UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

WERUSKA KARYNA FREITAS SANTOS BIASE

**Identificação de SNPs e associação com número de oócitos colhidos por
aspiração folicular em bovinos da raça Nelore**

Pirassununga
2008

WERUSKA KARYNA FREITAS SANTOS BIASE

**Identificação de SNPs e associação com número de oócitos colhidos por
aspiração folicular em bovinos da raça Nelore**

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles

FICHA CATALOGRÁFICA
preparada pela
Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de
São Paulo

S237i	<p>Santos-Biase, Weruska Karyna Freitas Identificação de SNPs e associação com número de oócitos colhidos por aspiração folicular em bovinos da raça Nelore / Weruska Karyna Freitas Santos-Biase – Pirassununga, 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos – Universidade de São Paulo. Departamento de Ciências Básicas. Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal. Orientador: Prof. Dr. Flávio Vieira Meirelles.</p> <p>Unitermos: 1. Embrião 2. FIV 3. Foliculogênese 4. Polimorfismo 5. Reprodução. I. Título.</p>
-------	--

DEDICATÓRIA

Ao meu amado esposo, *Fernando Biase*,
que deu sentido à minha existência e
brilho ao meu sorriso. Que com Amor me
ensinou que a Felicidade é uma decisão diária.
Por ser verdadeiro, único e eterno!

AGRADECIMENTOS

À **Deus** e meus **Anjos da Guarda**, pela benção da Vida, por proteger meus passos e me carregar no colo quando me sentia exausta. Obrigada por me dar forças para superar os obstáculos, pelos ensinamentos diários e por mais essa conquista.

Aos meus pais, **José e Vera**, pelo amor, humildade, sabedoria e sacrifício para me mostrar o caminho da dignidade.

Aos meus irmãos, **Rhanyer, Aretuza e Juliana**, pelos momentos compartilhados que nos fizeram crescer e deixaram saudades.

Ao Prof. Dr. **Flávio Vieira Meirelles**, agradeço pela orientação segura, sabendo conduzir e o momento de indicar o caminho. Pela confiança, ensinamentos e respeito proporcionados a cada dia de convívio. Por ser prudente conselheiro e pela sua dedicação e empenho para realização deste trabalho.

Ao Dr. **Fernando Henrique Biase**, pelo exemplo vivo de equilíbrio, sensatez, caráter e eficiência profissional. Por seu amor intocável a Ciência e Pesquisa. Meu Muito Obrigada, pelas idéias na elaboração do projeto, pela ajuda na execução e busca incessante de alternativas quando surgia um obstáculo, por todas as análises estatísticas (e não foram poucas!) e pela colaboração na execução deste manuscrito. Enfim, obrigada pela paciência, dedicação, humildade e por compartilhar seus ensinamentos.

Ao Dr. **Alexandre Rodrigues Caetano**, agradeço a colaboração nos experimentos, discussões, ensinamentos e por contribuir para a minha formação profissional.

Ao Prof. Dr. **Júlio Balieiro**, por estar sempre disposto a Ensinar, compartilhar e instigar a aprendizagem. Obrigada pelas orientações nas análises estatísticas e pelo apoio constante. Sua dedicação, determinação e empenho são admiráveis!

Aos Professores Dr. **José Bento Ferraz**, Dr. **Antônio Maia** e Dr. **Albino Luchiari**, pelo apoio, oportunidades e ensinamentos compartilhados.

Ao Prof. Dr. **Luiz Ricardo Goulart**, por me permitir dar os primeiros passos na pesquisa, pela grande amizade, confiança e ensinamentos. À **sua equipe**, pela amizade, dedicação, paciência, momentos agradáveis e empenho em pesquisar ... nenhum aprendizado é válido se não existirem pessoas com as quais possamos trocar experiências.

Às empresas, **Vitrogen** e **In Vitro Brasil**, em especial aos **Drs. Yeda Watanabe** e **José Henrique Pontes**, pela colaboração e fornecimentos de dados fundamentais para a realização deste trabalho.

À **Mônica Accorsi**, **Patrícia Stranieri** e **Christina Ferreira**, por terem acreditado no nosso projeto e não mediram esforços na obtenção do material biológico. Obrigada pelo profissionalismo, dedicação, colaboração e ensinamentos compartilhados. Por fim, minha gratidão pela Amizade e Respeito construídos.

À **Giovana Krempel Merighe**, pelos ensinamentos na área de produção *in vitro* de embriões bovinos, por me acolher de forma carinhosa no laboratório e pela colaboração deste trabalho.

Aos amigos, **Roberta**, **Nilton**, **Andrezza**, **Marcos**, **Giovana**, **Maurício**, **Luciane** e **Renata**, pela oportunidade de conhecê-los e pelos bons momentos vivenciados juntos. Obrigada pelas risadas, churrascos, pizzas e um bom vinho tornando meus dias mais felizes em Pirassununga!
Tenho a certeza de que amizades verdadeiras e puras não se abalam pela distância.

Aos amigos de sempre, **Amanda**, **Mirlaine**, **Marcela**, **Patrícia**, **Francis**, **Bárbara**, **Bruna**, **Erick**, **Flávio**, **Daniel**, **Frederico**, **Mariana**, **Fernanda**, **Josyanne**, **Gabriela**, minha gratidão pela amizade sincera e duradoura. Apesar da distância sempre estivemos unidos, um torcendo pelo sucesso do outro!

À Profa. **Silvia Binotti**, por ser minha mestra no ensino da língua inglesa e pela amizade forte e sólida.

Aos funcionários da Pós-Graduação, em especial **Conceição e Layla**, por me auxiliarem na parte burocrática acadêmica, pelo profissionalismo e amizade.

Aos funcionários da Biblioteca, em especial **Bernadete e Patrícia**, por toda ajuda durante o Mestrado, pelo profissionalismo e dedicação dispensados ao corpo discente.

Aos colegas, **Adriana Roberta, Alexandre Barreto, Aline César, Christina Ferreira, Elisângela Mattos, Felipe Perecin, Flávio Perna, Giovana Merighe, Lilian Rezende, Márcia Gilli, Marcus Chiaratti, Minos Carvalho, Mônica Accorsi, Moyses Miranda, Nilton dos Santos, Ricardo Oliveira, Sandra Oliveira e Tiago de Bem**, obrigada pelos momentos agradáveis e construtivos.

À **FAPESP**, pela concessão da bolsa de estudos, bem como o financiamento de parte do projeto e por proporcionar meu aperfeiçoamento profissional.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, USP**, pela oportunidade de cursar uma Pós-graduação de excelência.

RESUMO

SANTOS-BIASE, W.K.F. **Identificação de SNPs e associação com número de oócitos colhidos por aspiração folicular em bovinos da raça Nelore.** 2008. 86 f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

O Brasil é o país que mais realiza aspiração folicular de oócitos guiada por ultrassonografia (OPU) para fins de produção *in vitro* de embriões bovinos. Com isso é possível aumentar consideravelmente o número de progênie por fêmea por ano. O objetivo desse trabalho foi identificar polimorfismos em genes envolvidos na foliculogênese e associar alterações gênicas com o número de folículos pré-antrais recrutados em bovinos, estimados pelo número de oócitos recuperados por OPU. Dados de aspiração folicular feitas a campo em fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) foram obtidos de duas empresas diferentes, sendo que 30 fêmeas foram utilizadas para a prospecção de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs), 218 para estudos populacionais e dados de 193 fêmeas foram utilizados para a análise de efeitos das variações genéticas com o número de oócitos viáveis colhidos por OPU. Vinte fêmeas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) foram genotipadas para a identificação de alelos taurinos ou zebuínos específicos. Regiões dos genes Gdf9, Fgf8, Fgf10 e BmprII foram amplificadas por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) e seqüenciadas para prospecção de SNPs. Quatro polimorfismos foram genotipados por meio de restrição enzimática de DNA, (PCR-RFLP; genes: Gdf9, Fgf8, Lhr e DNA mitocondrial-mtDNA) ou PCR em tempo real utilizando sondas específicas para cada alelo (BmprII). A avaliação de efeitos dos marcadores sobre a característica foi realizada por análise de variância utilizando modelos mistos com dados repetidos, em que o número de oócitos viáveis foi considerado variável dependente, as fêmeas foram consideradas variável aleatória, e local de aspiração, ano de aspiração e o SNP foram efeitos fixos. O mesmo modelo foi utilizado para estimar efeito médio de substituição alélica, em que o marcador foi substituído por uma co-variável numérica. A diferença entre médias de quadrados mínimos foram estimadas por meio de contrastes e a significância avaliada por teste t. Os efeitos ou as diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $P < 0,05$. Foram identificados 19 SNPs sendo que 10 polimórficos entre as fêmeas Nelore, 04 causadores de substituição de aminoácidos na proteína. Entre os marcadores nucleares genotipados (Gdf9, A318C; Fgf8, C1027G; BmprII,

A40048G; Lhr C62478T), todos apresentaram equilíbrio de segregação alélica dentro do marcador e genotípica entre os marcadores ($P>0,05$). Os SNPs nos genes Gdf9, BmprII e Lhr genotipados em fêmeas Nelore e Holandesas apresentaram-se fixados na segunda raça. Foram identificados efeitos dos polimorfismos dos genes Gdf9, Fgf8, BmprII e Lhr ($P<0,05$), entretanto os variantes de mtDNA não foram significativos. As diferenças entre médias confirmaram os resultados da ANOVA. Para os polimorfismos no gene Gdf9, BmprII e Lhr, observou-se a tendência de os indivíduos heterozigotos terem menores médias de oócitos viáveis quando comparados aos homozigotos, já o polimorfismo no gene Fgf8, observou-se a tendência de interação aditiva entre os alelos, em que foi estimado um efeito médio de $1,13\pm0,01$ oócitos viáveis por troca de alelo C por G. Conclui-se que variações genéticas são causas de variabilidade do número de folículos presentes nos ovários, estimados por OPU.

Palavras chaves: Embrião, FIV, Foliculogênese, Polimorfismo, Reprodução

ABSTRACT

SANTOS-BIASE, W.K.F. **SNPs identified and associated with oocyte pick up collected from Nelore cows.** 2008. 86 f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2008.

Brazil is the country with the biggest number of ovum pick up (OPU) collection for bovine *in vitro* embryo production. This strategy is used to increase the number of calves born per cow per year. The objective of this work was to identify polymorphisms in genes related in folliculogenesis and associate some of the resulted gene variants with the number of pre antral follicle recruited in bovines, estimated by the number of oocytes collected by OPU. Records of open filed OPUs performed in Nelore cows (*Bos taurus indicus*) were obtained from two independent enterprises, and 30 females were used for single nucleotide polymorphism (SNP) prospection, 218 females for genotype and allelic population analysis and 193 females used for identification of genetic variation effects over the number of viable oocytes collected by OPU. Twenty Holstein cows (*Bos taurus taurus*) were also genotyped for identification of taurine and zebuine specific alleles. Segments of genes Gdf9, Fgf8, Fgf10 and BmprII were amplified by polymerase chain reaction (PCR) and sequenced for SNP prospection. Four polymorphisms were genotyped by means of enzymatic DNA digestion (PCR-RFLP, genes: Gdf9, Fgf8, Lhr and mitochondrial DNA - mtDNA) or real time PCR using allelic specific probes (Gene: BmprII). Genetic marker effect over the analyzed characteristic was realized by analysis of variance using mixed models with repeated data, in which the number of viable oocytes were set as dependent variable, the females were considered random variable, OPU place, OPU year and SNP were fixed effects. The same model was used for average allelic substitution effect estimation, where the genetic marker class was changed by a numeric co-variant. The least square means (LSM) differences were estimated by contrasts and the significance evaluated by t test. Fixed effects or LSMs differences were considered significant when $P < 0.05$. Nineteen SNPs were identified, from which ten were polymorphic among Nelore cows, four were expected to cause amino acid changes in protein. Among the nuclear genome markers genotyped (Gdf9, A318C; Fgf8, C1027G; BmprII, A40048G; Lhr C62478T, all resulted in allelic segregation equilibrium within marker and genotypic segregation equilibrium between markers ($P > 0.05$). The SNPs in genes Gdf9, BmprII and Lhr genotyped in Nelore and Holstein cows were fixed in the last breed. SNPs in genes Gdf9, Fgf8, BmprII

and Lhr affected the characteristic ($P < 0.05$), however the mtDNA variants did not. The LSMs differences confirmed the ANOVA results. Heterozygote females for SNPs in genes Gdf9, BmprII and Lhr tend to have smaller LSMs than homozygous ones. On the other hand, there is indication of additive allelic interaction between alleles of SNP in gene Fgf8, for which an average allele substitution was estimated in 1.13 ± 0.01 viable oocytes for a C/G change. We concluded that genetic variations were responsible for variable number of follicles present in ovaries, estimated by OPU.

Key words: Embryo, IVF, Folliculogenesis, Polymorphism, Reproduction

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1 Recrutamento e crescimento folicular.....	13
2.2 Alterações genéticas que afetam a fertilidade em mamíferos.....	17
2.3 Diferença genética entre bovinos taurinos e zebuínos.....	19
3. HIPÓTESE.....	21
4. OBJETIVOS.....	22
Geral.....	22
Específicos.....	22
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
5.1 Prospecção dos SNPs.....	24
5.2 Genotipagem.....	31
5.3 Análise populacional dos polimorfismos.....	35
5.4 Associação dos marcadores com o número de oócitos colhidos por OPU.....	37
6. RESULTADOS.....	40
6.1 Prospecção dos SNPs.....	40
6.2 Genotipagem de SNPs Identificados.....	43
6.3 Genotipagem de polimorfismos descritos na Literatura.....	45
6.4 Análise populacional dos polimorfismos.....	46
6.5 Associação dos SNPs com o número de oócitos colhidos por OPU.....	51
7. DISCUSSÃO.....	62
7.1 Identificação de SNPs.....	62
7.2 Caracterização de SNPs descritos na literatura.....	65
7.3 Caracterização da frequência combinada entre marcadores estudados.....	66
7.4 Avaliação dos efeitos dos marcadores genéticos sobre a característica.....	68
8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	78
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

1. INTRODUÇÃO

Os primeiros zebuínos chegaram ao Brasil no século XIX, entre 1870 e 1875, com as primeiras importações voltadas para criação de fonte protéica para a alimentação. A raça Nelore foi formada a partir do gado ongole (*Bos taurus indicus*), de grande porte e dócil, pelagem branca ou cinza clara, proveniente do sul da Índia, com contribuições do zebu misore (SANTIAGO, 1960). O padrão racial do Nelore (*Bos taurus indicus*) foi determinado pela Associação Brasileira de Criadores de Zebu (ABCZ), que considera aspectos essenciais da formação, desenvolvimento e morfologia do animal para caracterizá-lo como Nelore. Ainda de acordo com a ABCZ (2005), a raça Nelore é encontrada em 80 % do rebanho brasileiro, seja por meio de animais puros ou cruzados.

Apesar de ser extensamente utilizada para fins produtivos, a raça Nelore tem características reprodutivas distintas das raças européias. Pereira et al. (2000) relataram um intervalo médio entre partos de 394 dias, com herdabilidade estimada em 0,06. Esses resultados indicam que a raça Nelore tem permitido, em média, a criação de um bezerro por vaca ao ano nos rebanhos acompanhados para avaliações genéticas.

Uma das estratégias para aumentar a capacidade reprodutiva de bovinos foi descrita por Cushman et al. (2005) que, ao longo de 21 anos, fez seleção de fêmeas para ovulação de mais de um folículo por ciclo estral em uma população fechada chamada MARC Twinner cattle. Entretanto, a seleção para aumentar a taxa de ovulação em bovinos é controversa pelo aumento no número de partos distócicos em gestações de gêmeos e morte de bezerros ao nascimento (GREGORY et al., 1996).

O Brasil é o país com o maior rebanho comercial do mundo (ANUALPEC, 2004). É também o país que mais utiliza a fecundação *in vitro* de oócitos recuperados por OPU como

tecnologia reprodutiva em rebanhos de elite. Outra estratégia com a finalidade de aumentar a capacidade reprodutiva de fêmeas é a produção de embriões. De acordo com o relatório anual da sociedade internacional de transferência de embriões (IETS), em 2003, o Brasil transferiu em torno de 87.732 embriões produzidos *in vivo*, número que estaria em declínio para os anos seguintes. Por outro lado, em ascensão, está o número de embriões transferidos após aspiração folicular guiada por ultra-sonografia e produção *in vitro*. Em 2003, o Brasil transferiu mais de 60.000 embriões, o que representou mais de 56 % do total de embriões *in vitro* transferidos no mundo (THIBIER, 2004).

Com o amplo uso de biotecnologias da reprodução em bovinos, muitos estudos têm se dedicado ao desenvolvimento embrionário *in vitro*, porém há a escassez de estudos considerando o efeito genético da fêmea doadora de oócitos a ser trabalhado *in vitro*.

Em bovinos, não é conhecida associação de polimorfismos com taxa de ovulação. Um modelo de estudo que envolva ovulação múltipla não é de interesse pela conhecida dificuldade de partos de gestações de gêmeos. Dessa forma, um modelo que estude variações genômicas associadas ao número de folículos recrutados para o crescimento pode colaborar para o entendimento dos genes reguladores dos processos fisiológicos envolvidos. A colheita de folículos antrais por aspiração folicular guiada por ultra-sonografia, como rotina para a prática de FIV, pode gerar informações sobre a variabilidade da ativação dos folículos do conjunto de folículos pré-antrais. Apesar de haver fatores genéticos envolvidos no número de folículos pré-antrais recrutados durante as ondas foliculares, não se sabe o quanto da variação dessa característica é de origem genética, se é uma característica monogênica ou poligênica, se há variações gênicas nos reguladores do crescimento do folículo pré-antral e se alguma dessas variações poderia ter um efeito no número de folículos pré-antrais recrutados por onda folicular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Recrutamento e crescimento folicular

Em bovinos de raças zebuínas (Gir, Guzera e Nelore) o ciclo estral tem em média três ondas foliculares (Figura 1), variando de uma a quatro (FIGUEIREDO et al., 1997; VIANA et al., 2000; BORGES et al., 2004). Independente do número de ondas foliculares e do período da onda, diariamente folículos primordiais são recrutados para tornarem-se folículos primários e secundários.

Figura 1. Representação esquemática do recrutamento de folículos pré-antrais, crescimento de folículos primários e secundários gerando folículos antrais e desvio do folículo dominante em relação aos que entram em atresia. A ovulação ou degeneração do folículo dominante é dependente da ordem da onda folicular, os folículos das ondas anteriores à última onda folicular degeneram, o folículo dominante da última onda folicular do ciclo estral é ovulado. Abaixo na figura, está uma escala de tempo (dias) relativo a uma onda de FSH no ovário.

Na raça Nelore foram encontrados em média 35.539 folículos pré-antrais por animal (BASSO; ESPER, 2002). A caracterização por microscopia ultra-estrutural entre os folículos primordiais e os primários revela diferenças entre eles, em especial nas células da granulosa que se tornam cubóides quando o folículo primordial é ativado e recrutado para o crescimento (BASSO; ESPER, 2002). A principal semelhança que existe são as interações entre os oócitos e as células da granulosa por ligações do tipo GAP, que permitem a passagem de micro nutrientes e macro moléculas (ALBERTINI et al., 2001). Além das junções GAP há um eixo bidirecional de comunicação de sinais parácrinos entre o oócito e as células da granulosa que permite fina regulação do processo de recrutamento folicular (GILCHRIST et al., 2004).

Folículos primordiais seguem quiescentes nos ovários até o recrutamento de uma população crescente. Um balanço entre fatores inibitórios e estimulatórios locais ou do sistema reprodutivo regula a ativação dos folículos primordiais. Dados de expressão gênica do compartimento folicular de folículos quiescentes e em crescimento mostram que os genes do retinoblastoma e o oncogene Myc estão associados com a produção de inibidores de proliferação celular que pode prevenir a multiplicação de células da granulosa (BUKOVSKY et al., 1995; LI et al., 1994). Outro fator que tem sido associado como inibidor parcial do recrutamento de folículos primordiais para folículos em crescimento é o hormônio anti Mulleriano (AMH; DURLINGER et al., 2002).

Proteínas da família TGF β (activinas, proteínas morfogenética óssea, BMPs e fator de diferenciação-9, Gdf9) têm sido ligadas à regulação da ativação de folículos primordiais (MATZUK et al., 2002). A activina-A e o receptor de activina II (ACTRII) foram encontrados em oócitos, células da granulosa dos folículos primordiais e em estágios seqüentes, assim como foi detectado a proteína folistatina ligante de activina. A activina parece ser um fator intrafolicular que controla a ativação de folículos primordiais dependente de fatores como a idade celular e a disponibilidade de folistatina (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

As proteínas GDF9, ligante de oncogene Kit (KL), fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGF2), o fator inibidor de leucemia (LIF) e fator de crescimento neural (NGF) podem influenciar positivamente a transição de folículos primordiais para folículos primários. Camundongos transgênicos deficientes para GDF9 são inférteis pelo desenvolvimento bloqueado a partir de folículos primários (MATZUK et al., 2002). Essa proteína parece atuar como regulador parácrino da proliferação das células da granulosa e diferenciação em folículos primordiais. No estágio de folículo primário o KL produzido pelas células da granulosa estimula o crescimento folicular via o receptor c-kit na membrana do oócito (MONTRO; BERNSTEIN, 1993). O FGF2 estimula o recrutamento folicular em ratos e bovinos (NILSSON et al., 2001; RODGERS et al., 1996), sendo localizada nas células da granulosa e de oócitos de folículos primordiais e primários. Camundongos deficientes na proteína NGF mostram um efeito mediano do NGF na formação de folículos primários, sendo considerado importante, porém não essencial para a transição entre os folículos (DISSEN et al., 2001).

A transição entre folículos primordiais para primários ocorre de forma independente de ação direta de FSH, pois procede normalmente em mamíferos cujos genes *Fsh* e *Fshr* estão inativados (MEDURI et al., 2002).

A partir da formação de duas camadas de células da granulosa o folículo é considerado secundário embora ainda na sua forma pré-antral. Entre as grandes diferenças que ocorrem nessa fase de crescimento oocitário está a secreção de glicoproteínas de membrana ou proteínas da zona pelúcida (ZP). Essas proteínas são essenciais para o desenvolvimento do folículo normal e a expressão requer o fator de transcrição do fator de célula germinal alfa (Fig- α ; SOYAL et al., 2000).

Apesar de ser pouco vascularizado, fatores endócrinos têm papel representativo para a regulação de folículos pré-antrais. Experimentos *in vitro*, mostram que folículos secundários

são responsivos a fatores gonadotrópicos (VAN DEN HURK et al., 2000), porém, modelos *in vivo*, mostram que podem se desenvolver a folículos antrais com circulação mínima de FSH ou ausência da proteína FSHR (VAN DEN HURK et al., 2000). Já o hormônio luteinizante (LH) parece ser importante por iniciar a biosíntese de andrógenos nas células da teca que são capazes de estimular a formação de receptores de FSH nas células da granulosa (VAN DEN HURK et al., 2000).

Nesse estágio (secundário) o GDF9 controla a função biológica da activina e inibina (ELVIN et al., 1999). Já o BMP15 é importante para o desenvolvimento folicular após o estágio primário em ovelhas (YAN et al., 2001). GDF9 e BMP15 são expressos em oócitos de folículos primários e estágios seqüentes, sendo que controlam a formação do KL nas células da granulosa, GDF9 inibindo e BMP15 ativando sua expressão (OTSUKA et al., 2002). Em contrapartida, o KL controla a ação mitogênica das proteínas GDF9 e BMP15 (YOSHIDA et al., 1997; MCNATTY et al., 1999).

Outros fatores de crescimento derivados de folículos pré-antrais são: fator de crescimento de epiderme (EGF), fator de crescimento e transformação (TGF), fatores de crescimento semelhante à insulina (IGF), FGF2, FGF8 e alguns dos seus receptores (VAN DEN HURK et al., 1997; MCNATTY et al., 1999; VAN DEN HURK et al., 2000; BURATINI JR et al., 2005). Assim como os outros fatores de crescimento, o IGF-I é capaz de estimular a síntese de FSHR, tornando o folículo mais responsivo ao FSH (ZHOU et al., 1997).

Fatores de transcrição também atuam nos primeiros estágios de desenvolvimento folicular, como a proteína zinc finger 162 (SF-1) e o homólogo a proteína Wilms tumor (WT-1). O primeiro regula a formação do AMH, LHR e FSHR, já o segundo regula negativamente a diferenciação das células da granulosa (SADOVSKI; DORN, 2000; MEDURI et al., 2002).

A formação de uma cavidade fluídica (antro), circundada por multicamadas de células da granulosa caracteriza o folículo antral. Esse fluido é repleto de substâncias derivadas do sangue ou secreção de células foliculares, por exemplo: gonadotrofinas, esteróides, fatores de crescimento (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Durante o desenvolvimento folicular, o fluido antral é produzido com mais intensidade pela crescente vascularização celular e permeabilidade dos vasos sangüíneos (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Os elementos que sinalizam a formação do antro não são completamente conhecidos, porém estudos *in vitro*, sugerem que FSH, LH, activina e KL são os candidatos mais prováveis (HARTSHORNE, 1997; CORTVRINDT et al., 1998; DRIANCOURT et al., 2000; ZHAO et al., 2001).

2.2 Alterações genéticas que afetam a fertilidade em mamíferos

Os primeiros trabalhos que promoveram a conclusiva relação genética entre alterações genéticas com o número de oócitos ovulados e número de crias por parto foram descritos em 2001 quando se mostrou que uma alteração no gene Bone morphogenic protein receptor 1B (Bmpr 1B) afeta a taxa de ovulação em ovelhas da raça Booroola Merino (MULSANT et al., 2001; SOUZA et al., 2001; WILSON et al., 2001). Desde então estudos têm caracterizado mutações nos genes Bmpr 1B, Gdf9 e Bmp15 que ocorrem naturalmente e associado à taxa de ovulação em ovelhas (MCNATTY et al., 2005; DAVIS et al., 1999, 2001, 2005; HANRAHAN et al., 2005; ROYO-MARTINEZ et al., 2008) cujos genes e variantes estão sumarizados na Tabela 1.

Tabela 1. Polimorfismos que afetam o desenvolvimento folicular e a taxa de ovulação em ovelhas¹.

Gene	Alelo	Nome	Alteração DNA	Alteração Proteína	Posição do aminoácido
Bmpr 1B	FecB ^B	Booroola	A/G	Glu-Arg	249
Bmp 15	FecX ^G	Galway	C/T	Gln-stop	239
	FecX ^B	Belclare	G/T	Ser-Ile	367
	FecX ^I	Inverdale	T/A	Val-Asp	299
	FecX ^H	Hanna	C/T	Glu-Stop	291
	FecX ^L	Lacaune	G/A	Cys-Tyr	321
	FecX ^R	Aragonesa	del(TGGGTCCAGAAAAGCCC)		154
Gdf9	FecG ^H	High fertility	C/T	Ser-Phe	395
-	FecX2 ^w	Woodlands			
-	FecI ^I	Thoka			

¹ símbolos dos nucleotídeos e dos aminoácidos estão de acordo com normas da IUPAC. - gene desconhecido

Estudos genéticos também têm sido realizados para se identificar marcadores genômicos associados à fertilidade em humanos. Uma das características mais estudadas é a falência ovariana prematura, que se apresenta como um quadro de amenorréia e hipogonadismo, cujas causas são múltiplas e resultam em redução no número de folículos e/ou defeito nos mecanismos de estímulo ao desenvolvimento folicular (VILODRE et al., 2007). A depleção folicular pode ocorrer por uma deficiência folicular primordial ou por aceleração na atresia folicular (VILODRE et al., 2007).

Alguns polimorfismos pontuais ou alterações cromossômicas têm sido associados à falência ovariana prematura em humanos (SCHLESSINGER et al., 2003). Variantes nos genes Fshr, Foxl2, Inhα, Gdf9 e Bmp 15 têm sido considerados potenciais marcadores para

essa alteração funcional ovariana (AITTOMAKI et al., 1995; CRISPONI et al., 2001; DIXIT et al., 2004; DIXIT et al., 2005; DIXIT et al., 2006).

2.3 Diferença genética entre bovinos taurinos e zebuínos

A divergência genética entre bovinos que não contém cupim (*Bos taurus taurus* - taurino) e aqueles que contém cupim (*B. taurus indicus* - zebuíno) na porção dorsal do corpo já foi caracterizada com base nos genomas mitocondrial (mtDNA; LOFTUS et al., 1994) e nuclear (MACHUGH et al., 1997). Em ambos os casos foram demonstradas claras evidências de domesticação independente dos dois grupos genéticos que se divergiram entre 200.000 (dados de mtDNA) e 850.000 (DNA nuclear) anos a partir de um ancestral comum. Além disso, claras demonstrações de variantes no DNA genômico presentes em *B. taurus indicus*, mas ausentes em *B. taurus taurus* foram dadas com a caracterização de microsatélites (MACHUGH et al., 1997). Nos microsatélites DSS1 e D7S13 foram identificados alelos com alta frequência em animais zebuínos (0,5 a 0,7) que não estavam presentes em taurinos de origem européia (MACHUGH et al., 1997).

Com tal tempo de separação reprodutiva, mesmo mantendo a fertilidade entre híbridos, é de se esperar que haja diferentes polimorfismos entre os animais zebuínos e os taurinos. Atualmente, a caracterização mais extensa de SNPs em bovinos foi realizada a partir do seqüenciamento do genoma e comparação *in silico* das seqüências, identificou cerca de 2,3 milhões de SNPs no genoma de bovinos, dos quais 32.820 foram encontrados somente no genoma de bovinos da raça Holandesa e 40.975 foram encontrados somente na raça Brahman, quando comparados ao genoma de bovinos da raça Hereford (fonte:

<ftp.hgsc.bcm.tcm.edu/pub/data/Btaurus/snp/Btau20070913/README>). Esses dados reforçam a grande diferença que existe entre o genoma de taurinos e zebuínos.

Apesar de serem genomas altamente polimórficos, poucos SNPs peculiares às sub-raças taurinas e zebuínas têm sido caracterizados. Entre os genes com seqüências caracterizadas e polimórficas entre zebuínos e taurinos estão Hsp 70-1 (ADAMOWICZ et al., 2005), Igf2 (FLISIKOWSKI et al., 2005), Dgat1, Abcg2 (TANTIA et al., 2006), Gdf8 (TANTIA et al., 2006), G6PD (RAVI KUMAR et al., 2008) e Slc11A1 (MARTINEZ et al., 2008). Como Nelore é a raça representante de zebuínos mais freqüente, caracterizações do genoma de Nelore têm sido realizadas para fins de melhor conhecer as diferenças com o genoma taurino. Essas caracterizações têm sido realizadas para os genes Dgat1 (KAUPE et al., 2004 e LACORTE et al., 2006), Lhr, Fsh e Gnhr (MILAZZOTTO et al., 2008), Cxcl10, Ccl2, Ccl3, Igf1, Tnf e Ifng (ABATEPAULO et al., 2008).

3. HIPÓTESE

Variações do tipo SNPs nos genes Gdf9, Fgf8, Fgf10, BmprII, Lhr e no genoma mitocondrial têm influência sobre o número de folículos pré-antrais disponíveis para recuperação por OPU em bovinos da raça Nelore.

4. OBJETIVOS

Geral

O trabalho teve como objetivo tanto identificar polimorfismos não descritos na literatura em genes envolvidos na foliculogênese e associar alterações gênicas com o número de folículos pré-antrais recrutados em bovinos, estimados pelo número de oócitos recuperados por aspiração folicular guiada por ultra-sonografia.

Específicos

- Identificar polimorfismos nos genes Gdf9, Fgf8, Fgf10 e BmprII em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*);
- Confirmar a presença de alguns polimorfismos e estimar sua frequência em estudos populacionais na raça Nelore;
- Identificar variantes gênicos (alelos) específicos de animais *Bos taurus indicus* em comparação com animais *Bos taurus taurus*;
- Estimar a frequência de um polimorfismo previamente descrito no gene Lhr e no DNA mitocondrial, na amostra de animais da raça Nelore;

- Realizar análise de associação entre os polimorfismos selecionados e a variação do número de oócitos colhidos por sessão de aspiração folicular guiada por ultrasonografia.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Prospecção dos SNPs

5.1.1 Caracterização da amostra para sequenciamento

A amostra e os dados necessários para a prospecção dos polimorfismos e análise de associação foram obtidos mediante análise do banco de dados gentilmente cedidos pelas empresas Vitrogen e In Vitro Brasil, que são referências na área de biotecnologia de embriões. A amostra da qual foi feita à prospecção dos polimorfismos foi composta de animais fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) que foram submetidas ao processo de aspiração folicular guiado por ultra-sonografia, cujo número de oócitos aspirados (exceto In Vitro Brasil), número de oócitos viáveis e taxa de blastocisto produzidos *in vitro* foi armazenado no banco de dados das empresas. A partir desses bancos foram selecionadas fêmeas que resultaram em 2 ou mais aspirações foliculares e com taxa de blastocisto maior que 20 %. Quando autorizada pelos proprietários foram colhidas amostras de sangue para extração de DNA (Tabela 2).

Tabela 2. Número médio de oócitos colhidos por OPU e erro padrão nas fêmeas selecionadas para a prospecção dos SNPs.

Fêmea	Aspirações	Oócitos colhidos	Oócitos viáveis
1	6	31±4	30±4
2	9	31±5	24±4
3	4	8±1	5±1
4	11	29±6	24±5
5	12	33±5	28±4
6	5	8±2	4±1
7	7	32±3	29±3
8	25	58±10	51±9
9	6	78±21	69±19
10	4	72±12	59±12
11	8	103±19	94±16
12	6	28±6	25±5
13	8	25±4	21±3
14	12	33±5	28±4
15	14	72±7	64±6
16	7	89±38	76±34
17	11	102±38	80±28
18	10	17±2	14±2
19	15	23±2	19±2
20	6	23±3	22±2
21	10	24±3	21±3
22	24	24±3	20±2
23	9	25±7	23±7
24	4	80±6	64±13
25	19	4±1	3±1
26	16	92±9	75±7
27	11	93±25	85±23
28	5	11±1	9±1
29	10	11±1	8±1
30	6	30±4	27±3

5.1.2 Extração do DNA

DNA genômico de cada amostra foi obtido utilizando o procedimento de lise celular, digestão protéica, saturação salina dos debris celulares e precipitação do DNA em álcool. Brevemente, em uma amostra do sangue total (500 µL) foi adicionado solução de lise celular, seguido por centrifugação. Após sucessivas lavagens, o *pellet* de leucócitos foi submetido à digestão protéica (proteinase K, 500 µg/mL), seguido por precipitação das proteínas por centrifugação em solução salina saturada (NaCl 5M). Ao sobrenadante foi adicionado etanol (100 %) para precipitação do DNA, de acordo com o protocolo descrito por Sambrook (2001). Após secagem do *pellet* e eluição em água, a qualidade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose (0,8 %) contendo brometo de etídio. A quantidade de DNA extraído e de proteína em solução foi medida por espectrofotometria em absorbância a 260 nm e 280 nm, respectivamente.

5.1.3 Desenho dos primers e reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram desenhados *primers* para amplificar segmentos de exons e introns dos genes Gdf9, Fgf8, Fgf10 e BmprII, a partir de seqüências bovinas (GenBank) utilizando o programa Primer Express v.2 (Applied Biosystems; Tabela 3).

As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Epgradient S e consistiram de tampão, 1 x; MgCl₂, 1,5 mM; dNTPs, 400 µM cada; *primers*, 5 µM do senso e 5 µM do antisenso; Taq DNA polimerase, 1 U e DNA, 50 ng em um volume final de 25 µL.

As temperaturas utilizadas foram 94 °C por 2 minutos, 35 x (94 °C por 30 segundos, temperatura de pareamento de cada *primer* por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos) e 72 °C por 5 minutos. Uma alíquota de cada reação foi avaliada em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) quanto à qualidade e quantidade de material utilizando o marcador Φ X 174 – *Hind* III como referência. Após a exposição de luz ultravioleta as imagens dos géis foram digitalizadas em Scanner laser FujiFilm 3000 (Fuji, Japan) e analisadas em programa Image Gauge (Fuji, Japan).

Tabela 3. Genes com as seqüências dos *primers* e temperatura de pareamento utilizado nas reações.

Símbolo	Crom.*	Exons	Código <i>Primers</i>	<i>Primers</i> (5'=>3')	Temperatura de pareamento	Identificador Gi (GenBank)
Gdf9	7	1	Gdf9A	TTGCTAATCTCTCCAAGCCATG TGGAAGCTCTAAACCCACTGTAAC	53°C	119951959
		1	Gdf9B	GCCCACCCACACACCTAAAGTTTA GCACACCAACAGCTGAAAGAGGTA	65°C	
		2	Gdf9C	TGTATGAGAGAGATGGGAGCAGTGC TCCCGTGCTGAAGGATGCTG	65°C	
		2	Gdf9D	AAGACTCTCCCTAGAGCTCCATACTC TAGAACTGCAATTCCACCCAAG	55°C	
		2	Gdf9E	AAGAGAGGGCTGTCTGCCTGTCC ACCGCACACAGAAAATTTATGCCAC	63°C	
Fgf8	26	1 e 2	Fgf8A	ATGTGCATCCCTGGCCCCATGA TCAACCGAACACGTGCCGAGGAC	63°C	119951951
		4, 5 e 6	Fgf8B	CAGCCAGGTGGGGGTGGTTG GGTCCCTTCCCCAGCCCTCTC	64°C	
Fgf10	Nc**	1	Fgf10A	GAGAAAGGAFCGAGGAGAGGCAG CTATGCACTGAGGGAACCTTTGGG	62°C	119922026
		2	Fgf10B	TGGAATTGAGACATAGGCAGTTGAG CTTGGTGACTAGCCCTTTGTGC	63°C	
		2	Fgf10C	GGTCTCTTTACCTAAGCTAGGGTGGC CCTTGCCCCGCCCTTGAAAC	61°C	
		3	Fgf10D	ACACAGGAATTCACAAAGCAAGG CTATGAGTGTACCACCATCGGAAG	53°C	
BmprII	2	6	BmprIIA	ATACCAATTTTCAGAGCCATGC GCAGGTATGCTTTACCATTTGAG	63°C	119951937
		10	BmprIIB	CTTAAACAATTCAGTGGGCCAG TTTACACAATCCCTCCACTTACAC	63°C	
		11	BmprIIC	TCTCCTGTCAGTACCCCCTCCTAC AAGTTACTAGGCCTCGTTTGGGAA	62°C	

*Cromossomo; **Não conhecido.

5.1.4 Sequenciamento e Bioinformática

Aproximadamente 100 ng de cada aplicon foi desidratado em centrífuga a vácuo e diluído em água para a concentração de 5 ng/μL. As enzimas Exonuclease 1 e “Shrimp Alkaline Phosphatase” (ExoSAP-IT – Amersham Biosciences) foram utilizadas para purificar os produtos de PCR de forma rápida e eficiente do excesso de *primers* e de dNTPs utilizados para amplificar os fragmentos (SILVA JR. et al., 2001). Uma unidade da solução enzimática ExoSAP-IT foi adicionada em cada tubo, seguido de incubação a 37 °C por 15 minutos e, posteriormente, as enzimas foram degradadas a 80 °C por 15 minutos. Para o sequenciamento dos fragmentos foram utilizados 10 ng de DNA em reações com o Kit BigDye (BigDye® Terminator v3.1 and v1.1 Cycle Sequencing Kits, Applied Biosystems), em aparelho ABI 3100 (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante.

As seqüências obtidas foram analisadas de acordo com a qualidade (com exclusão das bases de baixa qualidade) e alinhadas (de acordo com a identidade de bases) mediante o uso dos programas Phred/Phrap/Consed (EWING; GREEN, 1998; EWING et al., 1998; GORDON et al., 1998). Os possíveis polimorfismos foram detectados automaticamente de acordo com o alinhamento entre as seqüências dos diferentes animais avaliados utilizando o programa polyphred (BHANGALE et al., 2006), seguindo-se inspeção visual nos cromatogramas do sequenciamento.

Para cada agrupamento de seqüências originadas do mesmo fragmento amplificado, realizado pelo programa PhredPhrap, foi gerado uma seqüência consenso que foi considerada representativa daquele agrupamento. Essa seqüência consenso foi submetida à comparação com o banco de seqüências genômicas (versão 3.1), de RNA mensageiro e de segmentos de RNA mensageiro seqüenciados (ESTs) bovinos (UNIGENE # 90) para a confirmação do

fragmento seqüenciado e para identificação de possíveis variantes da seqüência consenso quando comparada com as seqüências já depositadas no banco de dados do National Center for Biotechnology and Information (NCBI-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Essas comparações foram realizadas utilizando o programa BLAST com a sub-função megaBLAST (ALTSCHUL et al., 1990; MCGINNIS; MADDEN, 2004).

Cada gene seqüenciado foi investigado para comparação dos SNPs identificados contra o banco de SNPs do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=snp>), informações oriundas do banco público de ESTs pelo serviço “The Interactive Bovine In Silico SNP” (OBISS - <http://www.livestockgenomics.csiro.au/IBISS4/>) e as informações de seqüenciamento pelo serviço “Bovine Genome Assembly (v3.1)” (<http://www.livestockgenomics.csiro.au/perl/gbrowse.cgi/bova3/>) que localiza SNPs em seqüências genômicas.

Os domínios conservados das proteínas GDF9 e FGF8 foram encontrados utilizando o programa Conserved domain search locado no *site* do NCBI (MARCHLER-BAUER et al., 2005). Os alinhamentos múltiplos de proteína ou de DNA foram realizados com o programa Crustal W2 (LARKIN et al., 2007) e as informações a cerca dos aminoácidos presentes na proteína foram obtidos pelo aplicativo “pepinfo”. Esses aplicativos foram utilizados mediante o serviço disponível pelo European Bioinformatics Institute (LABARGA et al., 2007).

5.2 Genotipagem

5.2.1 Amostra

A amostra para genotipagem foi composta de 218 animais fêmeas Nelore (*Bos taurus indicus*) que foram submetidas ao processo de aspiração folicular guiado por ultra-sonografia, cujo número total de oócitos aspirados, número de oócitos viáveis e taxa de blastocisto produzidos *in vitro* foi armazenado no banco de dados das empresas Vitrogen e In Vitro Brasil. Dessas, 193 amostras foram utilizadas para análise de associação entre os polimorfismos e a característica, pois apresentam taxa de blastocistos produzidos *in vitro* igual ou maior que 20 % e com 2 ou mais aspirações foliculares.

Também foram avaliados 20 animais *Bos taurus taurus* da raça Holandesa pertencentes ao banco de DNA do laboratório para identificação de possíveis alelos específicos de raças zebuínas (*Bos taurus indicus*). A obtenção do DNA genômico da amostra de genotipagem e sua qualidade foi feita conforme descrito no item 5.1.2.

5.2.2 SNPs Identificados

5.2.2.1 PCR-RFLP

A partir dos *primers* Gdf9B e Fgf8A foram identificados polimorfismos que foram avaliados por Reação em Cadeia da Polimerase seguido de Restrição Enzimática (Polymerase chain reaction- restriction fragment lenght polymorphism – PCR-RFLP). Os amplicons foram gerados a partir dos iniciadores descritos na Tabela 3 e 15 µL do produto de PCR foi submetido a digestão enzimática, com as enzimas e condições de uso descritas na Tabela 4.

Tabela 4. Enzimas e condições de atividade utilizadas para reação de digestão do produto de PCR.

<i>Primer</i>	Enzima de Restrição	Unidades	Temperatura e Tempo
Gdf9B	<i>Nde</i> I	5	37 °C – 5 horas
Fgf8A	<i>Msp</i> I	5	37 °C – 5 horas

Os fragmentos resultantes da digestão foram avaliados em gel de agarose 2 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) usando como referência o padrão de DNA fita dupla (100 pares de base). Após a exposição de luz ultravioleta as imagens dos géis foram digitalizadas em Scanner FujiFilm 3000 (Fuji, Japan) e analisadas em programa Image Gauge (Fuji, Japan) permitindo a caracterização dos animais em homozigotos ou heterozigotos.

5.2.2.2 Discriminação alélica por PCR em tempo real

Foi selecionado um SNP a partir do *primer* BmprIIIC para a confecção do *primer* e sondas específicas para cada alelo pelo sistema de detecção TaqManTM. A sequência do *primer* F 5'–GCT AAT ATT TGA CTT GCT CTT TGT TCT GT–3' e R 5'–TCC TTC CGG GCA TTT TAA TAA ACA TAC T–3', e sondas VIC -CTC TTA CGA ACT TCC (específica alelo G) e FAM CTC TTA CAA ACT TCC (específica alelo A). As reações foram realizadas em PCR em tempo real (ABI Prism 7500 Sequence detection system - Applied biosystems) e consistiram de master mix (Mix *TaqMan Applied Biosystems*), 1 x; *primer* e sondas específicas, 1 x e DNA, 20 ng em um volume final de 10 µL. As temperaturas utilizadas foram 92 °C por 15 segundos e 60 °C por 50 segundos (45 x) e os resultados foram analisados através do software do PCR 7500 Tempo Real Applied Biosystems.

5.2.3 Marcadores descritos na Literatura

O gene receptor do hormônio luteinizante (Lhr) presente no cromossomo 11 foi avaliado nas fêmeas Nelore, sendo que o marcador está localizado no exon 11 como descrito por Marson et al. (2005). Para a amplificação por PCR do Lhr utilizou-se os *primers* F 5' – CAA ACT GAC AGT CCC CCG CTT T – 3' e R 5' – CCT CCG AGC ATG ACT GGA ATG GC – 3'. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Eppgradient S e consistiram de tampão, 1 x; MgCl₂, 3,5 mM; dNTPs, 400 µM cada; *primers*, 5 µM do senso e 5 µM do antisenso; Taq DNA polimerase, 1 U e DNA, 100 ng em um volume

final de 25 µL. As temperaturas utilizadas foram 94 °C por 5 minutos, 35 x (94 °C por 45 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos) e 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos foram avaliados em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL).

Uma alíquota de 15 µL do amplicon foi submetida à digestão utilizando a enzima de restrição *Hha* I a 37 °C por 3 horas, em seguida os fragmentos resultantes da digestão foram avaliados em gel de agarose 2 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) usando como referência o padrão de DNA fita dupla (100 pares de base). Após a exposição de luz ultravioleta as imagens dos géis foram digitalizadas em Scanner FujiFilm 3000 (Fuji, Japan) e analisadas em programa Image Gauge (Fuji, Japan), permitindo a caracterização dos animais em homozigotos ou heterozigotos.

A origem mitocondrial das doadoras (zebuína ou taurina) foi obtida de acordo com descrito por Meirelles et al. (1999). Esse marcador diferencia os indivíduos Nelore que contém DNA mitocondrial (mtDNA) originário de animais taurinos dos animais cujo mtDNA originou de animais zebuínos. Brevemente, a amplificação por PCR do mtDNA utilizou-se os *primers* F 5' - CCC AAC GAG GAA AAT ATA CC – 3' e R 5' – AAC CGC AAA CAA CCT CTT CC – 3'. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler Eppgradient S e consistiram de tampão, 1 x; MgCl₂, 3,5 mM; dNTPs, 400 µM cada; *primers*, 5 µM do senso e 5 µM do antisenso; Taq DNA polimerase, 1 U e DNA, 100 ng em um volume final de 25 µL. As temperaturas utilizadas foram 94 °C por 4 minutos, 35 x (94 °C por 30 segundos, 58 °C por 30 segundos, 72 °C por 45 segundos) e 72 °C por 5 minutos. Os fragmentos foram avaliados em gel de agarose 1,5 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL).

Uma alíquota de 15 µL do amplicon foi submetida à digestão utilizando a enzima de restrição *Hind* III a 37 °C por 3 horas, em seguida os fragmentos resultantes da digestão

foram avaliados em gel de agarose 2 % contendo brometo de etídio (0,5 mg/mL) usando como referência o padrão de DNA fita dupla (100 pares de base). Após a exposição de luz ultravioleta as imagens dos géis foram digitalizadas em Scanner FujiFilm 3000 (Fuji, Japan) e analisadas em programa Image Gauge (Fuji, Japan). As amostras foram analisadas de acordo com a presença ou ausência do sítio de restrição da enzima *Hind* III, os indivíduos foram classificados como portadores de mtDNA de *B. taurus taurus* (digeridos) ou portadores de mtDNA *B. taurus indicus* (não digeridos).

5.3 Análise populacional dos polimorfismos

5.3.1 Cálculo das frequências alélicas e genotípicas

As frequências genotípicas foram obtidas por contagem direta dos indivíduos genotipados, sendo que as proporções foram calculadas por:

$$P_{ii} = \frac{n_{ii}}{N}, P_{ij} = \frac{n_{ij}}{N} \text{ ou } P_{jj} = \frac{n_{jj}}{N},$$

em que P_{ii} : proporção de genótipos com alelo i; P_{ij} : proporção de genótipos com alelo ij, e P_{jj} : proporção de genótipos com alelo j; n: número de indivíduos genotipados com alelo i, j ou ij; N: número de indivíduos genotipados, sendo que $i \neq j$.

O desvio padrão da frequência genotípica foi estimada utilizando o procedimento descrito por Evett e Weir (1995):

$$\hat{\sigma}(P) = \sqrt{\frac{P(1-P)}{N}},$$

As proporções alélicas foram estimadas de acordo com as seguintes fórmulas:

$$\hat{p}_i = P_{ii} + \frac{P_{ij}}{2} \quad \text{e} \quad \hat{p}_j = 1 - \hat{p}_i,$$

e o desvio padrão da frequência alélica estimada foi obtida de acordo com:

$$\hat{\sigma}(\hat{p}_i) = \sqrt{\frac{\hat{p}_i(1-\hat{p}_i)}{2N}},$$

sendo o mesmo válido para o alelo j (EVETT; WEIR, 1995).

Para identificar se os variantes genéticos encontravam-se em equilíbrio populacional considerando acasalamento ao acaso, inicialmente foram utilizados as fórmulas descritas por Hardy-Weinberg (HARDY, 1908) para o cálculo das frequências genotípicas esperadas:

$$\hat{P}_{ii} = \hat{p}_i^2,$$

$$\hat{P}_{jj} = \hat{p}_j^2,$$

$$\hat{P}_{ij} = 2\hat{p}_i\hat{p}_j.$$

O teste exato, utilizando algoritmo envolvendo simulação baseada na cadeia de Markov chain (GUO; THOMPSON, 1992), foi realizado para testar a hipótese de equilíbrio de Hardy-Weinberg (H_0). O desvio de equilíbrio (H_1) foi considerado quando $P < 0,05$. Para tal, utilizou-se o programa GenePop v4.0 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

5.3.2 Teste de independência de segregação dos polimorfismos

Para testar a hipótese de que os genótipos de um *locus* nuclear são independentes dos genótipos de outro *locus* nuclear utilizou-se o teste exato de independência (algoritmo Markov chain; RAYMONT; ROUSSET, 1995). Um possível desequilíbrio de independência foi assumido quando $P < 0,05$. O teste foi realizado utilizando o programa GenePop v4.0 (RAYMOND; ROUSSET, 1995).

O teste exato de Fisher foi utilizado para verificar se existe independência entre os genótipos de *locus* nuclear e o genótipo do DNA mitocondrial. A possível dependência entre os mesmos foi considerada quando $P < 0,05$. O teste exato de Fisher foi realizado em Statistical Analysis Software 8.0.

5.4 Associação dos marcadores com o número de oócitos colhidos por OPU

Previamente à análise de efeitos, procedeu-se uma análise de correlação de Person entre os dados de número de oócitos colhidos por OPU e número de oócitos viáveis para auxiliar a tomada de decisão sobre quais dados seriam utilizados na análise de associação de efeitos sobre a característica.

Para a análise de associação entre os polimorfismos e o número de oócitos viáveis colhidos por OPU, inicialmente procedeu-se a transformação dos valores utilizando logaritmo com base 2 (Log_2). A pressuposição de distribuição normal dos dados foi testada pelo

procedimento de Kolmogorov-Smirnov (MASSEY JR., 1951), em que a probabilidade menor que 0,01 foi assumida como enquadramento dos dados na distribuição normal.

Cada marcador foi avaliado independentemente ou em pares, por análise de variância de dados repetidos, com o procedimento de modelos mistos e estimação dos efeitos por máxima verossimilhança restrita sendo utilizados para testar o efeito do genótipo sobre a característica, seguindo os modelos:

$$\text{Log}_2(y_{ijklm}) = \mu + A_{ij} + G_k + F_l + e_{ijklm}; \text{ para avaliações dos marcadores individualmente ou}$$

$$\text{Log}_2(y_{ijklm}) = \mu + A_{ij} + G_{1,2_k} + F_l + e_{ijklm}; \text{ para avaliações dos marcadores aos pares;}$$

em que y_{ijklm} = observação do $ijkl^{\text{ésimo}}$ indivíduo; μ = média geral da característica; A_{ij} = efeito aleatório da $i^{\text{ésima}}$ fêmea com $j^{\text{ésima}}$ punção folicular; G_k = efeito fixo do $k^{\text{ésimo}}$ genótipo; $G_{1,2_k}$ = efeito fixo do $k^{\text{ésimo}}$ genótipo combinado dos marcadores 1 e 2; F_l = efeito fixo do $l^{\text{ésimo}}$ local onde foi realizada a aspiração folicular; e_{ijklm} = erro associado a $ijklm^{\text{ésima}}$ observação, assumido com média igual a zero e distribuição normal. Utilizou-se a correlação não estruturada para formação da matriz de correlação entre os indivíduos.

Como o número de observações entre os genótipos de cada um dos marcadores, as comparações entre as médias de quadrados mínimos foram obtidas pelas estimativas de contrastes. As estimativas de contrastes foram obtidas para a diferença entre os dois homozigotos ($\hat{m}_{\text{hom1}} - \hat{m}_{\text{hom2}}$) que representou uma possível interação alélica de aditividade, a diferença entre os dois homozigotos com o heterozigoto ($\hat{m}_{\text{hom1}} + \hat{m}_{\text{hom2}} - 2\hat{m}_{\text{het}}$) que representou um desvio da interação alélica da aditividade, bem como para a diferença entre um homozigoto e o heterozigoto [$(\hat{m}_{\text{hom1}} - \hat{m}_{\text{het}})$ e $(\hat{m}_{\text{hom2}} - \hat{m}_{\text{het}})$]. As estimativas de diferenças ($\bar{D}$) foram testadas pelo teste t de Student em que $H_0: \bar{D} = 0$ e $H_1: \bar{D} > 0$.

Um efeito de substituição alélica foi estimado por meio de regressão entre os quadrados mínimos dos genótipos em que a inclinação da reta (β) é a estimativa da substituição. O procedimento estatístico utilizado para este teste foi semelhante ao anterior (ANOVA), em que houve apenas a mudança do efeito fixo do marcador por uma co-variável numérica associada ao mesmo (G_k , $K= 0, 1$ ou 2), onde estes números se referem a quantos alelos de efeito aditivo estão presentes em um determinado genótipo. A significância da substituição de alelos foi testada com t de Student para avaliar se $H_0: \beta = 0$, ou $H_1: \beta \neq 0$.

Os testes de efeito dos marcadores sobre as características, as estimativas de aditividade, desvio de aditividade e substituição alélicas, quanto os testes de diferenças de médias foram realizados no Statistical Analysis Software versão 8.0. Como foram realizadas múltiplas comparações, as probabilidades de significância dos resultados dos testes F, estimativas de diferenças dos contrastes e efeito médio de substituição alélica foram corrigidas pelo método de Bonferroni, em que para R testes com valores de P, $P_1, \dots, P_R$; o valor de P ajustado foi assumido como $R \times P_r$ (BLAND; ALTMAN, 1995). Valores de P igual a 0,0001 foram considerados como limite inferior para esta variável com fins de correção de Bonferroni. Os efeitos sobre a característica avaliada ou os resultados de contraste com probabilidade corrigida (P) $< 0,05$ foram considerados significativos. Os resultados de média e diferenças de quadrados mínimos e erros padrão foram apresentados como anti- $\log_2$, ou seja, na unidade de número de oócitos colhidos por OPU.

6. RESULTADOS

6.1 Prospecção dos SNPs

As amplificações dos fragmentos foram eficientes para os 14 pares de *primers* sintetizados, sendo possível cobrir regiões de introns e exons para os quatro genes avaliados. O sequenciamento dos fragmentos gerou cromatogramas possíveis de avaliar a qualidade e acurácia de cada base automaticamente e visualmente. Ao todo foram identificados 19 polimorfismos, dos quais 9 eram alterações de nucleotídeos aparentemente espécie específica (entre indivíduos da raça Nelore e Holandesa), não apresentando polimorfismo dentro de raças. Outros 10 variantes gênicos foram identificados como sendo polimórficos em indivíduos da raça Nelore. Entre as alterações, 4 resultam em troca do códon de leitura do aminoácido, causando modificações na proteína. Os SNPs identificados, bem como sua posição no gene estão descritos na Tabela 5 e esquematizados na Figura 2.

Tabela 5. Relação dos polimorfismos encontrados na raça Nelore.

Gene	Localização	Posição	<i>Bos taurus</i> <i>taurus**</i>	<i>Bos taurus</i> <i>indicus</i>	Troca de aa ^a
Gdf9	Exon 1	318*	C	C/A	Alanina/Glutamato
	Intron 1	788	C	T	
	Exon 2 3'UTR	2911	T	G	
Fgf8	Intron 1	288	A	G	Arginina/Prolina
	Intron 1	454		AAAA	
	Intron 1	478	A	C	
	Exon 2	1027*	G	G/C	
	Exon 2	1053	T	C	
	Intron 2	1136	C	G	
Fgf10	Intron 2	97819	G	G/C	Lisina/Glutamato
	Exon 3	98224	T	C	
	Exon 3 3'UTR	98500	G	G/T	
	Exon 3 3'UTR	98614	C	T	
BmprII	Intron 5	18202	A	A/C	
	Intron 5	18418	C	C/T	
	Exon 11 3'UTR	39468	T	T/A	
	Exon 11 3'UTR	39793	A	A/G	
	Exon 11 3'UTR	40048*	G	G/A	
	Exon 11 3'UTR	40243	T	T/C	

* Polimorfismos confirmados por outra técnica de genotipagem; ** GenBank; ^a aminoácido

Figura 2. Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos utilizados para prospecção de SNPs e dos polimorfismos encontrados. Os genes estão representados quanto a fita de DNA molde utilizada para a síntese de RNA no sentido 5'-3' (esquerda para direita). Linhas pretas representam região de DNA não codificante, em vermelho estão representados os exons e em azul os exons não traduzidos (UTRs). As setas representam os oligonucleotídeos utilizados para a geração dos fragmentos que foram seqüenciados [(→) oligo sense; (←) oligo antisense]. Letras iguais representam oligos utilizados na mesma reação de PCR. Os polimorfismos encontrados e que foram caracterizados populacionalmente estão representados por “*”, polimorfismos encontrados porém não genotipados na amostra completa estão representados por “x” e os variantes alélicos distintos da sequência bovina padrão estão representados por “+”.

6.2 Genotipagem de SNPs Identificados

Para se proceder a genotipagem dos animais 3 SNPs foram escolhidos, 1 SNP do gene *Gdf9* (nt 318), 1 do *Fgf8* (nt 1027) e 1 do *BmprII* (nt 40048). Sendo que para os dois primeiros utilizou-se a técnica de PCR-RFLP e para o terceiro a técnica de discriminação alélica por PCR em tempo real.

A amplificação do gene *Gdf9* (*primer* *Gdf9B*) e sua digestão com a enzima *Nde* I (sítio de restrição: 5'CA↓TATG 3') originou 1 fragmento para o genótipo AA (840 pb), 2 fragmentos para o genótipo CC (521 e 319 pb) e 3 fragmentos para o genótipo CA (840, 521 e 319 pb; Figura 3). Para o gene *Fgf8* (*primer* *Fgf8A*) e sua digestão com a enzima *Msp* I (sítio de restrição: 5'C↓CGG 3') originou 2 fragmentos para o genótipo CC (1000 e 191 pb), 3 fragmentos para o genótipo GG (835, 191 e 165 pb) e 4 fragmentos para o genótipo CG (1000, 835, 191 e 165 pb; Figura 4).

Figura 3. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA pós digestão do produto amplificado do segmento do gene *Gdf9* (*Gdf9B*). Os genótipos designados a cada padrão estão escritos na figura. M = marcador 100 pb.

Figura 4. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA pós digestão do produto amplificado do segmento do gene *Fgf8* (*Fgf8A*). Os genótipos designados a cada padrão estão escritos na figura. M = marcador 100 pb.

A genotipagem do marcador *BmprII* por meio de discriminação alélica com sondas fluorescentes e leitura em equipamento de PCR em tempo real foi eficiente. Todos os indivíduos genotipados tiveram a qualidade de informação do genótipo superior a 96,6 %, o que pode ser observado na representação gráfica da genotipagem (Figura 5).

Figura 5. Representação da discriminação alélica do polimorfismo no gene *BmprII* em PCR tempo real. Os genótipos AA, AG e GG estão indicados na figura.

6.3 Genotipagem de polimorfismos descritos na Literatura

O marcador que está presente no gene *Lhr* (nt 62478; Identificador Gi: 119903459) em que há uma substituição de pirimidinas (T/C) e é reconhecido pela enzima *Hha* I (sítio de restrição GC↓GC, presente no alelo C, mas ausente no alelo T) foi avaliado nas amostras de animais fêmeas Nelore. Para o genótipo TT o fragmento é de 303 pb, para o genótipo CC é de 155 e 148 pb e o genótipo CT apresenta 3 fragmentos (303, 155 e 148 pb; Figura 6).

Figura 6. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA após digestão do produto amplificado do segmento do gene *Lhr*. Os genótipos designados a cada padrão estão escritos na figura. M = marcador 100 pb.

Outro polimorfismo analisado foi o do DNA mitocondrial (mtDNA) que após a restrição enzimática do produto de PCR, aquele indivíduo que apresentou 2 fragmentos (possui sítio de restrição para enzima *Hind* III – sítio de restrição AAGC↓TT), foi considerado animal com mtDNA taurino (406 e 349 pb) e aquele que apresentou apenas um fragmento foi considerado com mtDNA zebuino (755 pb; Figura 7).

Figura 7. Padrão eletroforético dos fragmentos de DNA pós digestão do produto amplificado do segmento do DNA mitocondrial. Os genótipos designados a cada padrão estão escritos na figura, onde Bt é mtDNA *Bos taurus taurus* e Bi é mtDNA *Bos taurus indicus*. M = marcador 100 pb.

6.4 Análise populacional dos polimorfismos

As frequências genóticas observadas e as proporções alélicas estimadas estão descritas na Tabela 6. Foi possível observar que todos os marcadores genotipados, exceção do mtDNA, nos animais fêmeas Nelore nesse trabalho estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Entre os animais *Bos taurus taurus*, observou-se que todos os animais genotipados tinham o alelo C fixado no polimorfismo do gene Gdf9, G fixado no SNP do gene BmprII e C fixado no SNP do gene Lhr, além de que o genótipo do mtDNA encontrado em todos os indivíduos foi o taurino. Já para o gene Fgf8 todos os indivíduos genotipados apresentaram-se heterozigotos CG.

Tabela 6. Frequências genotípicas e alélicas para os polimorfismos genotipados nos animais Nelore.

Locus	Posição	N	Frequências					P (HW)
			Genotípicas			Alélicas		
Gdf9	318	218	AA	CA	CC*	A	C	0,1195
			0,02±0,01	0,16±0,02	0,82±0,03	0,10±0,01	0,90±0,01	
Fgf8	1027	203	CC	CG	GG	C	G	0,7790
			0,20±0,03	0,51±0,04	0,29±0,03	0,46±0,02	0,54±0,02	
BmprII	40048	217	AA	AG	GG*	A	G	0,4718
			0,16±0,02	0,45±0,03	0,40±0,03	0,38±0,02	0,62±0,02	
Lhr	62478	218	CC*	CT	TT	C	T	1,0
			0,02±0,01	0,25±0,03	0,73±0,03	0,14±0,02	0,86±0,02	
mtDNA		218	zebuíno			Taurino*		na
			0.24			0.76		

na: não aplicável; * genótipos fixados na amostra *Bos taurus taurus*.

Quanto à combinação de marcadores nucleares, existe homogeneidade de distribuição de indivíduos entre as combinações de genótipos ($P > 0,10$; Tabela 7). Quando se compara os marcadores nucleares com uma possível combinação de genótipo mitocondrial, para o gene Lhr observa-se heterogeneidade de distribuição dos animais entre os genótipos nucleares e o mitocondrial ($P = 0,0358$). Os dados mostram menor frequência do alelo C ($\hat{p}_C = 0,07$) em animais Nelore com mtDNA zebuino quando comparados com os animais com mtDNA taurino ($\hat{p}_C = 0,16$). Entretanto, nos demais polimorfismos analisados a distribuição de animais é homogênea entre os genótipos nucleares e os dois tipos de mtDNA (Tabela 8).

Tabela 7. Distribuição dos indivíduos (%) em diferentes combinações de genótipos.

<i>Locus</i>	Genótipos	Gdf9			Fgf8			BmprII		
		AA	CA	CC	CC	CG	GG	AA	AG	GG
Fgf8	CC	01 (0,49)	06 (2,96)	34 (16,75)						
	CG	01 (0,49)	16 (7,88)	86 (42,36)						
	GG	02 (0,99)	08 (3,94)	49 (24,14)						
BmprII	AA	00 (0,00)	06 (2,76)	28 (12,90)	08 (3,96)	17 (8,42)	08 (3,96)			
	AG	02 (0,92)	14 (6,45)	81 (37,33)	18 (8,91)	45 (22,28)	24 (11,88)			
	GG	02 (0,92)	14 (6,45)	70 (32,26)	15 (7,43)	40 (19,80)	27 (13,37)			
Lhr	CC	00 (0,00)	01 (0,46)	03 (1,38)	01 (0,49)	01 (0,49)	02 (0,99)	00 (0,00)	01 (0,46)	03 (1,38)
	CT	01 (0,46)	12 (5,50)	41 (18,81)	12 (5,91)	26 (12,81)	12 (5,91)	09 (4,15)	27 (12,44)	17 (7,83)
	TT	03 (1,38)	21 (9,63)	136 (62,39)	28 (13,79)	76 (37,44)	45 (22,17)	25 (11,52)	69 (31,80)	66 (30,41)

Tabela 8. Frequências genotípicas dos marcadores nucleares de acordo com o genoma mitocondrial.

<i>Locus</i>	N	Genótipo	Frequência (N)		P
			mtDNA zebuino	mtDNA taurino	
Gdf9	218	AA	0,00 (00)	0,02 (04)	0,1084
		CA	0,02 (04)	0,14 (30)	
		CC	0,22 (49)	0,60 (131)	
Fgf8	203	CC	0,03 (06)	0,17 (35)	0,2293
		CG	0,14 (29)	0,22 (74)	
		GG	0,07 (14)	0,36 (45)	
BmprII	217	AA	0,02 (05)	0,13 (29)	0,1891
		AG	0,13 (29)	0,31 (68)	
		GG	0,09 (19)	0,31 (67)	
Lhr	218	CC	0,00 (00)	0,02 (04)	0,0358
		CT	0,03 (07)	0,22 (47)	
		TT	0,21 (46)	0,52 (114)	

6.5 Associação dos SNPs com o número de oócitos colhidos por OPU

6.5.1 Descrição da característica

A descrição do número de oócitos totais e viáveis colhidos por sessão de aspiração folicular (OPU) encontram-se na tabela 9, há um número maior de fêmeas e observações em oócitos viáveis, pois uma das empresas não coleta o dado de oócito total. Existe correlação ($r = 0,9813$, $P < 0,0001$) entre o número de oócitos total e viáveis colhidos por OPU (Figura 8). Os dados evidenciam alta variabilidade do número de oócitos viáveis colhidos por OPU entre as fêmeas analisadas (Figura 9).

Tabela 9. Estatística descritiva de oócitos colhidos por sessão de aspiração folicular.

	N Fêmeas	N observações	Média	DP ¹	Mínimo	Máximo	Mediana	CV ² (%)
Total ^a	161	1008	38,73	29,34	1	200	31	75,78
Viáveis ^b	193	1426	29,63	25,23	1	194	22	85,15

¹ desvio padrão; ² coeficiente de variação; ^a todos os oócitos aspirados por OPU; ^b oócitos colhidos por sessão de OPU e avaliados como viáveis para a fecundação *in vitro*.

Figura 8. Dispersão entre os dados de oócitos totais e viáveis colhidos por OPU.

Figura 9. Box-plot do número de oócitos viáveis colhidos por aspiração por fêmea analisada.

Os dados originais de número de oócitos viáveis colhidos por aspiração folicular apresentaram uma distribuição Log-normal ($P<0,001$; Figura 10A), portanto os dados foram transformados por logarítmo na base 2 (Log2) para se atingir uma distribuição normal dos dados ($P<0,01$; Figura 10B) e permitir o uso de análise de variância por modelos mistos para analisar os efeitos dos polimorfismos sobre a característica avaliada.

Figura 10. Histograma dos dados de oócitos colhidos por aspiração folicular. A: dados originais. B: dados normalizados por Log2. As linhas representam a adequação das distribuições no histograma (verde: log-normal; vermelho: normal). Em detalhe nos gráficos estão informações de medida de tendência central, variabilidade (DP: desvio padrão; CV: coeficiente de variação) e os quantis.

6.5.2 Análise de efeitos individuais dos polimorfismos sobre a característica

Como resultado da análise dos efeitos fixos sobre o número de oócitos colhidos por OPU, observou-se que fatores ambientais ou temporais representaram fontes de variação para a característica avaliada ($P < 0,05$). Entre os genótipos avaliados, os polimorfismos nos genes Gdf9, Fgf8, BmprII e Lhr foram fontes de variação significativa para a característica avaliada ($P < 0,05$), sendo que o mesmo não foi observado nos dois tipos de DNA mitocondrial (Tabela 10). As médias de quadrado mínimos para o número de oócitos colhidos por aspiração folicular realizado para cada genótipo dos marcadores podem ser observados na Tabela 11.

Tabela 10. Resultado da análise de variância com efeitos fixos avaliados sobre o número de oócitos colhidos por OPU.

Fonte de variação	Número de classes	F	Probabilidade
Local da aspiração	52	5,75 – 6,98*	0,0001
Ano de aspiração	8	12,08 – 16,30*	0,0001
Gdf9	3	18,37	0,0004
Fgf8	3	6,66	0,0065
BmprII	3	24,29	0,0004
Lhr	3	17,78	0,0004
mtDNA	2	0,04	1,0000

* os valores de F estão representados com o menor e maior valor obtido nas 5 análises feitas.

Tabela 11. Estimativas de médias de quadrados mínimos (MQM) e erro padrão (EP) de oócitos aspirados por seção de aspiração folicular de acordo com os genótipos dos marcadores.

Marcador	Genótipos	N	MQM $\pm$ EP
Gdf9	AA	04	20,80 $\pm$ 0,44 ^{ab}
	CC	180	19,99 $\pm$ 0,01 ^b
	CA	34	14,00 $\pm$ 0,02 ^a
Fgf8	GG	59	22,07 $\pm$ 0,01 ^a
	CG	103	19,48 $\pm$ 0,01 ^{ab}
	CC	41	17,20 $\pm$ 0,02 ^b
BmprII	AA	34	22,83 $\pm$ 0,01 ^a
	GG	86	21,23 $\pm$ 0,01 ^a
	AG	97	16,76 $\pm$ 0,01 ^b
Lhr	CC	04	26,06 $\pm$ 0,03 ^a
	TT	160	21,17 $\pm$ 0,01 ^a
	CT	54	16,39 $\pm$ 0,01 ^b
mtDNA	taurino	53	19,61 $\pm$ 0,01 ^a
	zebuíno	165	19,41 $\pm$ 0,01 ^a

^{a,b} letras sobrescritas entre as linhas do mesmo marcador representam diferenças significativas entre as médias de quadrados mínimos estimadas pelos contrastes.

Seguindo a análise de associação dos genótipos com o fenótipo analisado, realizou-se o teste para verificar uma possível relação de aditividade entre os alelos dos genótipos, que resultou em uma relação de aditividade significativa ($P < 0,05$), com efeito médio de substituição alélica para os polimorfismos nos genes Gdf9, Fgf8 e Lhr (Tabela 12).

Tabela 12. Estimativas de desvio de aditividade, aditividade e efeito de substituição alélica nos marcadores avaliados para o número de oócitos colhidos por OPU.

<i>Locus</i>	Estimativas $\pm$ erro padrão					
	Desvio de aditividade	P	Aditividade	P	Substituição alélica	P
Gdf9	2,12 $\pm$ 1,61	1,0000	1,04 $\pm$ 1,59	1,0000	1,40 $\pm$ 0,01	0,0004
Fgf8	1,00 $\pm$ 1,10	1,0000	1,28 $\pm$ 1,08	0,0204	1,13 $\pm$ 0,01	0,0012
BmprII	1,78 $\pm$ 1,09	0,0017	1,11 $\pm$ 1,06	1,0000	1,02 $\pm$ 0,01	1,0000
Lhr	2,05 $\pm$ 1,15	0,0017	1,23 $\pm$ 1,12	1,0000	1,12 $\pm$ 0,01	0,0184

6.5.3 Análise de efeitos combinados dos polimorfismos sobre a característica

A análise de efeitos combinados entre dois genótipos identificou associações entre polimorfismos que influenciam significativamente a quantidade de oócitos colhidos por OPU ($P < 0,05$), com exceção à combinação do DNA mitocondrial com o polimorfismo no gene *Fgf8* (Tabela 13). As médias dos quadrados mínimos evidenciam a variabilidade da característica entre os diferentes possíveis genótipos (Tabelas 14 e 15).

Tabela 13. Análise de variância com efeitos fixos avaliados sobre o número de oócitos colhidos por OPU.

Fonte de variação	Número de classes	F	Probabilidade
Local da aspiração	52	5,28-6,77 ⁺	0,0001
Ano de aspiração	8	10,24-17,21 ⁺	0,0001
mtDNA*Gdf9	5	9,64	0,0010
mtDNA*Fgf8	6	2,84	0,1480
mtDNA*BmprII	6	12,21	0,0010
mtDNA*Lhr	6	7,34	0,0010
Gdf9*Fgf8	8	11,35	0,0010
Gdf9*BmprII	8	15,16	0,0010
Gdf9*Lhr	8	11,71	0,0010
Fgf8*BmprII	9	10,18	0,0010
Fgf8*Lhr	9	9,86	0,0010
Lhr *BmprII	8	11,66	0,0010

+ os valores de F estão representados com o menor e maior valor obtido nas 5 análises feitas.

* representa a interação dos marcadores.

Tabela14. Médias dos quadrados mínimos do número de oócitos colhidos por OPU das combinações dos genótipos de *loci* nucleares com os genótipos mitocondriais.

<i>Locus</i> mitocondrial	<i>Locus</i> nuclear -genótipo	N	MQM±EP
mtDNA	Gdf9		
taurino	AA	04	20,92 ± 1,58
taurino	CC	131	20,08 ± 1,07
zebuíno	CC	49	19,89 ± 1,08
taurino	CA	30	14,46 ± 1,09
zebuíno	CA	04	11,45 ± 1,18
mtDNA	Fgf8		
taurino	GG	45	22,41 ± 1,08
zebuíno	GG	14	21,48 ± 1,11
taurino	CG	74	19,80 ± 1,08
zebuíno	CG	29	18,60 ± 1,10
taurino	CC	35	17,22 ± 1,10
zebuíno	CC	06	16,95 ± 1,15
mtDNA	BmprII		
taurino	AA	29	23,88 ± 1,08
taurino	GG	67	21,97 ± 1,08
zebuíno	GG	19	19,00 ± 1,12
zebuíno	AA	05	18,87 ± 1,21
zebuíno	AG	29	18,76 ± 1,09
taurino	AG	68	15,82 ± 1,08
mtDNA	Lrh		
taurino	CC	04	26,70 ± 1,14
taurino	TT	114	21,30 ± 1,08
zebuíno	TT	46	21,01 ± 1,09
zebuíno	CT	07	17,88 ± 1,12
taurino	CT	47	16,14 ± 1,08

Tabela 15. Médias dos quadrados mínimos do número de oócitos colhidos por OPU das combinações dos genótipos de *loci* nucleares.

<i>Locus</i> nuclear - genótipo		N	MQM $\pm$ EP
Gdf9	Fgf8		
CC	GG	49	22,59 $\pm$ 1,08
AA	CG	01	20,54 $\pm$ 2,01
CA	CC	06	20,12 $\pm$ 1,39
AA	CC	01	19,60 $\pm$ 1,89
CC	CG	86	19,52 $\pm$ 1,08
CC	CC	34	15,91 $\pm$ 1,10
CA	CG	116	15,06 $\pm$ 1,10
CA	GG	08	8,98 $\pm$ 1,16
Gdf9	BmprII		
AA	GG	02	22,98 $\pm$ 1,99
CC	AA	28	22,68 $\pm$ 1,08
CA	AA	06	21,50 $\pm$ 1,16
CC	GG	70	21,31 $\pm$ 1,08
AA	AG	02	18,75 $\pm$ 1,86
CA	GG	14	18,10 $\pm$ 1,11
CC	AG	81	17,77 $\pm$ 1,08
CA	AG	14	9,73 $\pm$ 1,11
Fgf8	BmprII		
GG	GG	27	27,35 $\pm$ 1,10
GC	AA	17	27,34 $\pm$ 1,10
CC	AA	08	23,79 $\pm$ 1,17
GG	AA	08	21,50 $\pm$ 1,10
GC	GG	40	20,73 $\pm$ 1,09
GG	AG	24	19,81 $\pm$ 1,10
CC	GG	15	18,18 $\pm$ 1,15
CC	AG	18	17,08 $\pm$ 1,11
GC	AG	45	16,66 $\pm$ 1,08

continua...

Fgf8	Lhr		
GC	CC	01	48,97 ± 1,27
GG	CC	02	27,54 ± 1,17
GG	TT	45	26,09 ± 1,09
GC	TT	76	20,82 ± 1,08
CC	TT	28	19,01 ± 1,11
GC	CT	26	18,20 ± 1,09
CC	CT	12	16,58 ± 1,12
CC	CC	01	15,17 ± 1,30
GG	CT	12	13,84 ± 1,11
Lhr	BmprII		
CC	GG	03	27,76 ± 1,14
TT	AA	25	24,80 ± 1,09
TT	GG	66	21,52 ± 1,08
CT	AA	09	20,04 ± 1,10
CT	GG	17	19,99 ± 1,11
TT	AG	69	19,02 ± 1,08
CC	AG	01	14,63 ± 1,39
CT	AG	27	14,08 ± 1,09

Seguindo a análise de associação dos genótipos combinados com o fenótipo analisado, realizou-se o teste para verificar uma possível relação de aditividade entre os alelos dos genótipos, que resultou em uma relação de aditividade significativa ($P < 0,05$), com efeito de substituição alélica para a associação do marcador Gdf9 com o Fgf8 (Tabela 16).

Tabela 16. Estimativas de efeito de substituição alélica nos marcadores avaliados para o número de oócitos colhidos por OPU.

Marcador	Alelos favoráveis	Estimativas $\pm$ erro padrão	Probabilidade
Gdf9*Fgf8	C * G	$1,84 \pm 1,12$	0,0003
Gdf9*Lhr	-	$0,99 \pm 1,12$	1,0000
Fgf8*Lhr	-	$1,08 \pm 1,06$	0,4246

* representa a interação

7. DISCUSSÃO

O controle fisiológico da foliculogênese em mamíferos é conhecido como uma interação em séries de hormônios e proteínas, variáveis de acordo com tipo celular e com variação temporal, que regula o recrutamento folicular, e todo o processo de crescimento do folículo até a sua atresia ou ovulação. O presente estudo contribui com informações acerca da variabilidade genética que pode contribuir com a variabilidade fenotípica que existe no número de folículos recrutados durante as ondas foliculares. Neste trabalho foram identificados polimorfismos em genes de animais *Bos taurus indicus* e cujos variantes gênicos podem influenciar no número de oócitos colhidos por punção guiada por ultra-sonografia.

7.1 Identificação de SNPs

Em todo o genoma bovino são conhecidos aproximadamente (~) 2,3 milhões de polimorfismos, entre os quais ~ 32.820 foram identificados em indivíduos representantes de *Bos taurus taurus* (raça Holandesa) e ~ 40.975 foram identificados em representantes de *Bos taurus indicus* (raça Brahman). Entretanto, não se conhece ao certo o quanto a dimensão da diferença entre o genoma de *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, tão pouco se conhece o quanto os indivíduos da raça Nelore se diferenciam de animais taurinos.

No presente trabalho, ao todo foram identificados 19 novos polimorfismos. Nove variantes entre as raças foram observados, com possibilidade de se tratarem de alelos que estão em homozigose em cada tipo de raça (Nelore x Holandês). Diferenças gênicas entre

zebuínos brasileiros comparados com indivíduos taurinos têm mostrado alelos na raça Nelore diferentes dos alelos dos animais Holandeses, entretanto em genes diferentes dos estudados no presente trabalho. Estudos no gene codificante para a enzima acylCoA:diacylglycerol-acyltransferase (Dgat1) mostraram que os indivíduos zebuínos possuem alta frequência do alelo K (Gir: 0,96; Guzerá: 1,0; Nelore: 1,0) quando comparados com bovinos da raça Holandesa [F(K): 0,27; F(A): 0,73] (LACORTE et al., 2006). Os genes envolvidos na resposta imune: Tgb1, Cxcl10, Tnf, Ifng, Ccl3, Igfl e Ccl2 foram investigados para identificação de polimorfismos que possam auxiliar na identificação de possíveis variantes associados à resistência a carrapatos (ABATEPAULO et al., 2008). Foram identificadas 33 variações entre indivíduos da raça Nelore (N = 16) e Holandesa (N = 16), das quais 5 variações tiveram diferenças de frequência alélica entre as raças (genes: Cxcl10, Ccl3, Igfl e Ifng) e 6 variantes eram polimórficos em indivíduos da raça Nelore e não variáveis na raça Holandesa (Genes: Ccl2, Tnf e Ifng).

Os polimorfismos entre raças colaboram para uma divergência genética que existe entre zebuínos e taurinos no Brasil, estimada em 54 % (MACHADO et al., 2003), além de contribuir para a divergência fenotípica como nos casos dos polimorfismos T1053>C do gene Fgf8 e T98224>C do gene Fgf10 que provavelmente colaboram para troca de aminoácidos nas respectivas proteínas. Esses SNPs divergentes entre raças, como os encontrados nesse trabalho, podem ser possíveis candidatos a marcadores genéticos zebu ou taurino específico, com aplicabilidade na caracterização de características fenotípicas peculiares a cada raça, como a rusticidade do zebu, ou mesmo a caracterização de produtos de origem bovina, para fins de rastreabilidade.

Outros polimorfismos encontrados no presente estudo foram as 10 mutações em que se detectou nas fêmeas Nelore a presença de um alelo comum e possivelmente fixado nos taurinos, e outro alelo presente apenas nos animais Nelore. Entre esses, três polimorfismos

foram genotipados e caracterizados em 218 fêmeas Nelore e em 20 fêmeas da raça Holandesa. Em dois desses SNPs, observou-se que as 20 fêmeas Holandesas eram homozigotas para um alelo (Gdf9 - C; BmprII - G), indicando que não havia variação intra-específica. Entretanto, para o gene Fgf8, observou-se que as fêmeas Holandesas eram sempre heterozigotas (CG), indicando alta heterozigozidade desse *locus* que pode ter sido encontrada devido ao baixo número de indivíduos genotipados. Uma distribuição equivalente a esta, se confirmada, pode ser originada também pela existência de letalidade e ou dois genes ou pseudogenes presentes no genoma.

Em bovinos Nelore, para os 3 polimorfismos (genes: Gdf9, Fgf8 e BmprII) a frequência do alelo menos presente foi maior que 1 %, atendendo ao critério previamente descrito para se considerar o *locus* polimórfico (FALCONER; MACKAY, 1998). Apesar da baixa frequência do alelo A para o *locus* Gdf9 (nt 318), os três polimorfismos apresentaram distribuição em concordância com os princípios de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HARDY, 1908). Apesar de os polimorfismos do gene Gdf9 (nt 318 C/A) e Fgf8 (nt 1027 G/C) representarem possíveis alterações de aminoácidos por outros de diferentes características, e o polimorfismo no gene BmprII (nt 40048 G/A) estar localizado em uma região reguladora do gene, o equilíbrio gênico é indicativo que os polimorfismos não estão sofrendo pressão de seleção. Além disso, pode-se sugerir que as formas alternativas apareceram na população há tempo suficiente para se estabelecerem e se estabilizarem em equilíbrio, apesar de ser impossível prever a quanto tempo essas formas alélicas segregam na população.

7.2 Caracterização de SNPs descritos na literatura

Dois polimorfismos já descritos na literatura foram caracterizados na amostra de fêmeas Nelore (N = 218) e Holandesas (N = 20). O polimorfismo do gene *Lhr* foi previamente identificado em fêmeas Nelore (N = 100) em que a troca de pirimidinas na posição 62478 provavelmente promove troca de aminoácidos na posição 443 da proteína (MILAZZOTTO et al., 2008). O alelo mais freqüente na amostra de Nelore do presente trabalho foi a timina ($0,86 \pm 0,02$), tendo sido encontrado apenas nessa amostra. Por outro lado, o alelo C em homozigose foi encontrado em apenas 04 indivíduos Nelore e nas 20 fêmeas Holandesas. Esse polimorfismo foi previamente genotipado em bovinos em que se observou uma variação da freqüência do alelo T de 0,24 a 0,42 em 6 raças compostas (4 raças com 25 % de Zebu e 2 raças com 50 % de Zebu; MARSON et al., 2005). Em conjunto os resultados mostram que a freqüência do alelo T em animais Nelore é maior que o alelo C e que a segregação dos variantes é aleatória, reforçando o equilíbrio de Hardy-Weinberg observado na amostra de Nelore.

A ocorrência de dois tipos de genomas mitocondriais na raça Nelore foi previamente reportada (MEIRELLES et al., 1999). Foi demonstrada maior ocorrência de portadores de mtDNA taurino entre os indivíduos registrados como puro de origem (79 %, N = 48) e maior ocorrência de mtDNA zebuino entre os indivíduos registrados como puro de origem importada (74 %, N = 35). O presente trabalho apresentou freqüências de mtDNA taurino similares (76 %, N = 218), indicando que a amostra de Nelore estudada era composta por indivíduos de origem matrilinear *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*.

7.3 Caracterização da frequência combinada entre marcadores estudados

O equilíbrio de segregação entre os alelos de cada um dos polimorfismos foi observado. O mesmo equilíbrio de segregação foi observado entre os alelos dos quatro marcadores nucleares. Esse resultado é reflexo da presença dos marcadores em diferentes cromossomos (Figura 11) e provavelmente da ausência de seleção de características que esses polimorfismos podem estar associados.

Resultado semelhante foi observado para a combinação dos marcadores nucleares Gdf9, Fgf8 e BmprII com os dois tipos de DNA mitocondrial, em que as frequências alélicas nucleares parecem estar distribuídas equitativamente entre os grupos de animais com dois tipos de mtDNA. Entretanto, a distribuição alélica do polimorfismo do gene Lhr entre os dois tipos de mtDNA em conjunto com o resultado da genotipagem do marcador com os animais Holandeses é indicativo que o alelo C tende a ser fixado em indivíduos *Bos taurus taurus* e o alelo T tende a ser fixado em indivíduos Nelore que possuem linhagem maternal indiana. Por outro lado, os indivíduos Nelore de origem matrilinear taurina têm maior frequência do alelo C em comparação aos de origem matrilinear zebuína. Em conjunto os resultados sugerem que os alelos C e T têm origens diferentes, taurinas e zebuínas respectivamente.

Figura 11. Representação esquemática dos cromossomos em que se encontram os genes BmprII, Gdf9, Lhr e Fgf8. Os cromossomos representados estão separados por linhas tracejadas. À esquerda observa-se a representação do mapa genético (MARC-USDA), no meio o mapa físico e à direita a representação da densidade gênica do cromossomo, com a localização do gene analisado.

7.4 Avaliação dos efeitos dos marcadores genéticos sobre a característica

Observou-se uma diferença de ~ 9 oócitos entre os totais colhidos por aspiração folicular (OPU) e os viáveis. Isso se deve a seleção de oócitos que ocorre no momento da realização da maturação *in vitro* dos mesmos, em que apenas aqueles que por critérios morfológicos são considerados aptos a serem fecundados *in vitro* e tem maior chance de desenvolver embriões. Entretanto, observa-se que as medidas de dispersão (DP e CV) entre os dados de oócitos totais e viáveis são próximas, além de existir uma alta correlação entre os dados. Em conjunto essas informações indicam que os dados de oócitos viáveis colhidos por OPU são preditores da variabilidade no número de oócitos totais. O número maior de indivíduos e de observações na informação de oócitos viáveis foi determinante na escolha dessa característica para a avaliação estatística com os polimorfismos.

A média de oócitos colhidos por OPU observada nas fêmeas Nelore no presente trabalho (38,73) não é semelhante às médias apresentadas para colheitas de oócitos em fêmeas da raça Holandesa ($N = 10$, *Bos taurus taurus*), que variaram de $7,8 \pm 2,5$ para a fêmea com menor N de oócitos colhidos até $19,2 \pm 6,0$ para a fêmea com maior número de oócitos colhidos (BONI et al., 1997). A média observada também foi maior que as apresentadas para as fêmeas da raça Gir ($N = 08$, *Bos taurus indicus*) $7,46 \pm 5,77$ (RAMOS et al, 2007). Por outro lado, os dados são semelhantes aos apresentados em fêmeas Nelore com 60 a 90 dias de idade ($N = 18$), cuja recuperação de oócitos por aspiração folicular foi de $24,5 \pm 93,5$ (MALARD et al., 2001).

Os dados de oócitos totais colhidos por aspiração folicular são muito condizentes com a identificação de $33,4 \pm 3,2$ folículos recrutados por onda folicular observados para fêmeas Nelore ($N = 12$) com idade de 20 a 24 meses, apesar de serem um pouco maiores que os 25,4

$\pm 2,5$ oócitos colhidos por OPU para fêmeas da raça Aberdeen Angus ($N = 12$; CARVALHO et al., 2008). As grandes diferenças observadas entre os desvios padrão apresentados por Carvalho et al. (2008) e o presente trabalho deve-se provavelmente à diferença de indivíduos com dados colhidos em que o estudo de maior número de indivíduos seria capaz de captar melhor a variabilidade do número de folículos recrutados ou ainda ao fato de que as fêmeas estudadas nesse trabalho não foram aspiradas em momentos específicos da onda folicular.

A análise de variância realizada para identificar efeitos fixos sobre o número de oócitos viáveis colhidos por OPU identificou que as variáveis não associadas ao genoma (ano e local de aspiração) influenciaram significativamente na variabilidade da característica. Diferenças significativas ($P < 0,01$) foram observadas no número de oócitos colhidos semanalmente entre o intervalo seis meses em 10 fêmeas Holandesas (BONI et al., 1997). A variabilidade entre o local de aspiração representa um possível efeito de manejo dos animais aspirados em diferentes locais, ou fazendas, sendo que variações nutricionais afetam a dinâmica folicular, em especial aqueles nutrientes que afetam os níveis séricos do hormônio de crescimento, insulina, o sistema dos fatores de crescimento semelhante à insulina e leptina. (revisado por WEBB et al., 2004).

A análise de efeito do genoma mitocondrial não foi significativa sobre o número de oócitos colhidos por OPU (mtDNA taurino: $\bar{x} = 19,61$; mtDNA zebuino: $\bar{x} = 19,41$). Esse resultado, obtido com o uso do modelo de uma raça bovina com mtDNA de duas origens, e em conjunto com diferença entre o número médio de folículos recrutados por onda folicular em *Bos taurus indicus* (Nelore: 33,4) e *Bos taurus taurus* (Aberdeen Angus: 25,4; CARVALHO et al., 2008) é sugestivo de que variações nos genes nucleares influenciam mais o recrutamento folicular do que o genoma mitocondrial. Os dados obtidos com os polimorfismos nucleares avaliados nesse trabalho reforçam essa hipótese.

A análise de variância identificou possível efeito entre os genótipos do polimorfismo Gdf9 nt 318 C/A. Entretanto, a estimativa de contrastes das médias de quadrados mínimos apenas identificou a diferença entre os genótipos CC e CA. Um dos motivos para a similaridade entre as médias de quadrados mínimos de AA e CA provavelmente deve-se ao baixo número de indivíduos genotipados com AA ($N = 4$), que resulta no aumento do erro padrão da estimativa de média de quadrado mínimo. Essa variante “A” parece ser exclusiva de animais *Bos taurus indicus*. Um possível efeito de substituição alélica ($\beta = 1,40 \pm 0,01$) foi significativo ($P < 0,05$), entretanto pode ser visto como um falso positivo, já que o contraste entre os homozigotos não identificou um genótipo favorável para a característica (quanto mais alelos melhor). A genotipagem de mais animais permitiria melhor estimativa de valores para o genótipo AA com melhor caracterização entre as diferenças de médias de quadrados mínimos.

Em ovinos (raças Cambridge e Belclare), mutações no segmento do exon 2 do gene Gdf9 foram associadas à taxa de ovulação, em que indivíduos homozigotos eram estéreis (HANRAHAN et al., 2004). A hipótese corrente para essa ocorrência é de que os homozigotos têm baixa secreção da proteína GDF9 quando comparados aos heterozigotos (LIAO et al., 2003). Se considerados apenas os genótipos CC e CA, observa-se que os heterozigotos tiveram menor taxa de recrutamento folicular do que os homozigotos e essa alteração pode ser causada pela troca de aminoácidos que ocorre na porção não ativa da proteína que é altamente conservada entre os mamíferos (Figura 12A). A proteína GDF9 atua sob a forma de homodímero (JUENGEL et al., 2004) e em bovinos, a presença de duas proteínas, uma com o aminoácido alanina (alifático e apolar) e outra com glutamato (polar e negativo) na posição 95 (Figura 12B), poderiam atrapalhar a formação correta e adequada do mesmo, afetando a sua função. Uma alteração no funcionamento adequado do GDF9 pode ter efeito na manutenção do desenvolvimento de folículos secundários e terciários (EPIFANO; DEAN, 2002). Já em suínos, que são animais múltiparos, o gene Gdf9 foi caracterizado para a

identificação de 12 polimorfismos do tipo SNP. Um estudo de associação de 3 desses com o tamanho médio de leitegada (ZHANG et al., 2008), não permitiu estimativa da associação entre os genótipos e a característica avaliada.

Figura 12. Representação esquemática da proteína GDF9. (A) Esquema da localização do aminoácido alterado (aa 95) em relação aos dois sítios ativos TGF (vermelho e verde). Logo abaixo, segue a visão gráfica da conservação da proteína entre mamíferos (as duas primeiras sequências são *B taurus taurus* e *B taurus indicus*) em que branco representa a não conservação do aa e preto a total conservação do aa. (B) Visualização gráfica das características dos aa em parte da proteína gdf9, em que se vê a diferença entre a proteína na posição 95 (A/E).

A análise de variância evidenciou que o polimorfismo no gene Lhr (nt 62478 C/T) analisado nesse trabalho influenciou o número de oócitos colhido por OPU. Esse resultado foi confirmado pela estimativa de contraste entre as médias de homozigotos com as médias de heterozigotos ($2,05 \pm 1,15$; $P = 0,0017$), em que os genótipos CC e TT apresentaram maiores médias que o genótipo CT. Um efeito de aditividade entre os alelos (contraste entre os homozigotos) não foi identificada, entretanto foi possível identificar efeito médio de substituição alélica ($1,12 \pm 0,01$; $P = 0,0184$) em que o alelo C seria favorável ao maior número de oócitos colhidos por OPU. Todavia, há que se levar em consideração o baixo número de indivíduos genotipados como CC com conseqüente estimativa de média de quadrados mínimos que não deve ser representativo da realidade.

Em bovinos da raça British Friesian e Holandesas, polimorfismos no gene Lhr foram associados ($P < 0,05$) a valores genéticos de características reprodutivas (intervalo de partos e dias para o primeiro serviço) e características de desenvolvimento (condição corporal; HASTINGS et al., 2006), entretanto, entre os variantes analisados não estavam o polimorfismo analisado no presente trabalho. Em bovinos brasileiros, o polimorfismo Lhr (nt 62478 C/T) foi avaliado para identificação de possíveis efeitos sobre precocidade sexual de fêmeas. Em 6 raças compostas (50 ou 25 % zebu, $N = 320$) não foi identificada associação com taxa de prenhes das fêmeas com média de idade de 13,5 meses (MARSON et al., 2008). Nas análises com a raça Nelore não houve associação desse marcador com o fenótipo de puberdade sexual identificada aos 12-16 meses de idade das fêmeas (fêmeas prenhes $N = 39$, não prenhes $N = 61$), enquanto que possíveis associações desse fenótipo com polimorfismo no gene Fsh foram observadas (teste de χ^2 , $P < 0,05$) (MILAZZOTTO et al., 2008).

O efeito do polimorfismo no gene Lhr sobre o número de oócitos colhidos por OPU identificado no presente trabalho pode ser resultante da ação da glicoproteína LHR no ovário. A ação do hormônio luteinizante (LH) parece ser essencial para a manutenção do

desenvolvimento folicular a partir do estágio antral, uma vez que o receptor (LHR) começa a ser expresso nas células da granulosa no dia 4 do ciclo estral (XU et al., 1995). Em adição, camundongos com o gene *Lhr* deletado não tiveram maturação folicular além do estágio antral (PAKARAINEN et al., 2005). A proteína LHR no compartimento intracelular (THOMAS et al., 1994) atua sob a forma de dímeros (ROCHE et al., 1989) e a presença de duas formas protéicas poderia afetar a ligação do LH com LHR e por consequência a adequada manutenção do desenvolvimento folicular em indivíduos CT.

O polimorfismo A40048G no gene *BmprII* foi associado ao número de oócitos viáveis colhidos por OPU. As comparações de médias mostraram que os indivíduos heterozigotos têm menores valores médios quando comparados aos homozigotos. O polimorfismo genotipado para fins de investigação sobre a variabilidade da característica forma haplótipos com os demais polimorfismos observados na região 3'UTR do gene (dados não apresentados). A presença dessa alteração na porção 3' não traduzida do RNAm é indicativo que a expressão do gene *BmprII* em bovinos Nelore é regulada em níveis pós transcricionais. Uma vez que a região 3'UTR do RNAm tem uma função geral de regular a tradução do RNAm em local e momento específico, bem como de regular a estabilidade do RNAm em conjunto com a estrutura poliA 5' e as proteínas iniciadoras de tradução (WICKENS et al., 1997; LYKKE-ANDERSEN, 2001). Resultados de pesquisas realizadas com camundongos *BmprII* knockout não são informativos quanto ao funcionamento dessa proteína nos folículos ovarianos, pois os indivíduos morrem ainda no período embrionário por alterações na gastrulação (BEPPU et al., 2000).

Estudos funcionais são necessários para se compreender o mecanismo pelo qual essa possível regulação afetaria síntese da proteína receptora para o GDF9 e em consequência o número de folículos antrais presentes nos indivíduos heterozigotos. Por outro lado é necessário considerar a possibilidade de que essas alterações na região 3' UTR do gene não

sejam funcionalmente ligadas ao número de folículos antrais. Assim sendo, haveria(m) outro(s) polimorfismo(s) fisicamente ligado(s) que seria(m) responsável(is) por esse efeito sobre o fenótipo avaliado.

O efeito do polimorfismo no gene *Fgf8* (nt 1027 C/G) sobre o número de oócitos colhidos por OPU identificado pela ANOVA foi confirmado pelas estimativas de contrastes. O teste de contrastes entre os dois homozigotos é sugestivo de um possível efeito de aditividade entre os alelos ($1,28 \pm 1,08$; $P = 0,0204$), que foi confirmado pelo teste de desvio de aditividade ($2,12 \pm 1,61$; $P = 1,0000$) e a estimativa de efeito médio de substituição alélica ($1,13 \pm 0,01$; $P = 0,0012$) em que o alelo G seria favorável à característica. Por ser um polimorfismo que se encontra em equilíbrio de Hardy-Weinberg e com distribuição de alelos quase equivalentes dentro da amostra estudada ($\hat{p}_C = 0,46 \pm 0,02$; $\hat{p}_G = 0,54 \pm 0,02$), é possível que as estimativas de quadrados médios dos três genótipos sejam uma boa aproximação para inferências sobre as médias da população.

A variação de nucleotídeos na posição 1027 (G/C) resulta em troca de aminoácidos em um ponto não conservado da proteína e fora do sítio ativo da FGF8 (Figura 13A). Nesse caso a troca de aminoácidos com características diferentes (Figura 13B) conferiria maior atividade ao FGF8 e em consequência maior número de folículos recrutados por onda de foliculogênese.

Figura 13. Representação esquemática da proteína FGF8. (A) Esquema da localização dos aminoácidos alterados (aa 30,39) em relação ao sítio ativo (vermelho). Logo abaixo, segue a visão gráfica da conservação da proteína entre mamíferos (sequências assinaladas em preto são *B. taurus taurus* e *B. taurus indicus*) em que branco representa a não conservação do aa e preto a total conservação do aa. (B) Visualização gráfica das características dos aa em parte da proteína FGF8, em que se vê a diferença química dos aa na proteína na posição 30 (R/P) e 39 (S/P).

A análise da interação entre os marcadores avaliados nesse trabalho resultou em efeitos significativos entre as combinações de marcadores sobre o fenótipo avaliado, exceto a combinação mtDNA e Fgf8. Entretanto, o número desbalanceado de indivíduos e de dados entre as combinações genóticas dentro de cada par de marcadores torna difícil a comparação entre as médias para fins de identificação de melhores pares genóticos. Por outro lado, foi possível identificar um efeito médio de substituição alélica de $1,84 \pm 1,12$ em que os alelos Gdf9-C e Fgf8-G seriam os mais favoráveis. Esse resultado sugere uma tendência que deve ser considerada com cautela por causa das médias de oócitos apresentadas, bem como pelo número de indivíduos em cada classe genotípica.

8. CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

Variações genéticas do tipo SNPs foram identificadas em bovinos da raça Nelore, bem como quando comparados com a sequência de DNA de indivíduos *Bos taurus taurus*, o que confirma que a raça Nelore tem alelos diferentes das raças taurinas. As análises de associação entre os marcadores genéticos no Gdf9, Fgf8, BmprII e Lhr, evidenciam a existência de fatores genéticos que controlam o número de folículos antrais disponíveis no ovário no momento da aspiração folicular guiada por ultra-sonografia. Apesar do fenótipo avaliado nesse trabalho não conferir vantagem adaptativa natural diretamente às fêmeas, há que se considerar que existe vantagem comercial sobre o número de oócitos colhidos por sessão de aspiração folicular. Assim sendo alguns dos polimorfismos estudados nesse trabalho poderiam ser utilizados como ferramentas de seleção de fêmeas para a multiplicação do rebanho por meio de OPU e produção *in vitro* de embriões.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABATEPAULO, A.R.R. et al. Detection of SNPs in bovine immune-response genes that may mediate resistance to the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Animal Genetics**, v.39, n.3, p.328-329, 2008.
- ADAMOWICZ, T.; PERS, E.; LECHNIAK, D. A new SNP in the 3'-UTR of the hsp 70-1 gene in *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Biochemical Genetics**, v.43, n. 11-12, p.623-627, 2005.
- AITTOMAKI, K. et al. Mutation in the follicle stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, v.82, p.959-968, 1995.
- ALBERTINI, D.F. et al. Cellular basis for paracrine regulation of ovarian follicle development. **Reproduction**, v.121, p.647-653, 2001.
- ALTSCHUL, S.F. et al. Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403-410, 1990.
- ANUALPEC. **Anuário da Pecuária Brasileira**. FNP Consultoria e Comércio. São Paulo, SP. Editora Argos. 2004. 376p.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE CRIADORES DE ZEBUÍÑOS (ABCZ). ABCZnet. Disponível em < <http://www.abcz.org.br/>>. Acesso em 10 março 2008.
- BASSO, A.C.; ESPER, C.R. Isolation and ultrastructural characterization of preantral follicles in the Nelore breed cows (*Bos taurus indicus*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, n.6, p.311-319, 2002.
- BEPPU, H. et al. BMP type II receptor is required for gastrulation and early development of mouse embryos. **Developmental Biology**, v.221, p.249-258, 2000.
- BHANGALE, T.R.; STEPHENS, M.; NICKERSON, D.A. Automating resequencing-based detection of insertion-deletion polymorphisms. **Nature Genetics**, v.38, n.12, p.1457-1462, 2006.
- BLAND, J.M.; ALTMAN, D.G. Multiple significance tests: the Bonferroni method. **BMJ**, v.310, p.170, 1995. BONI, R. et al. Follicular dynamics, repeatability and predictability of follicular recruitment in cows undergoing repeated follicular puncture. **Theriogenology**, v.48, p.277-289, 1997.
- BORGES, A.M. et al. Follicular dynamic and ovulation time of non-lactating Gir and Nelore cows during two seasons of the year. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.56, n.3, p.346-354, 2004.

- BUKOVSKY, A. et al. Quantitative evaluation of the cell-cycle-related retinoblastoma protein and localization of Thy-1 differentiation protein macrophages during follicular development and atresia, and in human corpora lutea. **Biology of Reproduction**, v.52, p.776-792, 1995.
- BURATINI JR, J. et al. Expression of fibroblast growth factor-8 and its cognate receptors, fibroblast growth factor receptor (FGFR)-3c and -4, in fetal bovine preantral follicles. **Molecular Reproduction and Development**, v.70, p.255-261, 2005.
- CARVALHO, J.B.P. et al. Effect of early luteolysis in progesterone-based timed AI protocols in *Bos indicus*, *Bos indicus* X *Bos taurus*, and *Bos taurus* heifers. **Theriogenology**, v.69, p.167-175, 2008.
- CORTVRINDT, R.; HU, Y.; SMITZ, J. Recombinant luteinizing hormone as a survival and differentiating factor increases oocyte maturation in recombinant follicle stimulated hormone-supplemented mouse preantral follicle culture. **Human Reproduction**, v.13, p.1292-1303, 1998.
- CRISPONI, L. et al. The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus/inversus syndrome. **Nature Genetics**, v.27, p.159-166, 2001.
- CUSHMAN, R.A. et al. Evaluation of ovulation rate and ovarian phenotype in puberal heifers from a cattle population selected for increased ovulation rate. **Journal of Animal Science**, v.83, p.1839-1844, 2005.
- DAVIS, G.H. Major genes affecting ovulation rate in sheep. **Genetics Selection Evolution**, v.37, p.S11-S23, 2005.
- DAVIS, G.H.; BRUCE, G.D.; DODDS, K.G. Ovulation rate and litter size of prolific Inverdale (FecX^l) sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.14, p.175-178, 2001.
- DAVIS, G.H.; DODDS, K.G.; BRUCE, G.D. Combined effect of the Inverdale and Booroola prolificacy genes on ovulation rate in sheep. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.13, p.74-77, 1999.
- DISSEN, G.A. et al. Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. **Endocrinology**, v.142, p.2078-2086, 2001.
- DIXIT, H. et al. Missense mutations in the BMP15 gene are associated with ovarian failure. **Human Genetics**, v.119, p.408-415, 2006.
- DIXIT, H. et al. Mutational screening of coding region of growth differentiation factor 9 gene in Indian women with ovarian failure. **Menopause**, v.12, p.749-754, 2005.
- DIXIT, H.; DEENADAYAL, M.; SINGH, L. Mutational analysis of the mature peptide region of inhibin genes in Indian Women with ovarian failure. **Human Reproduction**, v.19, p.1760-1764, 2004.

DRIANCOURT, M.A. et al. Roles of kit and kit ligand in ovarian function. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.143-152, 2000.

DURLINGER, A.L.L.; VISSER, J.A.; THEMMEN, A.P.N. Regulation of ovarian function: the role of anti-Müllerian hormone. **Reproduction**, v.124, p.601-609, 2002.

ELVIN, J.A. Molecular characterization of the follicle defects in the growth differentiation factor 9-deficient ovary. **Molecular Endocrinology**, v.13, p.1018-1034, 1999.

EPIFANO, O.; DEAN, J. Genetic control of early folliculogenesis in mice. **Endocrinology and Metabolism**, v.13, n.4, p.169-173, 2002.

EVETT, I.W.; WEIR, B.S. **Interpreting DNA evidence**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1995.

EWING, B. et al. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p.175-185, 1998.

EWING, B.; GREEN, P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p.186-194, 1998.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to quantitative genetics**. 4ed. New York: Longman, 1996.

FIGUEIREDO, R.A. et al. Ovarian follicular dynamics in nelore breed (*Bos indicus*) cattle. **Theriogenology**, v.47, p.1489-1505, 1997.

FLISIKOWSKI, K. et al. Nucleotide sequence and variation of IGF2 gene exon 6 in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **Animal Biotechnology**, n.16, p.203-208, 2005.

GILCHRIST, R.B.; RITTER, L.J.; ARMSTRONG, D.T. Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.431-446, 2004.

GORDON, D.; ABAJIAN, C.; GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Research**, v.8, p.195-202, 1998.

GREGORY, K.E.; ECHTEMKAMP, S.E.; CUNDIFF, L.V. Effects of twinning on dystocia, calf survival, calf growth, carcass traits and cow productivity. **Journal of Animal Science**, v.74, p.1223-1233, 1996.

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

HANRAHAN, J.P. et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v.70, p.900-909, 2004.

HANRAHAN, J.P. et al. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction**, v.70, p.900-909, 2004.

HARDY, G. H. Mendelian proportions in a mixed population. **Science**, v.25, p.49-50, 1908.

HARTSHORNE, G.M. In vitro culture of ovarian follicles. **Reviews of Reproduction**, v.2, p.94-104, 1997.

HASTINGS, N. et al. Polymorphisms within the coding region of the bovine luteinizing hormone receptor gene and their association with fertility traits. **Animal Genetics**, v.37, p.583-585, 2006.

INTERNATIONAL EMBRYO TRANSFER SOCIETY (IETS). Disponível em <<http://www.iets.gov/>>. Acesso em 10 março 2008.

JUENGEL, J.L. et al. Physiology of GDF9 and BMP15 signalling molecules. **Animal Reproduction Science**, v.82-83, p.447-460, 2004.

KAUPE, B. et al. DGAT1 polymorphism in Bos indicus and Bos taurus cattle breeds. **Journal of Dairy Research**, v.71, p.182-187, 2004.

LABARGA, A. et al. Web services at the European Bioinformatics Institute. **Nucleic Acids Research**, v.35, p.W6-W11, 2007.

LACORTE, G.A. et al. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genetics and Molecular Research**, v.5, n.3, p.475-482, 2006.

LAISSUE, P. et al. Mutations and sequence variants in GDF9 and BMP15 in patients with premature ovarian failure. **Journal of Endocrinology**, v.154, p.739-744, 2006.

LARKIN, M.A. et al. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v.23, n.21, p.2947-2948, 2007.

LI, S. et al. Stage-limited expression of myc oncoprotein in the human ovary during follicular growth, regression and atresia. **Endocrine Journal**, v.41, p.83-92, 1994.

LIAO, W.X. et al. Effect of intracellular interactions on the processing and secretion of bone morphogenetic protein-15 (BMP-15) and growth and differentiation factor-9. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.6, p.3713-3719, 2003.

LOFTUS, R.T. et al. Evidence for two independent domestications of cattle. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, p.2757-2761, 1994.

LYKKE-ANDERSEN, J. mRNA quality control: Marking the message for life or death. **Current Biology**, v.11, p.R88-R91, 2001.

MACHADO, M.A. et al. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, n.1, p.1-6, 2003.

MACHUGH, D.E. et al. 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.

- MALARD, P.F. et al. Índice de recuperação e qualidade de ovócitos de bezerras Nelore, superovuladas e não superovuladas, de dois a três meses de idade. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, n.6, p.677-682, 2001.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. **Nucleic Acids Research**, v.33, p.D192-D196, 2005.
- MARSON, E.P. et al. Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research**, v.7, n.1, p.243-251, 2008.
- MARSON, E.P. et al. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. **Genetics and Molecular Research**, v.4, n.3, p.496-505, 2005.
- MARTINEZ, R. et al. Novel variants within the coding regions of the *Sic11A1* gene identified in *Bos taurus* and *Bos indicus* breeds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.125, p.57-62, 2008.
- MARTINEZ-ROYO, A. et al. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. **Animal Genetics**, v.39, p.294-297, 2008.
- MASSEY JR, F.J. The kolmogorov-smirnov test for goodness of fit. **Journal of the American Statistical Association**, v.46, n.253, p.68-78, 1951.
- MATZUK, M.M. et al. Intercellular communication in the mammalian ovary: oocytes carry the conversation. **Science**, v.296, p.2178-2190, 2002.
- MCGINNIS, S.; MADDEN, T.L. BLAST: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tools. **Nucleic Acids Research**, v.32, p.W20-W25, 2004.
- MCNATTY, K.P. et al. Control of early ovarian follicular development. **Journal of Reproduction and Fertility**, v.54, p.3-16, 1999.
- MCNATTY, K.P. et al. Genetic mutations influencing ovulation rate in sheep. **Reproduction, Fertility and Development**, v.13, p.549-555, 2001.
- MCNATTY, K.P. et al. Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.234, p.57-66, 2005.
- MEDURI, G. et al. Follicle-stimulating hormone receptors in oocytes? **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v.97, p.2266-2276, 2002.
- MEIRELLES, F.V. et al. Is the american zebu really *Bos indicus*? **Genetics and Molecular Biology**, v.22, p.543-546, 1999.
- MILAZZOTTO, M.P. et al. New molecular variants of hypothalamus-pituitary-gonad axis genes and their association with early puberty phenotype in *Bos Taurus indicus* (Nellore). **Livestock Science**, v.114, p.274-279, 2008.
- MONTRO, B.; BERNSTEIN, A. Dynamic changes in ovarian c-kit and Steel expression during the estrous reproductive cycle. **Development Dynamics**, v.197, p.69-79, 1993.

MULSANT, P. et al. Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Mérino ewes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.98, n.9, p.5104-5109, 2001.

NILSSON, E.; PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Basic fibroblast growth factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.175, p.123-130, 2001.

OTSUKA, F.; SHIMASAKI, S. A negative feedback system between oocyte bone morphogenetic protein 15 and granulosa cell kit ligand: its role in regulating granulosa cell mitosis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.99, p.8060-8065, 2002.

PAKARAINEN, T. et al. Knockout of luteinizing hormone receptor abolishes the effects of follicle-stimulating hormone on preovulatory maturation and ovulation of mouse graafian follicles. **Molecular Endocrinology**, v.19, n.10, p.2591-2602, 2005.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Correlação genética entre perímetro escrotal e algumas características reprodutivas na raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.29, n.6, p.1676-1683, 2000.

RAMOS, A.A. et al. Efeito da somatotropina na população folicular, recuperação de oócitos e produção in vitro de embriões em vacas Gir. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.36, n.2, p.380-386, 2007.

RAVI KUMAR, G.V.P.P.S. et al. Sequencing, characterization and genetic variation of the *Bos indicus* Glucose-6-phosphate-dehydrogenase gene. **DNA Sequence**, v.19, n.1, p.37-43, 2008.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOO Version 1.2: population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity**, v.86, p.248-249, 1995.

ROCHE, P.C.; RYAN, R.J. Purification, characterization and amino-terminal sequence of rat ovarian receptor for luteinizing hormone/human choriogonadotropin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.264, n.8, p.4636-4641, 1989.

RODGERS, R.J. et al. Action of extracellular matrix, fibronectin and steroidogenic enzymes, and growth of bovine granulosa cells in anchorage-independent culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v.8, p.249-257, 1996.

SADOVSKI, Y.; DORN, C. Function of steroidogenic factor I during development and differentiation of the reproductive system. **Reviews of Reproduction**, v.5, p.136-142, 2000.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 18.88p.

SANTIAGO, A.A. **O Nelore**. São Paulo: Instituto de Zootecnia, 1960. 451p.

SCHLESSINGER, D. et al. Genes and translocations involved in POF. **American Journal of Medical Genetics**, v.111, n.3, p.328-333, 2003.

SILVA-JUNIOR, W.A. et al. PCR template preparation for capillary DNA sequencing. **BioTechniques**, v.30, p.537-542, 2001.

SOUZA, C.J.H. et al. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. **Journal of Endocrinology**, v.169, p.R1-R6, 2001.

SOYAL, S.M.; AMLEH, A.; DEAN, J. Fig α , a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle development. **Development**, v.127, p.4645-4655, 2000.

TANTIA, M.S. et al. Comparative analysis of GDF8 (myostatin) in *Bos indicus* and *Bos taurus*. **DNA sequence**, v.17, n.4, p.311-313, 2006.

TANTIA, M.S. et al. DGATI and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. **BMC Veterinary Research**, v.2, n.32, p.1-5, 2006.

THIBIER, M. **Stabilization of numbers of in vivo collected embryos in cattle but significant increases of in vitro bovine produced embryos in some parts of the world.** Data Retrieval Committee Annual Report. International Embryo Transfer Society. http://www.iets.org/pdf/data_retrieval/december2004.pdf

THOMAS, D.M.; SEGALOFF, D.L. Hormone-binding properties and glycosylation pattern of a recombinant form of the extracellular domain of the luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor expressed in Mammalian cells. **Endocrinology**, v.135, n.5, p.1902-1912, 1994.

VAN DEN HURK, R. et al. Primate and bovine immature oocytes and follicles as sources of fertilizable oocytes. **Human Reproduction**, v.6, p.457-474, 2000.

VAN DEN HURK, R.; BEVERS, M.M.; BECKERS, J.F. In vivo and in vitro development of preantral follicles. **Theriogenology**, v.47, p.73-82, 1997.

VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**, v.63, p.1717-1751, 2005.

VIANA, J.H.M. et al. Follicular dynamics in Zebu cattle. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.12, p.2501-2509, 2000.

VILODRE, L.C. et al. Premature ovarian failure: present aspects. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v.51, n.6, p.920-929, 2007.

WEBB, R. et al. Control of follicular growth: local interactions and nutritional influences. **Journal Animal Science**, v.82, p. E63-E74, 2004.

WICKENS, M.; ANDERSON, P.; JACKSON, R.J. Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. **Genetics and Development**, v.7, p.220-232, 1997.

WICKENS, M.; ANDERSON, P.; JACKSON, R.J.; Life and death in the cytoplasm: messages from the 3' end. **Current Opinion in Genetics e Development**, v.7, p.220-232, 1997.

WILSON, T. et al. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein 1B receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction**, v.64, p.1225-1235, 2001.

XU, Z.Z. et al. Expression of FSH and LH receptor messenger ribonucleic-acids in bovine follicles during the first follicular wave. **Biology of Reproduction**, v.53, p.951-957, 1995.

YAN, C. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. **Molecular Endocrinology**, v.15, p.854-866, 2001.

YOSHIDA, H. et al. Stepwise requirement of c-kit tyrosine kinase in mouse ovarian follicle development. **Developmental Biology**, v.184, p.122-137, 1997.

ZHANG, Y. et al. Porcine growth differentiation factor 9 gene polymorphisms and their associations with litter size. **Journal of Genetics and Genomics**, v.35, p.163-169, 2008.

ZHAO, J. et al. Effect of activin A on in vitro development of rat preantral follicles and localization of activin A and activin receptor II. **Biology of Reproduction**, v.65, p.967-977, 2001.

ZHOU, J. et al. Insulin-like growth factor I regulates gonadotropin responsiveness in the murine ovary. **Molecular Endocrinology**, v.11, p.1924-1933, 1997.