



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO
E FSHR E ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS**

ANA CLÁUDIA DE MELO VALERIANO

DISERTAÇÃO DE MESTRADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2009



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA

**POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E
FSHR E ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS**

Ana Cláudia de Melo Valeriano

Orientador: Maurício Machaim Franco

Dissertação de Mestrado em Ciências Animais

013/2009

BRASÍLIA/DF
MAIO DE 2009

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

VALERIANO, A.C.M. **Polimorfismos de DNA nos genes dos receptores de estrogênio e FSHR e associação com resposta superovulatória em bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 43p. Dissertação de Mestrado.

Documento formal, autorizando reprodução desta dissertação de mestrado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente pra fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. O autor e o seu orientador reservam para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

VALERIANO, Ana Cláudia de Melo. **Polimorfismos de DNA nos genes dos receptores de estrogênio e FSHR e associação com resposta superovulatória em bovinos.** Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2009, 43p. Dissertação de Mestrado. (Mestrado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2009.

1. Receptor do FSH. 2. Receptor de estrógeno. 3. Polimorfismo SNPs. 4. Produção de embriões.

CDD ou CDU
Agris/FAO

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA**

**POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E FSHR E
ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS**

ANA CLÁUDIA DE MELO VALERIANO

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA
AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS, COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO
DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
ANIMAIS.**

APROVADA POR:

**MAURÍCIO MACHAIM FRANCO (EMBRAPA RECURSOS GENÉTICOS E
BIOTECNOLOGIA.
(ORIENTADOR)**

**CAROLINA MADEIRA LUCCI, Dr.(a) (UnB)
(EXAMINADOR INTERNO)**

**TATIANA AMABILE, Dr.(a) (EMBRAPA - CENARGEN).
(EXAMINADOR EXTERNO)**

BRASÍLIA/DF, 27 de MAIO de 2009

“O sofrimento é passageiro, desistir é para sempre.”
Lance Armstrong

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus.

Ao meu marido Leonardo, por estar comigo sempre que preciso e por tanta dedicação e esforço para que eu pudesse ser hoje o que sou.

Ao meu orientador Dr. Maurício Machaim Franco por ter me concedido a oportunidade de realizar esse trabalho, por sua confiança, dedicação e paciência.

À EMBRAPA recursos genéticos e biotecnologia, pelo suporte para que este experimento pudesse ser realizado.

Aos funcionários da EMBRAPA pelo apoio durante o projeto.

À Universidade de Brasília pelo curso oferecido.

Às minhas grandes amigas de laboratório Tatiane, Edylaine, Clarice e Valquíria pela ajuda nos momentos de dificuldade e por estarem sempre contribuindo para realização deste trabalho. Afinal somos todas “brometes”.

Aos amigos Marcela, Bárbara, Augusto, Renata, Allice, Fernanda, Antônio e demais colegas que contribuíram direta ou indiretamente para realização deste trabalho.

À “galera da sala 10” por estarem sempre presentes e nos momentos em que precisei.

À querida equipe da plataforma Luciana e Mário (conte comigo), por estarem sempre prontos a ajudar.

Aos grandes e queridos amigos da fazenda, Michele, Chivas, José, Bio, Troxa, Betina, e tantos outros que passaram e deixaram saudades, mas que estiveram comigo nos momentos de dificuldade.

Aos meus pais, Geraldo e Elza, pelo amor, dedicação, esforço e exemplo de vida.

Aos meus irmãos, Alessandra e Marcelo, minha cunhada Adriana, meus sobrinhos, Victoria, Bárbara e Gabriel pelo amor dedicado a mim.

Ao meu sogro e minha sogra, Francisco e Julieta, pela confiança, apoio e esforço para que eu pudesse alcançar mais essa vitória.

Obrigada a todos que estiveram comigo nos bons e difíceis momentos.

ÍNDICE

Capítulo	Página
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
ABREVIACÕES	xv
CAPÍTULO 1	01
1 INTRODUÇÃO	01
2 OBJETIVO	02
2.1 Objetivo Geral	02
2.2 Objetivo Específico	02
3 REVISÃO DE LITERATURA	02
3.1 Considerações do ciclo estral da fêmea bovina	02
3.2 Transferência de Embriões	04
3.3 O gene FSHR (receptor do hormônio folículo estimulante)	06
3.4 O gene ER1 (receptor de estrógeno 1)	08
3.5 Marcadores Moleculares	09
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	11
CAPÍTULO 2	18
1 RESUMO	18
2 ABSTRACT	19
3 INTRODUÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Material biológico	21
4.2 Extração do DNA	21
4.2.1 Lise celular	21
4.2.2 Lise nuclear e precipitação das proteínas	22
4.2.3 Precipitação do DNA	22

4.2.4	Rehidratação do DNA	22
4.2.5	Avaliação da qualidade do DNA	23
4.2.6	Quantificação do DNA	23
4.3	PCR para o gene FSHR e prospecção de SNPs	23
4.4	Genotipagem para o FSHR (PCR-RFLP)	25
4.5	PCR para o gene do receptor de estrógeno 1 (ER1)	26
4.6	Genotipagem para o ER1 (PCR-RFLP)	28
4.7	Equilíbrio de Hardy-Weinberg	28
4.8	Análises estatísticas	29
5	RESULTADO E DISCUSSÃO	29
6	CONCLUSÃO	42
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Gel de agarose 0,8% com amostras de DNA genômico de 7 colunas com animais da raça nelore, mostrando a boa qualidade do material extraído.	23
Figura 2.	Alinhamento das seqüências usando o programa DNAMAN. A primeira representa uma seqüência depositada no GenBank e as outras dos animais que foram seqüenciados e seus respectivos genótipos (Simental – 1; Jersey – 2; Nelore – 3)	25
Figura 3.	Sítio de restrição da enzima Alu I.	26
Figura 4.	Sítio de restrição da enzima Bgl I.	28
Figura 5.	Gel de agarose 2% com o produto de PCR resultante da otimização da amplificação do gene ER1. Onde PM indica o marcador de peso molecular 1 kb PLUS DNA LADDER (Invitrogen).	30
Figura 6.	Gel de agarose 2,0% mostrando o padrão dos três genótipos FSHR. As bandas no gel indicam que os animais 1 ao 4 são GG o animal 5 é CC e o animal 6 é CG.	30
Figura 7.	Gel de agarose 2,0% mostrando o padrão dos três genótipos ER1. As bandas no gel indicam que os animais 1 ao 4 são GG, os animais 5 e 6 AG e os animais 7 e 8 são AA.	31
Figura 8	Parte da seqüência da proteína do FSHR	33
Figura 9	Seqüência de DNA e cromatograma mostrando os três genótipos para a mutação no gene FSHR.	33
Figura 10	Seqüência de aminoácidos para diferentes espécies. A primeira seqüência representa um animal mutante encontrado neste trabalho, mostrando uma serina substituindo uma treonina, que aparece conservada nas seqüências de outras espécies.	34
Figura 11	Gráfico com número de estruturas coletadas de cinco raças (GIR, HOL, SRD, JER, NEL).	41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Marcadores moleculares em bovinos, ovinos e suínos	11
Tabela 2.	Origem dos animais por raça..	21
Tabela 3.	Condições para a otimização da amplificação do gene FSHR	24
Tabela 4.	Tamanho dos fragmentos esperados após digestão com a enzima de restrição Alu I.	26
Tabela 5.	Condições para a otimização da amplificação do gene ER1	27
Tabela 6.	Tamanho dos fragmentos esperados após digestão com a enzima de restrição Bgl I.	28
Tabela 7.	Cálculo da frequência de Hardy-Weinberg.	29
Tabela 8.	Frequência alélica dos genes FSHR e ER1 da população pesquisada	31
Tabela 9.	Frequência alélica para os genes FSHR e ER1 em diferentes raças	32
Tabela 10.	Frequência alélica do gene FSHR e ER1 de Bos taurus X Bos indicus	32
Tabela 11.	Frequência genotípica para os genes FSHR e ER1 na população estudada	34
Tabela 12.	Frequências genotípicas para o gene FSHR por raça estudada	35
Tabela 13.	Frequências genotípicas para o gene ER1 por raça estudada	36

Tabela 14.	Frequências genotípicas para os genes FSHR e ER1 em <i>Bos indicus</i> e <i>Bos taurus</i>	37
Tabela 15.	Média de produção de estruturas para o gene FSHR por genótipo	37
Tabela 16.	Média de produção de estruturas para o gene ER1 por genótipo	38
Tabela 17.	Produção de estruturas por raça com associação dos genótipos FSHR/ER	39
Tabela 18.	Comparação entre raças para resposta à SOV	40
Tabela 19.	Número de estruturas coletadas por raça.	40

RESUMO

POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E FSHR E ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS

Ana Cláudia de Melo Valeriano¹, Maurício Machaim Franco²

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²EMBRAPA Recursos Genético e Biotecnologia.

Estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos e a prospecção de genes candidatos que estão envolvidos no processo de ovulação são ferramentas de importantes quando se pretende incrementar a eficiência reprodutiva de rebanhos e melhorar as respostas das biotécnicas de multiplicação animal. Sendo assim, o objetivo deste estudo foi sequenciar e detectar polimorfismos em parte do “exon” 10 do gene do receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR); genotipar doadoras de embriões para um SNP nos genes receptor de estrógeno (ER) e FSHR; analisar se esses genes podem ser usados como marcadores moleculares para a resposta superovulatória em bovinos.

Palavras-chave: Receptor de FSH, receptor de estrogênio, polimorfismo, gene, bovinos.

ABSTRACT**DNA POLYMORPHISMS IN RECEPTORS ESTROGEN AND FSHR GENE AND ASSOCIATION TO SUPEROVULATORY RESPONSE IN BOVINE.**

Ana Cláudia de Melo Valeriano¹, Maurício Machaim Franco²

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²EMBRAPA Recursos Genético e Biotecnologia

Candidate gene based studies intend to identify polymorphisms and to prospect candidate genes evolved in ovulation process are important tools to increase the cattle reproduction efficiency and to improve animal biotechnology response. Thus, the aim of this study was to sequence and to detect polymorphisms present in exon 10 from follicle stimulation hormone receptor (FSHR) gene; to genotype estrogen receptor gene (ER1) and FSHR SNPs in embryo donors; and to verify the possibility to use these genes as molecular markers to assess the bovine ovulatory response.

Key-words: FSH receptor, estrogen receptor, polymorphisms, gene, bovine.

ABREVIACÕES

Arg.....	arginina
ATP.....	adenosina tri-fosfato
DNA.....	ácido desoxirribonucleico
dNTP.....	desoxirribonucleotídeo trifostato
ECP.....	cipionato de estradiol
EDTA.....	ácido etilenodiamino tetra-acético
ER1.....	receptor de estrógeno 1
FSH	hormônio folículo estimulante
FSHR.....	receptor do hormônio folículo estimulante
HOL.....	holandês
IATF.....	inseminação artificial em tempo fixo
JER.....	jersey
LH.....	hormônio luteinizante
MAS.....	seleção assistida por marcadores
MgCl ₂	cloreto de magnésio
NaCl.....	cloreto de sódio
NER.....	nelore
PCR.....	<i>polymerase chain reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
QTL.....	<i>quantitative trait loci</i> (locus de característica quantitativa)
RFLP.....	<i>restriction fragment length polymorphism</i> (polimorfismo de comprimentos de fragmentos de restrição)
SEN	senepol
Ser	serina

SNP.....	<i>single-nucleotide polymorphism</i> (polimorfismo de base única)
SOV.....	superovulação
SRD.....	sem raça definida
TAB.....	tabapuã
Taq.....	<i>thermus aquaticus</i>
TDE.....	detecção de estro
TE.....	transferência de embrião
Ter.....	treonina
TP.....	taxa de prenhez
U.....	unidade
UI.....	unidade internacional
UTR.....	<i>untranslated region</i>

CAPITULO 1

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento populacional humano nos obriga a aumentar a produção de alimentos preservando o meio ambiente (Franco & Melo, 2006). Com a necessidade de preservação ambiental, é preciso explorar a produção de alimentos de uma forma que se aumente a produtividade em por área utilizada. A caracterização fenotípica dos animais, de forma simplificada, é determinada pela interação entre genótipo e o meio ambiente. Desde a domesticação dos bovinos e exploração destes animais como fonte de alimento e matéria prima, o ser humano vem selecionando os melhores indivíduos para características de seu interesse, concomitantemente à seleção natural (Avelar, 2006).

O objetivo do melhoramento genético animal é alterar geneticamente populações de animais, com intuito de aumentar a frequência de genes (ou alelos) e de genótipos desejáveis, com o conseqüente reflexo favorável no mérito fenotípico médio de características destas populações que sejam importantes economicamente. A mais importante estratégia que o melhorista possui para alterar populações geneticamente é a seleção, que significa decidir quais indivíduos serão mantidos para pais e, desta forma, contribuirão com genes para a próxima geração. O objetivo genético da seleção é aumentar a frequência de alelos com efeitos desejáveis sobre características que estejam sendo objeto de um programa de melhoramento e a conseqüente diminuição da frequência dos outros alelos menos desejáveis (Pereira, J.C.C., 2004).

Trabalhos de seleção por melhoramento clássico e hoje, associado às técnicas de genética molecular, resultaram em animais muito produtivo e lucrativo. As técnicas de reprodução animal como inseminação artificial, produção *in vitro* e transferência de embriões,

clonagem e transgenia são ferramentas indiscutivelmente úteis à pecuária moderna, pois auxiliam na identificação, seleção e multiplicação de animais geneticamente superiores (Franco & Melo, 2006).

2. OBJETIVOS

2.1 - Geral

Verificar se FSHR e ER1 podem ser usados como marcadores moleculares para a resposta superovulatória em bovinos.

2.2 - Específicos

- 1) Sequenciar parte do “exon” 10 do gene do receptor do Hormônio Folículo Estimulante (FSHR);
- 2) Desenvolver um PCR-RFLP para detecção de polimorfismos no gene FSHR;
- 3) Genotipar doadoras de embriões de sete raças de bovinos para um SNP no gene ER1 e um no gene FSHR;
- 4) Associar estes SNPs à resposta superovulatória.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 – Considerações do ciclo estral da fêmea bovina

Em espécies monovulatórias, apenas um folículo é selecionado dentre os recrutados para continuar a crescer e diferenciar-se em folículo ovulatório (Ginther et al., 1996). O entendimento da fisiologia do ciclo estral bovino possibilitou que o mesmo fosse manipulado de forma a aumentar a eficiência reprodutiva em operações pecuárias (Binelli et al., 2006).

O estrógeno e o FSH atuam em sinergismo no ovário aumentando o número de receptores de FSH nas células da granulosa, resultando em crescimento e maturação folicular (Ireland and Richards, 1978 apud C.Sundarrajan et al, 1999).

O principal estímulo da expressão gênica e da atividade enzimática da P450arom é o FSH como já demonstrado em ruminantes (Gutiérrez et al. 1997). O crescimento folicular ocorre em "ondas" em bovinos, com o progresso da onda, um folículo dominante surge e os folículos restantes regridem. A regressão destes folículos subordinados ocorre no final do FSH plasmático transitório, o que levaram Silva et al (2006) à hipótese de que a diminuição na concentração sérica FSH causa a atresia de folículos subordinados e que com o declínio da concentração de FSH, pequenos e médios folículos contêm menos estradiol após comparação com folículo dominante emergente.

Em bovinos, grupos de folículos iniciam o desenvolvimento sincronicamente e esse fenômeno é conhecido como ondas de crescimento folicular e os intervalos interovulatórios apresentam 2 ou 3 ondas foliculares (Figueiredo et al., 1997) e o aumento das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento e emergência da onda folicular (Adams et al., 1992). Receptores de FSH (FSHR) foram detectados em folículos primários bovinos e o aumento do crescimento folicular pré-antral foi observado após adição de FSH ao meio de cultura, sugerindo o papel de coadjuvante para o FSH no controle do estágio pré-antral (Gutierrez et al., 2000). A fase antral do desenvolvimento folicular é dependente das gonadotrofinas, que induzem o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares (Fortune et al., 2001). O folículo selecionado é conhecido como folículo dominante e suprime ativamente o crescimento dos subordinados pela secreção de estradiol e inibina (Ginther et al., 1996).

A dinâmica folicular pode ser dividida em três estágios, sendo eles, recrutamento, seleção e dominância folicular, predominando quatro estágios de acordo com a atividade hormonal predominante: gonadotrofina independente, FSH dependente, FSH-LH dependente e LH dependente (Ginther et al.; 1996). A supressão seletiva de gonadotrofinas endógenas com uso de agonista de GnRH constituiu modelo interessante para avaliação dos requerimentos de FSH e LH para o desenvolvimento folicular antral de bovino. Folículos antrais bovinos cresceram até o diâmetro de 4mm na ausência de FSH e LH, indicando que as fases pré-antral e antral inicial contam fundamentalmente com o aporte de estimuladores locais. Já o crescimento entre 4 e 8mm mostrou-se dependente do FSH e independente do LH, enquanto que folículos maiores que 9mm só foram observados na presença de LH endógeno ou FSH exógeno (Gong et al., 1996). Segundo Buratini Júnior (2007) os folículos são considerados dependentes de FSH até a ocorrência da dominância.

Protocolos hormonais que controlam o desenvolvimento folicular e a função lútea permitem inseminação artificial em momento pré-determinado, superestimulação ovariana e sincronização de receptoras para transferência de embrião, potencializando a eficiência reprodutiva (Buratini Júnior, J., 2007). O controle do crescimento folicular depende de uma série de fatores de crescimento folicular que atuam tanto em nível ovariano quanto em nível hipofisário (Hsu et al., 1987).

Para a manipulação do ciclo estral bovino são comumente utilizadas estratégias farmacológicas. Tais estratégias consistem em protocolos de tratamentos hormonais, aplicados em uma seqüência pré-definida, visando um ou mais efeitos específicos, como por exemplo, controlar o recrutamento, a seleção, a ovulação ou a atresia folicular (Binelli et al, 2006). Objetiva-se com o controle da seleção folicular aumentar o número de folículos a continuar o crescimento e, potencialmente, a ovular em uma mesma onda. Para tanto, é necessário que se supra o animal com algum composto com atividade folículo-estimulante, uma vez que as concentrações endógenas de FSH tornam-se limitantes entre o recrutamento e a seleção de folículos em uma determinada onda (Adams et al., 1993).

Para o uso de fármacos e controle do ciclo estral deve-se primeiro entender que as gonadotrofinas chegam aos ovários pela corrente sanguínea, especificamente aos folículos, onde principalmente o FSH estimula o desenvolvimento desses folículos. Com isto, os folículos iniciarão a produção de estrógeno, estimulando os centros controladores da onda pré-ovulatória, além de um efeito positivo na secreção de gonadotrofinas na hipófise. Com o desenvolvimento dos folículos ocorre o aumento nos níveis de estradiol na circulação, o que provoca a redução do FSH para níveis basais através de feedback negativo (Fortune et al., 2004).

3.2 - Transferência de embriões

As tecnologias de transferência de embriões em bovinos têm sido desenvolvidas como um meio de acelerar a seleção genética. A transferência de embriões pode ser usada para aumentar a intensidade e a precisão da seleção, e também permite que os embriões sejam analisados para a presença de alelos específicos desejáveis antes da transferência (Hansen & Block, 2004).

Um dos principais aspectos negativos dos programas comerciais de transferência de embriões continua sendo a grande variabilidade de resposta das doadoras ao tratamento superovulatório com gonadotrofinas (Marques et al., 2008).

Jardina et al. (2007) avaliaram os resultados de 195 coletas de embriões realizadas no ano de 2005, com o objetivo de avaliar a doadora e a estação do ano na produção de embriões em vacas holandesas. As estações do ano foram divididas em: 1 (janeiro, fevereiro e março, n=56); 2 (abril, maio e junho n=37); 3 (julho, agosto e setembro n=50) e 4 (outubro, novembro e dezembro n=52). Foi detectado efeito de doadora em todas as variáveis ($p < 0,01$), mostrando a importância da seleção das doadoras. O número de embriões viáveis coletados (1 : $3,7 \pm 0,5$; 2: $2,4 \pm 0,5$; 3: $5,9 \pm 0,9$; 4: $4,4 \pm 0,7$; $p=0,001$). Quanto ao número de estruturas coletadas por doadora (lactantes: $6,7 \pm 0,8$ e não-lactantes: $4,4 \pm 0,5$; $P < 0,01$). Estes dados mostram que o número de embriões viáveis teve influência da escolha da doadora e influência da estação do ano.

Alvarez et al. (2006) fizeram um trabalho com 72 vacas Caracu e estas foram divididas em dois grupos de 36 animais cada, sendo que o grupo I recebeu 400 UI de Pluset e o grupo II 300 mg de Foltropin. Foi observado pelos autores que 16 vacas (22%) não responderam a superovulação, sendo 7 (19,4%) do grupo I e 9 (25,0%) do grupo II. Para os demais animais não houve diferença significativa no número de ovulação entre os dois grupos.

Oliveira et al.(1994) utilizando FSH relataram a obtenção de 3,2 zigotos transferíveis por vaca, enquanto Roberts et al.(1994) obtiveram 5,2 e Agarwal et al.(1993) somente um embrião transferível por vaca.

Estudos mostram também diferença na resposta superovulatória entre *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*, sendo que, *Bos taurus indicus* pode requerer menos FSH que o *Bos taurus taurus* para a resposta à superovulação. Contudo, doses menores de FSH suíno purificado (pFSH, Foltropin, Vetrepharm) com aproximadamente 80% menos de LH não diminuiu a resposta superovulatória de 15 novilhas *Bos taurus*, que produziram 9,37 e 9,60 embriões transferíveis, depois do uso de 200 e 160 mg de pFSH, respectivamente. Experimentos usando concentrações decrescentes de FSH (300, 200 e 100 mg, Foltropin) e comparando simultaneamente a resposta de doadoras *Bos taurus* versus doadoras *Bos indicus*, são atualmente o melhor caminho para testar a hipótese de que o gado Zebu é mais responsivo ao tratamento com FSH do que gado Europeu. (Barros & Nogueira, 2001). Trabalho previamente realizados por Kulick et al (1999) em *Bos taurus taurus* concluíram que os

padrões de FSH apresentaram declínio após a divergência folicular ao contrário do relatado em *Bos taurus indicus* por Castilho et al. (2007) onde houve elevação, nos níveis do FSH.

Em experimento realizado por Santiago et al. (2002) para verificar a resposta superovulatória de novilhas nelores em confinamento, tratadas com doses diferentes de FSH, não conseguiram observar diferença significativa entre os tratamentos. Indicando que o tratamento com FSH (250 UI) que produziu em média 4,16 embriões viáveis por doadora foi tão eficaz quanto o tratamento com FSH (500 UI) que produziu 3,15 embriões viáveis por doadora na média.

Bó et al. (2003) disseram que o crescimento dos folículos ovarianos e a dominância foi similar nos bovinos *Bos indicus* versus *Bos taurus*, contudo, o diâmetro máximo do folículo dominante (10-12 mm) e do CL (17-21 mm) parece ser menor nos bovinos *Bos indicus* que nos bovinos *Bos taurus* (14–20 mm e 20–30 mm) respectivamente. O conteúdo de progesterona no CL foi inferior em *Bos indicus* versus *Bos taurus*, talvez devido à baixa resposta ao estrogênio, menor pico de LH pré-ovulatório e outras diferenças endócrinas (Randel, 1984). Estas diferenças podem contribuir para as diferenças no número de folículos e/ou maior sensibilidade dos bovinos *Bos indicus* ao tratamento de FSH usado nos tratamentos de superovulação (Barros e Nogueira, 2001).

3.3 – O gene *FSHR* (receptor do hormônio folículo estimulante)

O *FSHR* está localizado no cromossomo 11 e é constituído de 2.375pb (genbank NM_174061). O *FSHR* possui três regiões de domínio, sendo elas: o domínio extracelular, uma região transmembrana e o domínio intracelular. Este receptor consiste de 10 exons e nove introns. Os exons de 1 a 9 codificam o domínio extracelular, enquanto a parte C-terminal do domínio extracelular, o domínio da transmembrana e o domínio intracelular são codificadas pelo exon 10 (Simoni et al, 2002).

A ação FSH é dependente da ligação a receptores localizados na membrana citoplasmática que pertencem à família dos receptores acoplados à proteína de ligação ao nucleotídeo guanina (proteína G). Uma característica importante dos receptores das gonadotrofinas é a presença de uma extensa região extracelular. Após ligação com o agonista, os receptores das gonadotrofinas ativam a proteína G, a qual, por sua vez, estimula a adenilciclase, determinando um aumento do AMP cíclico (AMPC) intracitoplasmático (Segaloff, 1993).

O FSH que se liga à receptores específicos para o hormônio localizados na superfície da membrana plasmática das células alvo nas gônadas (Thibault et al., 1993). De acordo com Stabenfeldt & Edqvist (1996) a principal função do FSH na fêmea é promover o crescimento dos folículos, atuando nas células da granulosa.

O FSH desempenha um papel crucial no crescimento folicular (C.Sundarrajan et al, 1999). O desenvolvimento folicular é dependente das gonadotrofinas, que induzem o recrutamento e o crescimento sincronizado de folículos antrais em ondas foliculares. O aumento das concentrações plasmáticas de FSH constitui o estímulo necessário para o recrutamento e emergência da onda folicular (Fortune et al., 2001; Buratini Jr, 2007).

Há evidências em ovelhas, vacas e porcas que o gene que codifica o receptor para FSH (FSH-R) não é expresso antes que o folículo atinja os graus 2 e 3 de desenvolvimento folicular (Tisdall et al., 1995). Em ruminantes domésticos há evidências que folículos dos graus 4 e 5 têm receptores funcionais para FSH e LH nas células da granulosa e células da teca, respectivamente, e que em ovelhas esses folículos são capazes de sintetizar progestágenos, andrógenos e estrógenos in vitro (Yuan et al., 1996).

Alguns trabalhos, em humanos, já mostraram que há polimorfismos na seqüência do DNA do gene que codifica para o receptor do hormônio folículo estimulante (FSHR) e que estes podem estar relacionados a algum fenótipo importante (Simoni et al., 1997). A interação entre o FSH e seu receptor já foi estabelecida por cristalografia (Fan et al., 2005), o que permitiu uma resolução das interações ligante-receptor ao nível molecular. Também foi demonstrado a importância de certas regiões do domínio extracelular da proteína FSHR para ligação ao hormônio e geração de cAMP (Kene et al., 2004). de Castro e colaboradores (2004) estudando a eficácia do tratamento com FSH e polimorfismos em alguns genes importantes envolvidos no mecanismo de ação do hormônio, concluíram que um pequeno conjunto de genes controla a resposta ao FSH em humanos; e que um modelo com poucos genes incluindo um padrão de genótipos específicos dos genes FSHR, ESR1 e ESR2 pode parcialmente explicar uma pobre resposta ao tratamento com FSH.

Segundo C.Sundarrajan (1999), mulheres que são submetidas à algum protocolo de estimulação folicular apresentam diferença significativa entre elas. Em mulheres, marcadores moleculares têm sido estudados e propostos para prognosticar o resultado de controle de estimulação ovariana (de Castro et al, 2003). Apesar de vários trabalhos mostrando as implicações de variantes alélicas no gene do FSHR e em outros genes, para a

resposta a tratamentos com FSH em humanos, pouco se conhece sobre esses mecanismos em bovinos.

3.4 – O gene *ER1* (Receptor do Estrógeno 1)

O gene ER1 bovino possui uma seqüência de 2852pb (GenBank AY340597). Este gene é composto dos exons A, B, C (5' – UTRs). O exon C do gene ER1 no bovino é constituído por uma seqüência de 321bp (GenBank AY641986). A transcrição A/G está na posição 151 na região promotora do exon C (Szreder e Zwierzchowski, 2004). A região C foi conservada entre as espécies e é responsável pela ligação específica junto ao estrógeno e contribui ainda para a dimerização e transativação (Green & Chambon, 1987).

Duas isoformas da proteína receptora para o estrógeno foram encontradas e caracterizadas em várias espécies, (White et al., 1987) o ER1 e o ER2, sendo que ambos os genes são expressos no ovário. Estudos estruturais do ER demonstraram que o domínio específico do DNA do ER2 e do ER1 são extremamente homólogos em aproximadamente 96% e o domínio específico ligante demonstrou apenas 59% de homologia. O ER1 pode formar heterodímero com o ER2 expressando junto à célula alvo, ambas isoformas (Ogawa et al., 1998).

ER1 e o ER2 demonstraram que a sinalização era oposta quando o estradiol estava ativado. O estradiol ligados ao ER1 induziu à transativação e, junto ao ER2, inibiu a transativação. Conclui-se então que estas duas isoformas sinalizam em diferentes caminhos, dependendo do ligante e do elemento resposta, sugerindo que os ER1 e ER2 podem ter diferentes papéis na expressão genética (Paech et al., 1997).

O estrógeno é um hormônio esteróide que tem profundos efeitos no sistema reprodutivo de ambos os sexos (Enmark et al., 1997). O estrógeno regula o metabolismo celular em vários tecidos, desempenhando um papel importante no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das características sexuais secundárias femininas, na reprodução e no metabolismo celular (Korach, 1994). O ER1 é predominantemente expresso em tecidos específicos, como a mama, útero e vagina, estando envolvido na regulação da reprodução (Enmark & Gustafsson, 1999). Estudos com camundongos knock-out para o gene ER1 em folículos e corpos hemorrágicos ovarianos mostraram que animais de ambos os sexos eram inférteis, concluindo que o gene tem um papel importante na fertilidade (Sundarrajan et al., 1999). Wu et al. (2006) determinaram que o gene ER em suínos é um dos principais genes

que afetam o tamanho da leitegada, sem qualquer correlação negativa para o crescimento e a característica fenotípica da carcaça.

O estradiol é sintetizado em células da granulosa a partir de andrógenos das células da teca, por reações de enzimas catalizadoras (Miller, 1998). A androstenediona, nos bovinos, é o substrato que é convertido em estrona através da P450 aromatase (P450arom). Estrona é então convertido em estradiol pela enzima 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase. A concentração de estradiol em pequenos folículos antrais são modestas em relação a concentração dos folículos em crescimento (Smith et al., 1996). O pico da concentração de estradiol folicular geralmente é obtido durante a fase de crescimento do folículo dominante, concentração de estradiol diminui consideravelmente quando o folículo atinge o seu máximo de diâmetro (Price et al., 1995). A perda de capacidade de sintetizar estradiol é um dos primeiros sinais de atresia folicular ou regressão (Ireland e Roche., 1983).

O estrógeno, por ser um hormônio esteróide, possui receptor nuclear (ER1 e ER2) e Glidewell-Kenney et al (2008) mostrou que o ER1 se move para o núcleo, e induz a transcrição de genes alvo diretamente pelo elemento de resposta do estrogênio em regiões reguladoras de DNA. Tornou-se cada vez mais reconhecido que o ER1 também manda sinais através de caminhos independentes aos elementos de resposta ao estrógeno. Estes incluem interações proteína-proteína para modular a atividade de outros fatores de transcrição.

O estrógeno tem uma função importante no crescimento e na reprodução suína. Um polimorfismo Pvu II tem demonstrado ser uma importante variação genética no gene receptor do estrogênio (Santana et al., 2006). C.Sundarrajan et al (1999) concluíram que o polimorfismo Pvu II poderia estar alterando a eficiência dos receptores de estrógeno mediante as funções do estrógeno, afetando o desenvolvimento ou crescimento folicular. O tamanho do folículo dominante é influenciado pela concentração circulante de estradiol (Sartori et al., 2004).

3.5 - Marcadores Moleculares

Marcador molecular é um polimorfismo molecular (DNA/Proteína) que influencia diretamente uma determinada característica fenotípica ou está associado fisicamente à região que influencia a característica (Franco & Melo, 2006).

A seleção de animais entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da

genética molecular. O uso do auxílio de marcadores genéticos, são partes integrantes da atual tecnologia que está à disposição da seleção animal. Os principais marcadores genéticos descritos são: as inserções e deleções, os polimorfismos de base única (SNP) e as regiões repetitivas. Quando estão localizados em regiões codificantes dos genes, os polimorfismos podem levar a alteração no aminoácido da seqüência protéica, nesse caso são chamados de polimorfismo “não sinônimo”, o que pode determinar diferenças na função protéica e consequente variação fenotípica (Curi, 2004).

Através dos marcadores genéticos, certas expressões podem ser identificadas e os indivíduos podem ser diferenciados. Um desses tipos de marcadores genéticos é representado pelo RFLP (Polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição). Na restrição utilizando o PCR-RFLP apenas o segmento de DNA que abriga o sítio polimórfico de restrição é amplificado para posterior análise. Como resultado, após a clivagem com a enzima de restrição apropriada, um número limitado de fragmentos são obtidos, que podem ser facilmente discriminados de acordo com o tamanho. O primeiro passo para a análise de PCR-RFLP é a amplificação do segmento do gene ou seqüência de DNA, em que se encontra o sítio polimórfico de restrição. A partir do produto da PCR, faz-se a digestão com a enzima de restrição e assim identificamos as diferenças existentes (Regitano, 2001).

Em programas de seleção animal, o uso de marcadores moleculares auxilia a seleção clássica e a seleção por observação. A utilização de marcadores moleculares associado ao uso de seleção clássica do rebanho tem como vantagem à precocidade de avaliação dos animais para características específicas, pois o uso de análise de DNA permite analisar os animais após o nascimento, agilizando assim a seleção genética animal.

O uso dos marcadores permite a seleção de reprodutores e doadoras que possuem as melhores características. Marcadores moleculares vêm sendo identificados e usados auxiliando na seleção do rebanho. Esses hormônios estão ligados à diversas vias metabólicas, como por exemplo, deposição de gordura subcutânea e crescimento. A tabela 1 mostra alguns dos marcadores moleculares que estão sendo estudados nas espécies bovina, ovina e suína.

Tabela 1 – Marcadores moleculares em bovinos, ovinos e suínos

Espécie	Autor	Gene	Função
Bovino	Buchanan et al. (2002)	LEP	Associado a gordura da carne
Ovino	Melo et al. (2008)	GDF-9	Associado à fertilidade
Suíno	Zhang et al. (2006)	ER	Tamanho da leitegada
Suíno	Franco et al. (2005)	GHRH	Associado ao ganho médio diário e esperado para espessura de gordura em Landrace

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, G.P.; MATTERI, R.L.; KASTELIC, J.P.; KO, J.C.H.; GINTHER, O.J. (1992) Association between surges of follicle stimulating hormone and the emergence of follicular waves in heifers. *J Reprod Fertil*, v.94, p.177-188.

ADAMS, G.P.; KOT, K.; SMITH, C.A.; GINTHER, O.J. (1993) Selection of a dominant follicle and suppression of follicular growth in heifers. *Anim Reprod Sci*;259-71.

ALVAREZ, R.H.; PIRES, R.M.L.; MARTINEZ, A.C.; NOGUEIRA, G.P. (2006) Resposta ovariana de novilhas mestiças superovuladas com dose única de FSHp injetada por via subcutânea e posterior reforço intramuscular. *Resumo anais SBTE*.

AVELAR, G.A. (2006) Associação entre marcadores de DNA microsatélite e características quantitativas de interesse produtivo em bovinos da raça nelore (*Bos indicus*). Tese (Doutorado em Ciência Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo. Orientador: José Fernando Garcia.

BARROS, C.M.; NOGUEIRA, M.F.G. (2001) Embryo transfer in *Bos indicus* cattle. *Theriogenology*, Gainesville, v. 56, p. 1483-1496.

BINELLI, M.; IBIAPINA, B.T.; BISINOTTO, R.S. (2006). Bases fisiológicas, farmacológicas e endócrinas dos tratamentos de sincronização do crescimento folicular e da ovulação. *Acta Scientiae Veterinariae*. 34 (Supl 1): 1-7.

BÓ, G.A.; BARUSELLI, P.S.; MARTÍNEZ, M.F. (2003) Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Animal Reproduction Science, Savoy*, v. 78:, p. 307-326.

BUCHANAN, F.C.; FITZSIMMONS, C.J.; VAN KESSEL, A.G.; THUE, T.D.; WINKELMAN-SIM, D.C. (2002) Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet Sel Evol* 34:105–116.

BURATINI JR., J. (2007) Endocrine and local control of folliculogenesis in cattle. *Rev Bras Reprod Anim, Belo Horizonte*, v.31, n.2, p.190-196.

CASTILHO, C.; GARCIA, J.M.; RENESTO, A.; NOGUEIRA, G.P.; BRITO, L.F.C. (2007) Follicular dynamics and plasma FSH and progesterone concentrations during follicular deviation in the first post-ovulatory wave in Nelore (*Bos indicus*) heifers. *Animal Reproduction Science*, v. 98, n. 3/4, p. 189-196.

C.SUNDARRAJAN, W.; LIAO, X.; ROY, A.C. (1999) Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Molecular Human Reproduction* vol. 5 n. 9 p. 797-802.

CURI, R.A. (2004) Relação entre os polimorfismos de genes envolvidos no controle do crescimento e na composição da carcaça e características de produção de bovinos de corte no modelo biológico superprecoce. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas (Genética)) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho.

DE CASTRO, F.; RUIZ, R.; MONTORO, L.; PÉREZ-HERMÁNDEZ, D.; PADILLA, E.S.C.; REAL, L.M.; RUIZ, A. (2003). Role of follicle-stimulating hormone receptor ser680asn polymorphism in the efficacy of follicle-stimulating hormone. *Fertility and Sterility*. 80(3):571-576.

DE CASTRO, F.; MORON, F.J.; MONTORO, L.; GALAN, J.J.; HERNANDEZ, D.P.; PADILLA, E.S.; RAMIREZ-LORCA, R.; REAL, L.M.; RUIZ, A. (2004). Human controlled ovarian hyperstimulation outcome is a polygenic trait. *Pharmacogenetics*. 14(5):285-93.

ENMARK, E.; GUSTAFSSON, J.A. (1999) Oestrogen receptors-an overview. *J Int Méd, Northampton*, v. 246, n. 2, p. 133-138.

ENMARK, E.; PLETO-HUIKKO, M.; GRANDIEN, K.; LAGERCRANTZ, S.; LAGERCRANTZ, J.G.; NORDENSKJOLD, M.; GUSTAFSSON, J. A. (1997) Human

estrogen receptor b-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*, Philadelphia, v. 82, n. 12, p. 4258-4265.

FAN, Q.R.; HENDRICKSON, W.A. (2005) Structure of human follicle-stimulating hormone in complex with its receptor. *Nature*. 433:269-277.

FIGUEIREDO, R.A.; BARROS, C.M.; PINHEIRO, O.L.; SOLER, J.M.P. (1997) Ovarian follicular dynamics in Nelore breed (*Bos indicus*) cattle. *Theriogenology*, v.47, p.1489-505.

FRANCO, M.M. & MELO, E.O. (2006). *Melhoramento animal: o uso de marcadores moleculares e da reprodução assistida*. Documentos 188, ISSN 0102-0110. EMBRAPA Recursos genéticos e biotecnologia.

FRANCO, M.M.; ANTUNES, R.C.; de OLIVEIRA, K.M.; PEREIRA, C.D.; BIASE, F.H.; NUNES, F.M.F.; GOULART, L.R. (2005) Association of a PIT1 gene polymorphism with growth hormone mRNA levels in pig pituitary glands. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto SP, v. 28, n. 1, p. 16-21.

FRIES, R. & RUVINSKY, A. (1999). *The genetics of cattle*. CABI Publishing. New York, N.Y. p. 15-22.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; YANG, M.Y. (2004) Follicular development: the role of the follicular microenvironment in selection of the dominant follicle. *Animal Reproduction Science*, v.82-83, p.109-26.

FORTUNE, J.E.; RIVERA, G.M.; EVANS, A.C.O.; TURZILLO, A.M. (2001) Differentiation of dominant versus subordinate follicles in cattle. *Biol Reprod*, v.65, p.648-654, 2001.

GINTHER, O.J.; WILTBANK, M.C.; FRICKE, P.M.; GIBBONS, J.R.; KOT, K. (1996) Selection of the dominant follicle in cattle. *Biol Reprod*, v.55, p.1187-1194.

GLIDEWELL-KENNEY, C.; WEISS, J.; HURLEY, L.A.; LEVINE, J.E.; JAMESON, J.L. (2008). Estrogen receptor alpha signaling pathways differentially regulate gonadotropin subunit gene expression and serum follicle-stimulating hormone in the female mouse. *Endocrinology*. 149(8):4168-76.

GONG, J.G.; CAMPBELL, B.K.; BRAMLEY, T.A.; GUTIERREZ, C.G.; PETERS, A.R.; WEBB, R. (1996) Suppression in the secretion of follicle-stimulating

hormone and luteinizing hormone, and ovarian follicle development in heifers continuously infused with a gonadotropin-releasing hormone agonist. *Biol Reprod*, v.55, p.68-74.

GREEN, S.; CHAMBON, P. (1987) Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature, London*, v. 325, n. 6099, p. 75-78.

GUTIÉRREZ, C.G.; CAMPBELL, B.K.; WEBB, R. (1997). Development of a long-term bovine granulosa cell culture system: induction and maintenance of estradiol production, response to follicle-stimulating hormone, and morphological characteristics. *Biology of Reproduction* 56 608–616.

GUTIERREZ, C.G.; RALPH, J.H.; TELFER, E.E.; WILMUT, I.; WEBB, R. (2000) Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. *Biol Reprod*, v.62, p.1322-1328.

HANSEN, P.J. & BLOCK, J. (2004) Towards an embryocentric world: the current and potential uses of embryo technologies in dairy production. *Reproduction, fertility, and development*. 16(2):1-14.

HSU, C.J.; HOLMES, S.D.; HAMMOND, J.M. (1987) Ovarian epidermal growth factor-like activity. Concentrations in porcine follicular fluid during follicular enlargement. *Biochemical and Biophysics Research Communications*, New York, v. 147, p. 242–247.

IRELAND, J.J.; ROCHE, J.F. (1983) Development of nonovulatory antral follicles in heifers: changes in steroids in follicular fluid and receptors for gonadotropins. *Endocrinology*; 112:150–156.

JARDINA, D.T.G.; RODRIGUES, C.A. & VASCONCELOS, J.L.M. (2007). 210 Factors affecting conception rate in lactating holstein recipients. *Reproduction, Fertility and Development* 19, 222–222.

KENE, P.S.; NALAVADI, V.C.; DIGHE, R.R.; IYER, K.S.; MAHALE, S.D. (2004). Identification of the structural and functional determinants of the extracellular domain of the human follicle stimulating hormone receptor. *Journal of endocrinology*. 182:501-508.

KORACH, K.S. (1994) Insights from the study of animals lacking functional estrogen receptor. *Science, Washington*, v. 266, n. 5190, p. 1524-1527.

MARQUES, M.O.; SILVA, K.C.F.; MAX, M.C.; GOMES, R.G.; SENEDA, M.M.. (2008) Principais estratégias para o incremento da TE em bovinos. *Acta Scientiae Veterinariae* 36(Supl. 2): s161-s164.

MELO, E.O.; SILVA, B. D. M. ; CASTRO, E.; SILVA, T. A. S. N. ; PAIVA, S. R. ; SARTORI, R. ; FRANCO, M.M.; SOUZA, C.J.H. ; NEVES, J.P. (2008) A novel mutation in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated, in homozygosis, with increased ovulation rate in Santa Inês sheep.. In: Forty-first Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction, Kona-Hawaii. *Reproductive Biology: basic Discoveries that Affect Our Lives*. Kona : SSR, 2008. v. 1. p. 141-141.

MILLER, W.L. (1988) Molecular biology of steroid hormone synthesis. *Endocr Rev*; 9:295–318.

OGAWA, S.; IOUE, S.; WATANABE, T.; HIROI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, H.; ORIMO, A.; HOSOI, T.; OUCHI, Y. MURAMATSU, M. (1998) The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochim Biophys Res Commun*, New York, v. 243, n. 1, p. 122-126.

OLIVEIRA, P.G.; VISINTIN, J.A.; BARNABE, V.H.; BARNABE, R.C. (1994) Efeitos do hormônio folículo estimulante (FSH) e da gonadotrofina da menopausa humana (hMG) como agentes superovulantes em tratamentos sucessivos de vacas da raça Holandesa, variedade preta e branca, utilizadas em transferência de embriões. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, v.31, n.3/4, p.288-94.

PAECH, K.; WEBB, P.; KUIPER, G.G.J.M.; NILSSON, S.; GUSTAFSSON, J.A.; KUSHNER, P.J.; SCANLAN, T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER alpha and ER beta at AP1 site. *Science*, Washington, v. 277, n.5, p. 1508-1510.

PEREIRA, J. C. C. (2004) *Melhoramento Genético aplicado à produção animal*. FEPMVZ Editora, 4ª ed., Belo Horizonte, MG, 609p.

PRICE, C.A.; CARRIÈRE, P.D.; BHATIA, B.; GROOME, N.P. (1995) A comparison of hormonal and histological changes during follicular growth, as measured by ultrasonography, in cattle. *J Reprod Fertil*; 103:63–68.

RANDEL, R.D. (1984) Seasonal effects on female reproductive functions in the bovine (Indian breeds). *Theriogenology*, Gainesville, v. 21, p. 170-185.

REGITANO, L. C. de A. (2001) Análise de polimorfismos de fragmentos de restrição utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR-RFLP). In: Luciana Correia de Almeida Regitano. *Biologia molecular aplicada à produção animal*. 1 ed. BRASÍLIA - DF: EMBRAPA informação tecnológica., v., p. 187-195.

SANTANA, B.A.A.; BIASE, F.H.; ANTUNES, R.C.A.; BORGES, M.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R. (2006) Association of the estrogen receptor gene Pvu II restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* vol.29 no.2

SANTIAGO, L.L.; TORRES, C.A.A.; NOGUEIRA, E.T.; da COSTA, E.P.; GUIMARÃES, J.D. (2002) Folículo dominante e resposta superovulatória em novilhas da raça nelore. *Rev. Bras. Zootec.* vol.31 no.1 suppl.0 Viçosa.

SARTORI, R.; HAUGHIAN, J.M.; SHAVER, R.D.; ROSA, G.J.; WILTBANK, M.C. (2004) Comparison of ovarian function and circulating steroids in estrous cycles of holstein heifers and lactating cows. *Journal of Animal Science*, v.87, p. 905-920.

SILVA, J.M.; HAMEL, M.; SAHMI, M.; PRICE, C.A. (2006). Control of oestradiol secretion and of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid accumulation by FSH involves different intracellular pathways in oestrogenic bovine granulosa cells in vitro. *Reproduction* 132, pp. 909-917.

SIMONI, M.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E. (1997). The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*. 18(6):739-773.

SIMONI, M.; NIESCHLAG, E.; GROMOLL, J. (2002). Isoforms and single nucleotide polymorphisms of the FSH receptor gene: implications for human reproduction. *Human Reproduction Update*. 8(5):413-421.

SMITH, L.C.; OLIVERA-ANGEL, M.; GROOME, N.P.; BHATIA, B.; PRICE, C.A. (1996) Oocyte quality and follicular hormone concentrations in small antral follicles before and after the emergence of a dominant follicle in cattle. *J Reprod Fertil*; 106:193–199.

STABENFEDT, G.H., EDQVIST, L.E.(1996) Processos reprodutivos na fêmea. In: *Fisiologia dos Animais Domésticos*. Ed. Guanabara, 11a ed., p.615-639.

SUNDARRAJAN,C.; LIAO, W.X.; ROY, A.C.; NG, S.C. (1999). Association of oestrogen receptor gene polymorphisms with outcome of ovarian stimulation in patients undergoing IVF. *Molecular Human Reproduction* vol.5 no.9 pp. 797-802.

SZREDER, T. & ZWIERZCHOWSKI, L. (2004). Polymorphism within the bovine estrogen receptor- α gene 5'-region. *J. Appl. Genet.* 45(2), pp 225-236.

THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M.C.; HUNTER, R.H.F. (1993) *Reproduction in mammals and man*. Paris: Aubin Imprimeur, p. 800.

TISDALL, D.J., WATANABE, K., HUDSON, N.L, SMITH, P., MCNATTY, K.P. (1995) FSH receptor gene expression during ovarian follicle development in sheep. *J. Mol. Endocrinol.* v.15, p.273-81.

YUAN, W., LUCY, M.C., SMITH, M.F. (1996) Messenger ribonucleic acid for insulin-like growth factors-I and - II, insulin-like growth factor-binding protein-2, gonadotropin receptors, and steroidogenic enzymes in porcine follicles. *Biol. Reprod.*, v.5, p.1045-54.

WHITE, R.; LEES, J.A.; NEEDHAM, M.; HAM, J.; PARKER, M. (1987) Structural organizations and expression of the mouse estrogen receptor. *Mol Endocrinol, Bethesda*, v. 1, n. 10, p. 735-744.

WU, Z.F.; LIU, D.W.; WANG, Q.L.; ZENG, H.Y.; CHEN, Y.S.; ZHANG, H. (2006) Study on the Association Between Estrogen Receptor Gene (ESR) and Reproduction Traits in Landrace Pigs. Institute of Genetics and Developmental Biology & The Genetics Society of China Published by Elsevier Ltd. *Acta Genetica Sinica*, Volume 33, Issue 8, August 2006, Pages 711-716.

ZHANG. S.; KNIGHT, T.J.; REECY, J.M.; BEITZ, D.C. (2008) DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Anim Genet* 39:62–70

CAPITULO 2

POLIMORFISMOS DE DNA NOS GENES DOS RECEPTORES DE ESTROGÊNIO E FSHR E ASSOCIAÇÃO COM RESPOSTA SUPEROVULATÓRIA EM BOVINOS

1. RESUMO

Ana Cláudia de Melo Valeriano¹, Maurício Machaim Franco²

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²EMBRAPA Recursos Genético e Biotecnologia.

Amostras de sangue de 453 doadoras de embriões de 7 raças (holandês, jersey, nelore, senepol, sem raça definida e tabapuã) foram utilizadas para o estudo. Após a extração de DNA as amostras foram avaliadas em gel de agarose 0,8%, quantificadas e padronizadas em 100ng/ml. Para prospecção de SNPs no gene FSHR um par de *primers* específicos foram desenhados para amplificação de parte do éxon 10. Os *amplicons* de dez animais de quatro raças (nelore, simental, holandês e Jersey), depois de purificados com o kit *GenClean II (Bio 101 Systems)*, foram seqüenciados pelo método de *dideoxi* em sequenciador automático ABI 3130 xl (*Applied Biosystem*). As seqüências obtidas foram analisadas pelos programas *Chromas* e *DNAMAN* versão 4.0, tendo como referência a seqüência depositada no *GenBank* (NM_174061). Onde foi encontrado o polimorfismo que quando há a troca de C/G gera um aminoácido diferente (ACC – treonina e AGC serina), então foi desenvolvido, com a enzima *Alu I*, um PCR-RFLP para a genotipagem de todos os animais. Os produtos gerados pela digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% e genotipados como CC, CG e GG. Para a genotipagem do gene receptor de estrógeno 1 (ER1) foram utilizados um par de primers descrito na literatura por Szreder & Zwierzchowski (2004) e enzima de restrição usada para PCR-RFLP foi a *Bgl I* e os produtos gerados pela digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% e então genotipados como

AA, AG e GG conforme tamanho dos fragmentos. Para analisar as frequências genóticas dos genes FSHR e ER1 foi usado o cálculo do equilíbrio de *Hardy-Weinberg*. Quando foi avaliada toda a população encontrou-se diferença do equilíbrio ($P=0,0049$ e $P=0,0001$) para os genes FSHR e ER1, respectivamente. Dentro das raças, não foram encontradas diferenças significativas para as frequências genóticas nos genes FSHR e ER1. Quando foi feita a comparação entre *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*, encontrou-se uma diferença significativa para as frequências genóticas para ambos os genes FSHR ($4,04e-07$) e ER1 ($4,31e-07$). No entanto, não houve associação da resposta à SOV aos polimorfismos estudados.

Palavras-chave: Receptor de FSH, receptor de estrogênio, polimorfismo, genes, bovinos.

DNA POLYMORPHISMS IN RECEPTORS ESTROGEN AND FSHR GENE AND ASSOCIATION TO SUPEROVULATORY RESPONSE IN BOVINE.

2. ABSTRACT

Ana Cláudia de Melo Valeriano¹, Maurício Machaim Franco²

¹Faculdade de Agronomia e Veterinária - UnB, DF, ²EMBRAPA Recursos Genético e Biotecnologia

Blood samples from 453 embryo donors belong to 7 breed (Dutch, Jersey, Nelore, Senepol, no defined breed and Tabapuã) were used in this study. After DNA extraction, the samples were assessed on 0,8% agarose gel, quantified and standardized to 100ng/mL. A specific primer pair was designed to FSHR SNPs prospecting at exon 10. The amplicons from 10 animals of 4 breed (Nelore, Simental, Dutch, and Jersey) were purified by using GenCleanII kit (Bio101 Systems) and sequenced at ABI 3130xl (Applied Biosystems). The gene sequence was analyzed by using Chromas and DNAMAN 4.0 software and NM_174061 as reference sequence. A C/G (ACC: threonine / AGC: serine) polymorphism was found and a genotyping RFLP-Alu I method was developed. The Alu I digestion products were submitted to horizontal electrophoresis on 2% agarose gel and were genotyped as CC, CG, and GG. To ER1 genotyping were used primers described by Szreder & Zwinerzchowsk (2004). The amplicons were used to Bgl I -RFLP and the digestion products were submitted to horizontal electrophoresis on 2% gel and genotyped as AA, AG, and GG. Hardy-Weinberg equilibrium

was used to analyze FSHR and ER genotypic frequencies. A equilibrium difference was observed when all population was analyzed ($P= 0,0049$ and $P= 0,0001$ to FSHR and ER1 respectively) . It was not observed FSHR and ER1 frequencies significant differences among individuals belong to same breeds. A FSHR and ER1 genotype frequency significant difference was observed between *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus*. However, the polymorphisms studied was not associated to SOV response.

Palavras-chave: FSH receptor, estrogen receptor, polymorphism, gene, embryo donors.

3. INTRODUÇÃO

A prospecção e o estudo de genes candidatos que estão envolvidos no processo de ovulação são ferramentas de importantes quando se pretende incrementar a eficiência reprodutiva de rebanhos e melhorar as respostas das biotécnicas de multiplicação animal. Os estudos baseados em genes candidatos buscam identificar polimorfismos diretamente nas regiões codificantes de um dado gene alvo ou nos elementos regulatórios flanqueadores dessas regiões (Almeida, 2003). Pereira, J.C.C (2005), comenta que o principal objetivo de projetos de mapeamento genéticos em animais é a localização de genes envolvidos com a variação genética em fenótipos economicamente importantes, que possam ser diagnosticados por meio de marcadores genômicos.

Para o desenvolvimento do trabalho amostras de sangue de doadoras de embriões de 7 raças diferentes foram coletadas. As doadoras são de sete regiões do Brasil, de onde foram enviados dados de coleta de embriões pra serem feitas as análises, onde se associa dados de coleta e polimorfismos dos genes FSHR e ER1.

A constituição de um banco de DNA de doadoras de embriões permite a busca por variantes gênicas que possam levar à melhoria nas respostas às técnicas de reprodução assistida, no caso deste trabalho, que melhor respondem a superovulação (SOV). Com isso pode-se almejar um incremento no número de embriões produzidos por animal, conseqüentemente otimizando o uso da fêmea, intensificando a multiplicação de animais de alto mérito genético e paralelamente otimizando os custos de produção.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 – *Material biológico*

Amostras de sangue periférico de 453 doadoras de embriões de 7 raças sendo elas gir, holandês (HOL), jersey (JER), nelore (NER), senepol (SEN), sem raça definida (SRD), tabapuã (TAB), que foram coletadas com agulha e tubos contendo anticoagulante. As raças senepol e tabapuã foram consideradas apenas para os cálculos de frequência alélica e genotípica, pois não foram fornecidos os dados de coleta dessas doadoras. As amostras vieram de 7 regiões do Brasil (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Rio Grande do Sul e Tocantins) conforme Tabela 2 e foram fornecidas por laboratórios que fazem parte da Associação dos Laboratórios de Produção In vitro de Embriões (ANPIVE). As coletas foram feitas por operadores de excelência, com ampla experiência em protocolos de transferência e coleta de embriões.

Nas Tabelas 15, 16 e 17 foram considerados os animais que possuíam os dados de genótipo e produção de estruturas.

Tabela 2 - Origem dos animais por raça.

LOCALIDADE	GIR	HOL	JER	NER	SEN	SRD	TAB
Brasília				59		41	
Goiás	51						26
Mato Grosso				43	48		
Minas Gerais				31			
São Paulo		67	31	17			
Rio Grande do Sul			3				
Tocantins				28			

4.2 – *Extração do DNA*

Após o recebimento das amostras de sangue, o DNA foi extraído de acordo com um protocolo de Salting Out descrito por Biase et al. (2002), conforme descrito a seguir:

4.2.1 - Lise celular:

800 microlitros (μ l) de solução de lise celular (10mM tris-HCl, 10 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 1,5% triton) foram colocados em microtubo de 2ml com 600 μ l de sangue total.

O microtubo foi invertido várias vezes para homogeneização da suspensão, e então incubando em temperatura ambiente. Após 5 minutos, a suspensão foi centrifugada por 30 segundos a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado, e ao precipitado foi acrescentado 1 ml da mesma solução de lise celular. A suspensão foi homogeneizada através do uso de vórtex por alguns segundos e depois centrifugada por 30 segundos a 13000 rpm. Repetiu-se o procedimento de lavagem do precipitado até que o mesmo estivesse límpido, aparentando coloração branca. Após as lavagens, o precipitado foi homogeneizado em vórtex por alguns segundos.

4.2.2 - Lise nuclear e precipitação das proteínas:

Para a lise nuclear, foram acrescentados 600 µl de solução de lise nuclear (50mM tris-HCl, 25 mM EDTA, 400mM NaCl, 1,0% SDS) ao pellet de núcleo e esta foi incubada durante 1 hora em “banho-maria” a 60°C. Após a incubação, os microtubos foram retirados do “banho Maria” e, sobre a suspensão foram adicionados 200 µl de Cloreto de Sódio (NaCl) saturado (6M) (solução de precipitação). A suspensão foi homogeneizada em vórtex por 30 segundos e incubada em gelo por 5 minutos. Após estes procedimentos a suspensão foi centrifugada por 6 minutos e o sobrenadante transferido para um novo microtubo.

4.2.3 - Precipitação do DNA:

600 µl de isopropanol gelado (-20°C) foram colocados sobre o sobrenadante. A suspensão foi invertida várias vezes e após o início da visualização do DNA precipitando, os microtubos foram colocados em freezer a -20°C overnight.

4.2.4 – Rehidratação do DNA:

Após a precipitação do DNA, os microtubos foram centrifugados por 16 minutos a 13000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o DNA precipitado foi lavado com 1 ml de etanol 70% através de centrifugação por 5 minutos a 13000 rpm. Após o descarte do etanol por inversão, o precipitado seco de DNA foi reidratado com 200 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), homogeneizado em vórtex e incubados em banho-maria a 50°C, por 30 minutos.

4.2.5 - Avaliação da qualidade do DNA

Após a extração, o DNA de cada amostra foi submetido à eletroforese horizontal em gel de agarose (0,8% em tampão TBE 0,5X), o gel foi impregnado com brometo de etídeo (10mg/mL) para a avaliação da qualidade (Figura 1). Após a eletroforese, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado em sistema fotodocumentador Eagle eye (Biorad).

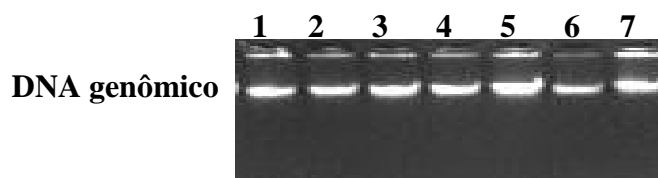


Figura 1 - Gel de agarose 0,8% com amostras de DNA genômico de 7 colunas com animais da raça nelore, mostrando a boa qualidade do material extraído.

4.2.6 - Quantificação do DNA

Após a avaliação da qualidade, as amostras de DNA foram quantificadas por espectrofotômetro (NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer).

Após a avaliação da qualidade e quantificação, todas as amostras de DNA foram diluídas para a concentração final de 100ng/μL e congeladas em freezer -80°C.

4.3 - PCR para o gene *FSHR* e prospecção de SNPs

Um par de primers específicos foram desenhados no Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia para amplificar e sequenciar parte do éxon 10 do gene *FSHR* que codifica parte dos domínios transmembrana, domínio C-terminal da proteína, além de parte da região 3' UTR do gene. Para a otimização dos primers e prospecção de SNPs, foram usadas amostras de DNA de dez fêmeas de 4 raças (nelore, simental, holandês e jersey) que apresentaram histórico de alta e baixa respostas a protocolos de superovulação.

As seqüências dos primers são as seguintes:

Forward: 5'ACTCACATCTACCTCACG 3'

Reverse: 5'GTAAGTGGAAGTGCTCTC3'

Esse par de primer amplifica um fragmento de 537pb, que corresponde à posição 796 do éxon 10 e vai até o códon TAC. O *primer forward* se alinha na posição 796 e

vai até a posição 813 do exon 10 e o *reverse* na posição 1315 até 1332 do exon 10 do gene FSHR.

A otimização da PCR para o gene do receptor de FSH (FSHR), foi desenvolvida no mesmo laboratório onde foram desenhados os primers. As condições de otimização estão descritas na tabela 3.

Tabela 3 – Condições para a otimização da amplificação do gene FSHR.

<i>N° do tubo</i>	<i>DNA</i> <i>ng</i>	<i>Taq</i> <i>U</i>	<i>MgCl₂</i> <i>mM</i>	<i>dNTP</i> <i>mM</i>	<i>primer</i> <i>pmoles</i>	<i>Tampão</i> <i>X</i>	<i>Água</i> <i>µl</i>	<i>Volume final</i> <i>µl</i>
1	100	1	1	0,4	5	1	15,8	20
2	100	1	1,5	0,4	5	1	15,6	20
3	100	1	2,0	0,4	5	1	15,4	20
4	100	1	2,5	0,4	5	1	15,2	20
5	100	1	3,0	0,4	5	1	15,0	20

As condições de reação que melhor amplificou e foram usadas para a PCR foram as seguintes: Tampão da enzima 1X (Invitrogen), 2 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 5 pmoles de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase (Invitrogen), 100 ng de DNA genômico, em volume final de 20 µl. As reações foram realizadas em termociclador (PTC-100 MJ *Research*) e consistiram de uma incubação inicial de 94°C por 3 minutos para desnaturação inicial e 35 ciclos de: 94°C por 40 segundos; 52°C por 45 segundos; 72°C por 1 minuto. Após a ciclagem, o amplificado foi submetido à uma etapa de extensão final de 72°C por 10 minutos e incubado a 4°C.

Após a amplificação, os *amplicons* dos 10 animais foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose (2% em TBE 0,5X) impregnado com brometo de etídio (10mg/mL) para posterior purificação dos fragmentos com o kit *GenClean II* (*Bio 101 Systems*). Os produtos purificados foram submetidos ao sequenciamento pelo método de dideoxi em sequenciador automático ABI 3130 xl (*Applied Biosystem*). Foram realizadas duas reações de sequenciamento para cada amostra de DNA, utilizando os mesmos *primers* que amplificaram os fragmentos. As seqüências obtidas foram analisadas pelos programas Chromas e DNAMAN versão 4.0, tendo como referência a seqüência abaixo depositada no

GenBank (ACC). Em destaque o códon onde foi encontrado o polimorfismo que quando há a troca de C/G gera um aminoácido diferente (ACC – treonina e AGC serina).

“actcacatctacctcacggtgaggaacccaacatcacatcctcttctagtgaccaagatagccaagcgcattggccatgctcatctccaccgacttcctctgcatggcaccatctcctctttgccatctctgcctccctcaaggtgccctcatctgtgccaagtcacaagatcctcctgtgctctgttctacccatcaactcctgtgccaacccttctctatgccatcttCaccaagaactccgcagggattcttcattctgctgagcaagtttgctgctatgaagtgaagcccagacctatagtcagaaaccicatccactgccacaacttcatccaaggaacggccactgccccccagctcccagggttactaatggttccaattacacacttatccccctaagacatttagccaagaactaaaacacaatgtacaaatgtttctgagtgttgaatgacagataagtcttgccttgaagaatatgccatggaagagctgacagagcacttccacttac”.

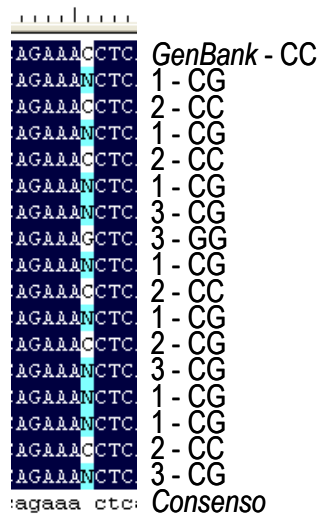


Figura 2 - Alinhamento das seqüências usando o programa DNAMAN. A primeira representa uma seqüência depositada no GenBank e as outras dos animais que foram seqüenciados e seus respectivos genótipos (Simental – 1; Jersey – 2; Nelore – 3)

Após avaliar a qualidade, analisando o cromatograma pelo programa Chromas e o alinhamento das seqüências no programa DNAMAN utilizando uma seqüência referência do *GenBank* (NM_174061) como mostra a Figura 2, foi desenvolvido no laboratório um PCR-RFLP para a genotipagem de todos os animais, com a enzima Alu I.

4.4 - Genotipagem para o FSHR (PCR-RFLP)

Para genotipagem do gene FSHR foi usada digestão com a enzima de restrição Alu I.

O sítio de restrição da enzima Alu I é mostrado na figura 3. Para a digestão com a enzima Alu I, foi utilizado o tampão React I (invitrogen) 1X e 5 U da enzima foram

adicionados ao produto final da PCR. O volume final da reação foi completado para 25 µl com água Milli Q, e incubado em banho-maria a 37°C *overnight*.

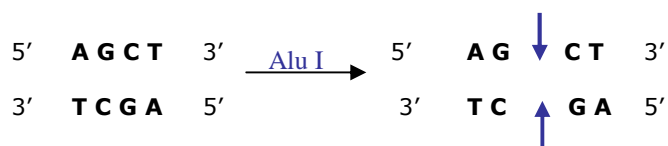


Figura 3 – Sítio de restrição da enzima Alu I

Os produtos gerados pela digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 0,5X) com brometo de etídio (10mg/mL de gel) para a genotipagem. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado em sistema fotodocumentador *Eagle eye* (Biorad) e então as amostras foram genotipadas como CC (1), CG (2) e GG (3), conforme tamanho dos fragmentos descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Tamanho dos fragmentos esperados após digestão com a enzima de restrição Alu I.

1 (CC)	2 (CG)	3 (GG)
376 pb	376 pb	- - -
- - -	326 pb	326 pb
139 pb	139 pb	139 pb
- - -	50 pb	50 pb
22 pb	22 pb	22 pb

4.5 – PCR para o gene do receptor de estrógeno 1 (ER1)

Para a otimização da genotipagem do gene do receptor de estrógeno (ER1), foi utilizado um par de primers descrito por Szreder & Zwierzchowski (2004), com as seguintes sequências:

Forward: 5' TTTGGTTAACGAGGTGGAG3'

Reverse: 5' TGTGACACAGGTGGTTTTTC3'

Para a otimização da PCR foram testadas as condições descritas na Tabela 5:

Tabela 5 – Condições para a otimização da amplificação do gene ER1

<i>N° do tubo</i>	<i>DNA</i> <i>ng</i>	<i>Taq</i> <i>U</i>	<i>MgCl₂</i> <i>mM</i>	<i>dNTP</i> <i>mM</i>	<i>primer</i> <i>pmoles</i>	<i>tampão</i> <i>x</i>	<i>Água</i> <i>μl</i>	<i>Volume final</i> <i>μl</i>
1	100	1	1	0,2	5	1	15,8	20
2	100	1	1,5	0,2	5	1	15,6	20
3	100	1	2,0	0,2	5	1	15,4	20
4	100	1	2,5	0,2	5	1	15,2	20

O programa utilizado no termociclador (PTC-100 MJ *Research*) para a otimização foi:

- 1° passo: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial);
- 2° passo: 94°C por 20 segundos (desnaturação);
- 3° passo: 53°C por 30 segundos (anelamento);
- 4° passo: 72°C por 40 segundos (extensão);
- 5° passo: volta ao 2° passo por mais 34 vezes;
- 6° passo: 72°C por 10 minutos (etapa final de extensão);
- 7° passo: 4° por tempo ilimitado.

Os produtos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%.

Para melhorar o resultado da PCR, o programa foi alterado passando de 35 para 37 ciclos de amplificação e com as condições seguintes:

Tampão da enzima 1X, 1 mM de MgCl₂, 0,4 mM de dNTPs, 5 pmoles de cada *primer*, 1U de Taq DNA polimerase, 100 ng de DNA em um volume final de 20 μl.

Foi utilizado o programa no termociclador (PTC-100 MJ *Research*), com os seguintes ciclos:

- 1° passo: 94°C por 3 minutos (desnaturação inicial);
- 2° passo: 94°C por 20 segundos (desnaturação);
- 3° passo: 53°C por 30 segundos (anelamento);
- 4° passo: 72°C por 40 segundos (extensão);
- 5° passo: volta ao 2° passo por mais 36 vezes;
- 6° passo: 72°C por 10 minutos (etapa final de extensão);
- 7° passo: 4° por tempo ilimitado.

4.6 - Genotipagem para o ER1 (PCR-RFLP)

A genotipagem do gene ER1 foi feita com a enzima de restrição Bgl I (Figura 4), usando as condições a seguir:

Tampão React I 1X e 2 U da enzima foram adicionados ao produto final da PCR. O volume final da reação foi completado para 25 µl com água Milli Q e então incubado em banho-maria a 37°C *overnight*.

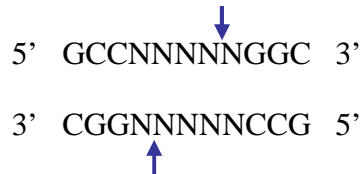


Figura 4 – Sítio de restrição da enzima Bgl I

Os produtos gerados pela digestão foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose 2,0% em tampão TBE 0,5X) com brometo de etídio (10mg/mL de gel) para a genotipagem. Após a eletroforese, o gel foi visualizado em luz ultravioleta e fotografado em sistema fotodocumentador *Eagle eye* (Biorad) e então as amostras foram genotipadas como AA (1), AG (2) e GG (3) conforme tamanho dos fragmentos descritos na Tabela 6.

Tabela 6 – Tamanho dos fragmentos esperados após digestão com a enzima de restrição Bgl I.

1 (AA)	2 (AG)	3 (GG)
242pb	242pb	- - -
- - -	182pb	182pb
- - -	60pb	60pb

4.7 - Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em uma população na ausência de seleção, migração, mutação e frequência de fluxo gênico o equilíbrio é atingido após uma geração de acasalamento ao acaso. Permanecendo inalterada por sucessivas gerações.

O cálculo do equilíbrio de *Hardy-Weinberg* (Frequência Esperada) é feito como a Tabela 7:

Tabela 7 – Cálculo da frequência de Hardy-Weinberg.

Espermatozóide	Óvulo	Cálculo da frequência genotípica (probabilidade)	Zigoto (genótipo)
A	A	0,60 x 0,60	P ² AA
A	G	0,60 x 0,40	Pq AG
G	A	0,40 x 0,60	Pq AG
G	G	0,40 x 0,40	q ² GG

Formula para o cálculo da frequência esperada (frequência de *Hardy-Weinberg*): $P^2 + 2Pq + q^2 = 1$, onde P² é AA, 2Pq AG e q² GG.

4.8 - Análises estatísticas

Para comparar a distribuição das frequências genotípicas observadas entre as subespécies *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus* fez-se uso dos Modelos Lineares Generalizados (GLM). Essa técnica de modelagem permite, além da distribuição normal, atribuir outras distribuições de probabilidade para a variável resposta. Nesse trabalho, optou-se pela atribuição da distribuição de Poisson, já que essa melhor se adequou aos dados.

Para comparação das frequências genotípicas observadas e esperadas utilizou-se o teste de aderência (*goodness of fit*) Qui-Quadrado.

Ambas as aplicações foram feitas no software livre de linguagem de programação estatística R.

Os dados de produção de embriões foram avaliados entre os tratamentos experimentais pelo teste de Kruskal Wallis, utilizando o programa Prophet, versão 5.0 (BBN Systems and Technologies, 1996).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para a otimização da PCR para o gene ER1 foi verificado que o magnésio é um fator importante para se conseguir uma boa e específica amplificação, onde foi constatado que a concentração de magnésio de 1 mM apresentou-se ideal para a amplificação do gene (Figura 5).

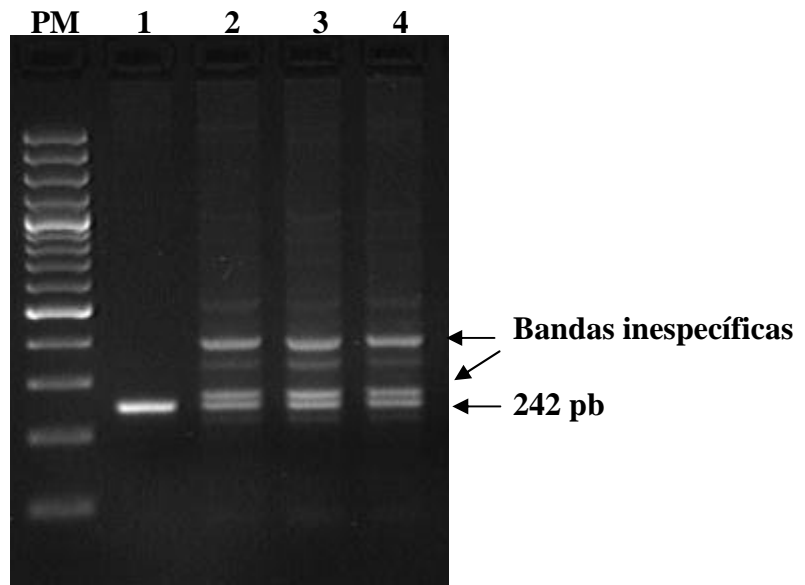


Figura 5: Gel de agarose 2% com o produto de PCR resultante da otimização da amplificação do gene ER1. Onde PM indica o marcador de peso molecular 1 kb PLUS DNA LADDER (Invitrogen). As condições das reações de 1 a 4 estão descritas na tabela 4.

As condições de genotipagem para o gene FSHR apresentou um padrão de banda de boa qualidade para um diagnóstico confiável, como mostram as figura 6.

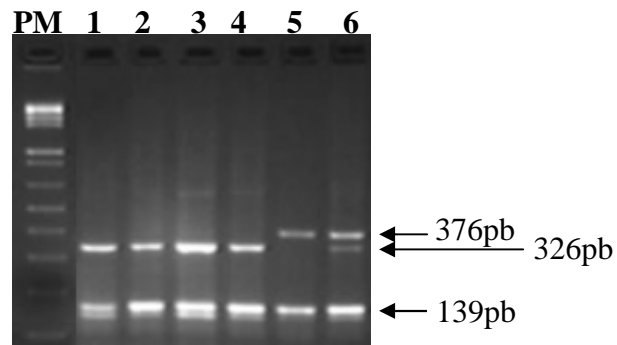


Figura 6 - Gel de agarose 2,0% mostrando o padrão dos três genótipos FSHR. As bandas no gel indicam que os animais 1 ao 4 são GG o animal 5 é CC e o animal 6 é CG.

As condições de genotipagem para o gene ER1 apresentou um padrão de banda de boa qualidade para um diagnóstico confiável, como mostram as figura 7.

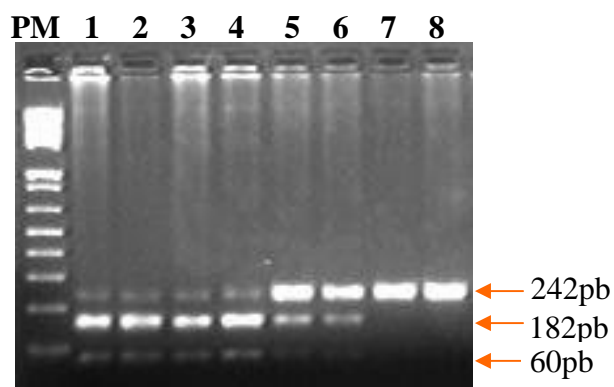


Figura 7 - Gel de agarose 2,0% mostrando o padrão dos três genótipos ER1. As bandas no gel indicam que os animais 1 ao 4 são GG, os animais 5 e 6 AG e os animais 7 e 8 são AA.

De Castro et al (2003) em estudos de frequência alélica em humanos no gene FSHR encontraram 57% para a frequência do alelo Asn680 e 43% para Ser680. Neste trabalho foi encontrado uma diferença na frequência alélica de 37% para o alelo C (Tre327) e 63% para o alelo G (Ser327) no gene FSHR. Para o gene ER1 foi encontrado 26% para o alelo A e 74% para o alelo G como mostra a Tabela 8 – Número de estruturas coletadas por raça.

Tabela 8 - Frequência alélica dos genes FSHR e ER1 da população pesquisada

<i>Gene FSHR</i>		<i>Gene ER1</i>	
Alelos	Quantidade	Alelos	Quantidade
C	0,37	A	0,26
G	0,63	G	0,74
<i>Total</i>	1,0	<i>Total</i>	1,0

Na tabela 9 podemos verificar a variação alelica para os genes FSHR e gene ER1, pode-se observar que a frequência para o alelo G é maior que o alelo C nas raças de origem *Bos taurus indicus* no gene do FSH e a frequência do alelo A é menor que a do alelo G para todas as raças analisadas no gene ER1.

Tabela 9 - Frequência alélica para os genes FSHR e ER1 em diferentes raças

Raça	<i>Gene FSHR</i>			<i>Gene ER1</i>		
	Alelos		Total	Alelos		Total
	C	G		A	G	
GIR	0,16	0,84	1,00	0,08	0,92	1,00
HOL	0,70	0,30	1,00	0,05	0,95	1,00
JER	0,58	0,42	1,00	0,23	0,77	1,00
NER	0,24	0,76	1,00	0,48	0,52	1,00
S E N	0,49	0,51	1,00	0,07	0,93	1,00
SRD	0,43	0,57	1,00	0,19	0,81	1,00
TAB	0,27	0,73	1,00	0,15	0,85	1,00

Tabela 10 – Frequência alélica do gene FSHR e ER1 de *Bos taurus* X *Bos indicus*

Raça	<i>Gene FSHR</i>			<i>Gene ER</i>		
	Alelos		Total	Alelos		Total
	C	G		A	G	
<i>Bos indicus</i>	0,23	0,77	1	0,36	0,64	1
<i>Bos taurus</i>	0,60	0,40	1	0,10	0,90	1

Quando foi considerado somente a origem dos animais, para o gene FSHR a frequência alélica para *Bos taurus indicus* é de C (23%) e G (77%) e *Bos taurus taurus* para os alelos C e G é 60% e 40% respectivamente. Para o gene ER1 a frequência do alelo A (36%) e G (64%) nos animais *Bos taurus indicus* e para *Bos taurus taurus* é 10% para alelo A e 90% para o alelo G (Tabela 10).

De acordo com Aittomaki et al (1995) mutações nos genes de receptores podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transdução do sinal endocrinológico, podendo interferir na resposta fisiológica esperada. Para o gene FSHR foram identificados três polimorfismos SNPs. Destes, dois são mutações silenciosas e um deles gera uma troca de aminoácido na sequência da proteína (códon ACC para AGC; treonina → serina), como mostrado nas Figuras 8 e 9. Frequentemente, as mutações gênicas de ponto, não trazem alterações na proteína a ser formada, quando isso ocorre essas alterações são conhecidas como mutações silenciosas. Quando há mutação com mudança de aminoácido, essa mudança é chamada mutação de substituição (Pereira, J.C.C., 2005). Como a mutação que troca a treonina por uma serina se encontra em uma região do domínio intracelular rica em

aminoácidos serina e treonina (Figura 8) e esses são aceptores clássicos de fosforilação, especula-se que este polimorfismo possa estar envolvido com a integridade do sítio ativo da transdução de sinal desse receptor alterando a resposta aos hormônios de protocolos de superovulação. A serina é o aminoácido mais comumente fosforilado nas proteínas; a treonina, o segundo. A taxa relativa de probabilidade de fosforilação desses aminoácidos é de aproximadamente 1000/100 para serina/treonina respectivamente (<http://www.geocities.com/bioquimicaplicada/aa7.htm>).

“SSYMKVSICLPMDIDSPLSQLYVMSLLVLNVLAFFVICGCYTHIYLTVRNPNTSSSS
DTKIAKRMAMLIFTDFLCMAPISFFAISASLKVPLITVSKSKILLVLFYPINSCANPFLYA
IFTKNFRRDFFILLSKFGCYEVQAQTYRSETSSTAHNFHPRNGHCPPAPRV TNGSNYT
LIPLRHLAKN”

Figura 8 - Parte da sequência da proteína do FSHR.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/41386765>

Segundo Berg et al (2004) fosforilação é um modo muito eficiente de controlar a atividade de proteínas, por razões estruturais, termodinâmicas, cinéticas e de regulação. A atividade de muitas enzimas, canais de membrana e outras proteínas-alvo é regulada pela fosforilação.

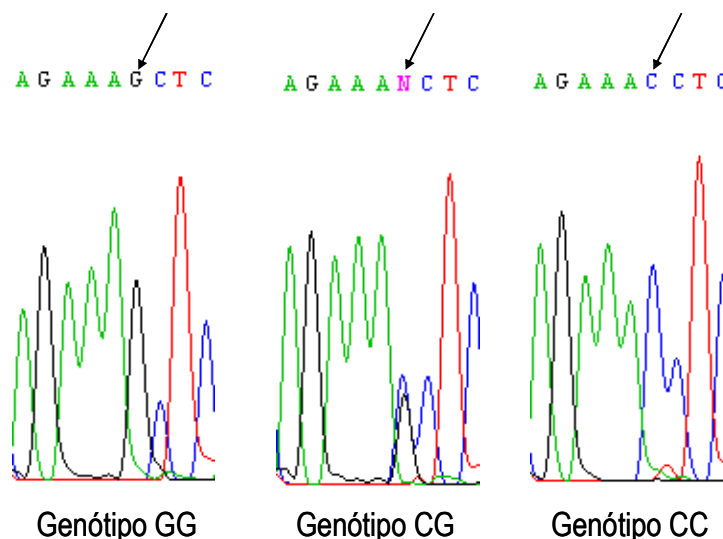


Figura 9 – Sequência de DNA e cromatograma mostrando os três genótipos para a mutação no gene FSHR.

Baseado na função da proteína FSHR e na característica da sequência dessa região, este polimorfismo seria um bom candidato a marcador para características de fertilidade em bovinos.

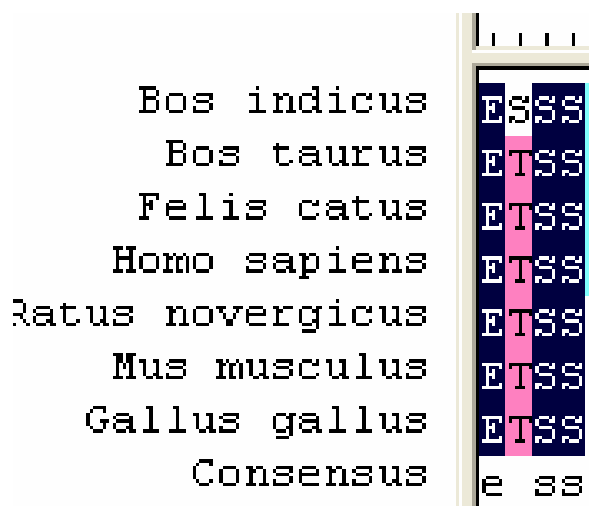


Figura 10 – Sequência de aminoácidos para diferentes espécies. A primeira sequência representa um animal mutante encontrado neste trabalho, mostrando uma serina substituindo uma treonina, que aparece conservada nas sequências de outras espécies.

A Tabela 11 mostra as frequências genótípicas observadas e esperadas para os genes FSHR e ER1.

Tabela 11 - Frequência genotípica para os genes FSHR e ER1 na população estudada

<i>Genótipo FSHR</i>	<i>Frequência Observada</i>	<i>Frequência Esperada</i>	<i>P</i>
CC	77	59,82	0,0049
CG	173	203,73	
GG	187	173,45	
Total	437	437	
<i>Genótipo ER</i>	<i>Frequência Observada</i>	<i>Frequência Esperada</i>	<i>P</i>
AA	51	29,61	0,0001
AG	123	168,54	
GG	264	239,85	
Total	438	438	

Baseando-se nas frequências genótípicas, quando se analisa os dados de toda a população estudada agrupada, independentemente de raça, verifica-se que a população não

está em equilíbrio de *Hardy-Weinberg* ($P=0,0049$ e $P=0,0001$, para os genes FSHR e ER1, respectivamente).

Pôde-se observar para o gene FSHR, uma diminuição do genótipo heterozigoto e aumento dos homozigotos. Essa diferença pode ser atribuída a uma seleção contra o heterozigoto, supondo que este possa ter uma resposta inferior para uma dada característica que está sendo selecionada dentro desse grupo. Uma outra hipótese é que há um efeito de raça gerando uma frequência esperada maior para o heterozigoto, uma vez que essa população é constituída por animais de várias raças agrupadas apresentando frequências genótípicas divergentes entre elas (Tabelas 12 e 13). Provavelmente isto ocorre pois não houve fluxo gênico entre os indivíduos entre as raças.

Para o gene ER1 observa-se também que há um desequilíbrio favorecendo a população de homozigotos e diminuindo a frequência de heterozigotos. As mesmas hipóteses discutidas para o gene FSHR podem ser usadas aqui para o ER1. Santana et al. (2006) estudando uma população de suínos da raça Large White constataram que o polimorfismo no gene ER (Pvu II) receptores de estrogênio no genótipo foi associada significativamente ($p < 0,05$) com o tamanho, ganho de peso médio diário e espessura de gordura.

Tabela 12 - Frequências genótípicas para o gene FSHR por raça estudada

Raça	Frequência observada			Total de animais	Frequência esperada			P
	CC	CG	GG		CC	CG	GG	
GIR	1	14	36	51	1,31	13,71	35,98	0,9608
HOL	32	30	5	67	32,83	28,14	6,03	0,8521
JER	11	16	6	33	11,10	16,08	5,82	0,9965
NER	12	61	101	174	10,02	63,48	100,50	0,7823
S E N	12	22	13	47	11,28	23,50	12,22	0,9089
SRD	6	23	12	41	7,58	20,10	13,32	0,6444
TAB	3	7	14	24	1,75	9,46	12,79	0,4389

Como mostram as Tabelas 12 e 13, não foram encontradas diferenças significativas para as frequências genótípicas nos genes FSHR e ER1, dentro de raças. Esse resultado suporta a hipótese de que o desequilíbrio das frequências dentro da população geral (agrupando todas as raças) pode ser também devido a efeito de raça com populações

diferentes e sem fluxo gênico e não a efeito de seleção para produção de embriões. Apesar de não poder descartar o efeito desses polimorfismos na resposta à superovulação, não sendo encontradas associações neste trabalho talvez pelo tamanho da população e variação na característica. Acredita-se que uma mutação no ER1 o hormônio (estrógeno) pode não se ligar e comprometer assim toda a via do FSH (Bigelow & Fortune, 1998).

Tabela 13 - Frequências genotípicas para o gene ER1 por raça estudada

Raça	Frequência observada			Total de animais	Frequência esperada			P
	AA	AG	GG		AA	AG	GG	
GIR	1	6	44	51	0,32	7,51	43,17	0,4137
HOL	0	7	60	67	0,17	6,36	60,47	0,8878
JER	2	11	20	33	1,74	11,70	19,56	0,9555
NER	44	77	52	173	39,86	86,36	46,78	0,3629
SEN	0	7	41	48	0,23	6,25	41,52	0,8492
SRD	3	9	28	40	1,44	12,32	26,24	0,2589
TAB	1	6	19	26	0,59	6,63	18,78	0,8407

Quando faz-se a comparação entre *Bos taurus indicus* x *Bos taurus taurus* como mostra a Tabela 14, encontra-se uma diferença significativa para as frequências genotípicas para ambos os genes FSHR e ER1. Visto que, *Bos indicus indicus* teve uma seleção para produção de carne e *Bos indicus taurus* para produção leiteira, essa diferença pode ser atribuída a seleção divergente de dois grupos de animais com diferença tanto quanto sua origem genética quanto para aptidão de produção (leite, carne). Segundo Fries (1999), a origem do *Bos taurus taurus* tem maior predominância na Europa, norte da Ásia, Oeste da África e Américas; *Bos taurus indicus* no entanto é mais próspero em climas áridos (predominante na África e Ásia).

Tabela 14 - Frequências genotípicas para os genes FSHR e ER1 em *Bos indicus* e *Bos taurus*

FSHR	Frequência observada %			Frequência esperada %			P
	CC	CG	GG	CC	CG	GG	
<i>Bos indicus</i>	6,42	32,93	60,65	5,29	35,42	59,29	0,571
<i>Bos taurus</i>	37,42	46,26	16,32	36,00	48,00	16	0,9121
<i>Bos indicus</i> vs <i>Bos taurus</i>							4,04e-07

ER	Frequência observada %			Frequência esperada %			P
	AA	AG	GG	AA	AG	GG	
<i>Bos indicus</i>	18,40	35,60	46,00	12,96	46,08	40,96	0,001348
<i>Bos taurus</i>	1,35	16,89	81,76	1,00	18,00	81,00	0,8633
<i>Bos indicus</i> vs <i>Bos taurus</i>							4,31e-07

Pode-se observar na Tabela 15 para o gene FSHR a produção média de estruturas das doadoras por genótipo (CC, CG e GG) dentro das raças estudadas GIR, HOL, JER, NER E SRD. Para as raças GIR, JER e o NER apresentam maior produção de estruturas para o genótipo CC onde para o GIR a produção é (CC 21 (59,66%), CG 6 (17,04%) e GG 8,2 (23,30%)); JER (CC 8,97 (39,84%) , CG 8,43 (36,19%) e GG 10,90 (23,97%)); e NER (CC 13,68 (36,26%), CG 12,80 (33,92%) e GG 11,25 (29,82%)). Para as raças HOL e SRD a maior produção de estruturas é do genótipo GG onde, HOL (CC 8,97 (31,66%), CG 8,43 (29,76%) e GG 10,90 (38,48%)) e SRD (CC 4 (13,70%), CG 11,65 (39,90%) e GG 13,55 (46,40%)).

Tabela 15 – Média de produção de estruturas para o gene FSHR por genótipo

RAÇA	Média de produção (N)	MÉDIA DE PRODUÇÃO POR GENÓTIPO		
		CC (N)	CG (N)	GG (N)
GIR	35,2 (36)	21 (1)	6 (10)	8,2 (25)
HOL	28,33 (56)	8,97 (25)	8,43 (26)	10,90 (5)
JER	29,32 (28)	11,68 (10)	10,61 (14)	7,03 (4)
NER	37,73 (143)	13,68 (89)	12,80 (43)	11,25 (11)
SRD	29,20 (30)	4 (2)	11,65 (17)	13,55 (11)
TOTAL	31,96 (293)	11,87 (127)	9,90 (110)	10,19 (56)

Quando avalia-se o gene ER1 quanto a produção média de estruturas das doadoras por genótipo (CC, CG e GG) dentro das raças GIR, HOL, JER, NER E SRD, pode-se observar na tabela 16 diferença de média de produção de estruturas. As raças GIR, HOL, JER, NER e SRD a média de produção de estruturas para cada raça é GIR AA 0 (0,00%), AG 6,33 (43,36%) e GG 8,27 (56,64%); HOL AA 0 (0,00%), AG 5,88 (39,02%) e GG 9,19 (60,98%); JER AA 7 (24,25%) , AG 12,48 (43,25%) , GG 9,38 (32,50%)); NER AA 12,94 (32,73%), AG 12,54 (31,72%) e GG 14,05 (35,55%)) e SRD AA 10,33 (30,04%), AG 12 (30,98%) e GG 12 (34,98%).

Tabela 16 – Média de produção de estruturas para o gene ER1 por genótipo

RAÇA	Produção média de estruturas (N)	MÉDIA DE PRODUÇÃO POR GENÓTIPO		
		AA (N)	AG (N)	GG (N)
GIR	14,60 (36)	- - -	6,33 (6)	8,27 (30)
HOL	15,07 (56)	- - -	5,88 (5)	9,19 (51)
JER	28,86 (27)	7 (1)	12,48 (8)	9,38 (18)
NER	39,53 (143)	12,94 (36)	12,54 (60)	14,05 (47)
SRD	34,33 (30)	10,33 (3)	12 (7)	12 (20)
TOTAL	26,48 (292)	10,09 (40)	9,85 (86)	10,58 (166)

A Tabela 17 apresenta a produção de estruturas por raça associando aos genótipos dos genes FSHR e ER. No total de produção de estruturas os animais que apresentam os genótipos CC/GG, GG/AA e GG/GG são os que possuem uma maior produção e os que apresentam os genótipo CC/AA apresentam menor produção de estruturas.

Tabela 17 - Produção de estruturas por raça com associação dos genótipos FSHR/ER

RAÇA	N	MÉDIA DE PRODUÇÃO POR GENÓTIPO (FSHR/ER)									
		CC/AA	CC/AG	CC/GG	CG/AA	CG/AG	CG/GG	GG/AA	GG/AG	GG/GG	
GIR	36	---	---	21 (1)	---	6 (3)	6 (7)	---	6,67 (3)	8,41 (22)	
HOL	56	7 (1)	---	8,97 (25)	---	6,38 (3)	8,70 (23)	---	5,13 (2)	14,75 (3)	
JER	27	4 (1)	12,75 (5)	11,5 (4)	---	12,02 (3)	9,46 (10)	---	---	7,03 (4)	
NER	142	---	10,45 (5)	13,17 (6)	11,24 (14)	12,32(19)	15,9 (10)	14,5 (21)	12,91 (36)	13,91 (30)	
SRD	30	---	6 (1)	2 (1)	10 (2)	16 (2)	11,23 (13)	11 (1)	11,5 (4)	15,33 (6)	
TOTAL	291	5,5 (2)	9,73 (11)	11,33 (37)	10,62 (16)	10,54 (30)	10,26 (63)	12,75 (22)	9,05 (45)	11,89 (65)	

Tabela 18 – Comparação entre raças para resposta à SOV.

Raça vs Raça	P
JER vs GIR	0.002
JER vs HOL	0.531
JER vs SRD	0.999
JER vs NER	0.999
NER vs GIR	0.001
NER vs HOL	0.105
NER vs SRD	0.999
SRD vs GIR	0.118
SRD vs HOL	0.999
HOL vs GIR	0.218

Tabela 19 – Número de estruturas coletadas por raça.

Raça	N	Média de estruturas coletadas	Desvio padrão
<i>GIR</i>	36	6,35	6,32
<i>HOL</i>	56	8,69	6,00
<i>SRD</i>	30	9,01	5,65
<i>JER</i>	28	10,47	5,09
<i>NER</i>	145	11,73	8,09

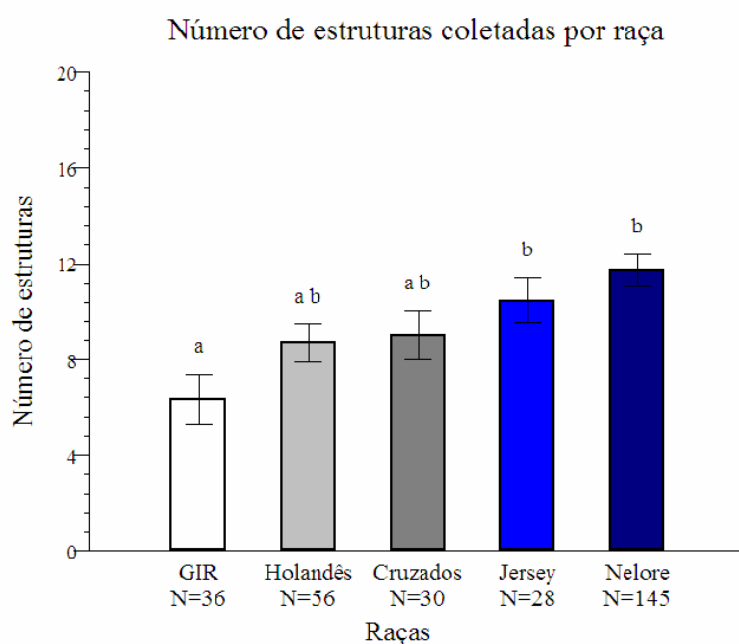


Figura 11 – Gráfico com número de estruturas coletadas de cinco raças (GIR, HOL, SRD, JER, NEL).

Não houve diferenças para respostas à SOV entre genótipos, mas quando fez-se a comparação das raças quanto ao número de estruturas coletadas, observa-se que JER vs GIR (0,002) e NER vs GIR (0,001) apresentam diferenças conforme nos mostra a Tabela 18 e a Figura 10 de acordo com a produção de estruturas conforme Tabela 19.

O desenvolvimento de técnicas moleculares tem permitido o conhecimento de como determinados genes atuam na determinação de características de interesse econômico. A utilização de técnicas moleculares combinadas à seleção tradicional, baseada no desempenho fenotípico, e da seleção assistida por marcadores moleculares (MAS), aumentará a eficiência dos programas de melhoramento genético. Segundo Abdel-Azim & Freeman (2002), o uso de MAS para pré-seleção de touros jovens, em esquemas de teste de progênie, pode aumentar o ganho genético em 7,6%. O uso dos marcadores permite melhorar a eficiência nos processos de seleção de animais reprodutores e matrizes, ainda na idade jovem que têm potencial para transmitir alelos favoráveis para o melhoramento dos rebanhos.

Alguns trabalhos com genes candidatos associados a características de interesse econômico têm sido desenvolvidos. Associação de polimorfismos no gene Pvu II em suínos com diferença e performance reprodutiva em suínos (Santana et al., 2006). Ribeiro et al. (2000) estimaram a frequência do gene da deficiência de adesão de leucócitos em gado Gir e Holandês. Unanian et al. (2000) estudaram a associação do polimorfismo do gene do

hormônio de crescimento com ganho de peso em bovinos da raça Nelore. Também estão sendo estudados genes de resistência a carrapatos, vermes gastrointestinais e mastite em bovinos das raças Zebuínas, pois a variação genética existente entre as raças de *Bos taurus* e *Bos indicus* permite a identificação de características associadas a resistência a parasitas, ao calor e a qualidade dos produtos (Martinez & Machado, 2002).

6. CONCLUSÃO

Não houve associação da resposta à SOV aos polimorfismos estudados, no entanto o resultado desse trabalho fornece novos SNPs para estudos futuros, fazendo-se necessários mais estudos para associar os polimorfismos encontrados com características de fertilidade.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIM, G.; FREEMAN, A.E. (2002) Superiority of QTL-assisted selection in dairy cattle breeding schemes. *Journal of Dairy Science*, v.85, p.1869-1880.

AITTOMAKI, K.; DIEGUEZ, J.L.L.; PAKARINEN, P. (1995) Mutation in FSH receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, v.82, p. 959-968.

ALMEIDA, S.E.M. (2003) Marcadores moleculares em sintonia com os genes da leptina e de seu receptor em bovinos: associação com parâmetros produtivos. Tese de doutorado. Genética e biologia molecular. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L. (2004) Livro de Bioquímica; Quinta edição; Editora Guanabara. P.509-546.

BIASE, F.H.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R. and ANTUNES, R.C. (2002) Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. *Genetics and Molecular Biology*. 25:313-315.

BIGELOW, K.L. & FORTUNE, J.E. (1998) Characteristics of Prolonged Dominant Versus Control Follicles: Follicle Cell Numbers, Steroidogenic Capabilities, and Messenger Ribonucleic Acid for Steroidogenic Enzymes. *Biology of Reproduction* 58, 1241-1249.

FRIES, R. & RUVINSKY, A. (1999). *The genetics of cattle*. CABI Publishing. New York, N.Y. p. 15-22.

MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. (2002) Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. Embrapa Gado de Leite. Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal.

PEREIRA, J.C.C.; RIBEIRO, S.H.A.; SILVA, M.A.; BERGMANN, J.A.G.; COSTA, M.D. (2005) Análise genética de características ponderais e reprodutivas de fêmeas bovinas Tabapuã. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.57, supl. 2, p.231-236.

RIBEIRO, L.A.; BARON, E.E.; MARTINEZ, M.L.; COUTINHO, L.L. (2000). PCR screening and allele frequency estimation of bovine leucocyte adhesion deficiency in Holstein and Gir cattle in Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, v.23 (4), p.831-834.

SANTANA, B.A.A.; BIASE, F.H.; ANTUNES, R.C.A.; BORGES, M.; FRANCO, M.M.; GOULART, L.R. (2006) Association of the estrogen receptor gene Pvu II restriction polymorphism with expected progeny differences for reproductive and performance traits in swine herds in Brazil. *Genetics and Molecular Biology* vol.29 no.2

SZREDER, T. & ZWIERZCHOWSKI, L. (2004). Polymorphism within the bovine estrogen receptor- α gene 5'-region. *J. Appl. Genet.* 45(2), pp 225-236.

UNANIAN, M.M.; BARRETO, C.C.; FREITAS, A.R. CORDEIRO, C.M.T.; JOSAHKIAN, L.A. (2000). Associação do polimorfismo do gene do hormônio de crescimento com a característica peso em bovinos da raça Nelore. *Rev. bras. Zootec.*, 29 (5): 1380-1386.