo os animais, portadores deste alelo, no grupo de alta produção de embriões, para um $p=0,01$.

Tabela 14: Análises de associação dos microssatélites e as classes de doadoras da raça Nelore.

	Classes Doadoras		Valores estatísticos	
	Baixa N	Alta N	χ^2	p
BM4325*97 x	8	2	3,92	0,05
outros alelos	52	58		
BM4325* 105 x	2	10	5,92	0,01
outros alelos	58	50		
IDVGA51* 175 x	8	17	4,09	0,04
outros alelos	52	43		
IDVGA51* 181 x	13	4	5,55	0,02
outros alelos	47	56		
ILSTS002* 135 x	16	7	4,35	0,04
outros alelos	44	53		
HEL5* 151 x	32	20	5,53	0,02
outros alelos	20	32		
HEL5* 153 x	5	16	7,22	0,01
outros alelos	47	36		
AFZ* 119 x	0	7	7,43	0,01
outros alelos	60	53		

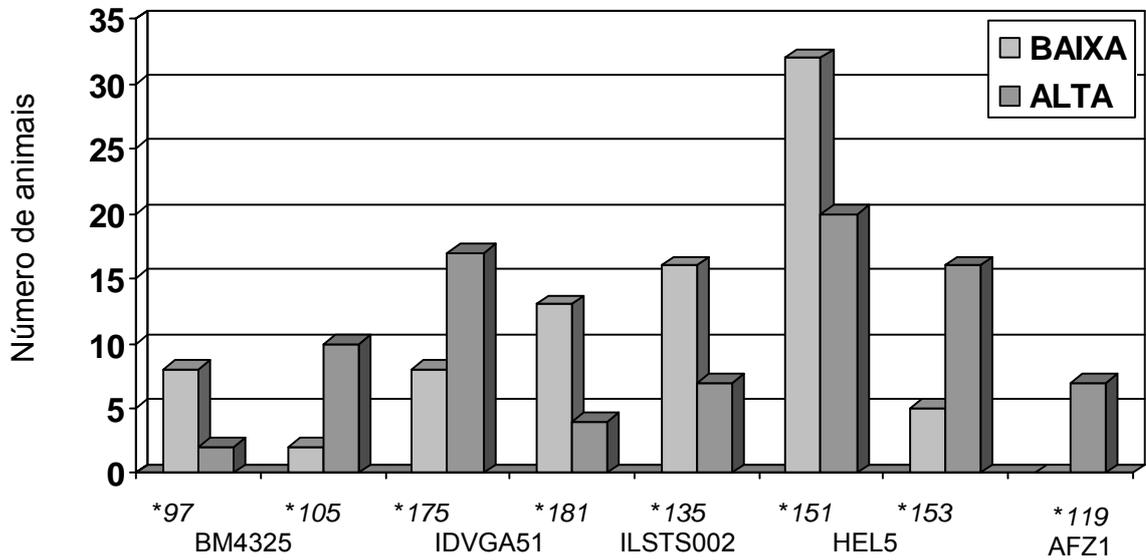


Figura 3: Número de doadoras agrupadas em baixa e alta produção de embriões viáveis em função dos alelos onde foram detectadas diferenças estatísticas nos seus respectivos sistemas para a raça Nelore.

6. DISCUSSÃO

As baixas estimativas de herdabilidade encontradas para a maioria das características reprodutivas têm sido observadas por diversos autores. Estas constatações indicam que o progresso genético para a fertilidade é pequeno, acumulando-se lentamente na população, de geração a geração, sendo altamente influenciado pelo meio ambiente (GIANNONI e GIANNONI, 1987). A heterozigose em uma população bovina pode fornecer informações importantes no que se refere à forma como determinada característica se expressa em seus descendentes. A identificação de genes que se manifestam em homozigose ou heterozigose e a correlação destas informações com aquelas de natureza fenotípica de interesse, resultaria em uma maior acurácia.

Os marcadores moleculares selecionados para desenvolver este estudo estão ligados a genes envolvidos no sistema hormonal da reprodução. A puberdade, peso ao primeiro parto e intervalo entre partos são fatores que podem servir de avaliação para identificar a fertilidade individual ou de um rebanho. A associação destes marcadores com a eficiência reprodutiva, observada, em trabalhos anteriores, foi realizada, em sua maioria, em um rebanho bovino híbrido (Brangus–Ibagé), obtido a partir de cruzamentos entre taurinos e zebuínos, atingindo as frações de 5/8 e 3/8 respectivamente. Neste estudo as frequências alélicas diferem entre as subespécies investigadas, dentro de cada sistema, e, por

conseqüência, distinguem-se daquelas observadas por outros autores para a raça híbrida. Essas diferenças eram de fato esperadas, já que estruturas de cruzamentos distintas e formas de manejo e seleção específicas interferem nas distribuições genótípicas e alélicas das populações.

As diferenças fenotípicas das respostas superovulatórias entre as classes baixa e alta foi altamente significativa, indicando que o modelo desenhado, para a execução deste experimento, é confiável. O poder de observação da análise estatística, para todas as interações foi de 1,0, como já mencionado, indicando, desta forma, que a hipótese do número de estruturas embrionárias viáveis por doadora está relacionada à raça e ao genótipo dos animais. Não houve diferenças na produção embrionária entre as raças na classe baixa, no entanto, entre os animais selecionados para comporem a classe alta foi observada uma diferença significativa em favor das doadoras da raça Nelore. Este fato pode ser em decorrência de termos tido uma maior opção de escolha das doadoras de alta produção de embriões, utilizando-se àquelas 30 de melhor resposta dentro de um universo de mais de 200 doadoras, além de estarem todas localizadas em uma central de transferência de embriões. Já, para a raça A. Angus, as amostras vieram de diferentes propriedades, cujo manejo pode ter influenciado nas respostas superovulatórias, proporcionando uma menor produção de embriões viáveis para as vacas consideradas de alta produção, em relação ao grupo de vacas Nelore.

A amostra A. Angus apresentou variação em quase todos sistemas, mas mostrou-se monomórfica no BM3004, ligado ao gene LH β , com a fixação do alelo *BMS3004*129*, sendo a mesma observação obtida por Silveira (2007), trabalhando com animais puros de origem, da mesma raça, mas de rebanhos distintos deste, podendo-se supor uma origem taurina para este alelo. Esta hipótese pode ser confirmada ao não ser observado este alelo nos 60 animais da raça Nelore estudados, nos quais foram constatados, apenas os alelos *BMS3004*132* e *BMS3004*138*. Adicionalmente, Steigleder et al. (2004), Silveira (2007) e Weimer et al. (2007) encontraram, em rebanhos de origem taurina, freqüências de 0,59, 0,66 e 0,64 respectivamente, para este alelo, este último

valor é similar ao que seria esperado em animais com um componente 5/8 Aberdeen Angus (Brangus-Ibagé) admitindo-se que a população A. Angus que originou a raça fosse também monomórfica para tal alelo. Machado (1999) e Weimer et al. (2007) encontraram associação entre este marcador e a eficiência reprodutiva nos animais heterozigotos, observaram nestes animais um menor intervalo entre partos. Bastos et al. (2003) analisando a resposta da indução hormonal do estro e ovulação no pós-desmame, em vacas Charolesas e cruzadas com Nelore, observaram que os animais heterozigotos responderam com maior taxa de prenhez do que os homozigotos. No entanto, Silveira (2007) estudando este mesmo sistema, não observou associação para intervalo entre partos, tanto para animais A. Angus como para um rebanho híbrido de várias raças (Gado Geral). No que se refere à resposta à superovulação não foi verificada associação entre o marcador BMS3004 e os grupos de alta e baixa produção de embriões, assim como em relação às médias de produção de embriões por genótipo, na raça Nelore, já que devido ao monomorfismo a análise não pode ser realizada nos A. Angus. Machado (1999) e Weimer et al. (2007) atribuíram os resultados observados à possibilidade do microssatélite BMS3004 atuar interferindo na regulação gênica do LH β , de tal modo que os animais heterozigotos poderiam produzir maior quantidade de cadeia β e, conseqüentemente, níveis mais elevados desse hormônio.

O microssatélite ILSTS002, também ligado ao gene do LH β , foi referido nas avaliações de Weimer et al. (2007) e Silveira (2007) como associado à eficiência reprodutiva. As freqüências mais observadas nas vacas Brangus-Ibagé e Gado Geral foram para os alelos *133 e *135; *135 e *137 (Weimer et al., 2007 e Silveira, 2007) e na raça A. Angus, para o alelo *135 (Silveira, 2007). No presente trabalho, verificamos freqüências idênticas para os alelos *133 e *135, na raça A. Angus, e, na raça Nelore, o *137 apresentou-se mais alto. Os valores dos alelos *133, *135 e *137 observados por Weimer et al. (2007) para o rebanho Brangus-Ibagé manteve a proporcionalidade referente à participação de cada subespécie na formação da raça híbrida.

Silveira (2007) observou associação envolvendo o marcador ILSTS002 onde animais, do rebanho Gado Geral, portadores de pelo menos um alelo *137 foram significativamente mais freqüentes (cerca de 20%), no grupo de vacas consideradas subfêrteis ($p=0,03$), ou seja, vacas que não conceberam em anos subseqüentes. Weimer et al. (2007) detectaram, em vacas da raça Brangus-Ibagé, um maior intervalo médio entre partos, estimado ao longo da vida reprodutiva do animal, em indivíduos possuidores de pelo menos um alelo *135. Na avaliação do sistema ILSTS002, em relação à influência deste marcador na produção de embriões, não foi observada diferença estatística entre as composições genótípicas, mesmo quando se utilizou a análise de agrupamento em classes de alelos curtos e longos. Porém, a presença do alelo *135 na composição destes genótipos, levou as doadoras da raça Nelore a apresentarem uma média de estruturas viáveis recolhidas, inferior àquelas sem a presença deste alelo, classificando-as como de baixa produção embrionária. Estes achados vão ao encontro das observações de Weimer et al. (2007) e Silveira (2007) indicando que os alelos *135 ou *137 aumentam o IEP, e neste trabalho, quanto a pobre resposta à superovulação, indicando que a presença deste ou destes alelos torna-se desvantajoso para a reprodução ou ainda a aplicação de biotécnicas de reprodução. Apesar de serem alelos distintos envolvidos nas associações, de acordo com Comings (1998) o efeito de um microsatélite no gene a ele ligado, seria dependente do tamanho da repetição e não de alelos específicos. Outra sugestão, para explicar o envolvimento de alelos distintos, seria a ocorrência de desequilíbrio de ligação (DL) entre o marcador ILSTS002 e uma mutação no gene LH β que modificaria sua expressão, sendo o alelo envolvido no DL variável entre as diferentes populações. O marcador ILSTS002 está mapeado a 59,9 cM do início do cromossomo BTA18 (Kemp et al., 1992) a 6 cM de distância do gene LH β . Desta forma, a hipótese de que este marcador esteja envolvido na regulação gênica, modificando a estrutura secundária ou terciária da molécula de DNA, facilitando o acesso de fatores de transcrição ou tradução, ou simplesmente afetando a edição da molécula de RNA (Li et al., 2004), não pode ser desprezada.

A respeito dos marcadores moleculares ligados a leptina, Silveira (2007) verificou que os animais possuidores de um alelo *IDVGA51*181* foram mais freqüentes no grupo de vacas subférteis ($p=0,05$). Estes achados estão de acordo com os resultados obtidos por Almeida et al. (2003) que verificaram que vacas com o alelo *IDVGA51*181* apresentavam piores performances reprodutivas. Passos et al. (2007) observaram maiores níveis de expressão do gene da leptina, em gordura subcutânea, em vacas possuidoras deste alelo, sugerindo que, provavelmente, ganhariam menos peso, em mesmas condições nutricionais e teriam um retorno ao estro mais tardio. Neste trabalho, nos animais da raça A. Angus ocorreu uma alta freqüência do alelo **175*, igualmente distribuído nos grupos de alta e baixa produção de embriões, desta forma, não apresentando diferenças estatísticas. Note-se que o alelo **181* apresentou, nesta amostra, uma das mais baixas freqüências até então descritas. Na raça Nelore, nos alelos **175* e **181*, foi verificado um desequilíbrio na distribuição dos animais nas classes baixa e alta, com um maior percentual de doadoras possuidoras do alelo **175*, na classe de alta produção embrionária e, de forma oposta, um maior número de animais carreadores do alelo **181*, nas doadoras de baixa produção embrionária. A observação, então, destas freqüências alélicas, favoráveis e desfavoráveis, é permitido indicar que o processo seletivo, para a fertilidade, está na direção correta, aumentando a freqüência do alelo desejável (**175*) e diminuindo o indesejável, **181*. Este achado é particularmente importante na população bovina A. Angus, aqui estudada e selecionada para desempenho reprodutivo. Em uma amostra não selecionada para performance reprodutiva, na raça A. Angus, Almeida et al. (2007) verificaram a freqüência de 0,16 para o alelo **181*, semelhante a encontrada, nesta investigação para a raça Nelore, e superior a observada no A. Angus (0,06).

Paralelamente a estas análises foram realizados agrupamentos dos genótipos conforme o tamanho dos alelos, segundo as indicações de Comings (1998). Silveira (2007) verificou que animais possuidores de alelos curtos (menores ou iguais a 177 pb) foram mais freqüentes no grupo de vacas férteis ($p=0,04$). Usando a mesma abordagem, 33 doadoras da raça Nelore foram

incluídas no grupo de alelos curtos, tendo como média de 9,2 embriões viáveis, superior estatisticamente ao grupo de alelos longos.

A associação envolvendo um grupo de alelos, classificados pelo tamanho da repetição, concorda com a sugestão de Comings (1998) de que o efeito de microssatélites sobre características quantitativas não seria dependente de um alelo específico, mas que o tamanho da seqüência repetida é que influenciaria a expressão gênica, facilitando a formação do DNA-Z e o acesso de fatores de transcrição.

Os marcadores moleculares do tipo SNPs [*LEP**Sau3A1*(+/-) e *LEP**Sau3A1*(A/B)], também localizados no gene da leptina, em posições distintas e decorrem de substituições em um único nucleotídeo. De acordo com Almeida et al. (2003) o alelo *LepSau3A1**(-) aumenta o IEP. Estes marcadores não mostraram relação com a resposta à superovulação, para ambas as raças estudadas. No entanto, quando comparamos os animais homozigotos AA e BB contra os heterozigotos AB, para a raça A. Angus, foi observado que as doadoras homozigotas tiveram uma média de produção de embriões estatisticamente superior as heterozigotas, porém nas fêmeas Nelore não foi verificada esta associação. Esta relação não havia ainda sido descrita para nenhum índice reprodutivo. As frequências alélicas encontradas na raça A. Angus, neste trabalho, foram semelhantes às observadas por Almeida et al. (2007) e Silveira (2007).

A leptina coordena o estado reprodutivo por meio de uma interação entre a reprodução e a nutrição e por estimular a liberação de LH e FSH, pela pituitária (Chehab et al., 2002), sendo que o excesso ou a deficiência de leptina pode estar associado com anormalidades da função reprodutiva (Moschos et al., 2002). Portanto, a associação entre vacas de diferentes classes de alelos (longos ou curtos), homo ou heterozigotas, com a presença ou não do alelo *IDVGA51*181*, com a produção de embriões, aqui analisada, pode ser em decorrência de diferenças na expressão do gene *Lep*, como sugerido por Passos et al.(2007).

Um marcador ligado ao gene do FSH β foi estudado com o objetivo de verificar a associação deste hormônio com a resposta à superovulação. Para tanto foi utilizado o BMS4325 que havia sido estudado por Duarte et al. (2005) em um

rebanho Brangus-Ibagé (5/8 Angus e 3/8 Nelore) e Silveira (2007) em um rebanho geral e em A. Angus PO. Silveira (2007) encontrou uma maior frequência nos alelos *103 e *105 no rebanho geral e *101 e *103 no rebanho A. Angus, dado este similar ao descrito por Duarte et al. (2005) para o rebanho Brangus-Ibagé. Embora Silveira (2007) não tenha encontrado associação, Duarte et al. (2005) observaram que os animais portadores do alelo *101 tiveram um intervalo médio entre partos de 54 dias menor, sendo portanto considerado pela a autora, um alelo favorável à performance reprodutiva de bovinos. No presente estudo, as doadoras da raça A. Angus tiveram uma maior incidência dos alelos *103 e *105 e houve uma distribuição parecida entre as classes baixa e alta produtoras de embriões, desta forma, não havendo diferenças estatísticas. Já no rebanho Nelore as frequências maiores foram dos alelos *101 e *103, porém mantiveram-se bem distribuídos nas classes não permitindo verificar diferenças estatísticas. Embora as frequências dos alelos *97 e *105 observadas no rebanho Nelore fossem baixas, ocorreu um desequilíbrio na distribuição entre as classes. Assim, para o *97, ocorreu a presença de um maior número de doadoras portadoras deste alelo enquadradas como baixa produtoras de embriões. As doadoras, portadoras do alelo *105, foram encontradas no grupo das fêmeas com melhor performance produtiva. Assim, o presente trabalho indica um alelo diferente (*105), daquele apontado (*101) por Duarte et al. (2005), como favorável para o marcador molecular BMS4325 na associação ao desempenho reprodutivo de bovinos.

Utilizando-se das premissas de Comings (1998), com relação ao agrupamento dos alelos, o sistema BMS4325 foi dividido em dois grupos na raça Nelore, conforme o seu tamanho de pares de base. Com esta estratégia, foram observados 47 animais possuidores dos alelos curtos (<103pb), com uma média de produção de embriões de 6,6, ao passo aqueles de alelos longos, em número de 12 animais, obtiveram uma média de 11,6 embriões, sendo está média superior estatisticamente. A justificativa para a melhor performance na produção de embriões, para aquelas doadoras da raça Nelore possuidoras dos alelos longos, seria a mesma descrita para o sistema IDVGA51, facilitando a formação do DNA-Z permitindo melhor acesso dos fatores de transcrição.

O estudo dos marcadores moleculares ligados ao gene do receptor de IGF, selecionados a partir do papel do IGF-I onde realiza controle sobre a foliculogênese, foi previamente realizado por Oliveira et al. (2005). Estes autores observaram uma associação positiva com a eficiência reprodutiva. O trabalho foi conduzido com animais da raça Brangus-Ibagé (5/8 Angus x 3/8 Nelore), verificaram a associação dos marcadores moleculares HEL5 e AFZ1 com o peso na concepção, peso ao primeiro parto e peso ao segundo parto, assim como o intervalo entre partos. Estes autores encontraram, após agrupar os alelos em longos e curtos, uma associação no sistema HEL5 para o intervalo entre partos favorável para os alelos curtos, enquanto que para o sistema AFZ1, o mesmo foi observado para os alelos longos. Silveira (2007) não observou associação para estes marcadores nos seus estudos com Gado Geral e A. Angus. No presente estudo não houve associação para estes sistemas no que diz respeito a alelos longos e curtos, tanto para a raça A. Angus como para a Nelore. Somente houve diferenças significativas quando verificamos a presença dos alelos HEL5*151 ou *153 na composição dos genótipos da raça Nelore, com uma frequência destes alelos de 0,50 e 0,20, respectivamente. Analisando estas frequências foi verificado que as doadoras carreadoras do alelo *151 foram incluídas na classe de baixa produtoras de embriões, enquanto que as portadoras do alelo *153, foram classificadas como de alta produção. Para o sistema AFZ1, houve uma associação para as vacas Nelore, onde a presença do alelo *119 permitiu as portadoras deste alelo ingressassem no grupo das doadoras classificadas como de alta produção. O sistema IGF tem sido apresentado como um importante componente que coordena a função folicular em diferentes espécies, incluindo a bovina (BURATINI Jr. et al. 2006). Alterações na concentração e no padrão de expressão dos componentes do sistema IGF e a sua interferência no crescimento e no mecanismo da dominância folicular, podem sugerir uma relevante influência deste sistema no recrutamento dos folículos primordiais, os quais são de fundamental importância em tê-los em maior número no início do tratamento superovulatório (ROOVE et al. 2005; IRELAND et al 2007).

Existem diferenças na dinâmica folicular entre *Bos taurus* e *Bos indicus*. Uma particularidade observada entre zebuínos e taurinos diz respeito ao número de ondas de crescimento folicular por ciclo estral. Estudos realizados em animais da raça Holandesa demonstraram predominância de duas e três ondas de crescimento folicular por ciclo estral (SAVIO et al., 1988; GINTHER et al., 1989). Contudo, em zebuínos existem relatos que descrevem maior incidência de 3 ondas, sendo notificada a presença de até 4 ondas de crescimento folicular por ciclo estral (Brahman – RHODES et al., 1995; Nelore – FIGUEIREDO et al., 1997; Gir – VIANA et al., 2000). Além da diferença no número de ondas, existem trabalhos que descrevem que fêmeas *Bos indicus* recrutam maior número de folículos por onda de crescimento folicular que fêmeas *Bos taurus* ($33,4 \pm 3,2$ vs $25,4 \pm 2,5$; CARVALHO et al., 2007). Essa característica tem influência direta na eficiência da técnica de transferência de embriões e de punção folicular, indicando vantagem de fêmeas zebuínas sobre taurinas, neste quesito. Existem relatos de que o número de folículos recrutados por onda de crescimento folicular apresenta diferenças entre indivíduos, e essa característica possui alta repetibilidade durante a vida reprodutiva da fêmea (BONI et al., 1997, CUSHMANN et al. 1999, ROOVER et al. 2005, IRELAND et al. 2007). Esse aumento do número de folículos presentes nos ovários pode estar relacionado ao sistema IGF. Existem evidências de que o sistema IGF difere entre esses grupos genéticos. Estudos realizados com vacas Brahman foram sugestivos de que esses animais apresentam maiores concentrações plasmáticas de IGF-I (SIMPSON et al., 1994, ALVAREZ et al., 2000) e menores concentrações de FSH quando comparadas com vacas Angus (ALVAREZ et al., 2000). Alguns autores levantaram a hipótese de que o maior número de folículos presentes no ovário de *Bos indicus* pode ser devido à elevada concentração de IGF-I, mesmo na presença de baixos níveis de FSH (BÓ et al., 2003), confirmado por Roover et al. (2005) e Ireland et al. (2007) que correlacionaram o baixo nível de concentração de FSH e a melhor resposta a superovulação. Essa diferença nas concentrações de FSH e de IGF-I pode explicar a maior sensibilidade ao tratamento superovulatório em doadoras *Bos*

indicus, sendo possível empregar doses inferiores às usualmente utilizadas para *Bos taurus*. (BARROS e NOGUEIRA, 2001; BARUSELLI et al., 2003).

O marcador molecular, para o receptor de FSH (FSHR), foi analisado na sua frequência genotípica. Na raça Nelore foram observados os genótipos CG e GG em uma frequência de 51,6 e 48,4, respectivamente. Estes resultados são semelhantes aos encontrados por Campagnari (2002), onde estudou este marcador em rebanhos Nelore. Esta autora não encontrou associação para a precocidade sexual nas fêmeas Nelore, assim como Marson (2005) analisando este mesmo marcador em população composta Europeu-Zebu. Neste caso, Marson (2005) não indicou este marcador para programas de melhoramento genético, com vistas à precocidade sexual. Contrariamente a estas autoras, foi encontrada no presente trabalho, uma associação positiva para este marcador. As doadoras da raça Nelore classificadas como heterozigotas (CG) apresentaram uma média de produção de embriões superior estatisticamente daquelas genotipadas como homozigotas. A ação dos hormônios gonadotróficos é dependente da ligação aos seus receptores específicos, presentes na superfície da membrana plasmática das células alvo nas gônadas (FORTUNE et al. 1994), porém, de acordo com Aittomaki et al. (1995), deleções ou mutações nos genes de receptores podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transmissão do sinal endocrinológico, podendo interferir na resposta esperada. Desta forma, o SNP FSHR poderia estar interferindo na regulação gênica do receptor de FSH das doadoras heterozigotas que poderiam facilitar a relação hormônio/receptor, ou ainda, produzir maior quantidade de receptores e, conseqüentemente, uma melhor resposta ao FSH exógeno.

Cushmann et al.(1999) indicaram claramente, nos seus experimentos, que vacas que tiveram uma baixa resposta a superovulação, estimuladas com FSH-p, tinham poucos folículos primordiais e terciários. Estas observações foram confirmadas por Singh et al. (2004) utilizando-se da ultrassonografia. Os tratamentos superovulatórios têm sido usados para aumentar o número de folículos em crescimento até o tamanho ovulatório, utilizando-se uma janela entre 8º e 12º dia do ciclo ou sincronizando a onda folicular com o auxílio de

implantes de progesterona associado ao estrógeno. Embora, segundo Erickson (1966), o número de folículos primordiais já esteja estabelecido desde o nascimento, há a possibilidade de aumentar a taxa de ativação destes folículos e subsequente incrementar o número de folículos que sobrevivem até o estágio de terciário, assim respondendo ao tratamento superovulatório. Desta maneira, segundo Cushmann et al. (1999) uma vaca que normalmente responde de forma pobre à superovulação pode se converter em uma de média a alta, desde que os folículos primordiais sejam hormonalmente estimulados previamente ao processo superovulatório. Adicionalmente a produção de folículos primordiais e terciários, Ireland et al. (2007) observaram que os animais ao responderem melhor, em termos de números de folículos primordiais, produziam uma menor qualidade de embriões viáveis, porém, segundo Roove et al (2005) esta diferença não estaria na qualidade dos oócitos e sim na influência do tratamento hormonal. Singh et al. (2004); Roove et al. (2005); Ireland et al. (2007); citam, nos seus trabalhos, que a classificação fenotípica baseada na variação do número de folículos, durante as ondas de crescimento folicular, podem servir no processo de seleção de doadoras. Importante salientar que nestes estudos houve uma repetição das respostas nas ondas de crescimento subsequentes, semelhantes às anteriores, como também citado por Boni et al., (1997), permitindo assim uma melhor resposta na produção de embriões. Peixoto et al. (2004) encontraram uma forte correlação das respostas às superovulações subsequentes, a partir da primeira coleta de embriões, com altos valores de herdabilidade. Estas observações corroboram com os achados no presente trabalho, onde observamos que a produção de embriões está ligada à presença ou ausência de certos alelos nos genes ligados à reprodução, principalmente nas amostras estudadas da raça Nelore. O processo seletivo desenvolvido com fins de eficiência reprodutiva, seja por puberdade, idade ao primeiro parto e intervalo entre partos, pode ter selecionado os alelos favoráveis e diminuído os desfavoráveis, na população, principalmente, no rebanho de doadoras da raça A.Angus.

Assim, em termos de genética e evolução pode ser considerado que cada indivíduo nascido em uma geração deixa uma proporção diferente de filhos para a

geração seguinte. Se existirem genes associados à adaptabilidade dos indivíduos, ou seja, alelos que determinem aos seus portadores maior chance de deixar mais filhos para a geração seguinte, estes alelos deverão passar para a geração seguinte em uma frequência maior que seus pares. Assim, o efeito da seleção natural é mudar as frequências dos genes na população.

A seleção artificial busca associar maior adaptabilidade aos indivíduos portadores de alelos cuja frequência se deseja aumentar. Embora naturalmente tais alelos possam não conferir maior adaptabilidade aos indivíduos, o homem interfere no processo e garante aos portadores dos alelos desejáveis a possibilidade de deixar mais descendentes para a geração seguinte. Assim, o efeito esperado da seleção artificial é aumentar a frequência dos alelos desejáveis na população, que no caso dos animais domésticos é o rebanho sob seleção.

A raça A. Angus, historicamente, vem sendo selecionada há mais tempo do que a raça Nelore e, também, apresenta uma população bastante reduzida quando comparada a raça Nelore, reduzindo, de tal modo, a variabilidade genética e com maior facilidade de promover a pressão de seleção sobre os caracteres desejáveis. Conforme Gianoni e Gianoni (1997) rebanhos estáveis apresentam valores de herdabilidade para características reprodutivas menores em relação àqueles em evolução genética. A herdabilidade de determinada característica é fundamental em programas de melhoramento genético, pois características de baixa herdabilidade, exceto quando a intensidade de seleção é alta, não apresentam respostas satisfatórias ao trabalho de seleção dos animais. Como os fatores genéticos ligados à reprodução possuem uma herdabilidade baixa, o tempo e a pressão de seleção são fatores de fundamental importância para fixar os genes desejáveis em uma população. Estas constatações possuem respaldo nos trabalhos conduzidos por Silveira (2007), onde não se observou nenhuma associação com marcadores moleculares ligados à reprodução em um rebanho A. Angus, altamente selecionado para a fertilidade, enquanto que várias outras foram observadas no rebanho de gado geral ou mesmo em rebanhos híbridos realizados por diversos autores.

CONCLUSÕES

- Os resultados verificados no presente trabalho indicaram que alguns dos sistemas estudados, previamente, para outras avaliações de performance reprodutivas, podem ser utilizados como critério de seleção de doadoras de embriões, principalmente em rebanhos em evolução.
- Com a avaliação dos genótipos foi possível organizar um banco de dados de respostas à superovulação de vacas das raças Aberdeen Angus e Nelore, compreendendo aspectos relacionados à resposta aos tratamentos superovulatórios.
- A produção de embriões em programas de SOV foi associada aos marcadores moleculares BM4325, ILSTS002, IDVGA51, HEL5 e AZF1, em Nelore e LepSau3A1A/B, em A. Angus. Estes resultados confirmam os dados previamente verificados com outros parâmetros reprodutivos.
- Foi possível realizar a primeira fase da MAS em relação ao marcador FSHRAl1, mapeado próximo ao gene do receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR), indicando uma associação para a produção de embriões na raça Nelore.

- É possível realizar a terceira fase da MAS, a partir de certos marcadores moleculares estudados (sua utilização para seleção em rebanhos comerciais), em rebanhos que encontram-se em evolução, mas essa metodologia não seria vantajosa para rebanhos seletivamente estáveis, nas raças aqui estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AITTOMAKI et al. Mutation in FSH receptor gene cause hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, Cambridge, v.82, n.6, p. 959-968, 1995.
- ALMEIDA, S.E.M.; ALMEIDA, E.A.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **J. Anim. Breed. Genet.** v. 120, p. 106-113, 2003.
- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., TERRA, G., NEVES, J. P., GONÇALVES. P. B. D., WEIMER, T. A. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. **Ciência Rural**, v. 37, p. 206-211, 2007.
- ALVAREZ P.; SPICER L.J.; CHASE J.R.;PAYTON C.C.; HAMILTON M.E.; STEWART T.D.; HAMMOND R.E.; OLSONTA A;C.;WETTEMAN R.P. Ovarian and endocrine characteristics during the estrous cycle in Angus, Brahman and Senepol cows in a subtropical environment. **J Anim Sci**, v.78, p.1291-1302, 2000.
- ALVAREZ, R.H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C. Resposta ovariana e produção de embriões de vacas superovuladas com Pluset ou Folltropin em dose única subcutânea **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 34, supl. 1, p. 516, 2006.
- AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; WILLIAMS, S.W.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER, D.H.; WILLIAMS, G.L. Leptin gene expression, circulating leptin, and luteinizing hormone pulsatility are acutely responsive to short-term fasting in prepubertal heifers: relationships to circulating insulin and insulin-like growth factor I. **Biol. Reprod.**, v. 63, p. 127-133, 2000.

- ANDERSON, G.B. Embryo transfer in domestic animals. **Adv. Vet. Sci**, New York, v. 27, p. 129-162, 1983.
- BAO, B.; CALDER, M.D.; XIE, S.; SMITH, M.F. YOUNGQUIST, R.S.; GARVERICK, H.A. Steroidogenic acute regulatory protein messenger ribonucleic acid (mRNA) expression is limited to theca of healthy bovine follicles. **Biology of reproduction**, supplement (abstract) 195, 1997.
- BAO B.; GARVERICK H.A. Expression of steroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **J Anim Sci**, v.76, p.1903-1921, 1998.
- BARACALDO MI, MARTINEZ MF, ADAMS GP, MAPLETOFT RJ. Superovulatory response following transvaginal follicle ablation in cattle. **Theriogenology**. n 1; v.53(6), p.1239-50, 2000.
- BARENDSE, W. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248, Patent US6383751, Disponível em <http://www.uspto.com>, 1997.
- BARROS, C.M.; FIGUEIREDO, R.A.; PINHEIRO, O.L. Estro, ovulação e dinâmica folicular em zebuínos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.19, n.1/2, p.9-22, 1995.
- BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. **Theriogenology**, v.56, p.1483-1496, 2001.
- BARUSELLI, P.S.; MARQUES, M.O.; REIS, E.L.; NASSER, L.F.T.; SILVA, R.C.P.; MENEGATTI, J.A.; VALENTIN, R.; SANTOS, I.C.C. Adequação da dose de FSH (Follitropin-v) em protocolos de superovulação de vacas nelore (*Bos taurus indicus*) com inseminação artificial em tempo fixo (SOTF). **Acta Sci Vet**, v.31, p.244-245, 2003.
- BARUSELLI, P.S.; REIS, E.L.; MARQUES, M.O.; NASSER, L.F.; BO, G.A. The use of hormonal treatments to improve reproductive performance of anestrus beef cattle in tropical climates. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.479-486, 2004.
- BARUSELLI, P.S.; SÁ FILHO, M.F.; MARTINS, C.M.; NASSER, L.F.T.; NOGUEIRA, M.F.G.; BARROS, C.M.; BÓ, G.A. Superovulation and embryo transfer in *Bos indicus* cattle **Theriogenology**, v.65, p.77-88, 2006.
- BARUSELLI, P. S.; GIMENES, L. U.; SALES, J.N.S. . Fisiologia reprodutiva de fêmeas taurinas e zebuínas. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.205-211, 2007.
- BASTIDAS, P.; RANDEL, R.D. Effects of repeated superovulation and flushing on reproductive performance of *Bos indicus* cows. **Theriogenology**, v.28, p.827-835. 1987.

- BEG M.A.; BERGFELT D.R.; KOT K.; GINTHER O.J. Follicle selection in cattle: dynamics of follicular fluid factors during development of follicle dominance. **Biol Reprod**, v.66, p.120-126, 2002.
- BELTRAME, R.T.; QUIRINO, C.R.; BARIONI, L.G. Curva de densidade de probabilidade do número de embriões viáveis coletados em vacas nelore superovuladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, n. 34, supl. 1, p. 496, 2006.
- BERGFELT, D. R.; KASTELIC, J. P.; GINTHER, O. J. Continued periodic emergence of follicular waves in non bred progesterone treated heifers. **Animal Reproduction Science**, v. 24, p. 193-204, 1991.
- BETTERIDGE K.J. Farm animal embryo technologies: achievements and perspectives. **Theriogenology**. v. 15, n.65(5), p.905-13, 2006.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. M. KEELE, J. W., et al. A genetic-linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, n. 2, p. 619-639, 1994.
- BÓ, G.A., MARTINEZ, M., NASSER, L.F. et al. Follicular dynamics of *Bos indicus* and *Bos taurus* beef cattle under pasture conditions in Argentina. In: **Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 10, 1993 Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte,. v.2, p.221,1993.
- BÓ GA, Hockley DK, Nasser LF, Mapletoft RJ. Superovulatory response to a single subcutaneous injection of Follitropin-V in beef cattle. **Theriogenology**. v. 1, n. 42(6), p.963-75, 1994.
- BÓ GA, BARUSELLI PS, MORENO D, CUTAIA L, CACCIA M, TRÍBULO R, TRÍBULO H, MAPLETOFT RJ. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. **Theriogenology**, v.1;57(1), p.53-72, 2002.
- BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTINEZ, M.F. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. **Anim Reprod Sci**, v.78, p.307-326, 2003.
- BÓ, G., MORENO, L., CUTAIA, L., BARUSELLI, O.S.; REIS, E.L. Manipulação do ciclo estral em doadoras e receptoras de embrião bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, p. 1, 2004.
- BOLAND, M.P.; GOULDING, D.; ROCHE, J.F. Alternative gonadotrophins for superovulation in cattle. **Theriogenology**, v.43, n.1, p.5-17, 1991.
- BOLAND, M.P.; LONERGAN, P.; O'CALLAGHAN, D. Effect of nutrition on endocrine parameters, ovarian physiology, and oocyte and embryo development. **Theriogenology**, v.55, p.1323-1340, 2001.

- BONI, R.; ROELOFSEN, M.W.M.; PIETERSE, M.C.; KOGUT, J.; KRUIP, THAM. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48,p.277-289, 1997.
- BURATINI J. Jr.; PRICE, C.A.; VISINTIN, J.A.; BÓ,G.A. Effects of dominant follicle aspiration and treatment with recombinant bovine somatotrophin (BST) on ovarian follicular development in Nelore (*Bos indicus*) heifers. **Theriogenology**, New York, v.54, n.3, p.421-431, 2000.
- BURATINI Jr. Controle endócrino e local da foliculogênese em bovinos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v.31, n.2, p.190-196, 2007.
- BURNS D.S.; JIMENEZ-KRASSEL F.; IRELAND J.L.; KNIGHT P.G.; IRELAND J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among animals, very high repeatability in individuals, and an inverse association with serum follicle-stimulating hormone concentrations. **Biol Reprod**. v. 73(1), p.54-62, 2005.
- CALLESEN, H., LOVENDAHL, P., BAK, A. et al. Factors affecting the developmental stage of embryos recovered on day 7 from superovulated dairy cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 73, p. 1539-1543, 1995.
- CAMPAGNARI, F. **Novas variantes moleculares dos genes receptores de hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio Folículo Estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. 2002. 82 f. Dissertação de Mestrado - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista- campus de Botucatu, 2002.
- CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. Evidence that inhibin has paracrine and autocrine actions in controlling ovarian function in sheep. **Journal of Reproduction and fertility**, abstracts Series 15 abstract 140, 1995.
- CARVALHO, J.B.P.; CARVALHO, N.A.T.; REIS, E.L.; NICHI, M.; SOUZA, A.H.; BARUSELLI, P.S. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* x *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, 2007.
- CASAS, E., WHITE, S. N., RILEY, D. G., SMITH, T. P. L., BRENNEMAN, R. A., OLSON, T. A., JOHNSON, D. D., COLEMAN, S. W., BENNETT, G. L., CHASE-JR, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, v. 83, p. 13-19, 2005.
- CHEBEL RC, DEMÉTRIO DG, METZGER J. Factors affecting success of embryo collection and transfer in large dairy herds. **Theriogenology**. v. 1; n.69(1), p. 98-106, 2008.

- CHEHAB, F. F., QIU, J., MOUNZIH, K., EWART-TOLAND, A., OGUS, S. Leptin and Reproduction. **Nutr. Rev.** 60, 10, p.S39-S46, 2002.
- CHENOWETH, P.J. Influence of the male on embryo quality. **Theriogenology**, v. 68, p. 308-315, 2007.
- CHUPIN,D.; COMBARNOUS,Y.;PROCOREUR,R. Different effect of LH and FSH induced superovulation in two breeds of cattle. **Theriogenology**, v.69, n.1, p. 1-8, 1985.
- COELHO, S.G. transferência de embriões de raças zebuínas. Belo Horizonte, Escola de Veterinária da UFMG, **dissertação de mestrado**, 1988.
- COMINGS, D. E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. **Molecular Psychiatry**, v. 3, p. 21-31, 1998.
- CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biol. Reprod.**, v. 60, p. 216-222, 1999.
- CURI, R. A., DE OLIVEIRA, H. N., SILVEIRA, A. C., LOPES, C. R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 36, p. 58-62, 2005.
- CUSHMAN, R.A.; DESOUZA, J.C.; HEDGPETH, V.S.; BRITT J.H. Superovulatory response of one ovary is related to the microand macroscopic population of follicles in the contralateral ovary of the cow. **Biol. Reprod.** v. 60, p.349-354, 1999.
- DAVIS, G. P., DeNISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2331- 2339, 1998.
- DE ROOVER R.; BOLS P.E.; GENICOT G.; HANZEN C.H. Characterisation of low, medium and high responders following FSH stimulation prior to ultrasound-guided transvaginal oocyte retrieval in cows. **Theriogenology**. n.. 15, v. 63(7), p.1902-13, 2005
- DEKKERS, J. C. M., ROTHSCHILD, M. F., MALEK, M. M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. **III Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína**, Via Internet, p. 22, 2001.
- DENTINE, M.R. Market assisted selection. In: **The Genetics of Cattle**, R. Fries & A. Ruvinsky (eds), CABI, Oxon, 1999.

- DI STASIO, L., DESTEFANIS, G., BRUGIAPAGLIA, A., ALBERA, A., ROLANDO, A. Polymorphism of the GHR gene and relationships with meat production and quality. **Animal Genetics**, v. 36, p. 138-140, 2005.
- DUARTE, L. B. H., MORAES, J. C. F., WEIMER, T. A. Diversity of microsatellites linked to the FSH β gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. **Ciência Rural**, v. 35, n. 1, p. 145-149, 2005.
- EPSTEIN, H. The Origin of the Domestic Animals of Africa. Africana Publishing Cooperation, New York, v. 1, p. 185–555, 1971.
- EPSTEIN, H.; MASON, I.L. Cattle. In: **Evolution of Domesticated Animals (Mason, I.L., ed.)**. Longman, New York, p. 6-27, 1984.
- ERICKSON, B.; REYNOLDS, R.A.; MURPHREE, R.L. Ovarian characteristics and reproductive performance of the aged cow. **Biol. Reprod.** v.15, p.555–560, 1976.
- FAO. Faostat Agricultural data. <http://faostat.fao.org>. 2008.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEN, p.220, 1998.
- FETNI, N.; SIROIS, J.; SILVERSON, D.; LUSSIER, J.G. Molecular analysis of gene expression in granulosa cells of dominant or preovulatory follicles in cattle by mRNA differential display (DDTR-PCR). **Theriogenology**, v. 57, p. 839, 2002.
- FIGUEIREDO, R.A., BARROS, C.M., PINHEIRO, O.L. et al. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLE, J.M.P. Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.
- FITZSIMMONS, C. J., SCHMUTZ, S. M., BERGEN, R. D., MCKINNON, J. J. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. **Mammalian Genome**, v. 9, p. 432-434, 1998.
- FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biological Reproduction**, v.50, p.225-232, 1994.
- FORTUNE J.E.; RIVERA G.M.; EVANS A.C.O.; TURZILLO A.M. Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. **Biol Reprod**, v.65, p.648-654, 2001.

- FORTUNE J.E.; RIVERA G.M.; YANG M.Y. Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. **Anim Reprod Sci**, v.82-83, p.109-126, 2004.
- FRIES, R., RUVINSKY, A. **The genetics of cattle**. New York: CABI Publishing,. 710p.,1999.
- GARCIA, G.J.K.; SEIDEL, G.E.; ELSDEN, R.P. Efficacy of shortened FSH treatment for superovulating cattle. **Theriogenology**, v. 17, n.1 p.90, 1982.
- GARCIA, J. F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, v. 56, p. 1393-1399, 2001.
- GARCIA, J. F. Utilização de marcadores moleculares para a seleção. **2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada**. Londrina-PR, p. 195-201, 2006.
- GARCIA, J. F., PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (Supl 1), p. 197-203, 2006.
- GELDERMANN, H. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. **Theor. Appl. Genet.**, v. 46, p.319-330, 1975.
- GIANNONI, M. A., GIANNONI, M. L. Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos. Editora Nobel, São Paulo, 1987, 463p.
- GINTHER O.J.; KNOPF L.; KASTELIC J.P. Temporal associations among ovarian events in cattle during oestrous cycles with two or three follicular waves. **J Reprod Fertil**, v.87, p.223-230, 1989.
- GINTHER O.J.; WILTBANK M.C.; FRICKE P.M.; GIBBONS J.R.; KOT K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biol Reprod**. Dec;55(6):1187-94, 1996.
- GONG, J.G.; BRAMLEY, T.A.; WEBB, R. The effect of recombinant bovine somatotropin on ovarian function in heifers: follicular populations and peripheral hormones. **Biology of Reproduction**, Madison, v.45, p.941-949, 1991
- GONG J.G.; CAMPBELL B.K.; BRAMLEY T.A.; GUTIERREZ C.G.; PETERS A.R.; WEBB R. Suppression in the secretion of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. **Biol Reprod**, v.55, p.68-74, 1996.

- GONZALEZ, A. LUSSIER, J.G.; CARRUTHERS, T.D.; MURPHY, B.D.; MAPLETOF, R.J. Superovulation of beef heifers with Follitropin-V: A new FSH preparation containing reduced LH activity. **Theriogenology**, p. 33-519, 1990.
- GRISART, B., FARNIR, F., KARIN, L., CAMBISANO, N., KM, J., KVASZ, A., MNI, M., SIMON, P., FRÈRE, J., COPPIETERS, W., GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **PNAS**, v. 101, p. 2398-2403, 2004.
- GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. Growth and antrum formation of bovine preantral in long-term culture in vitro. **Biol. Reprod.** v. 62, p. 1322-1328, 2000.
- HANSEN, P.J. Embryonic mortality in cattle from the embryo's perspective. **Journal Animal Science**, v.80 (Suplemento 2), p.33-44, 2002.
- HANSEN, P.J.; BLOCK, J. Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. **Reprod. Fertil. Dev.** 16, 1-14, 2004.
- HASLER J.F. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. **Theriogenology**. v. 1, n.56(9), p.1401-15, 2001.
- HASLER, J.F. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.15; n.79(3-4), p.245-64, 2003.
- HOUDE, A. A.; LAMBERT, J.; SAUMANDE, D.; SILVERSIDES, W., LUSSIER, J. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. **Mol. Reprod. Dev.** v.39, p.127, 1994.
- IRELAND J.J.; WARD F.; JIMENEZ-KRASSEL F.; IRELAND J.L.; SMITH G.W.; LONERGAN P.; EVANS A.C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum Reprod.** v. 22(6), p. 1687-95, 2007.
- JORGENSEN, C. B., KONFORTOV, B. A., MILLER, J. R. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. **Animal Genetics**, v. 27, p. 220, 1996.
- KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. T., MCGRAW, R. A., SONSTERGARD, T. S., SMITH, T. P. L., LOPEZ-CORRALEZ, N. L., BEATTIE, C. W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v. 7, p. 235- 249, 1997.

- KANITZ W.; BECKER F.; SCHNEIDER F.; KANITZ E.; LEIDING C.; NOHNER H.P.; PÖHLAND R. Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. **Reprod Nutr Dev.** v.42(6), p.587-99. Review, 2002.
- KATSKA, L.; SMORAG,Z. Number and quality of oocytes in relation to age in cattle. **Anim Reprod Sci**, v.7, p451-460, 1984.
- KEMP, S. J., BREZINSKY, L., TEALE, A. J. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. **Animal Genetics**, v. 23, p. 184, 1992.
- LAND, R.B.; HILL, W.G. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. **Anim. Prod.** v.21, p.1-12, 1975.
- LERNER, S.P. et al. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. **J. Anim. Sci.**, v.63, p.176-183, 1986.
- LI, Y.C., KORROL, A. B., FAHIMA, T., NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. **Molecular Biology and Evolution**, v. 21, p.991-1007, 2004.
- LIEFERS, S. C., te PAS, M. F. W., VEERKAMP, R. F., van der LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, v. 85, p. 1633-1638, 2002.
- LIMA WM, VIEIRA AD, THALLER NETO A, MEZZALIRA A, MATOS RC, REGORY RM. Improved superovulatory response in beef cattle following ovarian follicular ablation using a simplified transvaginal device. **Anim Reprod Sci**, n.1; v.100(3-4), p. 364-70, 2007.
- LINDSELL, C.E.; MURPHY, B.D.; MAPLETOFT, R.J. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-P at different stages of estrous cycle. **Theriogenology**, v.26, n.2, p.209-219, 1986.
- LOFTUS, R.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Nat. Sci., USA**, v.91, p. 2757-2761, 1994.
- LOONEY,C.R. Superovulation in beef females. In: **Proceedings of 5Th Annual Convention of AETA**, Fort Worth, Texas, p. 16-29, 1986.
- LUCY, M.C. Expectativas de índices reprodutivos em vacas leiteiras tratadas com somatotropina bovina. In:**CURSO NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS**, 5., Uberlândia, Anais..., Uberlândia, p.47-55, 2001.

- MACHADO, M.S.N. **Importância em controle de filiação e associação com caracteres reprodutivos de quatro microsátélites bovinos**. Santa Maria: Universidade Federal de Santa Maria, 1999, 74f. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria, 1999.
- MACHUGH, D.E. Molecular biogeography and genetic structure of domesticated cattle. Ph.D. thesis, University of Dublin, pp. 257, 1996.
- MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071-1086, 1997.
- MAPLETOFT, R.J.; PIERSON, R.A. Factors affecting superovulation in cow: practical considerations. **Embryo Transfer Newsl**, v.11, p.15-24, 1993.
- MAPLETOFT, R.J.; STEWARD, K.B.; ADAMS, G.P. Recent advances in the superovulation in cattle. **Reprod Nutr Dev**. v.42(6), p.601-11,2002.
- MARSON, E. P.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; BALIEIRO, J.C.C.; ELER, J.P.; FIGUEIREDO, L.G.G.; MOURÃO, G.B. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 4, n. 3, p. 496-505, 2005.
- MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SAUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**, v.19, p.56-81, 1983.
- MONTALDO, H. H., MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 1, p. 83-89, 1998.
- MOSCHOS, S., CHAN, J.L., MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil. Steril**. v. 77, n.3, p. 433-444, 2002.
- MOSCHOS, S., CHAN, J.L., MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. **Fertil. Steril**. 77, 3, 433-444, 2002.
- NOGUEIRA M.F.G.; BURATINI J.Jr.; PRICE C.A.; CASTILHO A.C.; PINTO M.L.G.; BARROS C.M. Expression of LH receptor mRNA splice variants in bovine granulosa cells: changes with follicle size and regulation by FSH in vitro. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.680-686, 2006.

- OLIVEIRA, J. F. C., NEVES, J. P., MORAES, J. C. F., GONÇALVES, P. B. D. Characterization of productive aspects in Brangus Ibagé cows with distinct levels of fertility. **Ciência Rural**, v. 32, p. 663- 667, 2002.
- OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; ALMEIDA, E.A.; STEIGLEDER, C.S.; MORAES, J.C.F.; GONÇALVES, P.B.D.; WEIMER, T.A. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus-ibagé cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 54-59, 2005.
- PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P., CULLEN, N. G., HYNDMAN, D. L., MORRIS, C. A., CRAWFORD, A. M., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., KEELE, J. W., SMITH, T. P. L. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 80, p. 3077-3085, 2002.
- PASSOS, D.T., HEPP, D., MORAES, J.F.C., WEIMER, T.A. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. **J. Anim. Breed. Genet.** 124, 2007.
- PAYNE, W.J.A. Domestication: A step forward in civilization. In: **Cattle Genetic Resources**. (eds. Hickman). World Animal Series, Publ. Elsevier, v. B7, p. 51-72, 1991.
- PEIXOTO M.G.; PEREIRA C.S.; BERGMANN J.A.; PENNA V.M.; FONSECA C.G. Genetic parameters of multiple ovulation traits in Nelore females. **Theriogenology**. v. 62, n 8, p.1459-64, 2004.
- PEIXOTO, M.G.C.D.; BERGMANN; J.A.G.; FONSECA, C.G.; PENNA, V.M.; PEREIRA, C.S. Effects of environmental factors on multiple ovulation of zebu donors. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58,n.4, 2006.
- PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ,J.B.S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 37, n.5, p. 703-708, 2002.
- POMP, D., ZOU, T., CLUTTER, A. C., BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a pcr-based polymorphism. **Journal Series**, Nebraska Agricultural Research Division, Paper number 11574, 1997.
- PRINGLE, T. D., WILIAMS, S. E., LAMB, B. S., JOHNSON, D. D., WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and age tenderness if Angus and Brahman crossbreed steers. **Journal of Animal Science**, v. 75, p. 2955-2961, 1997.
- RALPH, J.H.; WILMUT, I.; TELFER, E.E.; In vitro growth of bovine preantral follicles and the influence of FSH on follicular oocyte diameters. **J. Reprod and Fertility**, Abstracts Series 15, Abstract 12, 1995.

- RANDEL, R.D. Endocrine aspects of zebu cow. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, 8, 1989, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: Colégio **Brasileiro de Reprodução Animal**, v. 2. p. 1-23, 1989.
- REICHENBACH, H. D. Transferência e congelamento de embriões bovinos: considerações práticas. **Arquivos da Faculdade de Veterinária UFRGS**, v.31, n.1, p.15, 2003.
- RHODES, F.M.; DE'ATH, G.; ENTWISTLE, K.W. Animal and temporal effects on ovarian follicular dynamics in Brahman heifers. **Anim Reprod Sci**, v.38, p.265-277, 1995.
- ROBERT C.; GAGNÉ D.; LUSSIER J.G.; BOUSQUET D.; BARNES F.L.; SIRARD M.A. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. **Reproduction**, v.125, p.437-446, 2003.
- RODRIGUES, J.L. Transferência de embriões bovinos: histórico e perspectivas atuais. **Revista Brasileira de Reprodução**, Belo Horizonte, v.25,p.102-107, 2001.
- ROUILLIER, P.; GUILBAULT, L.A.; LUSSIER, J.G. et al. Changes in morphological appearance and functional capacity of recruited follicles in cows treated with FSH in the presence or absence of a dominant follicle. **Theriogenology**, v. 46, p.1053-1061, 1996.
- SAVAGE, N.C.; HOWELL, W.; MAPLETOFT, R.J. Superovulation in the cow using 17 β or GnRH in conjunto with FSH-p. **Theriogenology**, v.27, n.3, p. 383-394, 1987.
- SAVIO, J.D.; KEENAN, L.; BOLAND, M.P.; ROCHE, J.F. Pattern of growth of dominant follicles during the oestrous cycle of heifers. **J Reprod Fertil**, v.83, p.663-671, 1988.
- SCHROTH GP, CHOU PJ, HO PS Mapping Z-DNA in the human genome - Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. **Journal of Biological Chemistry** 267:11846-11855, 1992.
- SEGERSON, E.C.; HANSEN, T.R.; LIBBY, D.W.; RANDEL, R.D.; GETZ, W.R. Ovarian and uterine morphology and function in Angus and Brahman cows. **J Anim Sci**, v.59, p.1026-1046, 1984.
- SILVA, J.M.; PRICE, C.A. Insulin and IGF-I are necessary for FSH-induced cytochrome P450 aromatase but not cytochrome p450 side-chain cleavage gene expression in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. **J. Endocrinol.** v. 174, p. 499-507, 2002.

- SILVEIRA, J.C. **Marcadores moleculares e associação com características reprodutivas em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul.** 2007, 78f. Dissertação de Mestrado, ULBRA-Canoas/RS, 2007.
- SIMPSON, R.B.; CHASE, Jr. C.C.; SPICER, L.J.; VERNON, R.K.; HAMOND, A.C.; RAE, D.O.; Effect of exogenous insulin on plasma and follicular insulin-like growth factor I, insulin-like growth factor binding protein activity, follicular estradiol and progesterone, and follicular growth in superovulated Angus and Brahman cows. **J Reprod Fertil**,v.102, p.483-492, 1994.
- SINGH J.; DOMÍNGUEZ M.; JAISWAL R.; ADAMS G.P. A simple ultrasound test to predict the superstimulatory response in cattle.**Theriogenology**. v,62, n.1-2, p.227-43, 2004.
- 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.
- SPICER, L.J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domest. Anim. Endocrinol.**, v. 21, p. 251-270, 2001.
- SPICER, L.J. Proteolytic degradation of insuline-like growth factor binding proteins by ovarian follicles: a control mechanism for selection of dominant follicles. **Biol. Reprod**. v. 70, p. 1223-1230, 2004.
- SPLAN, R. K.; CUNDIFF, L. V.; VAN VLECK , L. D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. **J. Anim. Sci.** 76:2272–2278,1998.
- STEIGLEDER, C. S., ALMEIDA, E. A., WEIMER, T. A. Genetic diversity of brazilian creole cattle base don fourteen microsatellite loci. **Arch. Zoote**. v. 53, p. 3-11, 2004.
- STONE, R. T., KAPPES, S. M., BEATTIE, C. W. Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. **Animal Genetics**, v. 27, p. 216, 1996.
- STONE, R. T., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., BEATTIE, C. W. Characterization of 109 bovine microsatellites. **Animal Genetics**, v. 28, p. 62-66, 1997.
- TAUTZ, D. Notes on the definition and nomeclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: **DNA fingerprinting: State of the Science**, Pena et al. (eds), Verlag, Basel, p. 21-28, 1993.
- VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SÁ, W.F.; CAMARGO, L.S.A. Follicular dynamics in zebu cattle. **Pesq Agrop Bras**, v.35,p.2501-2509, 2000.

- VIANA, J.H.M. Cenário atual da Transferência de embriões produzidos in vivo e in vitro no Brasil e no Muindo. **O Embrião**. Jornal da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões, n 29, p.4-7, 2006.
- WANDJI, S.A.; PELLETIER, G.; SIRARD, M.A. Ontogeny and cellular localization of ¹²⁵I-labeled basic fibroblast growth factor and ¹²⁵I-labeled epidermal growth factor binding sites in ovaries from bovine fetuses and neonatal calves. **Biol. Reprod.** v. 47, p. 807-813, 1992.
- WEBB, R.; ARMSTRONG, D.G. Control of ovarian function; effect of local interactions and environmental influences on follicular turnover in cattle: a review. **Livestock Production Science**, v. 53, p. 95-112,1998.
- WEBB, R.; NICHOLAS, B.; GONG, J.G., CAMPBELL, B.K.; GUTIERREZ, C.G.; GARVERICK, H.A.; ARMSTRONG, D.G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod. Suppl.** v. 61, p. 71-90, 2003.
- WEIMER, T.A. Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal. In: **Diagnóstico Genético-Molecular**, MARKES, E.K. (org)., p. 203-218, ULBRA, Canoas, 2003.
- WEIMER, T.A., STEIGLEDER, C.S., MACHADO, M.S., ALMEIDA, S.E.M., OLIVEIRA, J.F.C., MORAES, J.C.F., HENKES, L.E. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. **Ciência Rural**, v. 37, 5, 2007.
- WILKINS, R. J., DAVEY, H. W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 27, p. 376, 1997.
- WILLET, E.L.; BLACK, W.G.; CASIDA, L.E.; SOTNE, W.H.; BUCKNER, P.J. Successful transplantation of fertilized bovine ovum. **Science**, v. 11, p. 247, 1951.
- WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; STANKO, R.L.; NIZIELSKI, S.E.; MORRISON, C.D.; KEISLER D.H. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domest. Anim. Endocrinol.**; v. 23, n.(1-2), p.339-49, 2002.
- XU, Z.Z.; GARVERICK, H.A.; SMITH, G.W.; HAMILTON, S.A.; YOUNGQUIST, R.S. Expression of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger ribonucleic acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, 53: 951-957, 1995.

Diversidade genética de doadoras de embriões das raças Nelore e Aberdeen Angus

Genetic diversity of embryos donors of Nelore and Aberdeen Angus breeds

Aguiar, Paulo Ricardo Loss – Med. Vet. Msc Professor
Adjunto do Curso de Medicina Veterinária ULBRA/RS

Silveira, Juliano Coelho – Biólogo, Msc Pesquisador

Glanzer, Werner Giehl – Bolsista de Iniciação Científica-
Lab. de Biotecnologia do H.V. ULBRA, Canoas /RS

Moraes, José Carlos Ferrugem – Doutor, Pesquisador da
EMBRAPA Pecuária Sul, Bagé/RS

Weimer, Tania de Azevedo – Profª. Doutora do Curso de
Medicina Veterinária ULBRA, Canoas/RS

Endereço para correspondência: prlaguiar@terra.com.br

Laboratórios de Fisiopatologia da Reprodução dos Animais Domésticos e de Biotecnologia, do Curso de Veterinária - ULBRA/Canoas-RS

RESUMO

Foi analisada a diversidade genética, em doadoras de embrião puras de origem das raças Nelore e Aberdeen Angus, através de marcadores moleculares (6 repetições curtas em tandem e 3 polimorfismos de um nucleotídeo) ligados à reprodução. A variação observada do número de alelos detectados nas raças Nelore e Angus foi de 2 a 8 e 1 a 10, respectivamente. As duas raças não apresentaram frequências alélicas semelhantes em nenhum dos sistemas estudados e alguns alelos foram observados somente em uma das raças, como para A. Angus BMS3004 129, HEL5 161, e, para Nelore BMS3004 132, 138, HEL5 149 e AFZ 111. Os valores de heterozigose esperada, nos diversos sistemas, em A. Angus variou de 0 a 87%, enquanto que, em Nelore, oscilou entre 0,03 e 0,75, sendo as médias de 56 e 50%, respectivamente. Conclui-se que as práticas seletivas aplicadas a estes rebanhos não afetaram grandemente a variabilidade genética dos mesmos. A diversidade entre rebanhos foi bastante alta, refletindo-se em baixa probabilidade (6×10^{-9}) de encontrar dois indivíduos geneticamente idênticos, um de cada rebanho.

Palavras-Chave: Doadoras de embrião, diversidade genética, marcadores moleculares

ABSTRACT

This paper analyzed the genetic diversity of embryos donors from Nelore and Aberdeen Angus pure of origin breeds, through molecular markers (6 short tandem repeats and 3 single nucleotide polymorphisms) linked to reproduction. The variation observed in the number of alleles in Nelore and A. Angus breeds was 2 to 8 and 1 to 10, respectively. No similarity in allele frequencies was observed in both breeds in all investigated systems, and some alleles were exclusive of one of the herds, such as BMS3004 129, HEL5 161, in A. Angus, and BMS3004 132, 138, HEL5 149 e AFZ 111, in Nelore. The expected heterozygosity varied from 0 to 87% in A. Angus, and from 0.03 to 0.75 in Nelore, the average values being of 56 e 50%, respectively. Therefore the selective practices applied to the breeds seem have not affected their genetic variability. The diversity between breeds were very high and resulted in a very low probability (6×10^{-9}) to find two identical animals, one from each breed.

Key words: Embryos donors, genetic diversity, molecular markers

INTRODUÇÃO

Os principais tipos de bovinos criados em todo o mundo são os zebuínos (*Bos primigenius indicus*) e os taurinos (*Bos primigenius taurus*; INTERNATIONAL COMMISSION ON ZOOLOGICAL NOMENCLATURE, 2003), os primeiros de origem indiana e os outros procedentes da Europa, e, devido a sua completa interfertilidade, devem ser considerados como variações geográficas de uma mesma espécie (EPSTEIN, 1971; EPSTEIN e MASON, 1984; PAYNE, 1991; LOFTUS et al., 1994). Segundo a Associação Nacional de Criadores de Zebuínos, a raça Nelore apresenta o maior número de criadores e animais registrados nesta entidade, enquanto que a Associação Nacional de Criadores - Herd Book Collares- indica a raça Aberdeen Angus como a líder em registros, nas de origem Européia.

Análises de polimorfismos curtos em tandem e de seqüências do DNA mitocondrial revelaram que os ancestrais dos zebuínos e taurinos divergiram algumas centenas de milhares de anos atrás e, que resultaram de eventos independentes de domesticação (LOFTUS et al., 1994; MACHUGH et al., 1997).

Taurinos e zebuínos possuem diferenças morfológicas e fisiológicas que refletem não só as mudanças ambientais onde estes animais se adaptaram, como diferentes seleções genéticas aplicadas ao longo do tempo. Os animais foram submetidos, historicamente, à seleção para a produção de leite e/ou carne, e em seguida, para ausência de aspás, e cor de pelagem, resistência a doenças, docilidade e fertilidade.

Na pecuária brasileira, várias técnicas têm sido introduzidas visando aumentar a eficiência da produção de animais puros, na tentativa de atender à grande demanda de seus descendentes, e, principalmente, permitir uma expansão do mercado consumidor, ávido por um produto de melhor qualidade a um menor custo. Entre estas técnicas, destaca-se a transferência de embriões (TE), que tem mostrado não somente ser um instrumento capaz de melhorar a performance produtiva, mas também possuir grande importância no campo de investigação científica. De acordo com Land e Hill (1975) o emprego da Múltipla Ovulação e Transferência de Embriões (MOET) aumenta em quase duas vezes a taxa de ganho genético obtida em comparação com as estratégias de programas de reprodução tradicionais.

Abordagens mais específicas que permitam o conhecimento de parâmetros genéticos relativos a características da variabilidade das respostas das vacas

doadoras de embriões aos programas de superovulação são uma necessidade inerente à aplicabilidade desta biotécnica. Com o aumento do conhecimento sobre o genoma animal e, conseqüentemente, da posição e efeito de locos principais para características quantitativas, tornou-se possível, utilizando-se marcadores moleculares, modificar-se as técnicas tradicionais de seleção, baseadas exclusivamente no aspecto fenotípico (DENTINE,1999). Para Weimer et al. (2003) e Garcia e Porto-Neto (2006) os marcadores moleculares, além de serem empregados para caracterizarem geneticamente populações, raças, espécies, para estudos de genealogias e controle de paternidade, podem ajudar a eliminar os inconvenientes da seleção baseada em análises exclusivas de fenótipo. As primeiras aplicações de marcadores moleculares na produção animal envolveram a identificação de características condicionadas por um loco principal. Estas, devido ao padrão de herança mais simples, são mais fáceis de detectar, e por isso, já existem muitos exemplos de marcadores empregados para identificar, corretamente, animais portadores de características monogênicas. Davis e DeNise (1998) comentam que os marcadores moleculares podem auxiliar técnicas reprodutivas avançadas como ovulações múltiplas, transferência de embriões, cultura de células primordiais, maturação e fertilização *in vitro*, pois permitem a identificação de genes específicos introduzidos no rebanho ou raças de interesse.

A primeira estratégia para a aplicação de marcadores moleculares na seleção animal é, no entanto, o conhecimento da variabilidade genética dos rebanhos-alvo. Assim, este trabalho avaliou a diversidade genética, em nove marcadores moleculares (seis polimorfismos curtos em tandem, STRs e três polimorfismos de um único nucleotídeo, SNPs), em dois rebanhos bovinos selecionados para a transferência de embriões.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram analisadas 59 doadoras de embrião da raça Aberdeen Angus e 60 da raça Nelore, sendo todos os animais puros de origem e registrados nas suas respectivas associações. Os animais da raça Nelore foram obtidos de uma única central de transferência de embriões, localizada no Estado do Mato Grosso do Sul, incluindo vacas de diferentes origens, enquanto que as amostras de Aberdeen Angus foram oriundas de 5 diferentes propriedades localizadas no Estado do Rio Grande do Sul.

Os DNAs foram preparados a partir de células sangüíneas, de amostras recolhidas em tubos contendo anticoagulante à base do sal de sódio ácido Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA), congeladas e remetidas ao Laboratório de Biotecnologia da Faculdade de Medicina Veterinária da ULBRA, localizada no município de Canoas/RS, região metropolitana de Porto Alegre. Ao chegar ao laboratório, foram processadas as extrações dos DNAs, utilizando-se a técnica descrita por Miller et al. (1988).

Os STRs foram investigados através da amplificação do DNA por PCR, com técnica padrão e “primers” e temperaturas de anelamento específicas (Tabela 1), com um volume final de 25µl e contendo 50ng de DNA.

Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel vertical de poliacrilamida não desnaturante (LAHIRI et al., 1997). Os fragmentos foram analisados, após a coloração com nitrato de prata, usando para comparação, o marcador de peso molecular de 25 pb (Promega).

Para a análise dos SNPs LepSau3A1 e FSHR, os produtos de amplificação foram clivados com as endonucleases Sau3A1 (Promega) e Alu I (New England), respectivamente, conforme o protocolo dos fabricantes. Os produtos de clivagem foram analisados em gel vertical de poliacrilamida (SAMBROOK e RUSSELL, 2001).

As freqüências alélicas e genotípicas foram computadas por contagem direta. A heterozigosidade esperada (H) e a probabilidade de identidade foram estimadas de acordo com Nei (1978) e Van Zeveren et al., 1990.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As freqüências alélicas dos STRs e SNPs analisados em doadoras de embrião das raças Nelore e Aberdeen Angus, estão apresentadas na Tabela 2. A variação observada, no número de alelos detectados nas raças Nelore e Angus foi de 2 a 10 e 1 a 10, respectivamente. As duas raças não apresentaram freqüências alélicas semelhantes em nenhum dos sistemas estudados e alguns alelos foram observados somente em uma das raças, como BMS3004 *129*, HEL5 *161*, em A. Angus e BMS3004 *132*, *138*, HEL5 *149* e AFZ *111*, em Nelore.

Na Tabela 2 verifica-se, também, que animais da raça A. Angus, quando comparados com os Nelores, apresentaram uma maior freqüência dos alelos *103* e *105* para o STR BM4325, enquanto, na raça Nelore, houve maior freqüência do alelo *101*. Estes foram também os alelos mais prevalentes em rebanhos das raças Aberdeen Angus e Gado Geral, previamente analisados (SILVEIRA, 2007).

Para o sistema BMS3004, a amostra de Aberdeen Angus mostrou-se monomórfica, para um alelo distinto dos observados em Nelore, sendo que nesta raça, o alelo *132* foi o mais freqüente. O monomorfismo observado em BM3004, na raça A Angus, havia sido descrito por Silveira (2007), trabalhando com animais puros de origem, da mesma raça, mas de rebanho distinto deste, podendo-se supor uma origem taurina para o mesmo. Esta hipótese pode ser confirmada ao não ser observado este alelo nos 60 animais da raça Nelore estudados, nos quais foram constatados, apenas os alelos BMS3004 *132* e *138*. Adicionalmente, Steigleder et al. (2004), Silveira (2007) e Weimer et al. (2007)

encontraram, em rebanhos de origem taurina, frequências de 0,59, 0,66 e 0,64 respectivamente, para este alelo, sendo este último valor similar ao que seria esperado em animais com um componente 5/8 Aberdeen Angus (Brangus-Ibagé) admitindo-se que a população A. Angus que originou a raça fosse também monomórfica para tal alelo.

No marcador molecular ILSTS002 foi observado que os alelos *133* e *135* foram os mais incidentes para a raça Aberdeen Angus, enquanto, para a raça Nelore as maiores frequências ficaram com os alelos *137* e *135*. As frequências mais observadas nas vacas Brangus-Ibagé e Gado Geral foram para os alelos *133*, *135* e *135*, *137*, respectivamente, (Weimer et al., 2007 e Silveira, 2007) e na raça A. Angus, para o alelo *135* (Silveira, 2007). Os valores dos alelos *133*, *135* e *137* observados por Weimer et al. (2007), para o rebanho Brangus-Ibagé, manteve a proporcionalidade referente à participação de cada subespécie na formação da raça híbrida.

As frequências alélicas do sistema IDVGA51 indicam que, para a raça Aberdeen Angus, o alelo *175* foi altamente incidente seguido pelo *183*; já em Nelore, este marcador comportou-se de forma adversa, sendo constatado que o alelo *177* foi o mais freqüente, seguido de *175* e *181*. Em pesquisas anteriores o alelo *175* tem sido observado como o mais freqüente, na maioria das populações (Almeida et al., 2003, 2007, Steigleder et al., 2004, Silveira 2007).

Problemas na amplificação de algumas amostras da raça Nelore, para o marcador HEL5, provocaram uma variação no número de indivíduos analisados neste sistema, sendo o total estudado foi de 52 doadoras. A Tabela 2 mostra, na raça Aberdeen Angus, uma frequência maior para os alelos *165*, *153* e *167* e, na Nelore, houve uma alta frequência do alelo *151* seguido do *153*. Silveira (2007) descreve os alelos *151* e *165* como os mais freqüentes, em A. Angus, enquanto Oliveira et al (2005) verificaram valores mais altos para *163* e *165*, em um rebanho Brangus-Ibagé.

Os valores observados para as frequências alélicas no marcador AFZ-1, nas vacas Aberdeen Angus, foram maiores para o alelo *123*, seguido de *117* e *125*. Na raça Nelore, o destaque deu-se para o alelo *121*, sendo que os alelos *113* e *123* também foram freqüentes, embora com um menor percentual. Estes alelos também apresentaram altas frequências em outros rebanhos bovinos previamente investigados (Oliveira et al, 2005, Silveira, 2007)

No marcador FSHR, para a raça Aberdeen Angus ocorreu uma homogeneidade para os alelos *C* e *G*, enquanto na raça Nelore, o alelo *G* foi superior em frequência em relação ao alelo *C*. Frequências mais elevadas do alelo *G* foram também relatadas por Marson et al. (2004) em animais híbridos taurinos/zebuínos.

Nos sistemas LEPSau3A1(A/B) e LEPSau3A1(1/2), os alelos *A* e *I* foram os mais freqüentes, em ambas as raças, similar ao previamente observado em

animais das raças Aberdeen Angus, Brangus-Ibagé e Gado Geral (Almeida et al 2003, 2007; Silveira 2007).

Variações nas frequências alélicas entre raças e, principalmente, entre rebanhos de uma mesma raça refletem, provavelmente, diferenças nas estruturas de cruzamentos utilizadas, no manejo aplicado aos vários plantéis e/ou nas práticas seletivas, que em geral visam objetivos distintos. Este último fator, pode, muitas vezes resultar em perda da variabilidade genética do rebanho.

A Tabela 2 apresenta, também, os valores de heterozigose esperada (H), nos diversos sistemas; em A. Angus, H varia de 0 a 87%, sendo a media entre sistemas, de 0,56, enquanto em Nelore tal parâmetro oscilou entre 0,03 e 0,75, com média de 0,50. Esses resultados de valores razoavelmente altos de diversidade genética são similares ao previamente descrito em outros rebanhos bovinos e sugerem que as práticas seletivas aplicadas a estes rebanhos não interferiram, grandemente, na variabilidade genética dos mesmos.

A diversidade entre os rebanhos foi bastante alta, refletindo-se em baixos valores de probabilidade de identidade entre as raças estudadas (PI), que oscilou entre zero e 6 % nos STRs e de 35 a 64%, nos SNPs (Tabela 2). Nestes últimos marcadores os valores são em geral mais altos, por se tratarem de sistemas dialélicos. O uso simultâneo dos nove sistemas investigados indica a grande variabilidade inter-populacional, já que a chance de dois indivíduos, um de cada rebanho, apresentarem o mesmo genótipo, é de 6×10^{-9} , ou praticamente nula, principalmente considerando os tamanhos populacionais.

CONCLUSÕES

A análise da diversidade genética de fêmeas doadoras de embriões, realizada através de nove marcadores moleculares, em duas raças bovinas (Nelore e Aberdeen Angus) indicou considerável variabilidade intra-populacional, sugerindo que as práticas seletivas aplicadas aos rebanhos não interferiu em seus níveis de diversidade. A variabilidade inter-populacional foi bastante elevada, de modo que a probabilidade de encontrar dois indivíduos, geneticamente idênticos, retirados aleatoriamente cada um de um rebanho é próximo de zero.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., TERRA, G., NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D., WEIMER, T. A. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. **Ciência Rural**, v. 37, p. 206-211, 2007.
- ALMEIDA, S.E.M.; ALMEIDA, E.A.; MORAES, J.C.F.; WEIMER, T.A. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **J. Anim. Breed. Genet.** v. 120, p. 106-113, 2003.

- BISHOP, M. D., KAPPES, S. M. KEELE, J. W., et al. A genetic-linkage map for cattle. **Genetics**, v. 136, n. 2, p. 619-639, 1994.
- DAVIS, G. P., DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal Animal Science**, v. 76, p. 2331- 2339, 1998.
- DENTINE, M.R. Market assisted selection. In: *The Genetics of Cattle*, R. Fries & A. Ruvinsky (eds), CABI, Oxon, 1999.
- EPSTEIN, H. The Origin of the Domestic Animals of Africa. **Africana Publishing Cooperation**, New York, v. 1, p. 185–555, 1971.
- EPSTEIN, H.; MASON, I.L. Cattle. In: *Evolution of Domesticated Animals* (Mason, I.L., ed.). Longman, New York, p. 6-27, 1984.
- GARCIA, J. F., PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34 (Supl 1), p. 197-203, 2006.
- HOUDE, A., A.; LAMBERT, J.; SAUMANDE, D. W. Silversides, and J.Lussier. 1994. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. **Mol. Reprod. Dev.** 39:127.
- JORGENSEN, C. B., KONFORTOV, B. A., MILLER, J. R. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. **Animal Genetics**, v. 27, p. 220, 1996.
- KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. T., MCGRAW, R. A., SONSTERGARD, T. S., SMITH, T. P. L., LOPEZ-CORRALEZ, N. L., BEATTIE, C. W. A second-generation linkage map of the bovine genome. **Genome Research**, v. 7, p. 235- 249, 1997.
- KEMP, S. J., BREZINSKY, L., TEALE, A. J. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. **Animal Genetics**, v. 23, p. 184, 1992.
- LAHIRI, D.K., ZANG, A., NURNBERGER, J.I. High-resolution detection of PCR products from STRs markers using a nonradioisotopic technique. **Biotechnol. Mol. Med.** V. 60, p. 70-75, 1997.
- LAND, R.B.; HILL, W.G. The possible use of superovulation and embryo transfer in cattle to increase response to selection. **Anim. Prod.** v.21, p.1-12, 1975.
- LOFTUS, R.; MACHUGH, D.E.; BRADLEY, D.G.; SHARP, P.M.; CUNNINGHAM, P. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proc. Nat. Sci., USA**, v.91, p. 2757-2761, 1994.

MACHUGH, D.E.; SHRIVER, M.D.; LOFTUS, R.T.; CUNNINGHAM, P.; BRADLEY, D.G. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). **Genetics**, v. 146, p. 1071-1086, 1997.

MARSON, E.P.; FERRAZ, J.B.S.; MEIRELLES, F.V.; BALIERO, J.C.C.; ELER, J.P.; MOURÃO, G.B.; FIGUEIREDO, L.G.G. Efeito dos polimorfismos dos genes do LHR e do FSHR sobre a precocidade sexual em novilhas de corte de diferentes composições raciais. **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**. 2004 Acesso no site www.sbma.org.br em 15/01/2008.

MILLER, S. A., DYKES, D. D., POLESKY, H. F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance in a small number of individual. **Genetics**, v.89, p. 583- 590, 1978.

OLIVEIRA, J.F.C.; NEVES, J.P.; ALMEIDA, E.A.; STEIGLEDER, C.S.; MORAES, J.C.F.; GONÇALVES, P.B.D.; WEIMER, T.A. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus-ibagé cattle. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, p. 54-59, 2005.

PAYNE, W.J.A. Domestication: A step forward in civilization. In: Cattle Genetic Resources. (eds. Hickman). World Animal Series, Publ. Elsevier, v. B7, p. 51-72, 1991.

POMP, D., ZOU, T., CLUTTER, A. C., BARENDSE, W. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a pcr-based polymorphism. **Journal Series**, Nebraska Agricultural Research Division, Paper number 11574, 1997.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. Molecular Cloning. A laboratory Manual, Third Edition. Vol. 1, Cold Spring Harbor, New York, 2001.

SILVEIRA, J.C. **Marcadores moleculares e associação com características reprodutivas em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul**. 2007, 78f. Dissertação de Mestrado, ULBRA-Canoas/RS, 2007.

STEIGLEDER, C. S., ALMEIDA, E. A., WEIMER, T. A. Genetic diversity of brazilian creole cattle base don fourteen microsatellite loci. **Arch. Zoot.** v. 53, p. 3-11, 2004.

- STONE, R. T., KAPPES, S. M., BEATTIE, C. W. Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. **Animal Genetics**, v. 27, p. 216, 1996.
- STONE, R. T., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., BEATTIE, C. W. Characterization of 109 bovine microsatellites. **Animal Genetics**, v. 28, p. 62-66, 1997
- VAN ZEVEREN, A., BOUQUET, Y., VAN DE WEGHE, A., COPPIETERS, W. A genetic blood marker study on 4 pig breeds. II Estimation and comparasion of within-breed variation. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 107, p. 104-112, 1990.
- WEIMER, T.A. Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal. In: Diagnóstico Genético-Molecular, MARKES, E.K. (org)., p. 203-218, ULBRA, Canoas, 2003.
- WEIMER, T.A., STEIGLEDER, C.S., MACHADO, M.S., ALMEIDA, S.E.M., OLIVEIRA, J.F.C., MORAES, J.C.F., HENKES, L.E. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. **Ciência Rural**, v. 37, 5, 2007.
- WILKINS, R. J., DAVEY, H. W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. **Animal Genetics**, v. 27, p. 376, 1997.

Tabela 1: Marcadores analisados, seqüências dos primers, tamanhos esperados dos produtos de amplificação em pares de bases (pb), temperatura de anelamento (TA) e referências.

Marcadores	Seqüência do Primers	Produtos (pb)	TA	Referências
BM4325	F- 5'AGA GTC AGA CAG GAC TGA GCG 3'	97-117	64-54°C ^a	KAPPES et al., 1997 STONE et al., 1997
	R- 5'CTG TAA CTT GCA AAT GCA AAT GTC TCG 3'			
ILSTS002	F- 5'TCT ATA CAC ATG TGC TGT GC 3'	123-137	54°C	KEMP et al., 1992
	R- 5'CTT AGG GGT GAA GTG ACA CG 3'			
BMS3004	F- 5'GGA CAG AGG AGC CTG GTT G 3'	129-138	56°C	STONE et al., 1996 KAPPES et al., 1997
	R- 5'AGT TGC GTT GTT CAT CAT TCC 3'			
LepSau3A1	F- 5'GTC ACC AGG ATC AAT GAC AT 3'	A/B :400	54°C	POMP et al., 1997 WILKINS e DAVEY., 1997
	R- 5'AGC CCA GGA ATG AAG TCC AA 3'	1/2: 690		
IDVGA51	F- 5'ATG GCA ATA TTT TGT TCT TTT TC 3'	175-183	50°C	KAPPES et al., 1997
	R- 5'ATT CCT TGA TGG TCT AAT GGT TA 3'			
HEL5	F- 5'GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA 3'	147-169	58°C	BISHOP et al., 1994
	R- 5'AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC 3'			
AFZ1	F- 5'TTG GAC GAC AAA ACT CAC GG 3'	151-129	50°C	JORGENSEN et al., 1996
	R- 5'GTG GCT GGA CTG GTC TGG TT 3'			
FSHR	F- 5' CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC 3'	306	58°C	HOUDE et al., 1994
	R- 5' AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGGG 3'			

^a PCR com "touchdown".

Tabela 2: Frequências alélicas dos marcadores moleculares nas diferentes amostras de Nelore e A. Angus.

Marcadores Amostras	ALELOS										H	PI	
STRs													
BM4325	97	99	101	103	105	107							
Nelore	0,08	0,16	0,45	0,20	0,10	0,01						0,72	
A. Angus	0,01	0,04	0,12	0,33	0,41	0,09						0,71	0,05
BMS3004	129	132	138										
Nelore		0,76	0,24									0,36	
A. Angus	1,0											0,00	0,00
ILSTS002	127	129	131	133	135	137	139	141					
Nelore	0,03	0,05	0,10	0,17	0,19	0,41	0,04	0,01				0,75	
A. Angus	0,11	0,01	0,07	0,30	0,30	0,13	0,06	0,02				0,79	0,05
IDVGA51	173	175	177	179	181	183							
Nelore	0,01	0,20	0,49	0,10	0,15	0,05						0,69	
A. Angus	0,01	0,58	0,11	0,04	0,07	0,17						0,62	0,06
HEL5	149	151	153	155	157	159	161	163	165	167	169		
Nelore	0,02	0,50	0,20	0,15	0,07	0,01		0,01	0,01	0,02	0,01	0,69	
A. Angus		0,05	0,19	0,10	0,06	0,02	0,04	0,12	0,20	0,15	0,07	0,87	0,01
AFZ1	111	113	115	117	119	121	123	125					
Nelore	0,04	0,21	0,02	0,01	0,06	0,43	0,22	0,01				0,72	
A. Angus		0,10	0,03	0,15	0,07	0,10	0,40	0,15				0,78	0,04
FSHR	C	G											
Nelore	0,25	0,75										0,39	
A. Angus	0,50	0,50										0,50	0,35
LepSau3A1 (A/B)	A	B											
Nelore	0,90	0,10										0,18	
A. Angus	0,72	0,28										0,41	0,48
LepSau3A1 (1/2)	1	2											
Nelore	0,99	0,01										0,03	
A. Angus	0,81	0,19										0,32	0,64

H: heterozigose esperada; PI: probabilidade de identidade entre rebanhos

Evaluation of molecular markers effects on reproductive performance in two beef cattle herds

J.C. Silveira,

D.T. Passos,

P.L. Aguiar,

J.C.F. Moraes,

T.A. Weimer

J.C. Silveira, D.T. Passos, P.L. Aguiar and T.A. Weimer

Laboratório de Biotecnologia, Hospital Veterinário.

Universidade Luterana do Brasil, Canoas, RS, Brazil.

J.C. Silveira (present address)

Animal Reproduction Laboratory, Colorado State University, Fort Collins, CO, USA

J.C.F. Moraes

Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brazil

Send correspondence to:

T.A. Weimer

Duque de Caxias, 910/101, 90010-280, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: + 55 51 30293594; fax: + 55 51 30293594.

E-mail address: taweimer@gmail.com

Abstract

Association studies were performed between reproductive efficiency and eight molecular markers [six short tandem repeats, STRs (BM4325, BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, AFZ1) and two single nucleotide polymorphisms, SNPs (LepSau3A1 A-B, and LepSau3A1 1-2)] linked to genes involved in the reproductive function in two beef cattle herds, a pure breed Aberdeen Angus sample (AA) that had been submitted to strong selection pressure for better reproductive performance, and a crossbreeding herd (CB) not suffering selection for reproduction improvement. No significant association between CI and genotype or alleles was detected in AA animals, but significant associations were verified between in CB cows: carriers of at least one IDVGA51 181 allele were more frequent in the sub-fertile group ($P=0.05$), while carriers of IDVGA51 173 and IDVGA51 177 alleles were more frequent in fertile cows ($P=0.01$ and $P=0.02$, respectively), and animals with short IDVGA51 alleles were 15% more common in fertile cows ($P=0.04$); also, carriers of at least one ILSTS002 137 allele were about 20% more frequent in the sub-fertile cows group ($P=0.03$). These data suggest the use of IDVGA51 and ILSTS002 for MAS in animals not previously submitted to selection, but this methodology may not be effective in herds resulting from strong selection for many generations.

Key words

Beef cattle, reproductive performance, Marked-Assisted Selection, Short Tandem Repeats, Single Nucleotide Polymorphisms

Abbreviations

AA	Aberdeen Angus breed
AFZ1	STR at BTA at BTA 21
AI	Artificial Insemination
BI	Brangus-Ibagé breed
BM4325	STR at BTA 15
BMS3004	STR at BTA 18
BTA	Bovine chromosome
CB	Crossbreeding herd
CI	Calving Interval
FSH	Follicle Stimulating Hormone
HEL5	STR at BTA 21
IDVGA51	STR at BTA 4
ILSTS002	STR at BTA 18
IGF-1	Insulin Like Growth factor
LD	Linkage Disequilibrium
Lep	Leptin
LepSau3A1 A-B	SNP 1 at Lep gene
LepSau3A1 1-2	SNP 2 at Lep gene
LH	Luteinizing Hormone
MAS	Marker-Assisted Selection
PCR	Polymerase Chain Reaction
PGF2 α	Prostaglandin F 2 alfa
PO	Pure Origin
SNPs	Single Nucleotide Polymorphisms
STRs	Short Tandem Repeats

Introduction

Reproductive efficiency is a major factor affecting livestock production. Several genes are involved in reproduction and in the reestablishment of postpartum ovarian activity, among which are the follicle stimulating hormone (FSH), the luteinizing hormone (LH), the insulin-like growth factor (IGF-1), the leptin (Lep), and their receptors genes. At the end of pregnancy, the hypothalamic-pituitary axis responds to a negative feedback effect of placental and ovarian steroids by suppressing FSH release and by accumulating this hormone in the anterior pituitary, depleting LH stores (review in Yavas and Walton 2000). After the reestablishment of LH stores in the anterior pituitary, between the 15th and 30th postpartum days, maternal-offspring bond increases postpartum anestrus due to the negative effect on LH release (Williams et al. 1996), which, in turn, affects the final maturation and ovulation of the dominant follicle. After LH stores are reestablished, nutritional status and suckling may be the most important factors that inhibit postpartum ovulation in beef cows. According to Rasby et al. (1992), nutrition restriction has a negative influence on LH release, and poor nutrition is a recognized cause of reduced fertility in cattle grazing in subtropical/tropical areas (Bó et al. 2003). IGF-1 is an important mediator of the effects of dietary intake and/or energy balance on cow fertility. Increased concentrations of IGF-1 could directly stimulate proliferation or steroidogenic capacity of thecal and/or granulosa cells (review in Diskin et al. 2003). The Lep gene codifies leptin protein, an adipocyte-secreted hormone that regulates energy homeostasis, plays a role in signaling nutritional status to the central reproductive axis, and seems also to stimulate LH and FSH release by the pituitary (Moschos et al. 2002; Zieba et al. 2005).

Genetic markers or polymorphisms inside or linked to these genes could influence their expression by modifying DNA conformation and therefore affecting the postpartum anoestrus duration. Genetic markers could then be used to increase the selection response in a methodology named marker-assisted selection (MAS). According to Davis and DeNise (1998), MAS is based on three phases: the detection phase, in which quantitative trait loci are identified and their effects on the phenotype are measured; the evaluation phase, in which the markers are evaluated in commercial populations; and the implementation phase, in which markers are combined with phenotypic and pedigree information in genetic evaluation to predict the genetic merit of individuals within the population.

Several authors described associations between reproductive performance and molecular markers, in the first MAS phase. Weimer et al. (2007) detected a positive association between BMS3004 and ILSTS002 short tandem repeats (STR), both mapped at BTA 18, near LH β chain gene, and lifetime calving interval (three or more calving intervals, CI); Duarte et al. (2005) verified a positive association between CI and BM4325 STR mapped close to FSH β gene at BTA 15; Oliveira et al. (2005) found a positive association between CI and HEL5 and AFZ1 STRs, both mapped at BTA 21 near IGF-I receptor gene; Almeida et al. (2003) verified positive associations between CI and markers mapped at BTA 4, linked to the Lep gene [the single nucleotide polymorphism (SNP) LepSau3A1 at the Lep intron 2, and the IDVGA51 STR in the same chromosome].

These associations need to be evaluated in commercial populations, following the second MAS phase (Davis and DeNise 1998) in order to be used in selective programs.

This paper analyzed the effect of the six STRs and two SNPs above described on reproductive performance, in two commercial beef cattle herds.

Materials and Methods

The first sample is composed of pure origin (PO) Aberdeen Angus cows (AA, n=119), raised on a private farm in South Brazil. These animals had been selected for around 10 years for improvement of calving interval (CI), weight at birth, and maternal ability. Cow ages varied from 2 to 10 years, with an average of 4 years, modal body score condition was of 4.0 [in a classification range from 1-very thin to 5-obese (Cachapuz 1991)], and average CI was of 378 ± 30 days; the animals have been managed at a stocking rate of 1.2 animal units per hectare (au ha⁻¹) on cultured pastures, with very high amount of dry matter per hectare. Reproductive seasons were performed annually during spring, extending from the 15th of October to the 1st of December; during the first week the cows were controlled daily to detect the onset of estrus and to perform artificial insemination (AI), 12 hours later. Animals not showing estrus signals were submitted to estrus induction with PGF2 α hormone and then inseminated. Cows which presented estrus return were submitted to a second AI. Animals not conceiving after this period were submitted to natural breeding for 15 days with confirmed bulls, which had been previously evaluated through expected progeny difference.

The second sample was composed of crossbreeding cows (CB, n=81) resulting from purebreds Hereford, Aberdeen Angus, Normand, Limousin and Brown Swiss and their synthetics, in different proportions, and Brangus-Ibagé (5/8 Aberdeen Angus x 3/8 Nelore) mated with Braford bulls. The animals were multiparous cows (ages varying from 4 to 6 years), with a modal body condition score of 3. The animals were kept at a stocking rate of 0.5-0.7 au ha⁻¹, on native pastures on a private farm in South Brazil, and had not been submitted to selection to improve reproduction. The annual mating season includes one major in spring-summer, from the 15th of November to the 15th of January, and a complementary one for the cows which remain non-pregnant in fall, from the 1st of April to the 15th of May. The animals were then classified in two groups (fertile and sub-fertile cows) on the basis of occurrence of pregnancy or non-pregnancy, after the two mating seasons: 42 CB cows were classified as fertile, once they became pregnant in the second spring season as suckling cows, having a calving interval inferior to 365 days; and 39 CB cows were classified as sub-fertile as they do not became pregnant after the two mating season, as non-suckled cows.

Blood samples were obtained from the tail vein or artery, using EDTA as anticoagulant, and following the Brazilian Principles of Veterinarian Medical Ethics (2001) and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals (1985)

DNA was extracted from leukocyte cells of peripheral blood by the method of Miller et al. (1988). The regions covering STRs and SNPs markers were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Kemp et al. 1992; Bishop et al. 1994; Houde et al. 1994; Jorgensen et al. 1996; Stone et al. 1996; Kappes et al. 1997; Pomp et al. 1997; Stone et al. 1997). STR amplification products and SNP amplicons, submitted to Sau3A1 endonuclease cleavages, were analyzed by vertical electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel (Lahiri et al. 1997).

For CB cows, the association analyses between alleles or genotypes and pregnancy state were performed by the Fisher exact test, and for AA, the comparisons were performed between alleles or genotypes and CI through the Kruskal-Wallis non-parametric analysis of variance. For both samples, two approaches were employed: a) following previously described associations, as indicated in Table 1; and b) comparing all alleles or genotypes

randomly; in this case, when a positive association was detected the significant class was compared with the others by a Chi-Square test. When the associations involved more than one allele, they were grouped in classes of short and long alleles. This approach was used for IDVGA51 (short alleles: 173-177 bp; long alleles: 179-183 bp) and ILSTS002 (short: 127-137 bp; long: 139-143 bp) markers. All statistical analyses were made using SPSS (1999).

Results

Allele frequencies for six STRs and two SNPs markers are presented in Table 2. The main differences among samples were the occurrence, in AA of monomorphism for BMS3004 and LepSau3A1 1-2, and higher frequencies of the alleles BM4325 101, IDVGA51 175, HEL5 151, AFZ1 115, and AFZ1 125, while in CB cows the alleles BM4325 105, IDVGA51 177, HEL5 149, and AFZ1 119 were more frequent and some alleles (ILSTS002 133, and HEL5 147) were exclusive to this breed.

No significant association between CI and genotype or alleles was detected in AA animals, but significant associations were verified between IDVGA51 and ILSTS002 markers and fertility groups, in CB cows: carriers of at least one IDVGA51 181 allele (Table 3) were more frequent in the sub-fertile cows group ($P=0.05$), while carriers of IDVGA51 173 and IDVGA51 177 alleles were more frequent in the fertile cows group ($P=0.01$ and $P=0.02$, respectively). The analysis grouping the alleles in classes indicated that carriers of short alleles were significantly more common in fertile cows ($P=0.04$).

For ILSTS002 STR (Table 4) carriers of at least one ILSTS002 137 allele were about 20% more frequent in the sub-fertile cows group ($P=0.03$), but no difference was observed between carriers and non-carriers of 135 allele, as previously described (Weimer et al 2007), neither between carriers of short or long alleles.

Discussion

The present work analyzed the effect of STRs and SNPs markers on reproductive performance in two different cattle livestock, a pure breed Aberdeen Angus sample (AA),

which had been submitted to strong selection pressure for better reproductive performance, and crossbreeding herd (CB) not suffering selection for reproduction improvement.

Only two associations were detected in CB cows, involving IDVGA51 and ILSTS002 STRs. In relation to IDVGA51 among the verified associations, one had been previously described: Almeida et al. (2003), analyzing cows lifetime calving interval in a Brangus-Ibagé (5/8 Aberdeen Angus x 3/8 Nelore) sample (BI) observed that the IDVGA51 181 allele was associated to lower CI, while Passos et al. (2007), testing leptin gene expression in the subcutaneous tissue in BI herd verified that IDVGA51 181 carrier cows presented higher Lep mRNA levels. Besides confirming the disadvantageous effect of this allele, the present paper detected the advantageous effect of IDVGA51 173 and IDVGA51 177 alleles. The analysis grouping alleles according to their base pairs size indicated a positive effect on reproduction of short alleles. This STR is mapped at 87 cM from the beginning of the BTA4 chromosome and at 2 cM downstream the Lep gene (Kappes et al. 1997), and therefore, could be in an enhancer transcription region and influence gene expression (Li et al. 2004), the effect being dependent on the repeat size (Comings 1998). Leptin coordinates the reproductive status by acting as a cross-link between reproduction and nutrition (Chehab et al. 2002); its expression is regulated by several hormones and proteins, and stimulates LH and FSH release by the pituitary. Additionally, leptin excess, deficiency, or resistance can be associated with abnormal reproductive function (review in Moschos et al. 2002). It is possible, then, that the differences in reproductive performance between cows with long or short alleles could be due to difference in Lep gene expression.

Concerning ILTST002, we verified the negative effect of the ILSTS002 137 allele. In a previous study, Weimer et al. (2007) detected higher lifetime CI in BI animals carrying at least one ILSTS002 135 allele. Although both alleles are associated to worst reproductive performance, the alleles involved differ between herds. Several reasons could be thought to explain these differences: the first one is error in genotyping, but this factor could be discarded, because in order to verify this effect, genotype analyses were performed using a control sample supplied by Weimer et al. (2007). The second one is that the effect would be not dependent on a specific allele, but on allele size (Comings 1998); this possibility was tested, grouping the alleles in short (127-137 bp) and long (139-145 bp) sequences, but no

significant difference was detected. The third is the occurrence of linkage disequilibrium (LD) between ILTS002 STR and a mutation at the Lep gene which modifies its expression, the allele involved in LD varying between populations; however, the sample size analyzed in both investigations did not permit to confirm this last hypothesis. ILSTS002 is mapped at 59.9 cM from the beginning of the BTA18 chromosome (Kemp et al. 1992) 6 cM distant from the LH β gene, and could play a role in gene regulation, even being distant from the LH β gene by altering the primary, secondary or tertiary structure of DNA, by binding to transcription or translation factors, or by affecting RNA edition (Li et al. 2004).

Although positive associations have been previously described between reproductive performance and BMS3004, BM4325, HEL5, AFZ1, Lep*Sau3A1* markers (Almeida et al. 2003; Duarte et al. 2005; Oliveira et al. 2005; Weimer et al. 2007), no association was verified in the present paper. Therefore, these associations seem to be specific to the previous samples and not valid for MAS for other cattle breeds. It is important to note that the studies involving BMS3004, BM4325, HEL5, AFZ1, and Lep*Sau3A1* were made considering cows lifetime calving interval. It is possible that the analysis of a single calving interval like the one performed in this paper may not have been strong enough to detect these associations.

No positive association was verified for the AA sample. These animals had a long history of strong selection pressure for reproductive performance and were in very good nutritional condition. As heritability for reproductive characters are usually small (Veerkamp and Beerda 2007) genetic markers effect would be even small in animals with good nutritional conditions and high reproductive performance.

These data suggest the use of IDVGA51 and ILSTS002 STRs for MAS, to improve selective procedures and to obtain animals with greater reproductive performance, in a shorter time interval, and in fewer generations, but only in animals not previously submitted to selection. However, this methodology may not be effective in herds resulting from strong selection for many generations.

Acknowledgements

We thank for L. Carneiro, N. Benavides, and W. Glanzner for the laboratory help. This work was supported by Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX),

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Estudos e Projetos (CAPES), EMBRAPA/Pecuária Sul and Universidade Luterana do Brasil.

References

- Almeida, S.E.M., Almeida, E.A. Moraes, J.C.F. and Weimer, T.A. 2003. Molecular markers in the Lep gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 123, 106- 113.
- Bishop, M.D., Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.T., Sunden, S.L.F., Hawkins, G.A., Toldo, S.S., Fries, R., Grosz, M.D., Yoo, J. Y. and Beattie, C.W. 1994. A genetic linkage map for cattle. *Genetics*, 136, 619-639.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S. and Martinez, M.F. 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 307–326.
- Brazilian Principles of Veterinarian Medical Ethics 2001 (Código de Ética Profissional do Médico Veterinário”) <http://www.redevet.com.br/noticias/etica.htm> (consulted 25 January 2002).
- Cachapuz, J.M. 1991. A pecuária de corte nos anos 80. In: *O setor primário do Rio Grande do Sul: Diagnóstico e Perspectivas Sócio-Econômicas*. Realidade Rural, Porto Alegre, RS, 3, 17-39.
- Chehab, F.F., Qiu, J., Mounzih, K., Ewart-Toland, A. and Ogus, S. 2002. Leptin and Reproduction Nutrition Review, 60, 10, S39-S46.
- Comings, D.E. 1998. Polygenic inheritance of micro/minisatellites. *Molecular Psychiatry*, 3, 21-31.
- Davis, G. P. and DeNise, S. K. 1998. The impact of genetic markers on selection. *Journal of Animal Science*, 76, 2331- 2339.
- Diskin, M.G., Mackey, D.R., Roche, J.F. and Sreenan, J.M. 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, 78, 345-370.
- Duarte, L.B.H., Moraes, J.C.F. and Weimer, T.A. 2005. Diversity of microsatellites linked to the FSH β gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. *Ciência Rural*, 35, 145-149.
- Houde, A., Lambert, A., Saumande, J., Silversides, D.W. and Lussier, J.G. 1994. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Molecular Reproduction Development*, 39, 127-135.
- International Guiding Principles For Biomedical Research Involving Animals 1985 http://www.cioms.ch/1985_texts_of_guidelines.htm (consulted 25 January 2002).
- Jorgensen, C.B., Konfortov, B.A. and Miller, J.R. 1996. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. *Animal Genetics*, 27, 220.
- Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.T., Mcgraw, R.A., Sonstergard, T.S., Smith, T.P.L., Lopez-Corrales, N.L. and Beattie, C.W. 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, 7, 235- 249.

- Kemp, S.J., Brezinsky, L. and Teale, A.J. 1992. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics*, 23, 184.
- Lahiri, D.K., Zang, A. and Nurnberger, J.I. 1997. High-resolution detection of PCR products from STRs markers using a nonradioisotopic technique. *Biotechnology and Molecular Medicine*, 60, 70-75.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T. and Nevo, E. 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Molecular Biology Evolution*, 21, 991-1007.
- Miller, S.A., Dykes D.D. and Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16, 1215.
- Moschos, S., Chan, J.L. and Mantzoros, C.S. 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertility and Sterility*, 77, 433-444.
- Oliveira, J.F.C., Neves, J.P., Almeida, E.A., Steigleder, C.S., Moraes, J.C.F, Gonçalves, P.B.D. and Weimer, T.A. 2005. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus-Ibagé cattle. *Genetic and Molecular Biology*, 28, 54-59.
- Passos, D.T., Hepp, D., Moraes, J.F.C. and Weimer, T.A. 2007. Effect of polymorphisms linked to Lep gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124.
- Pomp, D., Zou, T., Clutter, A.C. and Barendse, W. 1997. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *Journal of Animal Science*, 75, 1427.
- Rasby, R.J., Wettemann, R.P., Harms, P.G., Lusby, K.S. and Wagner, J.J. 1992. GnRH in infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, 9, 71-76.
- SPSS Inc. 1999 SPSS® Base v.10.0.5 for Windows™ User's guide. SPSS Inc., Chicago IL.
- Stone, R.T., Kappes, S.M. and Beattie, C.W. 1996. Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. *Animal Genetics*, 27, 216.
- Stone, R.T., Kappes, S.M., Keele, J.W. and Beattie, C.W. 1997. Characterization of 109 bovine microsatellites. *Animal Genetics*, 28, 62-66.
- Zieba, D.A., Amstalden, M. and Williams, G.L. 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Domestic Animal Endocrinology*, 29, 166-185.
- Weimer, T.A., Steigleder, C.S., Machado, M.S., Almeida, S.E.M., Oliveira, J.F.C., Moraes, J.C.F. and Henkes, L.E. 2007. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. *Ciência Rural*, 37, 5.
- Veerkamp, R.F., Beerda, B. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*, 68S, S266-S273.
- Williams, G.L., Gazal, O.S., Guzmán Vega, G.A. and Stanko, R.L. 1996. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Animal Reproduction Science*, 42, 289-297.
- Yavas, Y. and Walton, J.S. 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology*, 54, 1-23.

Table 1 Comparisons performed between fertility status or CI and allele markers according to previous described associations

Markers/ STRs	Comparisons	According to:
BM4325	Presence or absence of <u>101</u> allele	Duarte et al. (2005)
ILSTS002	Presence or absence of <u>135</u> allele	Weimer et al. (2007)
BMS3004	Heterozygous or homozygous	Weimer et al. (2007)
IDVGA-51	Presence or absence of <u>181</u> allele	Almeida et al. (2003)
HEL5 ^a	Homozygous for long allele or other genotypes	Oliveira et al. (2005)
AFZ1 ^b	Homozygous for short allele or other genotypes	Oliveira et al. (2005)
Marker/ SNP		
LepSau3A1 ^a	Homozygous 11 or other genotypes	Almeida et al. (2003)

^a: Short alleles: 147-157; long alleles: 159-169; ^b Short alleles: 115-121; long alleles: 123-129.

Table 2 Allele frequencies observed in 6 STR and 2 SNP for two cattle samples

Markers /Samples (n)	Alleles												
STRs													
BM4325	<u>97</u>	<u>99</u>	<u>101</u>	<u>103</u>	<u>105</u>	<u>107</u>	<u>109</u>	<u>111</u>					
CB (76)	0.01	0.03	0.13	0.50	0.25	0.04	0.03	0.01					
AA (125)	0.01	0.08	0.35	0.50	0.04	0.01	0.01	0.00					
BMS3004	<u>129</u>	<u>132</u>	<u>138</u>										
CB (81)	0.66	0.29	0.05										
AA (125)	1.00												
ILSTS002	<u>127</u>	<u>129</u>	<u>131</u>	<u>133</u>	<u>135</u>	<u>137</u>	<u>139</u>	<u>141</u>	<u>143</u>	<u>145</u>			
CB (79)	0.01	0.01	0.04	0.11	0.27	0.28	0.06	0.18	0.03	0.01			
AA (120)	0.03	0.05	0.06	0.00	0.22	0.40	0.09	0.14	0.01	0.00			
IDVGA51	<u>173</u>	<u>175</u>	<u>177</u>	<u>179</u>	<u>181</u>	<u>183</u>	<u>185</u>						
CB (81)	0.09	0.27	0.30	0.09	0.09	0.14	0.02						
AA (121)	0.02	0.64	0.17	0.04	0.02	0.10	0.01						
HEL5	<u>147</u>	<u>149</u>	<u>151</u>	<u>153</u>	<u>155</u>	<u>157</u>	<u>159</u>	<u>161</u>	<u>163</u>	<u>165</u>	<u>167</u>	<u>169</u>	<u>171</u>
CB (72)	0.06	0.18	0.15	0.10	0.03	0.02	0.02	0.04	0.09	0.12	0.10	0.06	0.03
AA (113)	0.00	0.08	0.23	0.07	0.04	0.03	0.03	0.02	0.11	0.19	0.13	0.05	0.02
AFZ1	<u>111</u>	<u>113</u>	<u>115</u>	<u>117</u>	<u>119</u>	<u>121</u>	<u>123</u>	<u>125</u>	<u>127</u>	<u>129</u>			
CB (51)	0.01	0.05	0.18	0.06	0.21	0.13	0.16	0.14	0.05	0.01			
AA (52)	0.00	0.01	0.28	0.07	0.05	0.06	0.10	0.30	0.13	0.00			
SNPs													
LepSau3A1 (A/B)	<u>A</u>	<u>B</u>											
CB (76)	0.78	0.22											
AA (78)	0.62	0.38											
LepSau3A1 (1/2)	<u>1</u>	<u>2</u>											
CB (76)	0.84	0.16											
AA (78)	1.00												

(n) number of animals; CB, crossbreeding cows; AA, Aberdeen Angus cows

Table 3 Association analysis performed between IDVGA51 alleles or allele groups (short or long) and fertility status

Associations	Crossbreeding Cows				Statistics	
	Fertile Cows		Sub-fertile Cows		χ^2	P
	N1	%	N1	%		
<u>IDVGA51 173</u>	12	14	3	4	5.82	0.01
Other alleles	72	86	75	96		
<u>IDVGA51 177</u>	32	38	17	22	5.34	0.02
Other alleles	52	62	61	78		
<u>IDVGA51 181</u>	4	5	10	13	3.67	0.05
Other alleles	80	95	68	87		
Long Alleles (179-185 pb)	22	26	32	41	4.00	0.04
Short Alleles (173-177pb)	62	74	46	59		

Table 4 Association analysis performed between ILSTS002 alleles or allele groups (short or long) and fertility status

Associations	Crossbreeding Cows				Statistics	
	Fertile Cows		Sub-fertile Cows		χ^2	P
	N1	%	N1	%		
<u>ILSTS002 137</u>	14	17	30	38	4.61	0.03
Other alleles	66	83	48	62		
<u>ILSTS002 135</u>	26	32	17	22	1.56	0.21
Other alleles	54	68	61	78		
Long Alleles (139-143 bp)	23	29	21	27	0.66	0.79
Short Alleles (127-137 bp)	57	71	57	73		