

UNIVERSIDADE LUTERANA DO BRASIL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E TOXICOLOGIA
APLICADA

MARCADORES MOLECULARES E ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS
REPRODUTIVAS EM DOIS REBANHOS BOVINOS DO RIO GRANDE DO SUL

Dissertação para obtenção do Título de
Mestre em Genética e Toxicologia
Aplicada

Juliano Coelho da Silveira

Orientador(a): Dr.(a) Tania de Azevedo Weimer

CANOAS

2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Tânia de Azevedo Weimer por ter me recebido em seu laboratório durante os últimos dois anos, pela orientação tranqüila, inspiradora e muito direcionadora, características que com certeza farão grande diferença na minha vida científica.

Ao Dr Daniel Thompsen Passos pelas inúmeras dicas e ensinamentos, que auxiliaram no meu crescimento pessoal.

Aos colegas do Laboratório 210: Ângela, Bruno, Carla, Daniele, Diego, Éverton, Fábio, Fernanda, Karen e Werner, que me agüentaram e me ajudaram a concluir esse trabalho, obrigado pelos Chimarrões e desculpem-me pelas cubas de eletroforese, fontes de eletroforese, termocicladores e etc.

Em especial as “Gurias” Natália e Lissandra que fizeram parte deste trabalho e tiveram a difícil tarefa de serem minhas bolsistas.

Aos professores e colegas do Laboratório de Fisiopatologia da Reprodução, em especial ao Prof. Paulo Aguiar pela ajuda nos assuntos de campo.

Aos animais que fizeram parte deste trabalho e seus proprietários por acreditarem em novas idéias.

Aos amigos e parentes, pois são nomenclaturas que se confundem, e para mim possuem o mesmo significado.

Em especial, aos meus pais que mesmo sabendo os riscos do endocruzamento apostaram na sua união.

Este trabalho foi financiado pelo CNPq, ULBRA e CAPES

Sumário

1. INTRODUÇÃO	10
1.1 BOVINUCULTURA.....	10
1.2 FISIOLOGIA DA REPRODUÇÃO	13
1.3 MARCADORES MOLECULARES	16
1.3.1 MICROSSATÉLITES.....	17
1.3.2 POLIMORFISMOS DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO - SNPS	18
1.4 MELHORAMENTO GENÉTICO.....	19
1.5 JUSTIFICATIVAS E OBJETIVOS	21
2. MATERIAIS E MÉTODOS	25
2.1 REBANHOS INVESTIGADOS	25
2.1.1 GADO GERAL.....	25
2.1.2 ABERDEEN ANGUS.....	26
2.2 MARCADORES MOLECULARES INVESTIGADOS	28
2.3. MÉTODOS LABORATORIAIS	29
2.3.1 COLETA DE AMOSTRAS E EXTRAÇÃO DE DNA.....	29
2.3.2 DETERMINAÇÃO DOS GENÓTIPOS	29
2.3 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	32
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 DIVERSIDADE GENÉTICA.....	35
3.2 ANÁLISES DE ASSOCIAÇÃO	40
3.2.1 GADO GERAL.....	40
3.2.2 ABERDEEN ANGUS.....	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48
ANEXO 1: GENETIC DIVERSITY AND MARKED ASSISTED SELECTION IN A BEEF CATTLE HERD: VALIDATION OF PREVIOUS ASSOCIATION OF MOLECULAR MARKERS AND REPRODUCTIVE PERFORMANCE.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – Aberdeen Angus

CB – Crossbred beef

CC – Condição corporal

DL – Desequilíbrio de ligação

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

FSH – Hormônio folículo estimulante

FSH β - Hormônio folículo estimulante cadeia beta

GG – Gado geral

GnRH – Hormônio Liberador de Gonadotrofinas

H – Heterozigosidade esperada

IEP – Intervalo entre Partos

IGF-I – Fator de crescimento semelhante a insulina

IGF-1R – Receptor do fator de crescimento semelhante a insulina

LD – Linkage disequilibrium

Lep – Leptina

LH – Hormônio Luteinizante

LH β – Hormônio Luteinizante cadeia beta

MAS – Seleção assistida por marcadores

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PIC – Conteúdo de informação polimórfica

PGF2 α – Prostaglandina F2 α

PO – Puro de origem

QTL – Locos para característica quantitativa

SNP – Single nucleotide polymorphism

STR – Short tandem repeat

RESUMO

A diversidade genética de seis repetições pequenas em tandem (STRs – BM4325, BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, AFZ1) e dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs – *LepSau3A1* A-B, *LepSau3A1* 1-2), próximos a genes envolvidos com a função reprodutiva, foram avaliados em fêmeas de dois rebanhos bovinos; foram também analisadas as associações com a performance reprodutiva. O primeiro, gado geral (GG), foi um rebanho híbrido, resultante do cruzamento de machos Braford com fêmeas Brangus ou Hereford, Aberdeen Angus, Normand, Limousin, Pardo Suíça e seus sintéticos. A amostra consta de vacas multíparas (n=81) submetidas a duas estações reprodutivas, uma principal de 15 de Novembro a 15 de Janeiro e uma complementar, para as vacas que permaneceram não prenhes, de 1 de Abril a 15 de Maio; após estas duas estações de entoure as vacas foram classificadas em dois grupos (férteis e subférteis), com base na ocorrência ou não de prenhez. O segundo, foi um rebanho puro de origem Aberdeen Angus (AA), as fêmeas (n=100) foram controladas diariamente para a detecção de estro, entre 15 de Novembro e 15 de Dezembro, e submetidas a inseminação artificial (IA); as vacas que apresentaram um segundo estro foram submetidas a uma segunda IA e as que não apresentaram sinais de estro sofreram indução de estro com o hormônio PGF2 α e então foram inseminadas. Os animais que não ficaram prenhes após esse período, foram submetidos a monta natural, por 15 dias e as que não emprenharam após o processo foram descartadas do rebanho.

A diversidade genética foi maior para GG do que para AA: o número de alelos variou de 2 a 13 GG e de 1 a 12 no AA, o conteúdo de informação polimórfica variou de 0,23 a 0,87 em GG, e de 0 a 0,85 em AA, e a heterozigosidade esperada variou de 27 a 89% (valor médio= 62%) em GG, e de 0 a 87% (média= 50%) em AA. Os alelos *BM4325*103*, *BMS3004*129*, *ILSTS002*137*, *LepSau3A1*A*, *LepSau3A1*1* foram mais freqüentes em ambas as amostras, enquanto *ILSTS002*135*, *IDVGA51*177*, *HEL5*149*, *AFZ1*119* foi mais comum em GG e *IDVGA51*175*, *HEL5*151*, *AFZ1*125* mais freqüente em AA.

Alguns alelos ocorreram em somente um rebanho *BM4325*107*, *BM4325*109*, *ILSTS002*133*, *HEL05*147*, *AFZ1*129* e *LepSau3A1*2* em GG e *IDVGA51*185* em AA. Não foi verificada associação significativa entre os marcadores *BM4325*, *BMS3004*, *HEL5*, *AFZ1* e *LepSau3A1* e a performance reprodutiva em ambos os rebanhos. Entretanto, os STRs *IDVGA51* e *ILSTS002*, próximos aos genes *Lep* e *LH β* , respectivamente, foram associados com a performance reprodutiva em GG, mas não em AA. Essas diferenças entre os rebanhos são provavelmente devidas ao fato de que as vacas AA resultaram de uma longa história de seleção para a melhor performance reprodutiva. Os resultados obtidos em GG confirmam a importância desses marcadores para a seleção assistida por marcadores, porém os alelos envolvidos na associação são diferentes dos previamente descritos. Estes achados sugerem a possível ocorrência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os STRs e os genes *Lep* e *LH β* , sendo o alelo envolvido no DL diferente entre populações. O presente estudo sugere a aplicação dos STRs *IDVGA51* e *ILSTS002* para se obter fêmeas reprodutivamente melhores, porém somente para rebanhos não submetidos a seleção prévia para a reprodução. Em relação ao *IDVGA51*, o uso de alelos classificados de acordo com o tamanho, demonstra ser melhor do que o uso de um alelo específico para realizar a seleção de animais com melhor performance reprodutiva.

ABSTRACT

The genetic diversity of six short tandem repeats (STRs - BM4325, BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, AFZ1) and two single nucleotide polymorphisms (SNPs - *LepSau3A1* A-B, *LepSau3A1* 1-2) linked to genes involved in reproductive function was evaluated in cows from two herds; association analysis with reproductive performance was also performed. The first herd was a crossbred beef (CB) herd (including the purebreds Hereford, Aberdeen Angus, Normand, Limousin and Brown Swiss and their synthetics and Brangus, in different proportions, mated with Braford bulls); the animals were multiparous cows (n= 81) submitted to two annual mating seasons, one major from November 15th to January 15th, and a complementary one for the cows which remain non-pregnant from April 1st to May 15th; after these two mating seasons the cows were then classified in two groups (fertile and sub fertile cows) on the basis of occurrence of pregnancy or non-pregnancy. The second herd was a pure breeding Aberdeen Angus (AA) herd (n=100); between November 15th and December 15th the animals were daily controlled to detect the onset of estrus and submitted to artificial insemination (AI); cows presenting a second estrus were submitted to a second AI and those not showing estrus signs were submitted to estrus induction with PGF2 α hormone and then inseminated. Animals not conceiving after this period were submitted to natural breeding for 15 days; those not conceiving after these processes were discarded from the herd.

Genetic diversity was higher for CB than for AA: the number of alleles ranged from 2 to 13 CB and from 1 to 12 in AA; polymorphic information content ranged from 0.23 to 0.87 in CB, and from 0 to 0.85 in AA; and expected heterozygosity ranged from 27 to 89% (mean value = 62%) in CB, and from 0 to 87% (mean = 50%) in AA. The alleles *BM4325*103*, *BMS3004*129*, *ILSTS002*137*, *LepSau3A1*A*, *LepSau3A1*1* were the more frequent in both samples, while *ILSTS002*135*, *IDVGA51*177*, *HEL5*149*, *AFZ1*119* were more common in CB and *IDVGA51*175*, *HEL5*151*, *AFZ1*125* more frequent in AA. Some alleles occurred in only one herd, *BM4325*107*, *BM4325*109*, *ILSTS002*133*, *HEL05*147*,

*AFZ1*129* e *LepSau3A1*2* in CB, and *IDVGA51*185* in AA. No association between BM4325, BMS3004, HEL5, AFZ1, and *LepSau3A1* markers and reproductive performance was detected in both herds. However, IDVGA51 and ILSTS002 STRs linked to *Lep* and *LHβ* genes, respectively, were associated to reproductive performance in CB, but not in AA. These differences among herds are probably due to the fact that AA cows result from a long history of intense selection for better reproductive performance. The results obtained in CB confirm the importance of these markers for marker-assisted selection, but the alleles involved in the association were different from those previously described. These findings suggest the possible occurrence of linkage disequilibrium (LD) between these STRs and *Lep* or *LHβ* genes, being the alleles involved in LD different between populations. The present study suggests the usefulness of IDVGA51 and ILSTS002 STRs to obtain females reproductively better, but only for herds submitted to previous selection for reproduction. In relation to IDVGA51, the use of alleles classified according to their size seem to be better than a specific allele to perform selection of animals with better reproductive performance.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Bovinocultura

As domesticações, tanto de plantas como de animais são, justificadamente, consideradas as maiores inovações culturais humanas, pois estão relacionadas com a construção de ferramentas, a conquista do fogo e o desenvolvimento da linguagem (MacHugh, 1996). Os bovinos ancestrais foram muito importantes na evolução do homem, o qual os mantém sob domesticação há nada menos que 10.000 anos, pois incrementaram sua qualidade de vida, gerando produtos para alimentação, vestimenta e trabalho como animal de tração (Fries e Ruvinsky, 1999).

As subespécies *Bos primigenius indicus* e *Bos primigenius taurus*, são as mais amplamente usadas, e possuem um antepassado comum, *Bos primigenius* o qual habitava o norte da África e Eurásia, encontrando-se extinto, na Europa, desde 1627. No Brasil, a introdução dos bovinos, ocorreu concomitantemente com a chegada dos primeiros colonizadores, que trouxeram raças de origem europeia, adaptadas ao clima temperado (*Bos primigenius taurus*), as quais tiveram que se estabelecer no clima tropical. Isto acabou gerando uma perda significativa das características produtivas e reprodutivas destes animais que foram, então, abandonados nos campos e sujeitados aos rigores dos trópicos, submetidos à seleção natural. Atualmente, podemos encontrar a herança desses rebanhos nas raças típicas ou nativas, como Curraleiro, Malabar (Giannoni e Giannoni, 1987) e Franqueiro (Steingleder et al., 2004). Esse cenário começou a mudar, durante o Brasil império, com a chegada dos primeiros zebuínos (*Bos primigenius indicus*), de origem indiana. Por se tratar de uma raça rústica e de forte adaptação climática em ambientes tropicais, o zebu, como é conhecido, levou ao desaparecimento diversas raças nativas, principalmente por competição por espaço (Giannoni e Giannoni, 1987).

No Rio Grande do Sul, a origem dos bovinos é bastante controversa, pois, não se sabe, realmente, qual povoado iniciou a criação. Inicialmente, os animais eram utilizados somente para o abate, objetivando a obtenção de couro e sebo, sendo a carne utilizada, localmente, e o restante desprezado. Mais tarde, a carne passou a ter maior valor quando começou ser salgada e transportada na forma de charque. O resultado foi uma explosão comercial, com um decréscimo repentino no tamanho das populações animais, e a necessidade de criação de novos rebanhos.

A pecuária bovina exerce um importante papel na economia do Brasil, que é considerado possuidor do maior rebanho comercial de carne bovina do mundo, com uma fatia de 28% do mercado externo (USDA, 2005). O IBGE, em 2004, estimou que o rebanho de bovinos de corte do Brasil era composto por 205 milhões de cabeças. O Brasil apresenta ainda o menor custo de produção de carne bovina, em torno US\$ 0,90/Kg (USDA, 2005) o que, em conjunto com as grandes extensões de terra, facilita o desenvolvimento desta atividade. O Rio Grande do Sul ocupa a sexta posição dentro do Brasil (IBGE, 2004) com um efetivo de 13,5 milhões de cabeças de gado (Secretaria de Agricultura e Abastecimento do Rio Grande do Sul, 2007) distribuídos por cerca de 11 milhões de hectares (aproximadamente 40% da área total do estado) e criados, principalmente, em campos nativos (Governo do Estado do Rio Grande do Sul; 2007; Carne do Pampa Gaúcho, 2007).

Apesar de a pecuária de corte, no Rio Grande do Sul, ser uma das principais fontes econômicas, com 2,6 milhões de toneladas de carne bovina abatidas por ano (ANUALPEC, 2006), apresenta dificuldades decorrentes de baixos índices de produtividade.

O principal fator limitante da rentabilidade da atividade pecuária é a baixa eficiência reprodutiva das vacas de cria (Bastos et al., 2003). O gasto energético da fêmea, no início da gestação e na manutenção da cria, não possibilita que a mesma entre em cio rapidamente o que diminui o número de crias por vaca. Assim, o prolongado período de anestro pós-parto (intervalo de tempo entre o

parto e o primeiro cio fértil), é modulado principalmente pela amamentação, nutrição e condição corporal.

As características mais comumente utilizadas para descrever a fertilidade de fêmeas são: a idade à puberdade, o número de serviços por concepção, o período de gestação, a idade ao primeiro parto e o intervalo entre partos, exigem observações rigorosas e registros precisos de datas, o que nem sempre é possível, em sistemas extensivos. O intervalo entre partos (IEP) representa uma forma simples e eficaz de medir a eficiência reprodutiva em bovinos, ao combinar num único valor, o período entre o parto e o próximo cio, o número e duração dos vários ciclos estrais até à concepção, e o tempo de gestação. O maior ou menor valor do intervalo médio entre partos de um rebanho é determinante para o maior ou menor número total de bezerros desmamados e conseqüentemente vendidos. De acordo com Cachapuz (1991) e Lobato (1985) somente 20 a 25% das vacas adultas e 6 a 15% das novilhas de primeira cria conceberão na próxima temporada reprodutiva. Assim, a maioria das fêmeas bovinas produziria apenas um bezerro a cada dois anos, com um intervalo médio parto-concepção em torno de 300 dias (Moraes, 1999; Neves et al., 1999). Outro fator limitante é que, na maioria das vezes, o produtor realiza apenas um período de inseminação (natural ou artificial) por ano, cerca de três meses após o parto; as fêmeas que não apresentarem cio fértil neste momento, permanecem não gestantes no período e só terão oportunidade de conceber na próxima temporada reprodutiva, um ano depois, quando não são descartadas do rebanho.

Outros fatores também limitam a produção de carne no Brasil, como a mortalidade de bezerros, a manifestação tardia de puberdade e primeiro parto das fêmeas, o abate tardio dos animais (Marson, 2005) a idade de desmame e o controle de ecto e endoparasitas (Lobato, 1985).

A eficiência reprodutiva dos rebanhos não depende apenas do sucesso fisiológico do sistema reprodutivo, mas também de outras rotas metabólicas. Um mecanismo eficiente de conversão alimentar é necessário para que os animais possam chegar às condições corporais adequadas, o que gera matéria prima para a produção de hormônios e conseqüentemente retorno da atividade cíclica

ovariana, estabelecimento e manutenção da gestação. Fisiologicamente, o metabolismo basal, o crescimento e a manutenção das reservas corporais têm prioridade sobre a reprodução. Embora a suplementação alimentar seja uma maneira adequada de se melhorar a taxa de concepção em bovinos de corte (Yavas e Walton, 2000), outras estratégias que visem o incremento da fertilidade, em bovinos, podem proporcionar ganhos expressivos em termos de aumento da lucratividade do sistema de produção.

1.2 Fisiologia da Reprodução

O controle hormonal do ciclo estral, em mamíferos, é baseado em um eixo central hipotálamo-hipófise anterior-ovário (Figura 1).

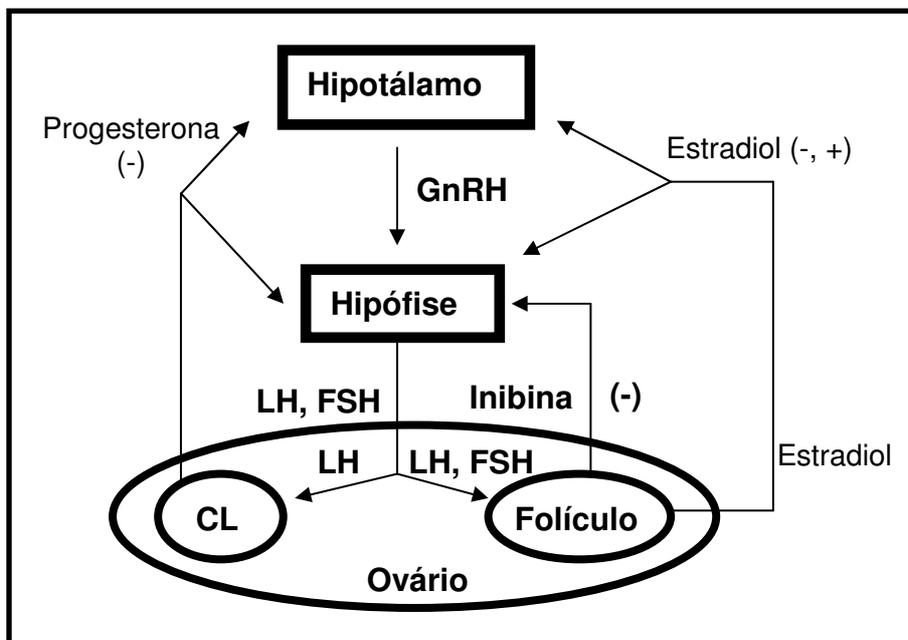


Figura 1: Interação hormonal entre os sistemas nervoso central e reprodutivo (embasado em Hafez,1988).

O ciclo estral dos mamíferos é constituído por diferentes hormônios: o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) produzido pelo hipotálamo, age sobre a hipófise anterior estimulando a liberação dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH).

O crescimento de folículos ovulatórios, em bovinos, é caracterizado por ondas foliculares, compreendidas pelos processos de recrutamento, seleção, dominância, divergência e, culminando, com atresia ou ovulação (Martin et al., 1988; Ginther et al., 1989). O folículo dominante se desenvolve por ação do FSH que atua, principalmente, estimulando o crescimento folicular. O LH é produzido em pulsos e em conjunto com o FSH induz a maturação dos folículos. À medida que o folículo se desenvolve ocorre a secreção de estrógenos, pelo folículo, sendo a ruptura do folículo e ovulação decorrentes de uma onda pré-ovulatória de LH. (Hafez, 1988). As ondas de LH ocorrem concomitante com pulsos de GnRH, esse último controlado pela secreção de estrógeno e progesterona e suas interações com neuro-hormônios (Cupp et al., 1995; Schams e Berisha, 2002).

Além do FSH e LH, a seleção da dominância folicular é regulada também pela inibina, que atua diretamente nas células da teca e granulosa, modulando o desenvolvimento folicular e a esteroidogênese (Gonçalves, 2004).

No início do período pós-parto, o eixo hipotálamo-hipófise anterior responde a um “feedback” negativo causado pelo efeito da placenta e de esteróides ovarianos, levando à supressão da liberação de FSH, ao acúmulo deste hormônio na hipófise anterior e reduzindo os estoques de LH (revisado por Yavas e Walton, 2000). No período pós-parto precoce (10-20 dias), as ondas foliculares recomeçam, mas os folículos dominantes falham em ovular devido à baixa frequência de pulsos de LH, em decorrência da diminuição dos estoques desse hormônio na hipófise anterior, que se restabelecem entre 15 e 30 dias pós-parto. A presença da cria com a vaca contribui para o aumento do período de anestro pós-parto devido ao seu efeito negativo da amamentação sobre a liberação de LH (Williams et al., 1996). O aumento da frequência de pulsos de LH é fundamental para o desenvolvimento folicular final, e o processo de ovulação.

Outros hormônios também parecem estar envolvidos no retorno ao cio, entre eles a leptina. Esta proteína é um hormônio que atua no controle da ingestão alimentar, pois é produzida pelos adipócitos e detectada por receptores especiais no cérebro, levando o hipotálamo a sinalizar a saciedade e aumentar o metabolismo de gordura (Auwerx e Staels, 1998; Barsh et al, 2000). Este

hormônio é o produto do gene *obese*, que foi inicialmente descoberto no genoma de camundongos (Zhang et al, 1994); em bovinos apresenta 3 exons e 2 introns, e traduz uma proteína funcional, de 16 kDa e 167 aminoácidos (He et al, 1995; De la Brousse et al, 1996). Estudos demonstram que além de contribuir na regulação do metabolismo energético e comportamento alimentar, atua na reprodução, em várias espécies (Gonçalves, 2004). Conforme Diskin et al. (2003) a leptina atua no hipotálamo e interfere na produção de LH e FSH, estando o decréscimo de expressão de leptina diretamente relacionado a menores níveis de fator de crescimento semelhante a insulina (IGF-I) e LH circulantes. O IGF-I é um polipeptídeo com a estrutura molecular semelhante à da insulina, que desenvolve um importante papel no crescimento e pode ter efeitos anabólicos nos adultos. Sua produção é estimulada pelo hormônio do crescimento (GH) e pode ser retardada por baixa nutrição, má sinalização do GH ou falha na cascata de sinalização de sua expressão.

O estado nutricional e a amamentação são também importantes, na retomada da atividade cíclica ovariana. A nutrição pode ser considerada como fundamental, pois a disponibilidade energética afeta a secreção do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) e das gonadotrofinas FSH e o LH, tendo possivelmente como mediadores fator de crescimento similar a insulina-(IGF-I) e a insulina, (Freitas e González, 2002).

Segundo Montiel e Ahuja (2005), o balanço energético e a sucção do leite estão relacionados com o tempo de anestro, sendo que animais com balanço energético negativo levam mais tempo para retornar ao estro, e que o ato da sucção interfere na liberação de GnRH pelo hipotálamo e, conseqüentemente, diminui o pulso de LH fundamental para o recrutamento do oócito e retorno ao estro. Entretanto não só a amamentação, mas o reconhecimento da cria pela mãe através de estímulos olfatórios e visuais é também fator negativo de retorno ao estro.

Vacas de corte com baixa condição corporal (CC) ao parto têm um intervalo mais longo entre o parto e a primeira ovulação que vacas com CC alta. O escore de CC é um método de classificação visual das condições nutricionais, em uma

escala que vai de 1 - muito magra até 5 – obesa (Cachapuz, 1991). Na parição, o CC é correlacionado positivamente com o desenvolvimento folicular precoce no pós-parto (Ryan et al., 1994), com o conteúdo pituitário de LH aos 30 dias pós-parto (Connor et al., 1990), com concentrações de IGF-I circulantes e freqüências de pulsos de LH (Bishop et al., 1994), com a freqüência de pulsos de LH e com o desenvolvimento de folículos estrogênio-ativos (Pinto-Andrade et al., 1995).

1.3 Marcadores Moleculares

Nos últimos quarenta anos, testes moleculares têm sido realizados, com o intuito de decifrar a estrutura genética e história evolutiva de diversos organismos biológicos. O gado domesticado, por exemplo, tem sido sujeito de numerosos estudos visando inventariar a variação genética intra e interpopulacional, o que têm esclarecido relações bioquímicas, citológicas e moleculares das diferentes raças (MacHugh, 1996).

A partir dos anos 80, o esforço somado de vários pesquisadores na busca do seqüenciamento de diferentes genomas, tem gerado subsídios científicos para a formação de mapas genéticos complexos; com base neles, é possível localizar genes específicos ou regiões próximas a genes que permitam monitorar características de interesse econômico, e assim desenvolver metodologias que permitem a identificação de genes candidatos e busca de locos para características quantitativas, QTLs.

Em bovinos, desde 1993, diversos estudos têm gerado mapas genéticos, culminando com a publicação do rascunho do genoma bovino em 2004. A partir do advento de mapas genéticos saturados, os marcadores genéticos têm sido muito utilizados, na identificação de parentesco e no monitoramento da introgressão gênica.

Os avanços na descoberta de marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento em animais possibilitou a descoberta, em bovinos, de polimorfismos e variantes moleculares nos genes de diversos hormônios e

receptores hormonais (Pringle et al., 1997; Campagnari, 2002; Liefers et al., 2002; Oliveira et al. 2002; Almeida, 2003; Li et al., 2004; Curi et al., 2005; Di Stasio et al., 2005; Duarte et al. 2005; Weimer et al. 2007) e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas, como por exemplo, as da calpaína e a calpastatina relacionadas à maciez da carne (Barendse, 1997; Page et al., 2002; Grisart et al., 2004, Casas et al., 2005).

Vários tipos de marcadores moleculares podem ser empregados na seleção animal. Neste trabalho, serão discutidos apenas aqueles aqui utilizados: os microssatélites ou repetições curtas em tandem (STR, short tandem repeats) e os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP, single nucleotide polymorphisms).

1.3.1 Microssatélites

Os microssatélites são caracterizados por repetições de seqüências nucleotídicas, de 2-6 pares de bases, em tandem, que podem estar flanqueando genes ou dentro dos mesmos e são ideais para estudos genéticos, pois são altamente polimórficos e se distribuem por todo o genoma (Schroth et al, 1992; Tautz, 1993; Li et al, 2004). Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada loco é provavelmente resultante de erros no deslocamento da DNA polimerase “Slippage” durante a replicação do DNA (Regitano e Coutinho, 2001).

Comings (1998) propôs que microssatélites exerçam efeito sobre a expressão dos genes aos quais eles estão associados, sendo esta ação dependente do tamanho da repetição. Isso se baseia na observação de que seqüências ricas em purinas e pirimidinas alternadas, (CA)_n, como os microssatélites, apresentam a capacidade de formar o DNA-Z em condições fisiológicas. Como há uma tendência para as seqüências de DNA-Z não se distribuírem ao acaso, e sim, se concentrarem nas regiões de iniciação da transcrição, os microssatélites por se localizarem também nestas regiões, teriam

um papel potencial na regulação gênica. Para Schroth et al. (1992) a formação de DNA-Z pode influenciar a expressão do gene por facilitar o contato com fatores de transcrição, pois esta conformação expõe as bases da molécula.

Segundo Li et al. (2004) as regiões de microssatélites podem ocorrer em regiões codificadoras de proteínas, em regiões 3' ou 5' não traduzidas (UTRs- Untranslated Regions) e em introns, exercendo forte influência sobre a expressão gênica, não importando se a localizados a 5' ou a 3' dos genes ou dentro dos mesmos, em introns ou exons. Esses autores mostraram que os microssatélites podem influenciar a expressão do gene por levar à perda ou ganho de função gênica, por afetar a transcrição ou a tradução, se localizados a 5' do gene, por levar a ocorrência de "slippage" na duplicação do DNA, por afetar o "splicing" do pré mRNA e o transporte para o citoplasma (se localizados em introns) ou por interferir na formação de heterocromatina.

Os microssatélites podem ser empregados para a identificação de regiões cromossômicas onde se localizam QTLs. A identificação de microssatélites por técnica de PCR pode ser feita com o uso de iniciadores (*primers*) complementares às seqüências que flanqueiam o microssatélite, permitindo gerar padrões alélicos que se associados a dados fenotípicos de interesse, possibilitarão a seleção precoce de seus portadores. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos locos microssatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente (Regitano e Coutinho, 2001).

1.3.2 Polimorfismos de um único nucleotídeo - SNPs

Os recentes avanços dos sistemas de seqüenciamento automatizado têm possibilitado a identificação de variações individuais, resultantes, por exemplo, de mutações de ponto, substituições, deleções e adições de um nucleotídeo que, uma vez caracterizadas, constituem os marcadores SNPs. Conhecendo-se a

mutação, pode-se, após a amplificação do DNA, genotipar o SNP com o uso de endonucleases específicas. Os SNPs são marcadores atraentes por se localizarem em qualquer parte do genoma podendo ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente (Regitano e Coutinho, 2001). A maioria dos marcadores SNPs são dialélicos, resultando em pouca informação por loco. Para mapeamento, cinco marcadores SNPs fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco microssatélite, de tal forma que os mapas de SNPs devem ter densidade maior do que de microssatélite (Beuzen et al., 2000)

1.4 Melhoramento Genético

Há muitos anos o homem vem realizando seleção animal, usando como base marcadores fenotípicos, direcionando a seleção para as melhores interações genótipo ambiente. Porém, o sistema depende da avaliação das características fenotípicas, havendo a desvantagem de esperar o desenvolvimento natural do animal a ser avaliado, para a realização das mensurações. Essa metodologia possui um forte componente de subjetividade uma vez que está sujeita a erros humanos e estatísticos, apesar de ser uma técnica amplamente usada para o melhoramento até o presente e ter obtido grande sucesso até então (Garcia, 2006).

Uma possibilidade de ampliar o processo seletivo é aliar as vantagens da seleção clássica com o uso de marcadores moleculares, que podem indicar precocemente animais que poderão, potencialmente, acrescentar mais ganhos ao rebanho em termos da característica de interesse. A principal vantagem da utilização de ferramentas moleculares é a precocidade de avaliação dos animais para as características específicas, uma vez que esta tecnologia permite análises dos indivíduos imediatamente após o nascimento, ou até mesmo durante as fases embrionárias, podendo inclusive ser incorporada a programas de produção *in vitro* e transferência de embriões, agilizando e otimizando os sistemas de seleção genética e produção animal (Garcia, 2001; Garcia e Porto-Neto, 2006).

A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo, sendo conseqüentemente controlado por vários genes, cujos efeitos se somam para construir o fenótipo final. Entretanto alguns genes apresentem papel majoritário na expressão dessas características, por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados, assim, como genes principais (Montaldo e Meza-Herrera, 1998).

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

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

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

Estes programas consistem de três fases, a primeira, de detecção, procura detectar marcadores moleculares associados a um gene candidato ou a um locus quantitativo, e os efeitos dos alelos do marcador na característica desejada são mensurados; a segunda, de validação, os marcadores previamente detectados são re-avaliados em outras populações; e a terceira, de implementação, os marcadores identificados como associados à característica de interesse são utilizados para prever o mérito de indivíduos, na população (Davis e DeNise 1998).

1.5 Justificativas e Objetivos

No melhoramento de bovinos a diferença de desempenho reprodutivo entre animais, mantidos em um mesmo plano nutricional, indica a existência de variabilidade genética (Oliveira et al., 2002). Essa melhor eficiência reprodutiva, no entanto, ocorre muitas vezes às expensas do sacrifício de outras características de interesse, tais como habilidade materna (Hetzl et al., 1989).

Segundo Garcia (2006) faz-se necessária a validação do efeito desses marcadores nas distintas populações de bovinos (rebanhos) existentes no Brasil, objetivando a melhor compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos com essas manifestações, que ainda estão longe de serem simples e diretamente explicados.

Em estudos anteriores, o grupo coordenado pela professora T. A. Weimer, verificou, na fase de detecção da MAS, a associação de vários marcadores moleculares com a eficiência reprodutiva, em um rebanho sintético Brangus-Ibagé (5/8 Aberdeen x 3/8 Nelore). Para tanto foram analisados microssatélites e/ou SNPs (Single Nucleotide Polimorphisms) ligados aos genes LH β (BM3004, ILSTS002, TGLA227), FSH β (ILSTS027, BM4325, MBO22), ESTR (MM12, ETH225) IGF1R (HEL5, TGLA122, AFZ1), Inibina α (BMS1824), GABA R (UW53), NPYR (URB002), GH (HEL10), Leptina (Lep*Sau3A1A/B*, Lep*Sau3A11/2*,

LepKpn2I, LepBsaAI, LepHphI, LepT945M, BM1500, IDVGA-51, RM088, BM1074, BM6315, BMS3013) e LEPR (BM7225, BMS694, BM2145).

Para o gene LH β , Weimer et al. (2007) detectaram associação positiva entre os marcadores ILSTS002 e BMS3004 com o intervalo entre partos (IEP). Animais portadores de um alelo *ILSTS002*135* apresentaram um IEP de 39 dias maior, em relação aos outros animais e os heterozigotos no loco BMS3004 apresentaram um IEP em torno de 35 dias menor. Em relação ao gene FSH β , Duarte et al. (2005), demonstraram que animais portadores do alelo *BM4325*101* apresentavam IEP mais curto. Para o gene IGF1R Oliveira et al. (2002) observaram maior IEP nos homozigotos para alelos longos no locus HEL5 e menor IEP nos homozigotos para alelos curtos no AFZ1. No gene da Leptina, Almeida et al. (2003) verificaram que os alelos *IDVGA51*181* e *LepSau3A1*2* aumentaram o IEP. Para que essas associações possam, posteriormente, ser utilizadas, em um esquema seletivo, faz-se necessário a execução da segunda fase da MAS, ou seja, a validação das mesmas em outras populações.

Dentro deste contexto, este trabalho tem como:

Objetivo geral:

Validação das associações previamente detectadas entre marcadores moleculares e desempenho reprodutivo, em dois rebanhos bovinos com diferentes graus de fertilidade .

Objetivos específicos:

1) Avaliação das frequências alélicas e genotípicas dos marcadores moleculares BMS3004 e ILSTS002 (em sintenia com o gene LH β), BM4325 (em sintenia com o gene do FSH β), HEL5 e AFZ1 (em sintenia com o gene IGF1R) , IDVGA51 e *LepSau3A1* (em sintenia com o gene da leptina), em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul;

2) Análise da ocorrência de associações entre esses marcadores e o desempenho reprodutivo.

MATERIAIS E MÉTODOS

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Rebanhos investigados

2.1.1 Gado geral

O gado geral é composto por diferentes raças, adaptadas ao local de criação e em geral resulta dos cruzamentos entre indivíduos puros-sangues dando origem a animais híbridos. Segundo Oliveira et al. (2002) nenhuma raça é perfeitamente adequada a todos os ambientes de produção, sendo o cruzamento entre raças uma forma simples e rápida de utilizar atributos desejáveis, através da heterose e gerar uma combinação ideal de determinadas características com um dado ambiente; isso que será mais pronunciado quanto mais geneticamente diferentes forem as raças ou linhagens envolvidas no cruzamento e mais adversas forem as condições de manejo, o que provavelmente tenha reflexo na sua maior plasticidade em respostas aos fatores ambientais.

O grau de mistura nestes animais é muito variado de região para região, pois depende muito da vontade do criador e de suas preferências em utilizar uma raça ou outra como principal formadora do rebanho. Normalmente, estes animais não passam por grandes programas de melhoramento, pois, em geral são rapidamente direcionados ao abate.

O rebanho gado geral, aqui investigado, é formado por animais provenientes da região da fronteira sul, do município de Bagé, resultantes de cruzamentos de touros Bradford com vacas de diferentes raças (Hereford, Aberdeen Angus, Normanda, Limousin, Pardo Suíça e seus sintéticos e Brangus). A amostra (n=80) é composta por vacas multíparas (com idades que variam de 4 a 6 anos), com CC modal, aos 60-81 dias do pós-parto, de 3 em uma escala que varia de 1 - muito magra a 5 - obesa (Cachapuz, 1991). Os animais foram criados em condições extensivas, com uma densidade populacional de 0,5 - 0,7

animal/hectare, em campo nativo, composto principalmente por *Paspalum* sp e *Axonopus* sp. Os animais foram submetidos a uma estação anual de entouramento de 15 de Novembro a 15 de Janeiro e as vacas que permaneceram vazias foram submetidas a uma segunda estação de entoure de 1º de Abril a 15 de Maio. No final das duas estações reprodutivas as vacas foram classificadas em dois grupos quanto à ocorrência de gestação (férteis e subférteis).

2.1.2 Aberdeen Angus

A raça Aberdeen Angus é oriunda da Escócia e seu nome foi tomado dos condados onde começou o seu desenvolvimento: Aberdeen e Angus. A história registra a existência dos "mochos pretos", cuja origem é tão remota que não é possível precisar como e quando apareceram. Tornaram-se famosos pela excelente qualidade de carne, rapidez de engorde e singular rusticidade. No início de 1800 teve início a expansão da raça com a seleção para o aperfeiçoamento de características produtivas, tendo como critérios primordiais de seleção a precocidade e a produção de carne, segundo a Associação Brasileira de Angus (ABA, 2007).

O Aberdeen Angus moderno caracteriza-se por sua fertilidade, longevidade, precocidade, rusticidade e facilidade de parto, além da ótima qualidade de carne. Devido à grande pressão de seleção é esperado que populações como a do Aberdeen Angus apresentem uma heterozigidade baixa, pois tratam-se de animais que vêm sendo submetidos a programas de melhoramento muito rigorosos há mais de duas centenas de anos. Possui seus principais centros criatórios estabelecidos nos Estados Unidos da América, Canadá, Argentina, Austrália, Inglaterra e Nova Zelândia, estando, porém, espalhada por todo o mundo (ABA, 2007).

O primeiro reprodutor Aberdeen Angus a entrar no Brasil foi importado do Uruguai para Bagé, em 1906, (ABA, 2007).

O rebanho Puro de origem (PO) Aberdeen Angus, analisado neste trabalho (n=100), é composto por animais de elite criados em condição intensiva, e que sofreram seleção em busca da melhor performance reprodutiva. As vacas são multíparas (com idades que variam de 14 meses a 12 anos), com uma CC modal, no pós-parto de 4 na escala descrita por Cachapuz (1991). Os exemplares foram todos criados em pastagens cultivadas de inverno e verão com *Cynodon dactylon* e *Lolium multiflorum*, padronizando, assim, o efeito de fatores ambientais. As mães foram mantidas em piquetes separados de acordo com o sexo da cria; os produtos de sexo masculino receberam suplementação alimentar (“creep feeding”), diminuindo, assim, o desgaste materno. Essa prática de manejo consiste no fornecimento de ração, em cochos onde somente os terneiros tenham acesso. O objetivo dessa prática é de reduzir a frequência do consumo de leite pelo terneiro, permitindo o incremento da condição corporal da vaca, sem prejuízo do crescimento e desenvolvimento do lactente (Gottschall, 2002). No período de reprodução, de aproximadamente 60 dias (15 de Novembro a 15 de Janeiro), as fêmeas foram controladas diariamente para a detecção de manifestação de estro e então inseminadas; os animais que retornaram ao estro foram re-inseminadas. Aquelas que não mostraram sinal de estro, após 7 dias do início da avaliação, foram submetidas à sincronização de estro, com o uso do hormônio PGF2 α . As fêmeas que retornaram ao estro novamente foram destinadas à monta natural com touros comprovadamente férteis. Todas as fêmeas que após a temporada reprodutiva de 60 dias não se encontravam prenhes foram descartadas da propriedade.

2.2 Marcadores Moleculares Investigados

Neste trabalho foram investigados seis STRs (BM4325, BMS3004, ILSTS002, IDVGA-51, HEL5 E AFZ1) e dois SNPs, ambos no gene *obese* e identificados pela mesma endonuclease (Lep *Sau3A1* 1/2 e Lep *Sau3A1* A/B).

BM4325 localiza-se na posição 59.9 cM do cromossomo BTA15 (Kappes et al., 1997; Stone et al., 1997), é um dinucleotideo (CA)_n, encontrando-se a uma distância de 26.1 cM a 3' do gene FSH, localizado na posição 37.8 cM do mesmo cromossomo. BMS3004 está localizado na posição 1.7 cM do cromossomo BTA18 (Stone et al., 1996; Kappes et al., 1997), é um trinucleotideo (CCA)_n que se encontra a uma distância de 46.5cM a 5' do gene LH, localizado na posição 48.2 cM do mesmo cromossomo. ILSTS002 está localizado na posição 55.9 cM do cromossomo BTA18 (Kemp et al., 1992), é um dinucleotideo (CA)_n que se encontra a uma distância de 7.7 cM a 3' do gene LH. IDVGA-51 é um dinucleotideo (CT)_n que se encontra na posição 84 cM do cromossomo BTA4 (Kappes et al., 1997), a uma distância de 3 cM a 5' do gene *obese*, localizado na posição 87 cM do mesmo cromossomo. HEL5 está mapeado na posição 13 cM do cromossomo BTA21 (Bishop et al., 1994), é um dinucleotideo (CA)_n que se encontra na mesma posição do gene IGF1R. E o STR AFZ1 está localizado na posição 68 cM do cromossomo BTA21 (Jorgensen et al., 1996), é um dinucleotideo (CA)_n que se encontra a uma distância de 49 cM a 3' do gene IGF1R.

Os dois SNPs Lep *Sau3A1* estão localizados no segundo intron do gene *obese*, no cromossomo BTA4 (Pomp et al., 1997; Wilkins e Davey., 1997); podem ser identificados pelas enzimas de restrição *Sau 3A1* ou *Mbo I*.

2.3. Métodos Laboratoriais

2.3.1 Coleta de amostras e Extração de DNA

O sangue foi obtido a partir das veias caudal ou jugular com anti-coagulante, refrigerado e transportado para o Laboratório de Biotecnologia do Hospital Veterinário da ULBRA. As amostras foram armazenadas até o momento da extração do DNA que foi realizada conforme método de Miller et al. (1988).

2.3.2 Determinação dos Genótipos

Todos os microssatélites foram investigados através da amplificação do DNA pela reação em cadeia da polimerase (**P**olymerase **C**hain **R**eaction), com técnica padrão e com “primers” e temperaturas de anelamento específicas (Tabela 1). As reações tiveram um volume final de 25µl e continham 50ng de DNA.

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

Para a análise dos SNPs o produto de amplificação que apresenta dois fragmentos (400 e de 690 pb) foi clivado com a endonuclease *Sau3A1* (Promega), conforme o protocolo do fabricante. A endonuclease cliva os dois fragmentos permitindo a identificação de dois polimorfismos: no fragmento de 400 bp a ausência do sítio de restrição corresponde ao alelo A, enquanto no alelo B, a *Sau3A1* gera dois produtos, de 310 e 90pb. O fragmento de 690 pb é clivado nos portadores do alelo 2, produzindo produtos de 470 e 220 bp, sendo o alelo 1 correspondente à ausência de sítio de restrição. Os produtos de clivagem foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10,5 %, não desnaturante, com

tampão de TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) pH 8,3, 300 V, 10 mA por aproximadamente 24 hs (Lahiri et al., 1997).

Tabela 1: Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo, seqüências dos primers, tamanhos esperados dos produtos de amplificação, temperatura de anelamento (TA) e referências.

Marcadores	Cromossomo.	Gene Alvo	Sequência do Primers	Produtos (pb)	TA	Referências
BM4325	15	FSH β	F- 5'AGA GTC AGA CAG GAC TGA GCG 3'	97-101	64-	Kappes et al., 1997
			R- 5'CTG TAA CTT GCA AAT GCA AAT GTC TCG 3'	103-117	54 ^o c ^a	Stone et al., 1997
ILSTS002	18	LH β	F- 5'TCT ATA CAC ATG TGC TGT GC 3'	123-137	54 ^o c	Kemp et al., 1992
			R- 5'CTT AGG GGT GAA GTG ACA CG 3'			
BMS3004	18	LH β	F- 5'GGA CAG AGG AGC CTG GTT G 3'	129-138	56 ^o c	Stone et al., 1996
			R- 5'AGT TGC GTT GTT CAT CAT TCC 3'			Kappes et al., 1997
Lep <i>Sau3A1</i>	4	Leptina	F- 5'GTC ACC AGG ATC AAT GAC AT 3'	A/B :400	54 ^o c	Pomp et al., 1997
			R- 5'AGC CCA GGA ATG AAG TCC AA 3'	1/2: 690		Wilkins e Davey., 1997
IDVGA51	4	Leptina	F- 5'ATG GCA ATA TTT TGT TCT TTT TC 3'	175-183	50 ^o c	Kappes et al., 1997
			R- 5'ATT CCT TGA TGG TCT AAT GGT TA 3'			
HEL5	21	IGF-IR	F- 5'GCA GGA TCA CTT GTT AGG GA 3'	147-157	58 ^o c	Bishop et al., 1994
			R- 5'AGA CGT TAG TGT ACA TTA AC 3'	159-169		
AFZ1	21	IGF-IR	F- 5'TTG GAC GAC AAA ACT CAC GG 3'	151-121	50 ^o c	Jorgensen et al., 1996
			R- 5'GTG GCT GGA CTG GTC TGG TT 3'	123-129		

^a PCR com "touchdown".

2.3 Análises Estatísticas

As freqüências alélicas e genotípicas foram computadas por contagem direta. A heterozigosidade esperada (H) e o conteúdo de informação polimórfica (PIC) foram estimados de acordo com Nei (1978) e Botstein et al. (1980).

As análises de associação foram realizadas por comparação entre as freqüências genotípicas ou alélicas, e o parâmetro reprodutivo.

No gado geral os animais férteis e subférteis foram comparados entre os genótipos ou alelos, utilizando o teste exato de Fisher.

No Aberdeen Angus as comparações foram feitas entre os genótipos ou alelos e a média do intervalo entre partos (IEP). Como esta variável não apresentou distribuição normal utilizou-se a análise de variância não paramétrica de Kruskal-Wallis.

Nas duas amostras, as análises foram realizadas em duas etapas: inicialmente, realizando as comparações previamente descritas (Tabela 2; Almeida et al., 2003; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Weimer et al., 2007). Em um segundo momento, os genótipos ou alelos foram comparados, ao acaso, com o grupo de fertilidade (gado geral) ou IEP (A. Angus). Nos dois casos, quando uma associação positiva foi detectada, o genótipo ou alelo desviante foi comparado com os demais, usando os mesmos testes estatísticos. Quando havia mais de um alelo envolvido nas associações, os mesmos foram agrupados em classes pelo tamanho, em alelos curtos ou longos. Esta metodologia foi utilizada para dois marcadores, IDVGA51 (alelos curtos: 173-177 pb; alelos longos: 179-183 pb) e ILSTS002 (alelos curtos: 127-137 pb; alelos longos: 139-143 pb).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS® para Windows™ (SPSS Inc, Chicago - Illinois, USA), versão 10.0.5.

Tabela 2: Comparações realizadas entre o grupo de fertilidade (fértil, subfértil, gado geral) ou IEP (A. Angus) conforme previamente descrito.

Marcador	Comparações realizadas	Referência
STR		
BM4325	Presença do alelo *101 e ausência do alelo *101	Duarte et al. (2005)
ILSTS002	Presença do alelo *135 e ausência do alelo *135	Weimer et al. (2007)
BMS3004	Heterozigotos e Homozigotos	Weimer et al. (2007)
IDVGA51	Presença do alelo *181 e ausência do alelo *181	Almeida et al. (2003)
HEL5 ^a	Homozigotos para alelos longos e outros genótipos	Oliveira et al. (2005)
AFZ1 ^b	Homozigotos para alelos curtos e outros genótipos	Oliveira et al. (2005)
SNP		
LepSau3A1 1/2	Homozigotos 11 e outros genótipos	Almeida et al. (2003)

^a: Alelos curtos: 147-157; alelos longos: 159-169; ^b Alelos curtos: 115-121; alelos longos: 123-129.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Diversidade Genética

As freqüências alélicas dos STRs e SNPs analisados nas amostras de gado geral e Aberdeen Angus, estão apresentadas na Tabela 3. Devido a problemas de amplificação em algumas amostras o número de indivíduos analisados variou entre os sistemas.

O número de alelos detectados variou de 2 a 13 no gado geral e de 1 a 12 no A. Angus, sendo *BM4325*103*, *BMS3004*129*, *ILSTS002*137*, *LepSau3A1*A* e *LepSau3A1*1* os mais freqüentes nas duas amostras e *ILSTS002*135* apresentando alta freqüência também no gado geral. Nos demais sistemas, os alelos mais comuns variaram entre as populações: *IDVGA51*177*, *HEL5*149* e *AFZ1*119* foram mais freqüentes no gado geral e *IDVGA51*175*, *HEL5*151* e *AFZ1*125* no Aberdeen Angus. Adicionalmente, alguns alelos foram exclusivos de uma das amostras: *BM4325*107*, *BM4325*109*, *ILSTS002*133*, *HEL5*147*, *AFZ1*129* e *LepSau3A1*2*, no gado geral e *IDVGA51*185*, em A. Angus.

Analisando-se os parâmetros de diversidade genética (Tabela 3) verifica-se que o conteúdo de informação polimórfica e a heterozigosidade foram maiores no gado geral (PIC vai 0,23 a 0,87, H oscila entre 27% e 89% com média de 62%) que em A. Angus (PIC = 0 a 0,85, H = 0 – 87%, com média de 0,50).

Essas diferenças, tanto na ocorrência de alelos exclusivos quanto nos valores de PIC e H refletem, provavelmente, por um lado, o grau de mistura existente no rebanho gado geral, pois, esse rebanho é resultante do cruzamento de diversas raças e, por outro, na intensa seleção aplicada sobre o rebanho Aberdeen Angus, uma raça pura, submetida a tal processo desde 1800.

Quando se comparam os dados do presente trabalho com os de outras populações brasileiras investigadas para os mesmos marcadores (Tabela 4) verifica-se que os alelos *BM4325*109*, *AFZ1*129*, *IDVGA*185* e *HEL5*171* não haviam sido observados em outros rebanhos.

Tabela 3: Freqüências alélicas dos marcadores moleculares nas diferentes amostras de gado de corte

Marcadores Amostras (n)	Alelos														H	PIC	
STRs																	
BM4325	*97	*99	*101	*103	*105	*107	*109	*111									
Gado geral (76)	0,01	0,03	0,13	0,5	0,25	0,04	0,03	0,01								0,67	0,62
A. Angus (125)	0,01	0,08	0,35	0,5	0,04	0,01	0,01	0,00								0,61	0,54
BMS3004	*129	*132	*138														
Gado geral (81)	0,66	0,29	0,05													0,48	0,40
A. Angus (125)	1																
ILSTS002	*127	*129	*131	*133	*135	*137	*139	*141	*143	*145							
Gado geral (79)	0,01	0,01	0,04	0,11	0,27	0,28	0,06	0,18	0,03	0,01						0,80	0,76
A. Angus (120)	0,03	0,05	0,06	0,00	0,22	0,4	0,09	0,14	0,01	0,00						0,76	0,72
IDVGA51	*173	*175	*177	*179	*181	*183	*185										
Gado geral (81)	0,09	0,27	0,30	0,09	0,09	0,14	0,02									0,79	0,76
A. Angus (121)	0,03	0,64	0,17	0,03	0,01	0,10	0,02									0,54	0,50
HEL5	*147	*149	*151	*153	*155	*157	*159	*161	*163	*165	*167	*169	*171				
Gado geral (72)	0,06	0,18	0,15	0,10	0,03	0,02	0,02	0,04	0,09	0,12	0,10	0,06	0,03			0,89	0,87
A. Angus (113)	0,00	0,08	0,23	0,07	0,04	0,03	0,03	0,02	0,11	0,19	0,13	0,05	0,02			0,87	0,85
AFZ1	*111	*113	*115	*117	*119	*121	*123	*125	*127	*129							
Gado geral (51)	0,01	0,05	0,18	0,06	0,21	0,13	0,16	0,14	0,05	0,01						0,85	0,83
A. Angus (52)	0,00	0,01	0,28	0,07	0,05	0,06	0,10	0,30	0,13	0,00						0,79	0,76
SNPs																	
LepSau3A1 (A/B)	* A	* B															
Gado geral (76)	0,78	0,22														0,34	0,28
A. Angus (78)	0,62	0,38														0,47	0,35
LepSau3A1 (1/2)	* 1	* 2															
Gado geral (76)	0,84	0,16														0,27	0,23
A. Angus (78)	1																

(n) tamanho amostral

Tabela 4: Frequências alélicas em diferentes rebanhos de gado criados no Rio Grande do Sul

STRs Rebanhos(n)	Alelos													H	Referências		
BM4325	*97	*99	*101	*103	*105	*107	*109	*111									
B. Ibagé (106)	0,01	0,04	0,42	0,41	0,06	0,06	0,00	0,00						0,65	Duarte et al., 2005		
Gado geral (76)	0,01	0,03	0,13	0,5	0,25	0,04	0,03	0,01						0,67	Presente trabalho		
A. Angus (125)	0,01	0,08	0,35	0,5	0,04	0,01	0,01	0,00						0,61	Presente trabalho		
BMS3004	*129	*132	*138	*141													
B. Ibagé (163)	0,64	0,31	0,05	0,00										0,49	Weimer et al., 2007		
Crioulo (73)	0,59	0,16	0,13	0,12										0,59	Steingleder et al., 2004		
Gado geral (81)	0,66	0,29	0,05	0,00										0,48	Presente trabalho		
A. Angus (125)	1														Presente trabalho		
ILSTS002	*121	*123	*125	*127	*129	*131	*133	*135	*137	*139	*141	*143	*145				
B. Ibagé (158)	0,01	0,01	0,08	0,02	0,04	0,15	0,25	0,25	0,11	0,06	0,02	0,00	0,00	0,83	Weimer et al., 2007		
Crioulo (72)	0,00	0,00	0,00	0,00	0,03	0,10	0,28	0,31	0,08	0,17	0,03	0,00	0,00	0,78	Steingleder et al., 2004		
Gado geral (79)	0,00	0,00	0,00	0,01	0,01	0,04	0,11	0,27	0,28	0,06	0,18	0,03	0,01	0,80	Presente trabalho		
A. Angus (120)	0,00	0,00	0,00	0,03	0,05	0,06	0,00	0,22	0,4	0,09	0,14	0,01	0,00	0,76	Presente trabalho		
IDVGA51	*171	*173	*175	*177	*179	*181	*183	*185									
B. Ibagé (160)	0,04	0,13	0,24	0,25	0,13	0,10	0,11	0,00						0,82	Almeida et al., 2003		
Crioulo (73)	0,02	0,40	0,18	0,01	0,14	0,23	0,02	0,00						0,74	Steingleder et al., 2004		
A. Angus (98)	0,00	0,00	0,40	0,10	0,09	0,16	0,25	0,00						0,73	Almeida et al., 2007		
Gado geral (81)	0,00	0,09	0,27	0,30	0,09	0,09	0,14	0,02						0,79	Presente trabalho		
A. Angus (121)	0,00	0,03	0,64	0,17	0,03	0,01	0,1	0,02						0,54	Presente trabalho		
HEL5	*147	*149	*151	*153	*155	*157	*159	*161	*163	*165	*167	*169	*171				
B. Ibagé (101)	0,00	0,12	0,12	0,08	0,03	0,00	0,01	0,06	0,18	0,20	0,09	0,02	0,00	0,87	Oliveira et al., 2005		
Gado geral (72)	0,06	0,18	0,15	0,10	0,02	0,02	0,02	0,03	0,09	0,11	0,10	0,05	0,02	0,89	Presente trabalho		
A. Angus (113)	0,00	0,08	0,21	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02	0,11	0,19	0,12	0,04	0,02	0,87	Presente trabalho		
AFZ1	*111	*113	*115	*117	*119	*121	*123	*125	*127	*129							
B. Ibagé (103)	0,00	0,00	0,00	0,22	0,12	0,25	0,19	0,14	0,05	0,00				0,81	Oliveira et al., 2005		
Gado geral (51)	0,01	0,05	0,18	0,06	0,21	0,13	0,16	0,14	0,05	0,01				0,85	Presente trabalho		
A. Angus (52)	0,00	0,01	0,28	0,07	0,05	0,06	0,10	0,30	0,13	0,00				0,79	Presente trabalho		
LepSau3A1 (A/B)	*A	*B															
B. Ibagé (96)	0,63	0,37												0,47	Almeida et al., 2003		
A. Angus (98)	0,87	0,13												0,22	Almeida et al., 2007		
Gado geral (76)	0,78	0,22												0,34	Presente trabalho		
A. Angus (78)	0,62	0,38												0,47	Presente trabalho		
LepSau3A1 (1/2)	*1	*2															
B. Ibagé (149)	0,94	0,06												0,12	Almeida et al., 2003		
A. Angus (98)	0,97	0,03												0,05	Almeida et al., 2007		
Gado geral (76)	0,84	0,16												0,27	Presente trabalho		
A. Angus (78)	1														Presente trabalho		

Comparando-se a heteroziguidade entre as populações, verifica-se que os maiores valores foram observados no gado geral, com exceção de dois sistemas, em que a raça B. Ibagé apresentou níveis mais altos de H; é importante salientar que esta é uma raça híbrida entre A. Angus e Nelore, o que explica sua alta diversidade.

Em dois sistemas, a amostra A. Angus mostrou-se monomórfica, enquanto todas as demais apresentaram variação. Para o sistema BM3004 ocorre a fixação do alelo *BMS3004*129*, podendo-se supor uma origem taurina para o mesmo. Esta hipótese é embasada por uma análise de 60 animais da raça Nelore (dados do autor, ainda não publicados), nos quais não se observou o alelo *BMS3004*129*, mas apenas *BMS3004*132* e *BMS3004*138*. Adicionalmente, Weimer et al. (2007) encontraram, em um rebanho sintético da raça Brangus-Ibagé (5/8 Aberdeen Angus X 3/8 Nelore), a frequência de 0,65 para este alelo; este valor é similar ao que seria o esperado (5/8) admitindo-se que a população A. Angus que originou essa raça híbrida fosse também monomórfica para tal alelo. Saliente-se, também, que a outra população (bovinos Crioulo) que apresenta este alelo (Tabela 4) possui origem taurina.

A Tabela 4 apresenta, em três sistemas, resultados de uma outra amostra de A. Angus estudada por Almeida et al. (2007) e a análise comparativa indica que os alelos mais comuns são os mesmos nas duas populações (*IDVGA51*175*, *LepSau3A1*1* e *LepSau3A1*A*), porém são evidentes algumas diferenças nas frequências de outros alelos, o que provavelmente seja reflexo da seleção diferenciada aplicada aos dois rebanhos; o estudado por Almeida et al. (2007) não havia sido alvo de seleção, enquanto, o estudado nesta dissertação resulta de um longo período de intensa seleção ancorada na busca da melhor performance reprodutiva.

3.2 Análises de Associação

3.2.1 Gado geral

Na amostra de gado geral foram analisadas possíveis associações entre os marcadores e os grupos de fertilidade (férteis e subférteis), tendo-se encontrado duas associações positivas, envolvendo os microssatélites *IDVGA51* e *ILSTS002*.

Os animais possuidores de um alelo *IDVGA51*181* (Tabela 5) (Gráfico 1 e Gráfico 2) (foram mais freqüentes no grupo de vacas subférteis ($p=0,05$). Estes achados estão de acordo com os resultados obtidos por Almeida et al. (2003) que verificou que vacas com o alelo *IDVGA51*181* apresentavam piores performances reprodutivas e com os dados de Passos et al. (2007) que observou maiores níveis de expressão do gene da leptina, em gordura subcutânea, em vacas possuidoras do alelo *IDVGA51*181*.

Adicionalmente, neste trabalho verificou-se que animais possuidores dos alelos *IDVGA51*173* e *IDVGA51*177* foram mais freqüentes no grupo de vacas férteis ($p=0,01$ e $p=0,02$, respectivamente). Devido a essas associações envolverem mais de um alelo, os mesmos foram agrupados em dois grupos [alelos curtos (173-177 pb) e alelos longos (179-183 pb)] e as comparações indicaram maior freqüência das repetições alélicas curtas nas vacas férteis ($p=0,04$).

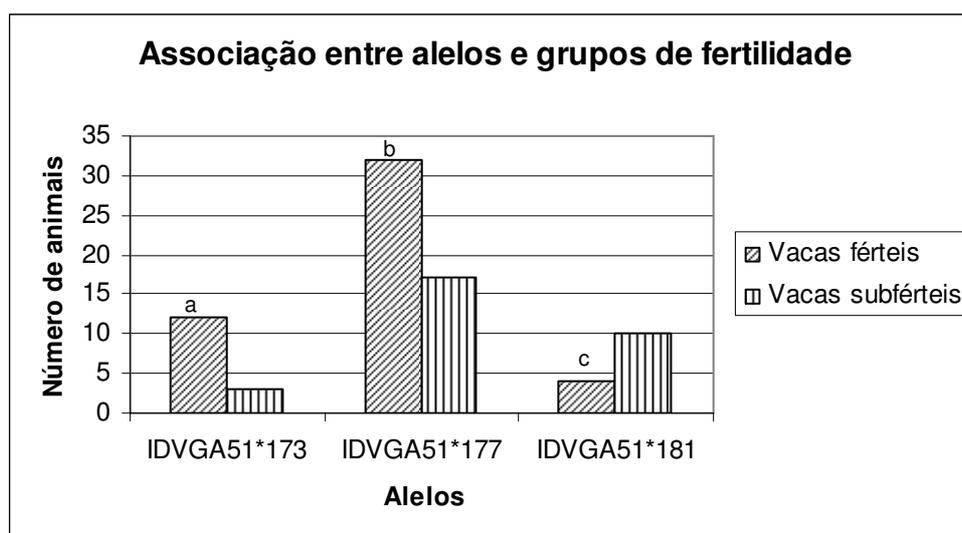
Este STR está mapeado a 2 cM do gene *Lep* (Kappes et al., 1997), podendo, estar envolvido em uma seqüência “enhancer” para a transcrição do gene (seqüências que ativam a transcrição e que podem estar localizadas milhares de pares de bases “upstream” ou “downstream” o gene que controlam; Li et al.,2004). A associação envolvendo um grupo de alelos, classificados pelo tamanho da repetição, concorda com a sugestão de Comings (1998) de que o efeito de microssatélites sobre características quantitativas não seria dependente de um alelo específico, mas que o tamanho da seqüência repetida é que influenciaria a expressão gênica, facilitando a formação do DNA-Z e o acesso de fatores de transcrição.

Tabela 5: Análises de associação entre o microssatélite IDVGA51 e os grupos de fertilidade

	Vacas férteis		Vacas subférteis		χ^2	ρ
	N ¹	%	N ¹	%		
<i>IDVGA51*173</i> x	12	14	3	4	5,82	0,01
Outros alelos	72	86	75	96		
<i>IDVGA51*177</i> x	32	38	17	22	5,34	0,02
Outros alelos	52	62	61	78		
<i>IDVGA51*181</i> x	4	5	10	13	3,67	0,05
Outros alelos	80	95	68	87		
Alelos longos (179-185 bp)	22	26	32	41	4,0	0,04
Alelos curtos (173-177 bp)	62	74	46	59		

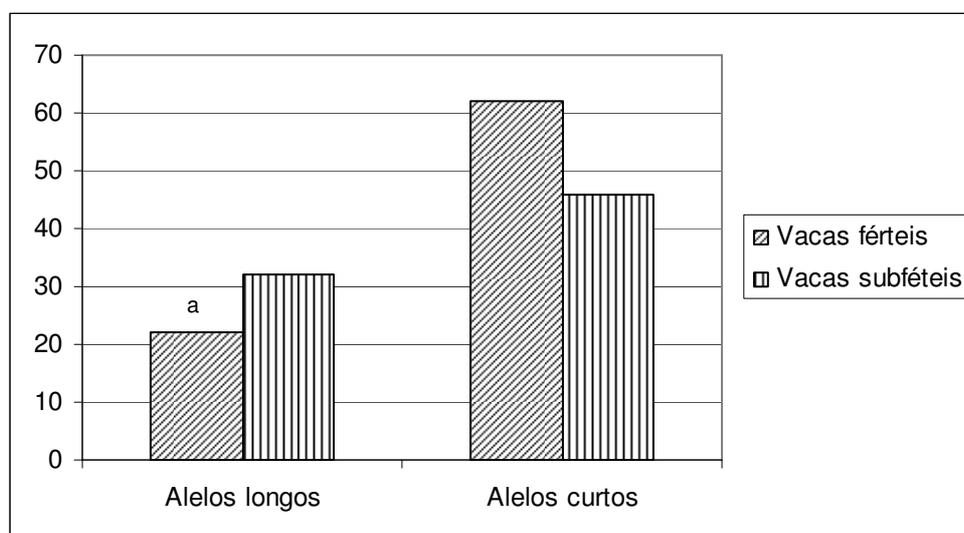
¹ número de alelos

Gráfico 1: Representação gráfica das associações entre os alelos do IDVGA51 e grupos de fertilidade.



^a = $\rho < 0,01$; ^b = $\rho < 0,02$; ^c = $\rho < 0,05$

Gráfico 2: Representação gráfica das associações entre os alelos classificados quanto ao tamanho e grupos do IDVGA51 e grupos de fertilidade.



^a= $\rho < 0,04$

Como já referido na introdução, a leptina coordena o estado reprodutivo por meio de uma interação entre a reprodução e a nutrição e por estimular a liberação de LH e FSH, pela pituitária (Chehab et al., 2002), sendo que o excesso ou deficiência de leptina podem estar associados com anormalidades da função reprodutiva (Moschos et al., 2002). Portanto, pode-se supor a associação entre vacas com diferentes classes de alelos (longos ou curtos) e performances reprodutivas decorram de diferenças na expressão do gene *Lep*.

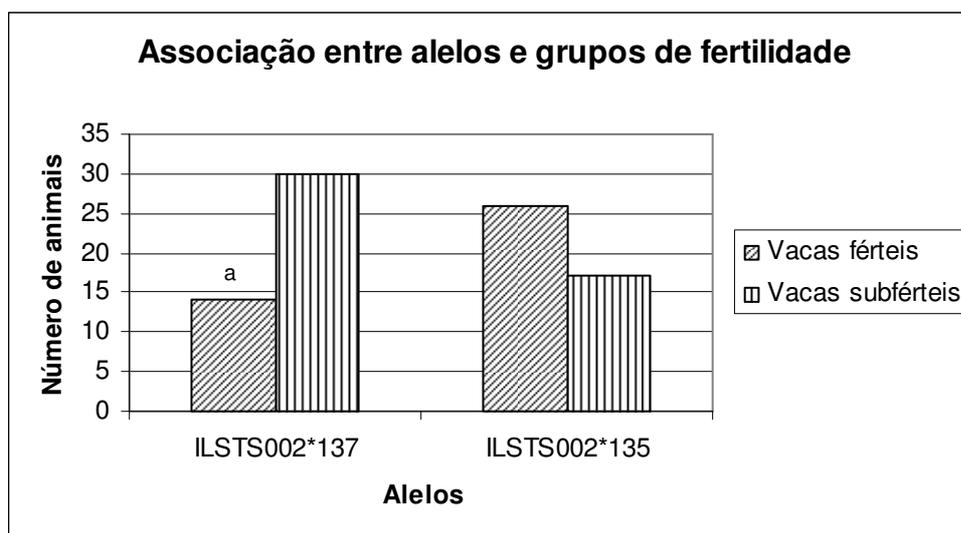
A segunda associação verificada envolveu o marcador *ILSTS002* (Tabela 6) (Gráfico 3), os animais possuidores de pelo menos um alelo *ILSTS002*137* foram significativamente mais frequentes (cerca de 20%), no grupo de vacas subfértéis ($\rho=0,03$).

Tabela 6: Análises de associação entre o marcador ILSTS002 e os grupos de fertilidade

	Vacas férteis		Vacas subférteis		χ^2	ρ
	N ¹	%	N ¹	%		
<i>ILSTS002*137</i> x Outros alelos	14	17	30	38	4,61	0,03
<i>ILSTS002*135</i> x Outros alelos	26	32	17	22	1,56	0,21
Alelos longos(139-145 bp) Alelos curtos(127-137 bp)	23	29	21	27	0,66	0,79
	57	71	57	73		

¹ número de alelos; devido a problemas de amplificação, o total de vacas férteis analisadas neste marcador foi de 40.

Gráfico 3: Representação gráfica das associações entre os alelos do ILSTS002 e grupos de fertilidade.



^a = $\rho < 0,03$

Weimer et al. (2007) detectaram um maior IEP médio, estimado ao longo da vida reprodutiva do animal, em indivíduos possuidores de pelo menos um alelo *ILSTS002*135*. Esta associação está na mesma direção da encontrada no

presente trabalho, porém envolvendo um alelo distinto. Pode-se pensar em várias razões para as diferenças observadas: a primeira, é a possibilidade de erro de genotipagem, porém todas as análises genotípicas foram realizadas utilizando-se amostras controles fornecidas por Weimer et al. (2007), o que exclui esta hipótese. A segunda, é que o efeito seria dependente do tamanho da repetição e não de alelos específicos (Comings, 1998); porém, a análise agrupando os alelos em classes [alelos curtos (127-137 pb) e alelos longos (139-145 pb)], não detectou associação significativa. A terceira e mais provável explicação é a ocorrência de desequilíbrio de ligação (DL) entre o marcador ILSTS002 e uma mutação no gene LH β que modificaria sua expressão, sendo o alelo envolvido no DL variável entre as diferentes populações. O marcador ILSTS002 está mapeado a 59,9 cM do início do cromossomo BTA18 (Kemp et al., 1992) a 6 cM de distância do gene LH β . Assim, não se pode afastar a hipótese de que este marcador esteja envolvido na regulação gênica, modificando a estrutura secundária ou terciária da molécula de DNA, facilitando o acesso de fatores de transcrição ou tradução, ou simplesmente afetando a edição da molécula de RNA (Li et al., 2004).

Não foram verificadas associações neste trabalho entre os grupos de fertilidade e os marcadores BMS3004, BM4325, HEL5, AFZ1 e Lep*Sau3A1*, previamente descritos como associados com características reprodutivas (Almeida et al., 2003; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Weimer et al., 2007). No entanto, essas associações foram verificadas utilizando-se, para comparação, a média de IEP da vida reprodutiva das vacas; assim, ou essas associações são restritas àquelas amostras ou os dados de uma única estação reprodutiva, como foi o caso da amostra de gado geral, não possuiam poder suficiente para detectar esses efeitos.

3.2.2 Aberdeen Angus

Nesta amostra, as análises de associação foram realizadas comparando os genótipos ou alelos com a média de intervalo entre partos, considerando a história reprodutiva dos animais, mas nenhuma associação positiva foi verificada. Que

fatores genéticos ou ambientais poderiam explicar a ausência de associação verificada para esta amostra?

O principal fator para a não detecção das associações previamente descritas, provavelmente, é que o rebanho analisado resulta de longo período de forte seleção em busca de uma excelente performance reprodutiva. Conforme descrito nos materiais e métodos, as fêmeas foram submetidas a um período reprodutivo de cerca de 60 dias, uma vez ao ano e aquelas que não engravidaram, neste período, foram descartados da propriedade, havendo uma enorme pressão de seleção para redução do intervalo entre partos. Assim, a amostra apresenta uma grande homogeneidade na característica analisada (o IEP variou de 315 a 537, com média de 382 e não apresentou distribuição normal), mascarando a possibilidade de detecção de associação. Se este raciocínio está correto, esperar-se-ia que os alelos anteriormente descritos como associados a maior intervalo entre partos apresentasse baixa frequência nesta amostra, o que de fato ocorre. Os alelos *ILSTS002*135*, *IDVGA51*181* e *LepSau3A1*2*, apresentam as frequências mais baixas já descritas no Rio Grande do Sul (ver Tabela 4).

Outros fatores a considerar são o estado nutricional e o manejo no pós-parto das vacas desta amostra. Segundo Diskin et al. (2003) o estado nutricional, avaliado pelo escore de condição corporal (CC), durante a gravidez, é muito importante para a determinação do período de duração do pós-parto. Para Sinclair et al. (2002) além da CC, a quantidade de matéria ingerida no pós-parto é determinante para o crescimento do folículo ovariano e sua maturação. Estes animais apresentaram altos escores de condição corporal e excelente manejo durante o pós-parto, que incluiu cuidados visando o menor desgaste possível das fêmeas, durante a amamentação. Desta forma, as excelentes condições ambientais podem estar mascarando as relações entre o efeito dos STRs e a performance reprodutiva.

Esses resultados sugerem que a seleção assistida por marcadores não seria aplicável a rebanhos que já estivessem próximo ao nível ideal de produção, como é o caso da amostra aqui analisada. No entanto, é válido lembrar que a excelente performance reprodutiva apresentada por este rebanho resulta de um

longo período seleção fenotípica e que o principal inconveniente desta metodologia é o tempo de espera necessário para a expressão da característica de interesse.

Portanto, o ideal seria aliar as duas metodologias de maneira que uma complemente as falhas da outra; porém, para que isso possa ser aplicado de maneira mais ampla, são necessários estudos em diferentes populações, comerciais e não comerciais, de maneira que esta tecnologia possa ser aplicada por diferentes tipos de criadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANUÁRIO DA PECUÁRIA BRASILEIRA - **Anualpec**. São Paulo, 2006. p. 277.
- ALMEIDA, S. E. M. Marcadores moleculares em sintenia com os genes da Leptina e de seu receptor em bovinos: associação com parâmetros produtivos. 2003. (Tese de Doutorado) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., MORAES, J. C. F., WEIMER, T. A. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet*, v.123, p. 106- 113, 2003.
- ALMEIDA, S. E. M., ALMEIDA, E. A., TERRA, G., NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D., WEIMER, T. A. Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. *Ciência Rural*, v. 37, p. 206-211, 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE ANGUS- ABA, www.angus.org.br, Dezembro de 2006.
- AUWERX, J., STAELS, B. Leptin. *Lancet*, v. 351, p. 737-742, 1998.
- BARSH, G. S., FAROOQI, I. S., O'RAHILLY, S. Genetics of body-weight regulation. *Nature*, v. 404, p. 644-651, 2000.
- BARENDSE, W. Assessing lipid metabolism. Patent WO9923248, Patent US6383751, Disponível em <http://www.uspto.com>, 1997.
- BASTOS, G. M., GONÇALVES, P. B. D., MACHADO, M. S. N., RESTLE, J., NEVES, J. P., OLIVEIRA, J. F. C., FARIAS, M. A., SIQUEIRA, L., FATURI, C. Hormonal Induction of ovulation and early weaning in postpartum fertility of homozygous and heterozygous beef cows for the microsatellite BMS3004. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 32, p. 1093- 1103, 2003.
- BEUZEN, N. D., STEAR, M. J., CHANG, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*, v. 160, p. 42-52, 2000.
- BISHOP, D. K., WETTEMANN, R. P., SPICER, L. J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. *Journal of Animal Science*, v. 72, p. 2703-2708, 1994.
- BISHOP, M. D., KAPPES, S. M. KEELE, J. W., et al. A genetic-linkage map for cattle. *Genetics*, v. 136, n. 2, p. 619-639, 1994.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M., DAVIS R.W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331, 1980.

CACHAPUZ, J. M. A pecuária de corte nos anos 80. In: O setor primário do Rio Grande do Sul- Diagnóstico e Perspectiva Sócio-Econômica. Série Realidade Rural, Porto Alegre, 3: 17-39, 1991.

CAMPAGNARI, F. Novas variantes moleculares dos genes receptores de hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio Folículo Estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). 2002. Dissertação de Mestrado. Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista- campus de Botucatu.

CARNE do PAMPA GAÚCHO, www.carnedopampagaucho.com.br/pampa.php, Junho de 2007.

CASAS, E., WHITE, S. N., RILEY, D. G., SMITH, T. P. L., BRENNEMAN, R. A., OLSON, T. A., JOHNSON, D. D., COLEMAN, S. W., BENNETT, G. L., CHASE-JR, C. C. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *Journal of Animal Science*, v. 83, p. 13-19, 2005.

CHEHAB, F. F., QIU, J., MOUNZIH, K., EWART-TOLAND, A., OGUS, S. Leptin and Reproduction. *Nutr. Rev.* 60, 10, p.S39-S46, 2002.

COMINGS, D. E. Polygenic inheritance and micro/minisatellites. *Molecular Psychiatry*, v. 3, p. 21-31, 1998.

CONNOR, H. C., HOUGHTON, P. L., LEMENAGER, R. P., MALVEN, P. V., PARFET, J. R., MOSS, G. E. Effect of dietary energy body condition and calf removal on pituitary gonadotropins, gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and hypothalamic opioids in beef cows. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 7, p. 403-411, 1990.

CUPP, A. S., STUMPF, T. T., KOJIMA, F.N., WERTH, L. A., WOLFE, M. W., ROBERSON, M. S., KITTOF, R. J., KINDER, J. E. Secretion of gonadotrophins change the luteal phase of the bovine oestrus cycle in the absence of corresponding change in progesterone or 17 β -oestradiol. *Animal Reproduction Science*, v. 37, p. 109-119, 1995.

CURI, R. A., DE OLIVEIRA, H. N., SILVEIRA, A. C., LOPES, C. R. Effects of polymorphic microsatellites in the regulatory region of IGF1 and GHR on growth and carcass traits in beef cattle. *Animal Genetics*, v. 36, p. 58-62, 2005.

DAVIS, G. P., DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. *Journal Animal Science*, v. 76, p. 2331- 2339, 1998.

DE LA BROUSSE, F. C., SHAN, B., CHEN, J. L. Identification of the promoter of mouse obese gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 93, p. 4096-4101, 1996.

DEKKERS, J. C. M., ROTHSCCHILD, M. F., MALEK, M. M. Potencial e aplicação de seleção assistida por marcadores para qualidade de carne. III Conferência Internacional Virtual sobre Qualidade de Carne Suína, Via Internet, 2001, p. 22.

DISKIN, M. G., MACKEY, D. R., ROCHE, J. F., SREENAN, J. F. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*, v. 78, p. 345-370, 2003.

DI STASIO, L., DESTEFANIS, G., BRUGIAPAGLIA, A., ALBERA, A., ROLANDO, A. Polymorphism of the GHR gene and relationships with meat production and quality. *Animal Genetics*, v. 36, p. 138-140, 2005.

DUARTE, L. B. H., MORAES, J. C. F., WEIMER, T. A. Diversity of microsatellites linked to the FSH β gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. *Ciência Rural*, v. 35, n. 1, p. 145-149, 2005.

FITZSIMMONS, C. J., SCHMUTZ, S. M., BERGEN, R. D., MCKINNON, J. J. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mammalian Genome*, v. 9, p. 432-434, 1998.

FRIES, R., RUVINSKY, A. *The genetics of cattle*. New York: CABI Publishing, 1999. 710p.

FREITAS, S. G., GONZÁLEZ, F. H. D. Seminário apresentado na disciplina Endocrinologia da Reprodução. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS. Março de 2002.

GARCIA, J. F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. *Theriogenology*, v. 56, p. 1393-1399, 2001.

GARCIA, J. F. Utilização de marcadores moleculares para a seleção. 2^o Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina-PR, p. 195-201, 2006.

GARCIA, J. F., PORTO-NETO, L. P. Uso de marcadores moleculares em programas de transferência de embriões. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.34 (Supl 1), p. 197-203, 2006.

GIANNONI, M. A., GIANNONI, M. L. *Genética e melhoramento de rebanhos nos trópicos*. Editora Nobel, São Paulo, 1987, 463p.

GINTHER, O. J., KASTELIC, J. P., KNOFF, L. Composition and characteristics of follicular waves during the bovine estrus cycle. *Animal Reproduction Science*, v. 65, p. 187-200, 1989.

GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, J. F. C., SILVEIRA, R. S., FERREIRA, R. Anestro pós-parto em vacas de corte. 1º Simpósio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina-PR. P. 105-116, 2004.

GOTTSCHALL, C. S. Desmame de Terneiros de Corte. Como? Quando? Por quê? Editora Agropecuária, Guaíba, 2002, 139p.

GOVERNO do ESTADO do RIO GRANDE do SUL, www.estado.rs.gov.br/, Junho de 2007.

GRISART, B., FARNIR, F., KARIN, L., CAMBISANO, N., KM, J., KVASZ, A., MNI, M., SIMON, P., FRÈRE, J., COPPIETERS, W., GEORGES, M. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. *PNAS*, v. 101, p. 2398-2403, 2004.

HAFEZ, E. S. E. *Reprodução Animal*. 4ª edição, Editora Manole, São Paulo, 1988, 720p.

HE, Y., CHEN, H., QUON, M. J., REITMAN, M. Themouse obese gene. Genomic organization, promoter activity, and activation by CCAAT/enhancer-binding protein alpha. *J. Bio. Chem.*, v. 270, p. 28887-28891, 1995.

HETZEL, D. J. S., MACKINNON, M. J., DIXON, R., et al. Fertility in a tropical beef herd divergently selected for pregnancy rate. *Animal Production*, v. 49, p. 73-81, 1989.

JORGENSEN, C. B., KONFORTOV, B. A., MILLER, J. R. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. *Animal Genetics*, v. 27, p. 220, 1996.

KAPPES, S. M., KEELE, J. W., STONE, R. T., MCGRAW, R. A., SONSTERGARD, T. S., SMITH, T. P. L., LOPEZ-CORRALEZ, N. L., BEATTIE, C. W. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, v. 7, p. 235- 249, 1997.

KEMP, S. J., BREZINSKY, L., TEALE, A. J. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics*, v. 23, p. 184, 1992.

LAHIRI, D.K., ZANG, A., NURNBERGER, J.I. High-resolution detection of PCR products from STRs markers using a nonradioisotopic technique. *Biotechnol. Mol. Med.* V. 60, p. 70-75, 1997.

LI, C., BASARAB, J., SNELLING, W. M., BENKEL, B., MURDOCH, B., HANSEN, C., MOORE, S. S. Assesment of a positional candidate gene *myf5* and *igf1* for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of *Bos taurus*. *Journal Animal Science*, v. 82, p. 1-7, 2004.

LI, Y.C., KORROL, A. B., FAHIMA, T., NEVO, E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Molecular Biology and Evolution*, v. 21, p.991-1007, 2004.

LIEFERS, S. C., te PAS, M. F. W., VEERKAMP, R. F., van der LENDE, T. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. *Journal of Dairy Science*, v. 85, p. 1633-1638, 2002.

LOBATO, J. F. P. Gado de cria- Tópicos. Porto Alegre: Adubos Trevo, 1985, p.18. (Circular Técnica).

MACHUGH, D. E. Molecular biogeography and genetic struture of domesticated cattle. 1996, 257p. Tese (Department of Genetics)- Trinity College, University of Dublin.

MARSON, E. P. Caracterização da freqüência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte precoce. (Tese Doutorado) Universidade de São Paulo- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 87f, 2005.

MARTIN, G. B., PRICE, C. A., THIERY, J. C., WEBB, R. Interaction between inibn, oestradiol and progesterone in the control of gonadotropin secretion in ewe. *Journal of Reproduction and Fertility*. V. 82, p. 319-328, 1988.

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

MINISTÉRIO da AGRICULTURA, PECUÁRIA e ABASTECIMENTO, [http://www.agricultura.gov.br/ estatísticas/ pecuária](http://www.agricultura.gov.br/estatísticas/pecuária), Maio de 2007.

MONTALDO, H. H., MEZA-HERRERA, C. A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. *Eletronic Journal of Biotechnology*, v. 1, p. 83-89, 1998.

MONTIEL, F., AHUJA, C. Body condition and suckling as factors influencing the duration of postpartum anestrus in cattle: a review. *Animal Reproduction Science*, v. 85, p. 1-26, 2005.

MORAES, J. C. F. Anestro e fertilidade pós-parto em bovinos de corte. In: GALINA, C. et al. Avanços na reprodução bovina. Editora Universitária: UFPEL/ Pelotas, 1999, Cap. 2, p.25-33.

MOSCHOS, S., CHAN, J.L., MANTZOROS, C.S. Leptin and reproduction: a review. *Fertil. Steril.* 77, 3, 433-444, 2002.

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

NEVES, J. P., GONÇALVES, P. B. D., OLIVEIRA, J. F. C. Fatores que afetam a eficiência reprodutiva na vaca. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, v. 23, p. 99-105, 1999.

OLIVEIRA, J. F. C., NEVES, J. P., MORAES, J. C. F., GONÇALVES, P. B. D. Characterization of productive aspects in Brangus Ibagé cows with distinct levels of fertility. *Ciência Rural*, v. 32, p. 663- 667, 2002.

OLIVEIRA, J.F.C., NEVES, J.P., ALMEIDA, E.A., STEIGLEDER, C.S., MORAES, J.C.F, GONÇALVES, P.B.D., WEIMER, T.A. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus_Ibagé cattle. *Genet. Mol. Biol.* 28, 1, 54-59, 2005.

PAGE, B. T., CASAS, E., HEATON, M. P., CULLEN, N. G., HYNDMAN, D. L., MORRIS, C. A., CRAWFORD, A. M., WHEELER, T. L., KOOHMARAIE, M., KEELE, J. W., SMITH, T. P L. Evaluation of a single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. *Journal of Animal Science*, v. 80, p. 3077-3085, 2002.

PASSOS, D.T., HEPP, D., MORAES, J.F.C., WEIMER, T.A. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 124, 2007.

PINTO ANDRADE, L., RHIND, S. M., WRIGHT, I. A., MCMILLEN, S.R. GODDARD, P. J., BRAMLEY, T. A. Effects of infusion of GnRH pulses and level of body condition on ovarian function in postpartum beef cows. *Animal Reproduction Science*, v. 40, p. 177-192, 1995.

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

PRINGLE, T. D., WILIAMS, S. E., LAMB, B. S., JOHNSON, D. D., WEST, R. L. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and age tenderness if Angus and Brahman crossbreed steers. *Journal of Animal Science*, v. 75, p. 2955-2961, 1997.

REGITANO, L. C. A., COUTINHO, L. L. *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. Brasília. Embrapa informação Tecnológica, 2001, 215p.

RYAN, D. P., SPOON, R. A., GRIFFITH, M. K., WILLIAMS, G. L. Ovarian follicular recruitment, granulosa cell steroidogenic potential and growth hormone/insulin-like growth factor-I relationships in suckled beef cows consuming high lipid diets: effects of graded differences in body condition maintained during the puerperium. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 11, p. 161-174, 1994.

SCHAMS, D., BERISHA, P. M. Steroids as local regulators of ovarian activity in domestic animals. *Domestic Animal Endocrinology*, v. 23, p. 53-65, 2002.

SCHROTH GP, CHOU PJ, HO PS Mapping Z-DNA in the human genome - Computer-aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. *Journal of Biological Chemistry* 267:11846-11855, 1992.

SINCLAIR, K.D.; MOLLE,G.; REVILLA, R. et al. Ovulation of the first dominant follicle arising after day 21 post partum in suckling beef cows. *Anim. Sci.*, v.75, p.115-126, 2002.

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

STONE, R. T., KAPPES, S. M., BEATTIE, C. W. Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. *Animal Genetics*, v. 27, p. 216, 1996.

STONE, R. T., KAPPES, S. M., KEELE, J. W., BEATTIE, C. W. Characterization of 109 bovine microsatellites. *Animal Genetics*, v. 28, p. 62-66, 1997.

TAUTZ, D. Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. *Exs* 67:21-28,1993.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, v. 17, p. 6463-6471, 1989.

United States Department of Agriculture- USDA, 2005 <http://www.fas.usda.gov/dlp/circular/2005/05-04LP/dlp5-03LP.pdf>.

WEIMER, T.A., STEIGLEDER, C.S., MACHADO, M.S., ALMEIDA, S.E.M., OLIVEIRA, J.F.C., MORAES, J.C.F., HENKES, L.E. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-lbagé cattle herd. *C. Rural*, v. 37, 5, 2007. (in press).

WILLIAMS, G.L., GAZAL, O.S., GUZMÁN VEGA, G.A., STANKO, R.L. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 289–297, 1996.

WILKINS, R. J., DAVEY, H. W. A polymorphic microsatellite in the bovine leptin gene. *Animal Genetics*, v. 27, p. 376, 1997.

YAVAS, Y. WALTON, J. S. Postpartum acyclicity in suckled beff cows: A Review. *Theriogenology*, v. 54, p. 25-55, 2000.

ZHANG, Y., PROENCA, R., MAFFEI, M., BARONE, M., LEOPOLD, L., FRIEDMAN, J. M. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, v. 372, p. 425-432, 1994.

Anexo 1: Genetic diversity and Marked Assisted Selection in a beef cattle herd: validation of previous association of molecular markers and reproductive performance

(Artigo submetido à revista Livestock Science em 11/06/07)

From: "Livestock Science" <livsci@elsevier.com>
To: <taweimer@gmail.com>
Sent: Monday, June 11, 2007 1:31 PM
Subject: Submission Confirmation for Livestock Science

Title: Genetic diversity and Marked Assisted Selection in a beef cattle herd: validation of previous association of molecular markers and reproductive performance

Dear Dr Weimer,

Your submission has been received by the journal Livestock Science.

You will be able to check on the progress of your paper by logging onto the Elsevier Editorial Systems as an Author using the following information:

<http://ees.elsevier.com/livsci/>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned.

Please note also that the journal will continue to be published from 1st January 2006 under the new title Livestock Science. The title change will not affect the volume and issue numbering, such that the first volume of Livestock Science will be volume 99. The new title Livestock Science will not be affiliated with the European Association for Animal Production.

If your article is accepted, it is very likely that it will be published in Livestock Science. Please e-mail the Editorial Office at livest@elsevier.com if you have any queries regarding this.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Editorial Office Staff
Livestock Science

Genetic diversity and Marked Assisted Selection in a beef cattle herd:
validation of previous association of molecular markers and reproductive
performance

J.C. Silveira^a, D.T. Passos^a, P.L. Aguiar^a, J.C.F. Moraes^b, T.A. Weimer^{a*}

^a*Laboratório de Biotecnologia, Hospital Veterinário, Universidade Luterana do Brasil, Canoas,
Brazil.*

^b*Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS, Brazil*

* Corresponding author, address: Duque de Caxias, 910/101, 90010-280, Porto Alegre, RS,
Brazil. Tel.: + 55 51 30293594; fax: + 55 51 30293594.

Abstract

Genetic diversity of six short tandem repeats, STRs (BM4325, BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, AFZ1) and three single nucleotide polymorphisms, SNPs (LepSau3A1 A-B, LepSau3A1 1-2, and FSHRA $lu1$) linked to genes involved in reproductive function and their possible effect on reproductive performance were analyzed in 81 crossbred beef cows (including the purebreds Hereford, Aberdeen Angus, Normand, Limousin and Brown Swiss and their synthetics and Brangus herds, in different proportions) mated with Braford bulls. The animals were multiparous cows (ages varying from 4 to 6 years), with a modal body condition score at 60-81 days postpartum of 3 in a classification ranging from 1- very thin to 5- obese . They were kept at a stocking rate of 0.5 - 0.7 animal units/hectare on native pastures mainly composed of *Paspalum* sp and *Axonopus* sp on a private farm in Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil. The annual mating season includes one major, from 15th November to 15th January, and a complementary for the cows which remain non-pregnant from 1st April to 15th May. The animals were then classified in two groups (fertile and sub fertile cows) on the basis of occurrence of pregnancy or non-pregnancy, after the two mating season. High genetic diversity level was observed: polymorphic content information ranged from 0.23 to 0.87, and expected heterozygosity ranged from 27 to 89%, with an average value of 62%. The more frequent alleles were *BM4325*103*, *BMS3004*129*, *ILSTS002*137*, *IDVGA51*177*, *LEPSau3A1*A*, *LEPSau3A1*1*, *HEL5*149*, *AFZ1*119* and *FSHRA $lu1$ *C*. IDVGA51 and ILSTS002 STRs, linked to Lep and LH β genes, respectively, were associated to reproductive performance. These data confirm previous finding, although the alleles involved were not the same,

suggesting the use of IDVGA51 and ILSTS002 STRs in the implementation phase of marker-assisted selection, to obtain animals with greater reproductive performance. Additionally, the present study suggests the use of IDVGA51 size allele, instead of a specific allele, to perform selection of better reproductive animals.

Key words: marked-assisted selection, reproductive performance, short tandem repeats, single nucleotide polymorphisms, beef cattle, genetic diversity.

1. Introduction

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

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

Several authors described associations between reproductive performance and molecular markers, in the first MAS phase: Weimer et al. (2007) detected a positive association of lifetime calving interval (three or more calving intervals; CI) with BMS3004 and ILSTS002 short tandem repeats (STR) both mapped at BTA 18 near LH β chain gene; Duarte et al. (2005) verified positive association between CI and BM4325 STR mapped close to FSH β gene at BTA 15; Oliveira et al. (2005) found positive association between CI and HEL05 and AFZ1 STRs mapped at BTA 21 near IGF-1 receptor gene; Almeida et al. (2003) verified positive association between CI and markers mapped at BTA 4, linked to Lep gene (the single nucleotide polymorphism (SNP) LEPSau3AI at the Lep intron 2, and the IDVGA51 STR in the same chromosome). Campagnari (2002) described an *AluI* SNP in the FSHR gene and Ferreira et al. (2002) detected differences in FSHR mRNA expression between ovary cells in different stages of oestrus cycle.

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

This paper analyzed the genetic diversity of the six STR and the three SNP above described and their effect on reproductive performance in crossbreeding beef cows.

2. Materials and Methods

The sampled animal were crossbred cows (including the purebreds Hereford, Aberdeen Angus, Normand, Limousin and Brown Swiss and their synthetics, and Brangus) in different proportions mated with Braford bulls. The animals were multiparous cows (ages varying from 4 to 6 years), with a modal body condition score at 60-81 days postpartum of 3 in a classification ranging from 1- very thin to 5- obese (Cachapuz, 1991). The animals were kept at a stocking rate of 0.5 - 0.7 animal units/hectare on native pastures mainly composed of *Paspalum* sp and *Axonopus* sp on a private farm in Bagé, Rio Grande do Sul. The annual mating season includes one major from 15th November to 15th January, and a complementary for the cows which remain non-pregnant from 1st April to 15th May. The animals were then classified in two groups (fertile and sub fertile cows) on the basis of occurrence of pregnancy or non-pregnancy, after the two mating season.

Blood samples were obtained from the tail vein or artery, using EDTA as anticoagulant following the Principles of Veterinarian Medical Ethics and the International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals. From a total of 81 cows 42 were classified as fertile, once they became pregnant in the spring season as suckling cows, having a calving interval inferior than 365 days; and 39 cows were classified as sub fertile as they do not became pregnant after the two mating season, as non suckled cows.

DNA was extracted from leukocyte cells of peripheral blood by the method of Miller et al. (1988). STRs and SNPs were amplified by the polymerase chain reaction (PCR) as previously described (Kemp et al., 1992; Bishop et al., 1994; Houde et al., 1994; Jorgensen et al., 1996; Stone et al., 1996; Kappes et al., 1997; Pomp et al., 1997; Stone et al., 1997; Campagnari, 2002). STR amplification products and SNP amplicons (submitted to *Sau3AI* or *AluI* endonucleases cleavages) were analyzed by vertical electrophoresis in non-denaturing polyacrylamide gel (Lahiri et al., 1997).

Genotype and allele frequencies were estimated by direct counting. Expected heterozygosity (H) and content of polymorphic information (PIC) were estimated according to Nei (1978) and Botstein et al. (1980). Association analyses between alleles or genotypes and pregnancy state were performed by Fisher exact test in two approaches: a. following the previous described associations (Table 1); b. comparing all alleles or genotypes randomly; in this case, when a positive association was detected the significant class was compared with the others by a Chi-Square test. When the associations involved more than one allele, they were grouped in classes of short and long alleles. This approach was used for IDVGA51 (short alleles: 173-177 bp; long alleles: 179-183 bp) and ILSTS002 (short: 127-137 bp; long: 139-143 bp) markers. All statistical analyses were made using SPSS[®] for Windows[™] software (SPSS Inc, Chicago - Illinois, USA), version 10.0.5.

3. Results

3.1 Genotype and allele frequencies

Allele frequencies for STR and SNP markers are presented in Table 2. The number of alleles in STR markers varied from three in BMS3004 to thirteen in HEL5, and the more frequent were *BM4325*103*, *BMS3004*129*, *ILSTS002*135* and *ILSTS002*137*, *IDVGA51*177*, *HEL5*149* and *AFZ1*119*. Concerning to SNPs, *LEP Sau3A1*A*, *LEP Sau3A1*1*, and *FSHR Alu1*C* alleles were the more commons. Polymorphic content information ranged from 0.23 to 0.87 while expected heterozygosity ranged from 27 to 89%, with an average of 62%.

3.2 Association Analyses

Significant association was verified between IDVGA51 and ILSTS002 and fertility groups. Carriers of at least one *IDVGA51*181* allele (Table 3) were more frequent in the sub fertile cows group ($\rho=0.05$), while carriers of *IDVGA51*173* and *IDVGA51*177* alleles were more frequent in the fertile cows group ($\rho=0.01$ and $\rho=0.02$, respectively). Due to these results these alleles were grouped in classes and the short alleles were significantly more common in fertile cows ($\rho=0.04$).

For ILSTS002 STR (Table 4) only one association was verified: carriers of at least one *ILSTS002*137* allele were about 20% more frequent in the sub fertile cows group ($\rho=0.03$).

No relation was verified between the fertility status and genotypes or allele classes for BM4325, BMS3004, HEL5, AFZ1, LEPSau3A1 and FSHrAlu1 markers.

4. Discussion

Among the previous described associations only two (involving *IDVGA51* and *ILSTS002* STRs) were verified in the present paper. Almeida et al. (2003) analyzing cows lifetime calving interval observed that *IDVGA51*181* allele was associated to lower reproductive performance. The present paper found two new associations, besides that previously described: *IDVGA51*173* and *IDVGA51*177* alleles were advantageous in relation the reproductive state. When the alleles were grouped according to their size (in base pairs), animals with short alleles (173-177 bp) presented better reproductive performance (Table 3). This STR is mapped at 87 cM from the beginning of BTA4 chromosome and at 2 cM downstream the *Lep* gene (Kappes et al., 1997), and therefore, could be in an enhancer transcription region (sequences which activate transcription, and can be located thousands base pairs upstream or downstream the gene they control), and influence gene expression (Li et al., 2004), the effect being dependent on the repeat size (Comings, 1998). According to Passos et al. (2007) carrier cows of *IDVGA51*181* allele presented higher levels of *Lep* gene expression in the subcutaneous tissue. Leptin coordinate the reproductive status acting as a cross-linking between reproduction and nutrition (Chehab et al., 2002); its expression is regulated by several hormones and proteins, and stimulates LH and FSH release by the pituitary. Additionally, leptin excess, deficiency or resistance can be associated with abnormal reproductive function (review in Moschos et al., 2002). It is possible, then, that the differences in reproductive performance between cows with long or short alleles could be due to difference in *Lep* gene expression.

The other association detected was a high frequency of *ILSTS002*137* in cows with lower reproductive performance. In a previous study, Weimer et al. (2007) detected lower lifetime calving interval in animals carrying at least one *ILSTS002*135* allele. Several reasons could be thought to explain the difference between the involved allele: the first one

is error in genotyping, but this could be discarded because all genotype analyses were performed using a control sample supplied by Weimer et al. (2007). The second one is that the effect would be not allele specific but depending on allele size; the possibility was tested, grouping the alleles in short (127-137 bp) and long (139-145 bp) alleles, but no significant difference was detected. The third and more probable explanation is the occurrence of linkage disequilibrium (LD) between ILTS002 STR and a mutation at Lep gene which modify its expression, the allele involved in LD varying between populations. ILSTS002 is mapped at 59.9 cM from the beginning of BTA18 chromosome (Kemp et al., 1992) 6 cM distant from LH β gene. It could play a role on gene regulation, even being distant from the LH β gene. According to Li et al. (2004) STRs downstream or upstream gene sequences (even located at thousand cM from the target gene) could regulate gene expression by altering the primary, secondary or tertiary structure of DNA, by binding to transcription or translation factors, or by affecting RNA edition.

No association was verified in the present paper between reproductive performance and BMS3004, BM4325, HEL05, AFZ1, LEP *Sau3/A1*, and FSHR *Alu1* markers previously described (Ferreira et al., 2002; Almeida et al., 2003; Duarte et al., 2005; Oliveira et al., 2005; Weimer et al., 2007). Therefore, these associations seem to be specific of the previous samples and could not be applied for MAS for other cattle breeds. It is important to note that the studies involving BMS3004, BM4325, HEL05, AFZ1, and LEP *Sau3/A1* were made considering cows lifetime calving interval. It is possible that the analysis of a single calving interval like the performed in this paper could not be enough strong to detect these associations.

5. Conclusions

Association studies performed between nine molecular markers linked to genes involved in reproductive function and reproductive efficiency in a beef cattle breed, indicated that two STR (IDVGA51 and ILSTS002) linked to Lep and LH β genes, respectively, are associated to reproductive performance. These data suggest the use of IDVGA51 and ILSTS002 STRs in the implementation phase of Marker-Assisted Selection, to obtain animals with greater reproductive performance. However, this study suggests the use of IDVGA51 size allele, instead of a specific allele, to perform selection of better reproductive animals.

Acknowledgements

This work was supported by Programa de Apoio a Núcleos de Excelência (PRONEX), Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Estudos e Projetos (CAPES), EMBRAPA/Pecuária Sul and Universidade Luterana do Brasil.

References

- Almeida, S.E.M., Almeida, E.A., Moraes, J.C.F. and Weimer, T.A, 2003. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 123, 106- 113.
- Bishop, M.D., Kappes, S.M. Keele, J.W., Stone, R.T, Sunden, S.L.F., Hawkins, G.A., Toldo, S.S., Fries, R., Grosz, M.D., Yoo, J., Beattie, C.W., 1994. A genetic-linkage map for cattle. *Genetics* 136, 2, 619-639.
- Bó, G.A., Baruselli, P.S., Martinez, M.F., 2003. Pattern and manipulation of follicular development in *Bos indicus* cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 307–326.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M. and Davis R.W., 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32, 314-331.
- Cachapuz, J.M., 1991: A pecuária de corte nos anos 80. In: O setor primário do Rio Grande do Sul. Diagnóstico e Perspectiva Sócio-Econômica. Realidade Rural, Porto Alegre, 3.
- Campagnari, F., 2002. Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio liberados de gonadotrofinas (GnRHR) e hormônio folículo estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore). 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado). Inst. Biociências, UNESP, Botucatu.
- Chehab, F.F., Qiu, J., Mounzih, K., Ewart-Toland, A. and Ogus, S., 2002. Leptin and Reproduction. *Nutr. Rev.* 60, 10, p.S39-S46.
- Comings, D.E., 1998. Polygenic inheritance of micro/minisatellites. *Mol. Psychiatry* 3, 21-31.
- Davis, G. P. and DeNise, S. K., 1998. The impact of genetic markers on selection. *J. Anim. Sci.* 76, 2331- 2339.

- Diskin, M.G., Mackey, D.R., Roche, J.F., Sreenan, J.F., 2003. Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Anim. Reprod. Sci.* 78, 345-370.
- Duarte, L.B.H., Moraes, J.C.F., Weimer, T.A., 2005. Diversity of microsatellites linked to the FSH β gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. *C. Rural.* 35, 1, 145-149.
- Ferreira, J.L., Toniolli, R., Duarte, A.B.G., Campagnari, F., Boscaro, A.P., Pazini, F.S., Garcia, J.F., 2002. Relative expression of insulin like growth factor I (IGFI) and follicle stimulating hormone receptor (FSHR) in follicles and ovarian tissue from *Bos primigenius indicus* (Nelore). *Braz. J. vet. Res. anim. Sci.* 39, 4, 208-212.
- Houde, A., Lambert, A., Saumande, J., Silversides, D.W. and Lussier, J.G., 1994. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Mol. Reprod. Dev.* 39, 127-135.
- Jorgensen, C.B., Konfortov, B.A. and Miller, J.R., 1996. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. *Anim. Genet.* 27, 220.
- Kappes, S.M., Keele, J.W., Stone, R.T., McGraw, R.A., Sonstergard, T.S., Smith, T.P.L., Lopez-Corrales, N.L. and Beattie, C.W., 1997. A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Res.* 7, 235- 249.
- Kemp, S.J., Brezinsky, L. and Teale, A.J., 1992. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. *Anim. Genet.* 23, 184.
- Lahiri, D.K., Zang, A. and Nurnberger, J.I., 1997. High-resolution detection of PCR products from STRs markers using a nonradioisotopic technique. *Biotechnol. Mol. Med.* 60, 70-75.

- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T. and Nevo, E., 2004. Microsatellites Within Genes: Structure, Function, and Evolution. *Mol. Biol. Evol.* 21, 6, 991-1007.
- Miller, S.A., Dykes, D.D., Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res. Suppl.* 16, 1215.
- Moschos, S., Chan, J.L. and Mantzoros, C.S., 2002. Leptin and reproduction: a review. *Fertil. Steril.* 77, 3, 433-444.
- Nei, M., 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance in a small number of individual. *Genetics* 89, 583- 590.
- Oliveira, J.F.C., Neves, J.P., Almeida, E.A., Steigleder, C.S., Moraes, J.C.F, Gonçalves, P.B.D. and Weimer, T.A., 2005. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus_Ibagé cattle. *Genet. Mol. Biol.* 28, 1, 54-59.
- Passos, D.T., Hepp, D., Moraes, J.F.C. and Weimer, T.A., 2007. Effect of polymorphisms linked to LEP gene on its expression on adipose tissues in beef cattle. *J. Anim. Breed. Genet.* 124.
- Pomp, D., Zou, T., Clutter, A.C. And Barendse, W., 1997. Mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a pcr-based polymorphism. *Journal Series, Nebraska Agricultural Research Division, Paper number 11574.*
- Rasby, R.J., Wettemann, R.P., Harms, P.G., Lusby, K.S., Wagner, J.J., 1992. GnRH in infundibular stalk-median eminence is related to percentage body fat in carcasses of beef cows. *Domest. Anim. Endocrinol.* 9, 71–76.
- SPSS inc. SPSS® Base 10.0.5 for Windows™ User's guide. 1999.
- Stone, R.T., Kappes, S.M. and Beattie, C.W., 1996. Five polymorphic trinucleotide (CCA) bovine microsatellites. *Anim. Genet.* 27, 216.

- Stone, R. T., KAPPES, S.M., KEELE, J.W., BEATTIE, C.W., 1997. Characterization of 109 bovine microsatellites. *Anim. Genet.* 28, 62-66.
- Zieba, D.A., Amstalden, M. and Williams, G.L., 2005. Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: A comparative review. *Dom. Anim. Endocrinology* 29, 166-185.
- Weimer, T.A., Steigleder, C.S., Machado, M.S., Almeida, S.E.M., Oliveira, J.F.C., Moraes, J.C.F. and Henkes, L.E., 2007. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. *C. Rural* 37, 5 (in press).
- Williams, G.L., Gazal, O.S., Guzmán Vega, G.A., Stanko, R.L., 1996. Mechanisms regulating suckling-mediated anovulation in the cow. *Anim. Reprod. Sci.* 42, 289–297.
- Yavas, Y., Walton, J.S., 2000. Induction of ovulation in postpartum suckled beef cows: a review. *Theriogenology* 54, 1–23.

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

Marker	Comparison of fertile and sub fertile cows with:	According to:
STR		
BM4325	Presence *101 allele and absence *101 allele	Duarte et al. (2005)
ILSTS002	Presence *135 allele and absence *135 allele	Weimer et al. (2007)
BMS3004	Heterozygous and homozygous	Weimer et al. (2007)
IDVGA-51	Presence *181 allele and absence *181 allele	Almeida et al. (2003)
HEL5 ^a	Homozygous for long allele and other genotypes	Oliveira et al. (2005)
AFZ1 ^b	Homozygous for short allele and other genotypes	Oliveira et al. (2005)
SNP		
LEP <i>Sau3A1</i> ^a	Homozygous 11 and other genotypes	Almeida et al. (2003)

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

Table 2

Allele frequencies of six STRs and three SNPs in a beef cattle breed

Markers	Alleles												
SRTs													
BM4325	*97	*99	*101	*103	*105	*107	*109						
	0.01	0.03	0.13	0.5	0.25	0.03	0.02						
BMS3004	*129	*132	*138										
	0.66	0.29	0.05										
ILSTS002	*127	*129	*131	*133	*135	*137	*139	*141	*143				
	0.01	0.01	0.03	0.1	0.27	0.27	0.06	0.18	0.02				
IDVGA-51	*171	*173	*175	*177	*179	*181	*183	*185					
	0.00	0.09	0.27	0.30	0.08	0.08	0.14	0.00					
HEL5	*147	*149	*151	*153	*155	*157	*159	*161	*163	*165	*167	*169	*171
	0.06	0.18	0.15	0.10	0.02	0.02	0.02	0.03	0.09	0.11	0.10	0.05	0.02
AFZ1	*113	*115	*117	*119	*121	*123	*125	*127	*129				
	0.04	0.18	0.05	0.21	0.13	0.16	0.13	0.04	0.01				
SNPs													
LEPSau3A1 (A/B)	*A	*B											
	0.77	0.22											
LEPSau3A1 ^a	*1	*2											
	0.83	0.16											
FSHRA _{lu} 1	*G	*C											
	0.44	0.55											

^aLEPSau3A1*1: absence of restriction site; LEPSau3A1*2: presence of restriction site.

Table 3

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

Comparisons	Fertile cows		Sub fertile cows		χ^2	ρ
	N ¹	%	N ¹	%		
<i>IDVGA*173</i> x	12	14	3	4	5.82	0.01
others alleles	72	86	75	96		
<i>IDVGA*177</i> x	32	38	17	22	5.34	0.02
others alleles	52	62	61	78		
<i>IDVGA*181</i> x	4	5	10	13	3.67	0.05
others alleles	80	95	68	87		
Long alleles (179-185 bp)	22	26	32	41	4.0	0.04
Short alleles (173-177 bp)	62	74	46	59		

¹ number of alleles

Table 4

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

Comparisons	Fertile cows		Sub fertile cows		χ^2	ρ
	N ¹	%	N ¹	%		
<i>ILSTS002*137</i> x others alleles	14	17	30	38	4.61	0.03
<i>ILSTS002*135</i> x others alleles	26	32	17	22	1.56	0.21
Long alleles (139-145 bp)	23	29	21	27	0.66	0.79
Short alleles (127-137 bp)	57	71	57	73		

¹ number of alleles; due to amplification problems the total of fertile cows analyzed for this marker was 40.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)