

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

WILDER HERNANDO ORTIZ VEGA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *rs109778173* (G>T) NO GENE *BMP4* BOVINO E
SUA ASSOCIAÇÃO COM DADOS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM
VACAS GIR**

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro, 2014

WILDER HERNANDO ORTIZ VEGA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *rs109778173* (G>T) NO GENE *BMP4* BOVINO E
SUA ASSOCIAÇÃO COM DADOS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM
VACAS GIR**

Dissertação de mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias, da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal.

ORIENTADORA: Professora Celia Raquel Quirino

Co-orientadora: Dra. Clara Slade Oliveira

Campos dos Goytacazes, RJ

Fevereiro, 2014

WILDER HERNANDO ORTIZ VEGA

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO *rs109778173* (G>T) NO GENE *BMP4* BOVINO E
SUA ASSOCIAÇÃO COM DADOS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES EM
VACAS GIR**

Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito Parcial para obtenção de grau de Mestre em Produção Animal na área de concentração de Fisiologia e Melhoramento Genético Animal.

Em 20 de fevereiro de 2014

Banca examinadora

Profa. Celia Raquel Quirino (Doutora Ciência animal) – UENF Orientadora

Dra. Clara Slade Oliveira (Doutor, Medicina Veterinária) - EMBRAPA

Dra. Raquel Varella Serapião (Doutora, Produção Animal) – PESAGRO

Prof. Álvaro Fabricio Lopes Rios(Doutor, Ciências Biológicas) - UENF

Ângelo Jose Burla Diaz (Doutor, Biociências e Biotecnologia) – UENF

*Às pessoas que devo o amor pela terra
e as maravilhas da natureza... meus
avôs Luis, Gilma, Francisco e
Yolanda.
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao nosso criador

À professora Celia Quirino, que não só me recebeu no laboratório, mas principalmente por ter depositado total confiança em mim e no meu trabalho. Sua orientação e amizade foram cruciais para esta caminhada no Brasil. Pela oportunidade serei eternamente grato!

A todos os professores e instituições que fizeram parte da minha formação durante estes dois anos do curso. Ângelo, Gonçalo e Álvaro. A Clara Slade e Raquel pela amizade e oportunidade na Embrapa e na Pesagro.

Aos meus colegas e amigos que fizeram parte da partilha acadêmica Pollyane, Antônio, Ana Silvia e tantos outros que me ajudaram nos momentos de fraqueza.

Aos amigos Colombianos, por fazer a saudade da terra tolerável e manter o ânimo sempre em frente. Mauricio, Diego, Hector, Gina, Jorge, Amanda, Diana, Oscar, Osli, Yuli e Camila.

A Amanda Silva de Azevedo, pela amizade, sinceridade e grande colaboração acadêmica nesta nova área.

Aos meus amigos de sempre, Aline Pacheco, Junior, Mariana, Miguel Alejandro, Dévanny, Thiago, Julia, Gleice e Isac; a eles, pela paciência, carinho, colaboração e disposição constante.

Aos meus amigos da república, Bruno, Roger, Leoni Thabata e Mikail, pelo convívio e os ensinamentos.

Aos meus pais Ubaldo e Maria Edelia pelos conselhos e exemplo de vida; aos meus irmãos Wiston e Diego, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Às mulheres mais importantes nesta etapa da minha vida, Maritza e minha filha Ana Sophia, pelo suporte, amor e disposição incondicional nesta caminhada.

A Xiomara, grande mulher que representa essa irmã no meu coração.

A UENF pela oportunidade de fazer do meu sonho, realidade; e, pela concessão da bolsa nos últimos 7 meses do mestrado.

RESUMO

Na pecuária bovina, o Brasil é atualmente o país com maior produção embrionária mundial. Com a progressão do segmento comercial da produção *in vitro* de embriões, também tornaram-se evidentes algumas lacunas acadêmicas relacionadas com a variabilidade nos resultados dos diferentes trabalhos referentes aos índices de produção oocitária e taxas de prenhez, que são evidentes quando se comparam resultados de produção *in vitro* de embriões de diferentes vacas doadoras de oócitos. O objetivo do presente estudo foi avaliar um gene candidato relacionado com o desenvolvimento embrionário e fertilidade em vacas da raça Gir, participantes de programas de produção de embriões pela técnica de aspiração folicular e fertilização *in vitro* (OPU-PIVE). O SNP rs109778173 do gene *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)* foi avaliado. O DNA foi extraído de 50 vacas Gir doadoras de oócitos do folículo piloso e 212 sessões de OPU-PIVE foram analisadas. A genotipagem foi feita pela técnica PCR- RFLP, utilizando a enzima de restrição HinfI. Estudo de associação entre características da OPU- PIVE e mutação no gene de interesse foi feito. Correlações fenotípicas entre características de OPU-PIVE e taxas de prenhez foram estabelecidas. Mutação no SNP avaliado foi relacionada com baixo número de oócitos viáveis, baixa porcentagem de oócitos viáveis e baixas taxas de prenhez ao dia 30. Correlações entre características numéricas da OPU-PIVE foram de moderada e moderadamente alta magnitude (Número de oócitos viáveis com número de embriões clivados ao dia 4 de cultivo, número de embriões clivados no dia 4, com número de embriões transferíveis ao dia 7). A característica Número de oócitos viáveis mostrou repetibilidade de 0,66 além de apresentar correlação moderada e moderadamente alta com características ligadas a taxas de prenhez. Mutação G > T mostrou-se afetando significativamente características da OPU-PIVE e taxas de prenhez, sugerindo participação de componente gênico nestas. É possível aperfeiçoar o processo OPU-PIVE através do uso das correlações fenotípicas na seleção da doadora.

Palavras chave: OPU-PIVE, Mutação sinônima, , características fenotípicas, doadoras de oócitos, SNP.

RESUMEN

En producción Bovina, Brasil es actualmente el país con mayor producción embrionaria mundial. Con el crecimiento del segmento comercial de la producción *in vitro* de embriones, también se tornaron evidentes algunas lagunas académicas relacionadas con la variabilidad en los resultados de los diferentes trabajos referentes a los índices de producción oocitárea y tasas de preñez, que son evidentes cuando se comparan resultados de producción *in vitro* de embriones de diferentes vacas donadoras de oócitios. El objetivo del presente estudio fue evaluar un gen candidato relacionado con desarrollo folicular y fertilidad en vacas de la raza Gir participantes de programas de producción de embriones por la técnica de aspiración folicular y fertilización *in vitro* (OPU-PIVE). El SNP rs109778173 del gen *Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)* fue evaluado. ADN fue extraído del folículo piloso de 50 vacas Gir donadoras de oócitios. 212 sesiones de OPU-PIVE fueron analizadas. El genotipaje fue hecho con la técnica de PCR-RFLP, utilizando la enzima de restricción HinfI. Estudio de asociación entre las características de OPU-PIVE y la mutación en el gen de interés fue realizado. Correlaciones fenotípicas entre las características de la OPU-PIVE y tasas de preñez fueron establecidas. La mutación en el SNP evaluado fue relacionada con bajo número de oócitios viables, bajo porcentaje de oócitios viables y bajas tasas de preñez al día 30. Correlaciones fenotípicas entre las características numéricas de la OPU-PIVE fueron de moderada y moderadamente alta magnitud (número de oócitios viables con número de embriones clivados al día 4 de cultivo, número de embriones clivados al día 4 de cultivo, con número de embriones transferibles al día 7). La característica número de oócitios viables mostro repetibilidad de 0.66, además de presentar correlación moderada y moderadamente alta con características ligadas a las tasas de preñez. La mutación G > T afectó significativamente características de OPU-PIVE y tasas de preñez, lo que sugiere participación del componente genético en estas. Es posible optimizar el proceso de OPU-PIVE a través del uso de las correlaciones fenotípicas en la selección de la donadora.

Palabras clave: OPU-PIVE, Mutación sinónima, características fenotípicas, donadoras de oócitios, SNP.

SUMARIO

CAPITULO 1 CONSIDERAÇÕES GERAIS	11
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	13
3. REVISÃO DE LITERATURA	14
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	29
CAPITULO 2. CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS ENTRE CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES E TAXAS DE PRENHEZ EM DOADORAS GIR.	35
1. INTRODUÇÃO	36
2. MATERIAL E MÉTODOS	37
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
REFERÊNCIAS.....	47
CAPITULO 3. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NO GENE <i>BMP4</i> E CARACTERÍSTICAS DE OPUPIVE EM VACAS GIR	50
1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	52
3. RESULTADOS	55
4. DISCUSSION	58
5. CONCLUSSÃO	60
REFERÊNCIAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1 Produção de embriões FIV e TE 2006 – 2010 (Fonte . THIBIET. IETS, 2011) _____ 14

Figura 2: Receptores de BPM mediam a sinalização de BPMs através da ativação de Samd (Fonte:XIAO,et al., 2007). _____ 26

Figura 3. (A) Fluxograma que mostra a especificação de um tipo de células progenitoras ectodérmicas no embrião vertebrado, em função do tempo através dos estágios blástula, gástrula e nêurula e as vias de sinalização ativas em cada etapa. (B) Representação esquemática de um embrião de galinha em etapas de blástula inicial, blástula tardia, gástrula e nêurula tardia, descrevendo a regiões de progenitores com a cor codificada em (A).(Fonte: PATTHEY & GUNHAGA, 2014)____
_____ 27

CAPÍTULO 3

Figura 1. Gel de eletroforese capilar (A) e eletroferograma (B) de PCR-RFLP com Hinfl. O genótipo GT mostra dois fragmentos para o alelo clivado (75pb e 105pb) e um no alelo não clivado 187pb. (Mutação em heterozigose). _____ 56

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1.

Tabela 1. Genes candidatos atuando nos processos reprodutivos das vacas _____ 25

CAPÍTULO 2.

Tabela 1. Classificação das doadoras Gir de acordo a sua eficiência nas características da OPU-PIVE _____ 40

Tabela 2 . Médias e desvio-padrão, valores mínimos, máximos de características da OPU – PIVE em vacas doadoras da raça Gir (b. Indicus) no estado do Rio de Janeiro, Brasil _____ 41

Tabela 3. Resultados para características da OPU-PIVE em vacas Gir brasileiras _ 42

Tabela 4. Correlações fenotípicas entre características de produção in vitro de embriões usando OPU e número e proporção de prenhezes em vacas Gir. _____ 44

Tabela 5. Valores médios da repetibilidade para características de OPU-PIVE em vacas Gir doadoras de oócitos _____ 46

CAPÍTULO 3.

Tabela 1. Condições do primer utilizado na amplificação do SNP rs109778173 no gene *BMP4* _____ 53

Tabela 2. SNP no gene *BMP4* e informação da endonuclease de restrição _____ 54

Tabela 3. Frequências genotípica e alélica no gene *BMP4* para o SNP utilizado no teste de associação em bovinos da raça Gir _____ 55

Tabela 4. Índices genéticos da população na região do exon 2 do gene *BMP4* (187 pb) _____ 56

Tabela 5. Associação entre o SNP (rs109778173) genótipo do gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em vacas da raça Gir _____ 57

CAPITULO 1. CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

Na pecuária bovina, o Brasil é atualmente o país com maior produção embrionária mundial. Após amplo e consolidado conhecimento obtido com o método de superovulação e de transferência de embriões (*Multiple ovulation and embryo transfer*- MOET), o país também passou a dominar a aspiração folicular (*Ovum pick up* - OPU) e a produção *in vitro* de embriões (PIVE).

Com a progressão do segmento comercial da produção *in vitro* de embriões, também se tornaram evidentes algumas lacunas acadêmicas, relacionadas principalmente com a variabilidade nos resultados dos diferentes trabalhos referentes aos índices de produção oocitária, taxas de prenhez e tipo de raça, entre outras, constata-se tais resultados de PIVE quando estes são comparados entre diferentes vacas doadoras de oócitos (PONTES, 2009).

Na última década, tem-se observado um incremento no interesse de cientistas no uso da informação genômica como ferramenta adicional nos sistemas de produção bovina (SONSTEGARD et al., 2001; VEERKAMP e BEERDA, 2007).

Quando determina-se a associação entre o polimorfismo de DNA e uma característica, o polimorfismo para esse gene pode ser considerado um marcador genético, candidato em programas de seleção assistida por marcadores (MAS) (CHANG et al., 2012).

Os polimorfismos que afetam características de produção são de grande importância, como exemplo, produção de leite ou qualidade de carcaça. No entanto, a seleção genética assistida pode ser ainda mais importante para o melhoramento genético de características reprodutivas, pois estas são de baixa herdabilidade e muitas vezes difíceis de fixar; logo o uso de métodos convencionais torna-se mais trabalhoso e não tão eficaz (OIKONOMOU et al., 2011; VERLAG, 2012).

Com a evolução das novas ferramentas genômicas visando o desenvolvimento das técnicas de produção *in vitro* de embriões, diversos estudos têm sido delineados na tentativa de compreender os diferentes fenômenos relacionados a fisiologia reprodutiva bovina em cada uma de suas etapas (KHATIB, 2008; HAYASHI, 2010; KOMMADATH, 2010; LA ROSA, 2011; KIM, 2012; Li, 2012). No entanto, os resultados referentes ao isolamento de genes precisam ser validados nas diferentes populações animais, com o intuito de utiliza-los nos programas de melhoramento genético de cada raça.

Muitos trabalhos com bovinos vêm identificando e avaliando polimorfismos para um amplo número de genes, ligados a características de interesse econômico (qualidade de carcaça, resistência a parasitas, produção e qualidade do leite) e, obtendo resultados positivos em matéria de ganho genético para tais características (NEVAREZ, 2011; OIKONOMOU et al., 2011; KOMISAREK et al., 2011; CHANG et al., 2012).

O gene Proteína morfogênica do osso (*BMP4*) encontra-se associado a diversas funções em mamíferos; assim, estudos recentes (La Rosa, et al., 2011, Li et al 2012) mostram sua importância nos processos de desenvolvimento embrionário e fertilização *in vitro* em bovinos.

A falta de informação genômica para novas características de interesse econômico, que possam ser utilizadas nos diferentes programas de melhoramento genético bovino no Brasil, e em particular, naqueles dedicados a multiplicação de alelos através de biotecnologias reprodutivas como OPU-PIVE. A proposta do presente trabalho tem como objetivo avaliar o polimorfismo *rs109778173* (G>T) no gene *BMP4* bovino e sua associação com dados de produção *in vitro* de embriões em vacas da raça Gir.

2.OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o polimorfismo *rs109778173* (G>T) no gene *BMP4* bovino e sua associação com dados de produção *in vitro* de embriões em vacas Gir

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a presença de marcadores moleculares, para o gene candidato *BMP4* assim como determinar os genótipos na população e a sua frequência alélica.
- Verificar o grau de associação existente entre o marcador molecular proposto e a eficiência na produção *in vitro* de embriões em vacas doadoras de oócitos.
- Estimar as correlações fenotípicas entre as características ligadas a OPU – PIVE e taxas de prenhez.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES NO BRASIL

Desde o final da década de 1980, com o desenvolvimento da aspiração folicular guiada por ultrassom (Ovum pick up – OPU), a produção *in vitro* de embriões (PIVE) tornou-se uma técnica bem conhecida e desenvolvida tanto na pesquisa quanto na produção comercial de embriões bovinos (THIBIER, 2007). No ano de 2011, o número total de embriões transferíveis produzidos foi de 453.471. O Brasil aparece como líder mundial na PIVE de bovinos (IETS, 2012) ,por ter produzido 85% destes embriões (318.119). De 2006 a 2011, houve um crescimento de 28% no número de embriões FIV produzidos e uma diminuição de 73% na produção de embriões por TE (Fig. 1).

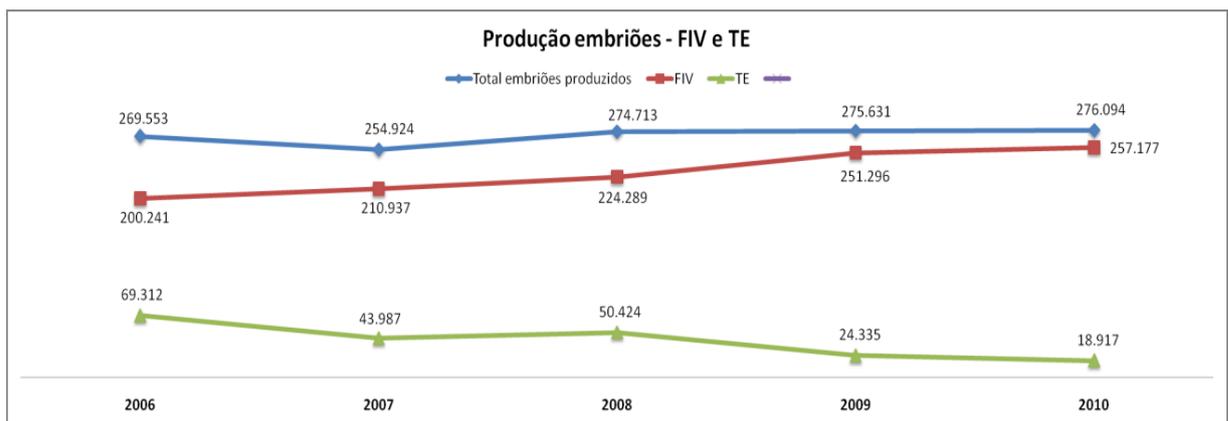


Figura 1 Produção de embriões FIV e TE 2006 – 2010 (Fonte . THIBIET. IETS, 2011)

Em muitos países, quando a recuperação pela lavagem uterina é inviável a produção *in vitro* de embriões bovinos (PIVE) é proposta como alternativa. Já no Brasil, hoje a PIVE constitui-se na primeira opção para a multiplicação de animais de interesse zootécnico e/ou comercial. Isto provavelmente tem relação com o predomínio da raça Nelore no plantel nacional. Para fêmeas Nelore, pode-se admitir uma quantidade maior de embriões por procedimento com a PIVE, quando comparada à coleta e transferência de embriões (NONATO JR. et al., 2003). Além da situação referente à raça Nelore, o cenário da PIVE nacional pode ser compreendido por algumas outras particularidades, como a grande quantidade de laboratórios privados com domínio da técnica e, os altos preços, por vezes

especulativos, alcançados por animais da raça Nelore. Embora nos últimos anos a situação de mercado tenha se estabilizado, tais aspectos em muito contribuíram para a consolidação da técnica no Brasil (PONTES, 2009).

3.2 VARIABILIDADE NA PRODUÇÃO DE EMBRIÕES

PONTES et al., (2011) coletaram dados durante um período de 5 anos numa central comercial de produção *in vitro* de embriões no Brasil, mostrando diferenças na produção de embriões e taxas de prenhez entre doadoras Nelore. O grupo de vacas consideradas como de alta produção embrionária obteve 82,6% em produção de oócitos viáveis, 42,3% em taxa de embriões viáveis e 43,6% de taxa de prenhez aos 30 dias, enquanto que o grupo base obteve 81,6%, 33,8% e 33,4 % respectivamente.

Apesar da produção *in vitro* de embriões (PIVE) ser uma das mais importantes biotecnologias na reprodução de bovinos, tem sua eficiência ainda baixa com apenas 30-40% de oócitos com desenvolvimento até blastocistos. Isso ocorre provavelmente devido ao fato do ambiente *in vitro* não reproduzir as condições do ambiente *in vivo*, resultando em embriões com morfologia e expressão gênica alterada (CAMARGO et al, 2006). A principal desvantagem da técnica OPU-FIV é a sua grande variação que ocorre devido aos fatores biológicos, independente da metodologia utilizada na produção de embriões. As variações correspondem a fatores individuais, tanto do macho quanto da fêmea assim como da interação de fatores mistos (PALMA, 2001).

Estudos prévios desenvolvidos com a técnica de superovulação e coleta de embriões mostraram grande variabilidade de resultados entre animais. MONIAUX et al.(1983) e BURNS et al. (2005). Estudando a presença de variações no número de folículos em crescimento por onda (com base em estudos ultrassonográficos), observaram uma alta variação destas estruturas ovarianas individuais; possuindo ainda grandes diferenças no número de folículos não ovulatórios por ciclo estral. Estas observações foram evidenciadas por IRELAND et al.(2007) que verificaram a relação entre o número de folículos antrais por onda de crescimento, com a resposta

a superovulação. Estes estudos mostraram que vacas com alto número de folículos, comparadas com aquelas com número baixo durante as ondas de crescimento folicular, respondem melhor a superovulação e produzem mais embriões capazes de se desenvolver até blastocistos.

ROOVER et al. (2005) relataram que da mesma forma que vacas que produzem um maior ou reduzido número de oócitos repetem esse comportamento nas punções subsequentes. Também afirma que, em relação à qualidade dos oócitos e à capacidade de se desenvolverem até blastocistos após o processo de fertilização *in vitro*, as vacas classificadas como de alta produção de folículos apresentaram, também, uma maior taxa de blastocistos transferíveis.

CAMARGO et al. (2006) resumiram os fatores que afetam o desenvolvimento embrionário *in vitro* em fatores: maternos (ativação genômica, ovocitários, foliculares), paternos, raciais, ambientais, de idade, de variação individual, assim como relacionados com o ambiente de cultivo *in vitro* propriamente dito.

Segundo SCHULTZ (2002) em relação aos fatores maternos, o oócito é o gameta que contribui com praticamente todo o citoplasma para o zigoto, fornecendo os transcritos e as proteínas necessárias para o desenvolvimento embrionário inicial. Este ambiente citoplasmático oferece as condições adequadas, de modo que o genoma embrionário pode ser ativado, e o embrião continue o seu desenvolvimento. Por isso, a qualidade do oócito é essencial, antes e depois da ativação do genoma embrionário, pois este evento é chave fundamental no desenvolvimento subsequente do embrião. Neste contexto, o efeito individual da doadora na competência e desenvolvimento do oócito, deve ser considerado nos programas de produção *in vitro* de embriões (CAMARGO et al. 2006).

TAMASSIA et al. (2003) observaram grande variação entre o número de oócitos recuperados e a taxa de blastocistos produzidos; o que significa que, um número elevado de oócitos não necessariamente resultará em uma maior taxa de blastocistos.

3.3 AS AVALIAÇÕES GENÉTICAS

O melhoramento animal vem sendo realizado de maneira empírica ou científica desde que o homem começou a domesticar os animais e percebeu que poderia modificar a produtividade e aptidão dos mesmos ao longo das gerações (FERRAZ, 2012).

Segundo FERRAZ et al. (2012) e DE OLIVIEIRA, (2012), não é possível conhecer com precisão o valor genético dos animais. O desempenho destes, também denominado fenótipo, é resultado da constituição gênica que o animal possui, chamado genótipo, e ainda os efeitos do meio ambiente. O desempenho dos animais, seja qual for a característica estudada, estará sempre influenciado pelo genótipo, o meio ambiente e pela interação genótipo-ambiente; portanto o fenótipo medido não reflete diretamente sua qualidade ou potencialidade genética. O genótipo por sua vez, é influenciado por três componentes: o valor aditivo dos genes (A), os efeitos de dominância (D) e a interação entre genes de *loci* diferentes (I) localizados em outras partes do cromossomo ou até mesmo em outros cromossomos.

No caso do componente A, no processo evolutivo, devido às mutações, os genes passaram a apresentar pequenas variações em diferentes formas, chamados de alelos ou polimorfismos. Dependendo da maneira como essas diferentes formas dos genes (alelos) interagem, pode ocorrer um desvio da ação aditiva, chamado efeito de dominância (D); também a interação (I) pode interferir na expressão de um gene específico. Quando é estimado o valor de A através da estatística e este valor é utilizado para a escolha dos animais que deixarão mais descendentes com as características genéticas desejáveis, é possível obter o ganho máximo que a seleção pode oferecer (FERRAZ et al, 2012; DE OLIVIEIRA, D.A.A.; 2012). Estes autores afirmam que avaliar a qualidade genética de um animal nada mais é do que estimar o seu valor genético aditivo (A). O valor genético aditivo esperado (*Expected Breeding Value ou EBV*) é o valor que o animal teria como reprodutor, ou seja, como transmissor de genes que condicionam um determinado fenótipo e, mostra o quanto da média os filhos de um animal seria desviada em

relação à média de todos os filhos dos reprodutores em utilização, isto é, o quanto produziriam a mais ou a menos.

Os conceitos usados para estimar o ganho genético variam dependendo do tipo de exploração; assim, os pecuaristas de corte usam DEPs (Diferenças Estimadas de Progênie) que são por definição, a fração de uma superioridade de progênie atribuídas aos efeitos dos genes do reprodutor e correspondem a metade de seu valor genético aditivo. Os criadores de gado de leite utilizam os termos PTA (*Predicted Transmitting Ability* ou Habilidade prevista de transmissão) TA (*Transmitting Ability* ou habilidade de transmissão) ou ainda, PD (*Predicted Difference*) ou SC (*Sire Comparison* ou Comparação entre Reprodutores). (FERRAZ et al. (2012)

A acurácia nas estimativas das DEPs é relevante na busca de ganho genético numa população de animais. Esta por sua vez, é determinada por fatores próprios da análise, como número de filhos do reprodutor e número de parentes deste, onde são medidas as características de interesse; assim altas acurácias são obtidas a partir de muitas informações do reprodutor. Isso significa também maior tempo entre o nascimento desse reprodutor e seu uso no rebanho, aumentando-se o intervalo de gerações e o ganho genético por ano. A seleção genômica junto com as DEPs aumenta a acurácia e, portanto, aumenta o ganho genético numa população (FERRAZ et al. (2012).

Segundo BIDANEL, (2011) o uso das ferramentas de seleção genômica resultará em programas de melhoramento genético mais eficientes, assim, estas novas ferramentas, baseadas na tecnologia do DNA, irão possibilitar entender a função dos genes envolvidos nas características de interesse.

O interesse na aplicação de marcadores genéticos tem se concentrado na acurácia da predição do mérito genético de animais para características que são difíceis ou custosas de serem medidas, como as de eficiência reprodutiva, carcaça e resistência a doenças (THALLMAN, 2004). Para essas características é difícil e oneroso determinar as DEPs, o que dificulta o melhoramento com estes métodos convencionais (CASAS, 2005).

3.4 PRINCÍPIOS DA SELEÇÃO ASSISTIDA POR MARCADORES MOLECULARES (SAM)

Novas ferramentas da genômicas têm proporcionado um olhar sem precedentes no funcionamento inteiro do genoma bovino; a relação entre a variação de sequências de DNA e diferenças na conformação, saúde, desempenho reprodutivo e produtivo dos bovinos. A seleção genética envolve a seleção genômica; e termos como polimorfismos de nucleotídeos simples (SNPs) e haplótipos tornaram-se parte do vocabulário cotidiano (DEEKERS et al. 2007, WEIGEL, 2011).

Existem três fases no desenvolvimento de programas de seleção com auxílio de marcadores. Na fase de detecção, os polimorfismos do DNA são usados como marcadores para detectar QTLs (*Quantitative Trait Loci*) que estejam segregando em determinadas populações com frequências alélicas específicas. Um ou mais alelos associados com QTLs são identificados. O efeito do alelo do QTL determinado e a sua posição no genoma é estimada. Na fase de avaliação, os marcadores são testados em populações alvo ou em famílias para determinar se o QTL está segregando nestas populações. Na fase de implementação, os marcadores são utilizados dentro e entre famílias para gerarem um banco de dados de genótipos. Estes dados serão então combinados com as informações fenotípicas e de pedigree; então, a avaliação é realizada dentro de uma população de acordo com o mérito genético dos indivíduos (MARTINEZ et al., 2002).

Sob esse novo enfoque, os estudos foram divididos em dois passos: a detecção de marcadores associados a características quantitativas (QTLs), e seu uso na seleção assistida por marcadores (SAM) (MISZTAL, 2011). Para que os marcadores possam ser utilizados, eles devem ser marcadores genéticos, ou seja, segregar segundo as leis de Mendel, e fazer parte ou estarem próximos (ligados) a uma região que codifique características fenotípicas relevantes para a pecuária (DE OLIVEIRA, 2012). Para que um determinado marcador molecular possa ser utilizado na identificação de QTL, a população a ser avaliada deve encontrar-se em situação de desequilíbrio de ligação, avaliada através do cálculo da frequência gênica.

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

3.5 POLIMORFISMO DE UM ÚNICO NUCLEOTÍDEO (SNPs)

Os diversos tipos de marcadores biológicos são: marcadores morfológicos (baseados no fenótipo), bioquímicos (tipo isoenzimas) e moleculares, que correspondem a segmentos de DNA polimórficos (DE OLIVEIRA, 2012).

Os marcadores moleculares são segmentos identificáveis de sequências de nucleotídeos que diferem entre indivíduos. Dentre os diversos marcadores, dois tipos têm tido ampla difusão: os SNPs (polimorfismos de um único nucleotídeo) e os microssatélites, também chamados de STRs (repetições curtas em tandem). Ambos criam padrões únicos e identificáveis de DNA que podem ser utilizados para monitorar a transmissão de regiões cromossômicas específicas dos parentes para sua progênie (MURILLO, 2010).

Para FERREIRA e GRATTAPAGLIA (2009), o tipo de polimorfismo mais comum entre alelos é a substituição de uma base nucleotídica por outra. Neste polimorfismo, incluem-se também pequenas inserções ou deleções que diferenciam os alelos, determinando importantes e abundantes fontes de diversidade intra e interespecífica na sequência de DNA. Em uma população, uma variação de sequência de DNA é considerada polimórfica se é observada em pelo menos 1% dos indivíduos analisados.

Durante o processo de sequenciamento do genoma humano, observou-se que 90% do polimorfismo encontrado no genoma eram SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), resultantes da alteração de uma única base (mutações pontuais) (CAIXETA et al. 2009). Os SNPs são mais abundantes que os marcadores tipo microssatélites, ocorrendo com uma frequência de cerca de um SNP por 500 pares

de bases em bovinos (HEATON et al. 2001), o que permitiria o mapeamento fino de loci de caracteres quantitativos (QTL, *Quantitative trait loci*), (VAN TASSELL et al. 2007). SNPs dentro dos genes podem ser também as mutações responsáveis pelas variações nos fenótipos.

A descoberta de SNPs é geralmente centrada no re-sequenciamento de produtos de PCR (*amplicons*) em DNA extraído de uma amostra diversa e representativa da espécie estudada. Este re-sequenciamento é um processo útil e objetivo, sendo baseado no uso de *primers* que amplificam via PCR segmentos de 300 a 800 pares de bases do gene candidato ou, quando possível, gene inteiro, além de regiões vizinhas (FERREIRA, e GRATTAPAGLIA, 2009). Segundo estes autores, identificar SNPs é um desafio que pode permitir a detecção em abundância de marcadores moleculares para estudos de ligação, bem como de potenciais variações de sequência em regiões *codantes* ou reguladoras, passíveis de análise em estudos de associação com variação fenotípica de características complexas. A situação mais comum para descoberta de SNPs é o re-sequenciamento de linhagens com base em análise de distancia genética para maximizar a potencial detecção de polimorfismo. A região genômica a ser re-sequenciada é definida, e após o desenho de *primers* o re-sequenciamento é efetuado via PCR. Os *amplicons* de diferentes linhagens são alinhados para identificação de SNPs e pequenas inserções / deleções.

Atualmente os SNPs presentes nos painéis comercialmente disponíveis, são utilizados para prever os valores genéticos dos animais, neste caso chamado valor genômico. Assim não é necessário o mapeamento de QTLs. Os animais de uma população referência com dados fenotípicos conhecidos são genotipados com o painel de SNPs e, o efeito de cada um dos SNPs sobre cada uma das características é estimado. Depois, animais candidatos á seleção são genotipados com este mesmo painel de SNP e, o valor genômico é então predito. Em bovinos leiteiros este método de seleção está sendo aplicado desde 2010 para seleção de touros (DE OLIVEIRA, 2012).

3.6 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE - POLIMORFISMO NO TAMANHO DO FRAGMENTO DE RESTRIÇÃO (PCR-RFLP)

A PCR-FRLP (*Polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) é uma popular técnica de genotipagem, útil na pesquisa de características complexas associadas à SNPs. Esta técnica tem sido bastante utilizada em trabalhos que visam encontrar diversidade genômica (JESUS et al., 2008).

O primeiro passo na análise de PCR-RFLP é a amplificação do fragmento que contém a variação e, em seguida o tratamento do fragmento amplificado com uma enzima de restrição específica (RASMUSSEN, 2012). Essas modificações podem ocasionalmente alterar a sequência ou substituir bases nitrogenadas em um ou mais sítios de reconhecimento de uma determinada enzima (CAIXETA et al. 2009). As enzimas de restrição clivam o DNA em locais específicos, denominados sítios de restrição, ao longo da molécula de DNA e geram polimorfismos de tamanho (SCOTT et al., 2000).

Uma vez que diferentes indivíduos apresentam diferenças no genoma, esta técnica pode identifica-las, pois determinadas variações podem alterar sítios de clivagem para enzimas de restrição utilizadas. Desta forma, a comparação dos perfis resultantes pode detectar pequenas alterações (polimorfismos) que diferenciem os genótipos (SCHINCARIOL, L.P 2011).

3.7 GENES CANDIDATOS

Uma das abordagens utilizadas para detectar associações entre marcadores e características de interesse econômico é denominada gene candidato (VEERKAMP e BEERDA, 2007), que se baseia no estudo da variação fenotípica para uma característica, em relação ao nível de polimorfismo de DNA na sequência de genes previamente conhecidos por estarem envolvidos na fisiologia e desenvolvimento desta característica. Para detectar associações entre o gene candidato e a característica de interesse, é necessário encontrar formas alternativas

do gene, resultantes de mutações de ponto na sequência do gene. Também pode-se sequenciar um grupo de indivíduos de uma população segregante para encontrar os polimorfismos na sequência do gene, denominados haplótipos (MARTINEZ et al. 2002).

Segundo DE OLIVEIRA (2012), a grande variação no número cromossômico das espécies de mamíferos, assim como os padrões de bandas cromossômicas distintos que apresentam, indicam que a homologia entre seus genomas é proveniente de rearranjos cromossômicos que ocorreram durante a sua evolução. O mapeamento comparativo dos genomas das diferentes espécies, baseado na premissa que cada uma delas compartilha um ancestral comum, converteu-se no procedimento para identificar os chamados *genes candidatos*. *Genes candidatos*, segundo LEDUR e SCHMIDT, (2000), são genes sequenciados, de ação biológica conhecida, que estão envolvidos com o desenvolvimento ou fisiologia da característica que se deseja estudar em espécies ricas em informações fenotípicas, como humanos e camundongos.

Para FERREIRA e GRATTAPAGLIA (2009), há várias maneiras de selecionar genes candidatos para experimentos de associação. No entanto, sugere-se uma estratégia combinada utilizando dados de mapeamento de QTLs e de sequenciamento de genes candidatos (*candidate gene approach*) na região genômica que engloba o QTL. Isso pode ser adequado para maximizar o potencial de identificar e isolar polimorfismos associados ao controle de uma característica de interesse.

Estudos de genes candidatos em humanos têm gerado controvérsia por serem identificados no controle de uma característica em estudos e não confirmados em estudos subsequentes. Isso, no entanto, pode ocorrer quando o gene selecionado possui um pequeno efeito na variação fenotípica ou, quando ocorrem mudanças nas condições experimentais. Cada população estudada pode possuir uma composição genética que favoreça ou não, a detecção de genes de pequeno efeito, inclusive por possíveis variações na composição alélica nos locos de interesse, ou de padrão de desequilíbrio de ligação ao longo do genoma. Outros fatores, como interação genótipo ambiente, podem também interferir no poder de detecção de associação (BELÓ et al. 2008).

Os diversos resultados das biotecnologias reprodutivas tais como a transferência de embriões e fertilização *in vitro*, que mostram variabilidade entre vacas e entre raças gera inquietude no meio científico (AGUIAR, 2008). A procura do entendimento da fisiologia de cada um dos eventos que ocorrem antes, durante e depois da fertilização do embrião e até sua implantação, leva a descoberta de genes com características pleitrópicas, que são convertidos em genes candidatos (WILLIAMS, 2009, KHATIB, 2009 e HUANG, 2010). Portanto, estes genes estão sujeitos a serem avaliados através dos polimorfismos; em seguida validados e implementados nos diferentes programas de SAM.

O Centro Nacional de Informação Biotecnológica dos Estados Unidos, NCBI, (*National Center for Biotechnology Information*), que armazena uma coleção não redundante de sequências, incluindo DNA genômico, transcritos e proteínas, tem, entre outras funções, fornecer informação biomédica para a comunidade científica mundial. A classificação ou estado de cada um dos genes e produtos gerados é registrada nas bases de dados internacionais. Isto varia desde anotação genômica simples (*genome annotation*) até validada (*validated*), passando por estados intermediários como: inferência (*Inferred*), modelo (*Model*), predito (*Predicted*), provisional (*Provisional*) e revisado (*Reviewed*), segundo o grau de conhecimento que se tenha sobre o produto em questão (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#status>).

3.8 GENES CANDIDATOS ATUANDO NOS PROCESSOS REPRODUTIVOS DAS VACAS

O cruzamento de informações de mapeamento genético de vários experimentos para características ligadas a fisiologia reprodutiva dos bovinos, gera evidências que podem correlacionar tais genes (genes candidatos, Tabela No.1) com características fenotípicas, caso particular, as taxas de produção e qualidade ovocitária, assim como a taxas de fertilização embrionária e de prenhez das vacas doadoras participantes em programas de fertilização *in vitro* de embriões.

Tabela 1. Genes candidatos atuando nos processos reprodutivos das vacas

GENE	NOME (NCBI)	TIPO PRODUTO	SEQUENCIA REFERENCIA	CROMOSSOMO
<i>BMP4</i>	Bone morphogenetic protein 4 [Bos taurus]	Proteína codificante	PROVISIONAL	10
<i>ID3</i>	Inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein [Bos taurus]	Proteína codificante	PROVISIONAL	2

Fonte: NCBI, 2014

3.8.1 Proteínas Morfogenéticas do osso (BMPs) no desenvolvimento folicular e embrionário

Um dos principais fatores que afetam a fertilidade em bovinos se relaciona com o desenvolvimento do período pré-implantação do embrião; o qual é um complexo processo regulado por várias vias ou sinais de transdução. O sistema de sinalização do fator transformante – β (TGF- β) é responsável por muitos processos biológicos incluindo proliferação, diferenciação celular e apoptose, assim como, no desenvolvimento embrionário precoce. (LI, et al. 2012).

As Proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) são fatores de crescimento multi-funcionais, que pertencem à superfamília do fator de crescimento transformante- β (TGF β), (CHEN, et al., 2004). Uma vez que as BMPs foram descobertas por Urist na década do 1960 (URIST, 1965) , até à data ,cerca de 20 membros da família de BMP , foram identificados e caracterizados (XIAO, et al., 2007).

Moléculas que se ligam às proteínas morfogenéticas do osso (BMPs) , no espaço extracelular, podem regular o nível posicionamento e o tempo de ação para os sinais de BMP e, desse modo, os eventos padrão de desenvolvimento. Na

maioria dos casos, as proteínas BMP de ligação extracelular atuarão como inibidores da sinalização por sequestrar BMPs dos seus receptores ou, através da redução da circulação de BMP de uma célula para outra. (UMULIS, et al.,2009). Estudos dos sinais de transdução têm revelado que Smad 1, 5 e 8 são as moléculas intimamente unidas aos receptores de BMP e desempenham um papel central na transdução do sinal de BMP. (CHEN, et al., 2004). Ver Figura 2.

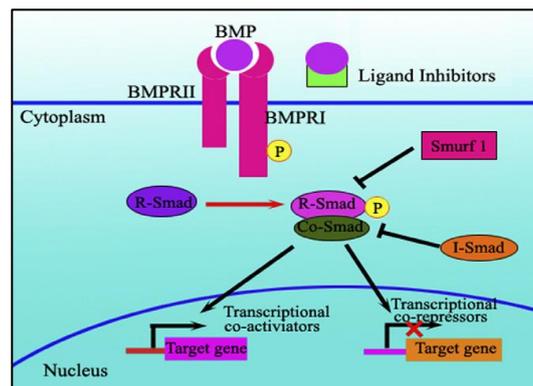


Figura 2: Receptores de BPM mediam a sinalização de BPMs através da ativação de *Smad* (Fonte:XIAO,et al., 2007).

BOBE et al.; (2004) sugeriram pela primeira vez que, membros superfamília TGF β estavam envolvidos na regulação da competência da maturação oocitária (OMC) ou reinício da meiose em truta. Constata-se a retomada da meiose depois de demonstrar mudanças no número de transcritos nos folículos *in vivo* durante aquisição da OMC, mostrando forte aumento para *BMP4* e *inhibina-A* quando a maturação se aproximava.

Várias BMPs foram implicadas como reguladores autócrinos / parácrinos do desenvolvimento folicular do ovário demonstrado pela expressão de *BMP4* e *BMP7* em células da teca em camundongos (SHIMASAKI et al., 1999). Novas evidências surgiram apoiando a teoria de que *BMP4* e *BMP7* originados da teca ou do estroma celular promovem a transição inicial de folículos primordiais melhorando a sobrevivência do folículo (PHIL & CLAIRE, 2006).

A exposição *in vitro* de ovários de ratos neonatais à *BMP4* aumentou a proporção de desenvolvimento de folículos primários e reduziu o número de folículos primordiais em repouso. Por outro lado, a exposição de um anticorpo neutralizante

para *BMP4* resultou em ovários menores acompanhado por uma perda progressiva de oócitos e folículos primordiais, e um aumento da apoptose celular (NILSSON et. al., 2003).

As BMPs, além do desenvolvimento folicular, têm um papel importante dentro do desenvolvimento precoce na formação do padrão embrionário e as estruturas esqueléticas. A ruptura na sinalização de BMP pode afetar o plano do desenvolvimento corporal do embrião. *BMP4* e seus inibidores participam no desenvolvimento da placa neural. (WILSON, et. al., 2001, PATTHEY & GUNHAGA, 2014).

Atingir o destino neural por células ectodérmicas embrionárias é um passo fundamental na formação do sistema nervoso vertebrado. A Indução neural parece envolver a sinalização por factores de crescimento de fibroblastos (FGF) e a atenuação da actividade das BMPs (WILSON, et al., 2000). No entanto, sinais adicionais são necessárias para o estabelecimento do destino epidermal e neural ; as proteínas *Wnt* bloqueiam a resposta das células do epiblasto para os sinais dos FGF, permitindo a expressão e a sinalização de BMP para dirigir o destino epidérmico. (WILSON,et. al., 2001) (Figura 3).

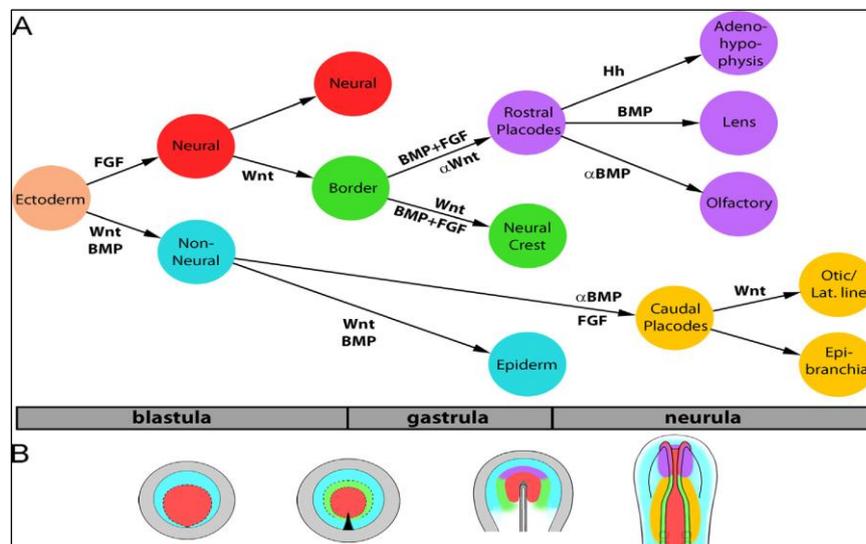


Figura 3. (A) Fluxograma que mostra a especificação de um tipo de células progenitoras ectodérmicas no embrião vertebrado, em função do tempo através dos estágios blástula, gástrula e nêurula e as vias de sinalização ativas em cada etapa. (B) Representação esquemática de um embrião de galinha em etapas de blástula inicial, blástula tardia, gástrula e nêurula tardia, descrevendo a regiões de progenitores com a cor codificada em (A). (Fonte: PATTHEY & GUNHAGA, 2014)

Para determinar os papéis de ligantes de BMP, receptores e proteínas de sinalização no desenvolvimento embrionário e na vida pós-natal, mutações nulas de ligantes, receptores de BMP e genes *Smad* foram criados, e alterações fenotípicas nestes animais têm sido extensivamente estudadas. (CHEN, et al.,2004). Embriões mutantes homocigotos para *BMP4* morrem entre os dias 6.5 e 9.5 mostrando pouca ou nenhuma diferenciação mesodermal (WINNIER et. al., 1995)

Um estudo conduzido por Li et al. (2012) formulado para testar a hipótese de que a expressão alterada de genes do TGF- β no período da pré-implantação de embriões bovinos, está associado com anormalidades morfológicas destes embriões. Esse estudo testou a expressão de 25 genes deste sistema em embriões produzidos *in vitro* que foram classificados no estado de blastocisto em embriões degenerados ou normalmente desenvolvidos. Dez genes mostraram diferenças estatísticas nos padrões de expressão dos grupos de embriões avaliados. Uma vez feita à análise de associação gênica, demonstrou-se que os genes da via TGF- β , especialmente *BMP4* e *ID3* têm vital função na regulação do período de pré-implantação embrionária; tanto a nível materno quanto embrionário. Assim, estes genes podem ser utilizados como marcadores genéticos para desenvolvimento do embrião e fertilidade de bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIAR, P.R.L. Estudo de marcadores moleculares (microsatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias. Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-graduação em ciências veterinárias. Porto Alegre, 2008
- BELÓ, A.;ZHENG,P.; LUCK,S.;SHEN,B.; MEYER,D,J.; LI,B.; TINGEY,S.; REFALSKI,A. Whole genome scan detects an allelic variant on *fad2* associated with increased oleic acid levels in maize. **Mol. Genet. Genomics**. 279: 1-10, 2007.
- BIDANEL, J-P. Biology and genetics of reproduction. In: ROTHSCHILD MF, RUVINSKY, A, **The Genetics of the Pig**, 2nd edn. Edit. CABI Cambridge, MA, USA. pp,218–241, 2011
- BOBE, J., NGUYEN, T., & Jalabert, B. (2004). Targeted gene expression profiling in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ovary during maturational competence acquisition and oocyte maturation. **Biol. Reprod.**, 71, 73–82.
- BURNS, D.S.; JIMENEZ-KRASEL, F.; IRELAND,J.L.; KNIGHT,P.G.; IRELAND, J.J. Numbers of antral follicles during follicular waves in cattle: evidence for high variation among, very high repeatability an individuals, and an inverse association with serum-follicle stimulating hormone concentrations. **Biol Reprod**. V. 73 (1), p. 54-62. 2005
- CAIXETA,E.T.; OLIVEIRA,A.C.; DE BRITO,G.G.; SAKIYAMA, N.S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM e_____. **Marcadores Moleculares**. 2 ed. Viçosa: Folha de Viçosa, 2009. p. 12-93.
- CAMARGO, L.S.A.; VIANA, J.H.M.; SÁ, W.F.; FERREIRA, A.M.; RAMOS, A.A.; VALE FILHO V.R. Factors influencing *in vitro* embryo production. **Anim. Reprod.**, v.3, n.1, p.19-28, Jan./Mar. 2006.
- CASAS, E. (2005). Aplicación de la genómica para identificar genes que influyen sobre características económicamente importantes en animales1. *XIX Reunión de ALPA y la XXXIII Reunión de la Asociación Mexicana de Producción Animal-AMPA*. Tampico , México.
- CHANG,M.T.,CHENG, Y.S., HUANG, M.C,. The SNP Genotypes of Growth Hormone Gene Associated with Reproductive Traits in Tsaiya Ducks. **Reprod Dom Anim** 47, 568–573 (2012); doi: 10.1111/j.1439-0531.2011.01918.x ISSN 0936-6768.
- CHEN, D., ZHAO, M., & MUNDY, G. R. (December 2004). Bone Morphogenetic Proteins. **Growth Factors**, Vol. 22 (4), pp. 233–241.

- DE OLIVEIRA, D.A.A.; Genética molecular- novas tecnologias liadas ao melhoramento animal. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético aplicado à produção Animal**. Edit. FEPMVZ, 2012. p. 667-676.
- DE OLIVEIRA, H.N. Mapeamento de QTLs e seleção assistida por marcadores. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético aplicado à produção Animal**. Edit. FEPMVZ, 2012. p. 648-666
- DEKKERS, J.; ROTHSCCHILD, M. New tools to make genetic progress. In: **London Swine conference**. Proceedings. London J.M. Murphy. p . 53-63, 2007
- FERRAZ, J.B.S.;REZENDE, F.M. Biologia molecular no melhoramento animal: o impacto do uso de marcadores moleculares na seleção dos animais. In: PEREIRA, J.C.C. **Melhoramento Genético aplicado à produção Animal**. Edit. FEPMVZ, 2012. p. 677-710.
- FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. Genética de associação em plantas. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. **Marcadores moleculares**. Edit. Folha de Viçosa, 2009, p. 351-355
- HAYASHI, K.G.; USHIZAWA, K.; HOSOE, M.; TAKAHASHI, T. Differential genome-wide gene expression profiling of bovine largest and second-largest follicles: identification of genes associated with growth of dominant follicles. **Reproductive Biology and Endocrinology**. 8:11, 2010 In: <http://www.rbej.com/content/8/1/11>
- HEATON, M. P.; W. M. GROSSE, S. M.; KAPPES, J. W. KEELE, C. G.; CHITKOMCKOWN, L. V.; CUNDIFF, A.; BRAUN, D. P. Little and W. W. Laegreid (2001). "Estimation of DNA sequence diversity in bovine cytokine genes." **Mammalian Genome** 12(1): 32-37.
- HUANG,W.;YANDELL, B.S.; KHATIB, H. Transcriptomic profiling of bovine IVF embryos revealed candidate genes and pathways involved in early embryonic development. **BMC Genomics**. 11:23, 2010.
- IETS statistics. (2012). *The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals*.
- IRELAND, J.J.; WARD, F.; JIMENEZ-KRASEL, F.; IRELAND, J.L.; SMITH,G.W.; LONERGAN, P.; EVANS, A.C. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. **Hum Reprod**. V.22 (6), p. 1687 -95. 2007.
- JESUS, O. N; FIGUEIRA, A; SILVA, S. O. Caracterização da constituição genômica de bananeira por meio de marcadores PCR-RFLP. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA, 54., 2008, Salvador. Resumos... Disponível em: <<http://www.sbg.org.br>>. Acesso em: 18 de Março 2013.
- KHATIB, H.; HUANG,W.; WANG, X.; TRAN,A.H.; BINDRIM, A.B.; SCHUTZKUS, B.; MONSON,R.L.; YANDELL, S. Single gene and gene interaction effects on fertilization and embryonic survival rates in cattle. **J. Dairy Sci**. 92:2238–2247, 2009.

- KHATIB, H.; MONSON, R. L.; SCHUTZKUS, V.; KOHL, D. M.; ROSA, G. J. M.; RUTLEDGE J. J. Mutations in the STAT5A Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk Composition in Cattle. **J. Dairy Sci.** 91:784–793, 2008
- KIM, J.; CHOI, Y.H.; CHANG, S.; KIM, K.T.; JE, J.H. Defective folliculogenesis in female mice lacking Vaccinia-related kinase 1. **Scientific Reports** | 2 : 468 | DOI: 10.1038/srep00468. 2012
- KOMISAREK, J.; MICHALAK, A.; WALENDOWSKA, A. The effects of polymorphisms in DGAT1, GH and GHR genes on reproduction and production traits in Jersey cows. **Animal Science Papers and Reports** vol. 29 (2011) no. 1, 29-36
- KOMMADATH, A.; MULDER, H. A.; DE WIT, A. A. C.; WOELDERS, H.; SMITS, M. A.; BEERDA, B.; VEERKAMP, R. F.; FRIJTERS, A. C. J.; TE PAS, M. F. W. Gene expression patterns in anterior pituitary associated with quantitative measure of oestrous behaviour in dairy cows. **Animal** (2010), 4:8, pp 1297–1307. doi:10.1017/S1751731110000303
- LA ROSA, I.; CAMARGO, L.; PEREIRA, M.M.; MARTIN, R.F.; PAZ, D.A.; SALAMONE, D.F. Effects of bone morphogenetic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on *in vitro* maturation and culture of bovine preimplantation embryos **Reproductive Biology and Endocrinology**, 9:18, 2011 In: <http://www.rbej.com/content/9/1/18>
- LEUDUR, M.C.; SCHMIDT, G.S. Genética molecular: aplicação de tecnologias moleculares no melhoramento genético de aves. **Avicultura Industrial**. Fev, 2000. Disponível em: <http://www.bichoonline.com.br/Artigos/embrapave0007.htm>. Acesso em Março 18 2013.
- LI, G.; KHATEEB, K.; SCHAEFFER, E.; ZHANG, B.; KHATIB, H. Genes of the transforming growth factor-beta signaling pathway are associated with pre-implantation embryonic development in cattle. **Journal of Dairy Research** 79 310–317, 2012.
- MARTINEZ, M.L., MACHADO, M.A. Programa Genoma Brasileiro de Bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. Anais do IV Simpósio Nacional de Melhoramento Animal, 2002.
- MIZSTAL, I. FAQ for genomic selection. **J. Anim. Breed. Genet. Edit.**, v. 128, p. 245-246, 2011.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D.; SUMANDE, J. Superovulatory responses of cattle. **Theriogenology**. V. 19, p. 56-81. 1983.
- MURILLO, V.E.V. Biotecnología. In: BERMUDEZ, M.M.; VELAZQUEZ, G.M. **Guía técnica de programas de control de producción y mejoramiento genético en bovinos de carne**. Edit. Alfa Design And Printing, Mex. 2010, p. 30-34
- NATIONAL CENTER OF BIOTECHNOLOGY INFORMATION, NCBI. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/RefSeq/key.html#status> Acesso em Agosto 2012.

- NEVAREZ, P.L.; RINCON, G.; MEDRANO, J. F.; RILEY, D. G.; CHASE JR. C. C.; COLEMAN, S. W.; VANLEEUEWEN, D. M.; DEATLEY, K. L.; ISLAS-TREJO, A.; SILVER, G. A.; THOMAS, M. G. Single nucleotide polymorphisms in the growth hormone–insulin-like growth factor axis in straight bred and crossbred Angus, Brahman, and Romosinuano heifers: Population genetic analyses and association of genotypes with reproductive phenotypes. **J. Anim. Sci.** 2011. 89:926–934 doi:10.2527/jas.2010-3483.
- NILSSON, E., DORAISWAMY, V., & SKINNER, M. (2003). Transforming growth factor-beta isoform expression during bovine ovarian antral follicle development. **Molecular Reproduction and Development**, 66 237–246.
- NONATO JR, I.; PONTES, J.H.F.; ERENO JR, J.C.; BLASCHI, W.; UVO, S.; OLIVERIA, J.A.; SENEDA, M.M. FSH prior follicle aspiration: comparison between two gonadotropins to *in vitro* embryo production. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 31, p. 513, 2003. (Abstract).
- OIKONOMOU, G., MICHAILIDIS, G., KOUGIOUMTZIS, A., AVDI,M., BANOS, G., Effect of polymorphisms at the STAT5A and FGF2 gene loci on reproduction, **Research in Veterinary Science** Volume 91, Issue 2, , P 235–239. 2011
- PALMA, G. Producción *In vitro* de embriones bovinos. In:_____ **Biotecnología de la Reproducción**. Edit. INTA, 2001. p. 225-289.
- PATTHEY, C., & GUNHAGA, L. (2014). Signaling pathways regulating ectodermal cell. **EXPERIMENTAL CELL RESEARCH**, 321 - 11 – 1 6.
- PHIL, G. K., & CLAIRE, G. (2006). TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. **Reproduction** , 132 191–206.
- PONTES, J., NONATO-JUNIOR, I., SANCHES, B., ERENO-JUNIOR, J., UVOA, S., BARREIROS, T., et al. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. **Theriogenology**, 71 690–697.
- PONTES, J.H.F.; STERZAB, F.A.M.; BASSOA, A.C.,et al. Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. **Theriogenology**, 75 p.1640–1646, 2011
- RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis- Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. In: MAGDELDIN, S. **Gel Electrophoresis - Principles and Basics**, Edit. ,InTech, 2012, p. 315-320. ISBN: 978-953-51-0458-2 Available from: <http://www.intechopen.com/books/gel-electrophoresis-principles-and-basics/restrictionfragment-length-polymorphism-analysis-of-pcr-amplified-fragments-pcr-rflp-and-related-te>
- ROOVER, D. R., GENICOT, G., LEONARD, S., BOLS, P., DESSY, F. Ovum pick up and *in vitro* embryo production in cows super stimulated with an individually adapted super stimulation protocol. . **Animal Reproduction Science**, v. 86, p. 13-25, 2005.

- SCHINCARIOL, L.P. Identificação de marcadores SNP pelas técnicas de PCR-RFLP e Tetra-primer ARMS-PCR e suas associações com qualidade de bebida em café. Dissertação de Mestrado, Instituto Agronômico Curso de Pós-Graduação em Agricultura Tropical e Subtropical . Campinas, 2011, 54 fls.
- SCHULTZ, R.M. The molecular foundations of the maternal to zygotic transition in the preimplantation embryo. **Hum Reprod Update**, 8:323-331. 2002
- SCOTT, K. D.; ABLETT, E. M.; LEE, L. S.; HENRY, R. J. AFLP. Markers distinguishing an early mutant of flame seedless grape. **Euphytica**, v. 113, n. 3, p. 245-249, 2000.
- SHIMASAKI S, Z. R. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. **PNAS** , 96 7282–7287.
- SONSTEGARD, T.S., TASSELL, C.P., ASHWELL, M.S., 2001. Dairy cattle genomics: tools to accelerate genetic improvement? **Journal Animal Science** 79, 307–315.
- SPELMAN, R.J.; BOVENHUIS, H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programs. **Anim. Genet.**, v. 29 p. 77-84, 1998.
- TAMASSIA, M.; HEYMAN, Y.; LAVERGNE, Y.; RICHARD, C.; GELIN, V.; RENARD, JP.; CHASTANT-MAILLARD, S. Evidence of oocyte donor cow effect over oocyte production and embryo development *in vitro*. **Reproduction**, 126:629-637. 2003.
- THALLMAN, R. M. (2004). DNA testing and marker assisted selection. *Proc. Beef Improv. Fed. 36th Ann. Res. Symp. Ann. Meet.*, (págs. 20-25). Sioux Falls, DS, USA.
- THIBIER, M. New records in the numbers of both in vivo-derived and *in vitro*-produced bovine embryos around the world in 2006. **International Embryo Transfer Society Newsletter**, v.25 n.4, p.15-20, 2007.
- UMULIS, D., O'CONNOR, M. B., & BLAIR, S. S. ((2009)). The extracellular regulation of bone morphogenetic protein signaling. **Development** , 136, 3715-3728 .
- URIST, M. (1965). Bone formation by autoinduction. **Science** , 150, 893–899.
- VAN TASSELL, C.P.; MATUKUMALLI, L.; TAYLOS, C.; SMITH, T.; SONSTEGARD, T.; SCHANABEL, R.; SILVA, M.V.G.B.; WIGGANS, G.; LIU, G.; MOORE, S.; TAYLOR, J. Construction and application of a bovine high density SNP assay. **Journal Of Animal Science**, 2007, Vol.85, pp.421-422
- VEERKAMP, R., & BEERDA, B. (2007). Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. **Theriogenology**, Volume 68, Supplement 1S P, 266–S273.
- VERLAG, B.G. **Reprod Dom Anim** Reproduction in Farm Animals in an Era of Rapid Genetic Change: Will Genetic Change Outpace Our Knowledge of Physiology? 47 (Suppl. 4), 313–319 (2012)

- WEIGEL, K.; MELAND, O.; Haplotypes Affecting Fertility and their Impact on Dairy Cattle. **Genetic Trends**. Vol. 63 No. 3. p. 11, 2011
- WILLIAMS, J.L.; DUNNER, S.; VALENTINI, A.; et al. Discovery, characterization and validation of single nucleotide polymorphisms within 206 bovine genes that may be considered as candidate genes for beef production and quality. **Animal Genetics**, 40, 486–491, 2009.
- WILSON, S. I., ANNA, R., TOLLEIV, T., WILLERT, K., NUSSE, R., & EDLUND, T. M. (2001). neural and epidermal fates in the chick embryo. **NATURE**, VOL 411 -325-329.
- WILSON, S. I., GRAZIANO, E., HARLAND, R., & JESSELL, T. M. (2000). An early requirement for FGF signalling in the acquisition of neural cell fate in the chick embryo. **Curr. Biol.** 10, 421±429 ., 10, 421-429.
- WINNIER, G., BLESSING, M., LABOSKY, P., & HOGAN, B. (1995). Bone morphogenetic protein-4 is required for mesoderm formation and patterning in the mouse. **Genes Dev**, 9- 2105–2116.
- XIAO, Y.-T., XIANG, L.-X., & SHAO, J.-Z. (2007). Bone morphogenetic protein. Mini review. **Biochemical and Biophysical Research Communica-tions**, 362 - 550–553.

CAPITULO 2. CORRELAÇÕES FENOTÍPICAS ENTRE CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES E TAXAS DE PREENHEZ EM DOADORAS GIR

Resumo:

O crescimento da raça Gir no Brasil em termos de ganho genético para o leite, juntamente com as condições do mercado, levou ao uso da produção *in vitro* de embriões, utilizando a aspiração folicular transvaginal guiada pela ultrassonografia (OPU-PIVE) como biotecnologia líder para a multiplicação de material genético. O objetivo deste trabalho foi estudar as correlações fenotípicas entre características da OPU-PIVE e as taxas de prenhez registradas em um programa de transferência de embriões, utilizando vacas da raça vacas Gir como doadoras de oócitos. Foram analisados dados provenientes de 211 sessões de OPU e 298 transferências de embriões durante os anos de 2012 e 2013. Análise estatística foi desenvolvida utilizando SAS 2009. Estimativas das correlações simples de Pearson foram obtidas. As correlações foram realizadas para: NVcoc e PVcoc , número e proporção de complexos cumulus -oócitos viáveis ; Ncleavd4 e Pcleavd4 , número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura ; Ntembd7 e Ptembd7 , número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura ; NPrD30 e PPrD30 , número e proporção de prenhezes 30 dias após a transferência, e NPrD60 e PPrD60 , número e proporção de prenhezes no dia 60 após a transferência. Moderadas a moderadamente altas correlações foram encontradas para todas as características numéricas, sugerindo estes como os parâmetros mais adequados para a seleção de doadoras de oócitos Gir em programas de PIVE. Para o caso NVcoc é proposto como característica de seleção, devido a correlações positivas com outras características numéricas, como taxa de prenhez no dia 30 e a sua repetibilidade (0.66).

Palavras chave: OPU-PIVE, Vacas Gir, repetibilidade.

1. INTRODUÇÃO

Desde o final dos anos 1980, o desenvolvimento da aspiração folicular guiada por ultrassonografia (Ovum pick up - OPU) para produção *in vitro* de embriões (PIVE), tornou-se uma técnica bem conhecida e desenvolvida na pesquisa e na produção comercial de embriões bovinos (Thibier , 2008). Em 2011, o número total de embriões viáveis produzidos no mundo foi de 453.471, cerca de 85 por cento destes (318.119), foram produzidos no Brasil, colocando o país como líder quantitativo mundial em PIVE bovina (IETS, 2012). Nos últimos anos, observou-se um crescimento progressivo da produção de embriões no Brasil em raças leiteiras, diretamente relacionada com produção *in vitro*. O uso de OPU-PIVE em vacas Gir, por exemplo, aumentou mais de 600% nesse período (Viana et al., 2010b).

Independentemente do grande progresso ao longo das últimas décadas, a PIVE ainda é uma técnica caracterizada por baixa eficiência relativa (Siqueira et al., 2012). Diferentes estudos têm relatado a eficiência de 10 a 40% na produção de embriões (considerando os estágios de maturação, fertilização e cultura até o estágio de blastocisto) (Lonergan & Fair 2008;. Rizos, et al, 2008) e, as taxas de prenhez entre 30 e 40% (Peterson & Lee, 2003).

A correlação entre as características fenotípicas só pode ser conhecida quando se mede diretamente; isto promove a descoberta de componentes cruciais no processo de produção que podem ser modificados para aumentar a produtividade das características de interesse (Coimbra, et al, 2004.).

Quando duas características economicamente importantes mostram correlação genética positiva, a seleção pode ser direcionada para uma dessas, e, geralmente, a que é mais facilmente medida é eleita, porque no final as duas alternativas serão melhoradas (Pereira, 2012).

Merton et al, (2009) em vacas da raça Holandesa (*Bos taurus taurus*) encontraram correlação genética moderada e positiva para alguns das características PIVE (número de embriões totais e transferíveis no dia 7 de cultura); embora para outras, a correlação foi zero. Os comportamentos das correlações fenotípicas observadas foram em consonância com correlações genéticas.

O resultado final do processo de OPU-PIVE é medido pelo número e percentagem de prenhezes por embrião transferido. Portanto, a determinação de correlações fenotípicas entre características relacionadas na OPU-PIVE, pode contribuir para a compreensão das complexas associações que esse processo pressupõe.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Doadoras de oócitos

Os dados de OPU-PIVE utilizados neste estudo foram coletados de 50 doadoras Gir; vacas adultas com mais de 4 anos de idade. Todas as vacas estavam ciclando e com escore corporal entre três e quatro (em uma escala de um a cinco; Edmonson et al., 1989) e foram mantidos somente em pastagens com sombra. Foram estudadas um total de 211 sessões de OPU e 298 transferências de embriões. Nenhuma das fêmeas foi submetida a tratamento hormonal antes da OPU - PIVE. Os animais encontravam-se no estado do Rio de Janeiro, Brasil.

2.2. Recuperação e classificação oocitária

Complexos cumulus-oócitos (CCOs) foram colhidos por punção folicular. Imagem dos ovários foi realizada utilizando um dispositivo de ultrassom portátil com uma sonda de setor de 7,5 MHz equipado com um guia intravaginal de agulha (scanner 100S, Pie Medical, Maastricht, Holanda), e folículos entre 2 de 8 milímetros foram perfurados com o uso de agulhas hipodérmicas descartáveis calibre 19G e, uma bomba vácuo para aspiração de 60-80mmHg. Complexos cumulus oócito foram classificados de acordo com o citoplasma e número de camadas de células do cumulus, em: I. Viáveis (GI: mais de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ GII: mais de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou menos de 3 camadas e citoplasma homogêneo/ GIII: menos de 3 camadas e citoplasma com granulações; ou parcialmente desnudos e citoplasma homogêneo ou com leves granulações) e II.

Não viáveis (GIV: parcialmente desnudos e citoplasma com granulações; ou desnudos, ou expandidos ou degenerados).

2.3. Maturação *in vitro*, fertilização e cultivo dos embriões.

Os oócitos viáveis foram maturados *in vitro* (MIV) em meio TCM 199, suplementado com 10% SFB e 1,0µg/mL FSH (Pluset®, Calier), 50µg/mL hCG (Profasi®, Serono), 1,0µg/mL estradiol (Sigma E-2758), 0,2mM piruvato de sódio e 83,4µg/mL amicacina. Após a MIV, espermatozoides viáveis de palhetas congeladas de sêmen sexado foram separados por gradiente de Percoll descontínuo e a fertilização *in vitro* (FIV) foi realizada em meio TALP-FIV, com 0,2mM piruvato, 83,4µg/mL amicacina e suplementado com 6mg/mL de BSA. O cultivo *in vitro* (CIV) foi realizado em meio SOF suplementado com 2,5% SFB por 7 dias. Todas as etapas da PIVE foram realizadas em estufa incubadora a 38,5°C, atmosfera de 5% CO₂ com ar atmosférico e alta umidade relativa. A taxa de clivagem foi avaliada 96h após a FIV e a taxa de blastocisto no dia 7.

2.4 Transferência dos embriões produzidos *in vitro*

As prenhez foram produzidas por transferência de blastocisto grau I. Os embriões foram transferidos não cirurgicamente em novilhas receptoras mestiças *B. indicus* x *B. Taurus* (sincronizadas previamente com um protocolo hormonal a base de progesterona e benzoato de estradiol e cipionato e cloprostenol) para o corno uterino ipsilateral ao corpo lúteo. A gravidez foi diagnosticada por exame de ultrassom no dia 30 e 60 após a transferência de embriões.

2.5. Correlações fenotípicas

A correlação fenotípica (r_p), é definida como a relação entre os fenótipos da característica P1 e a característica P2. As correlações foram classificadas

segundo a sua magnitude como: baixa (<0,2), moderada (0,2 a 0,49), moderadamente alta (0,5 a 0,8) ou alta (> 0,8).

2.6. Definição das características da OPU-PIVE tratadas

As características fenotípicas foram avaliadas da seguinte forma: 1. Número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis (Nvcoc e Pvcoc) classe I, II e III, que foram maturados com sucesso, fertilizados e cultivados *in vitro*, 2. Número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura (Ncleavd4 e Pcleavd4), 3. Número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura (Ntembd7 e Ptembd7) como proporção do Nvcoc, segundo a classificação IETS como estágio 4 (mórula), grau 1 (excelente ou bom), e estágios 5 - 7 (blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido), grau 1 e 2 (excelente e regular). Número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência (NPrD30 e PPrD30) e 5. Número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência (NPrD60 e PPrD60). As taxas de gravidez foram calculadas com base no número de embriões transferidos e este parâmetro foi dependente do número de receptoras disponíveis no programa.

Muitas empresas que se dedicam à produção *in vitro* de embriões bovinos costumam medir seus resultados em termos de percentagens ou proporções, e assim, avaliar o desempenho real do processo limitando efeito numérico óbvio em muitas características. Vacas com alta taxa de produção de oócitos, geralmente produzem mais embriões no final do processo, no entanto, isso nem sempre se traduzem em bons índices de clivagem, de embriões e de prenhez. Obtenção de taxas elevadas nas características acima anotadas poderia melhorar consideravelmente a baixa eficiência do processo de OPU-PIV relatada na literatura científica. (Camargo, et al., 2006).

As vacas foram classificadas de acordo com o grau de eficiência nas características de interesse acima mencionados em grupos de alta, média e baixa eficiência. Para classificar as vacas em processo de OPU-PIV, os valores médios relatados na literatura científica (vacas Gir) para cada uma das variáveis (Camargo

et al., 2007, Pontes, et al., 2010, Grazia, et. al., 2012, Silva et al., 2012, Oliveira, et al, 2013) foram considerados, comparando estes resultados com os obtidos pelas instituições onde foram coletados os dados. Para esta classificação, apenas as proporções para todas as características foram consideradas (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação das doadoras Gir de acordo a sua eficiência nas características da OPU-PIVE

CARACTERÍSTICA	Classe alta (%)	Classe média (%)	Classe baixa (%)
PVcoc	≥ 80	50 – 79	< 50
PcleavD4	≥ 80	60 – 79	< 60
PTembD7	≥ 30	20 – 29	< 20
PPrD30	≥ 40	30 – 39	< 30
PPrD60	≥ 35	25 – 34	<25

2.7. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o software SAS 9.0 (2009). Médias e desvio padrão foram calculados com PROC-MEANS, estimativas para os coeficientes de correlação de Pearson entre as características foram calculadas pelo PROC-CORR. Repetibilidade de algumas características foi obtida a partir das estimativas das variâncias pelo método REML, procedimento Varcomp.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 OPU-PIVE e taxas de prenhez

Um total de 2.758 oócitos foram coletados, 2068 (75,25% ± 20,5) foram considerados viáveis (gerando uma média de 9,77 ± 6,79 oócitos viáveis por procedimento). Percentuais de oócitos clivados, embriões por oócito clivado, e taxa de prenhez por sessão OPU-PIVE aos 30 e 60 dias após a transferência são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 . Médias e desvio-padrão, valores mínimos, máximos de características da OPU – PIVE em vacas doadoras da raça Gir (b. *Indicus*) no estado de Rio de Janeiro, Brasil

.**Característica	Média ± Desvio padrão*	Mínimo	Máximo
NVcoc	9.77 ±6.79	0	44
PVcoc (%)	75,25 ± 20.5	16.7	100
NcleavD4	6.44 ±4.89	0	30
PcleavD4 (%)	66.79 ±33.70	3.8	100
NTembD7	2.61 ±2.68	0	12
PTembD7 (%)	35,47 ±34.62	0	100
NPrD30	0.65 ±1.10	0	7
PPrD30 (%)	28.91 ± 39.59	0	100
NPrD60	0,61 ± 1.06	0	7
PPrD60 (%)	25.73 ±37.85	0	100

* Estatística descritiva de dados não transformados das características da OPU-PIVE.

** NVcoc e PVcoc, número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis; Ncleavd4 e Pcleavd4, o número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura; Ntembd7 e Ptembd7, o número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura; NPrD30 e PPrD30 número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência e NPrD60 e PPrD60, número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência.

Dos 298 embriões transferidos, 139 (28.91%) e 129 (25.73%) levaram a prenhez após o dia 30 e 60 de transferência de embriões, respectivamente. O número total de embriões clivados no dia 4 variou de 0 a 30 e a percentagem de embriões clivados desde 3.8% a 100%.

As vacas avaliadas no presente trabalho foram classificadas dentro da classe média em relação a características porcentuais como PVcoc e PcleavD4, (75.25 e 66.79%, respectivamente). As vacas se encontraram na classe alta na característica Ptembd7 com 35,47% do total dos embriões com desenvolvimento até blastocisto no dia 7 de cultivo.

Resultados semelhantes para PVcoc e PcleavD4 também são apresentados nos estudos de Camargo, et al., (2007), Pontes et, al., (2009) e Oliveira et al., (2013). A Tabela 3 mostra a variabilidade desta característica em outros estudos.

No entanto, o valor de Nccov obtido neste estudo (9.77 ± 6.79) foi diferente dos obtidos por Pontes et al., (2010) e Viana et al., (2010) com valores de médios de 12.1 ± 3.9 e 7.0 ± 1.0 , respectivamente.

Tabela 3. Resultados para características da OPU-PIVE em vacas Gir brasileiras

Característica ----- Referência	NVcoc	PVcoc (%)	PcleavD4 (%)	PTembD7 (%)	PPrD30 (%)	PPrD60 (%)	OPU-IVP sessions
Camargo,2007	-	-	66.7	29.4	44	-	33
Pontes,2010	12.1 (± 3.9)	70,7	68	45	40	-	3778
Silva, 2012	-	58,5	59,6	26,8	-	-	250
Grázia, 2012	16 ($\pm 1,0$)	61,5	86,6	61,3	-	-	68
Oliveira,2013	8,94 ($\pm 0,69$)	74,73	80,97	45,19	47,18	42,95	178
Este estudo, 2014	9.77 (± 6.79)	75,25 (± 20.5)	66,79 (± 33.7)	35,47 (± 34.6)	28,9 (± 39.5)	25,73 (± 37.8)	211

Variabilidade entre doadoras da mesma raça tem sido relatada em vários estudos (Pontes et al, 2010, Machado, et al., 2006). O efeito de técnico, do laboratório e do número e intervalo entre sessões de OPU também foram citados como fontes de variação (Abdoon, et al., 2001, Camargo, et al., 2006, Pontes, et al., 2011).

As taxas de gestação obtidos no presente estudo 30 e 60 dias após transferência de embriões foram $28.9 (\pm 39.5)$ e $25.73 (\pm 37.8)$. Este resultado pode ser considerado baixo para o primeiro caso (30 dias) e meio para o dia 60. Os resultados de Pontes et al., (2010) e Oliveira et al., (2013) mostram valores mais elevados ($> 40\%$) no dia 30.

O fato de o programa ter incluído doadoras sem sessões prévias de OPU-PIVE (41% das vacas), pode ter influenciado no resultado final de taxas de prenhez. Este resultado seria concordante com os achados de Vega et, al., (2013), que mostrou o efeito do número de sessões de OPU - PIVE sobre as taxas de prenhez

(média de 6.9% para o grupo de 1 a 5 sessões e 30.9% para o grupo de doadoras de oócitos com 6 até 13 sessões em vacas *B. indicus*).

Vários estudos mostram a influência do meio de cultura *in vitro* sobre o desenvolvimento embrionário (Farin, et al, 2001; Khosla, et al, 2001; Malekshah & Moghaddam, 2005; Camargo, et al, 2006) e sobre a taxa de prenhez (Hasler , 2000). Fatores genéticos foram determinados influenciando nesta situação. A correlação nula entre a fertilidade e NTembD7 encontrado por Merton et al., (2009), pode indicar que a capacidade para o desenvolvimento dos complexos cumulus-oócito é maior quando a maturação, fertilização e o desenvolvimento ocorre *in vivo*, em comparação com *in vitro*. Abdoon et al. (2001) sugerem que os fatores relacionados com o ambiente de cultura estão relacionados com a capacidade dos complexos cumulus –oócito de desenvolver até blastocistos.

PVcoc, PcleavD4 e PTembD7 são características de proporção em relação ao número de complexos cumulus-oócitos viáveis obtidos em sessões de OPU. A grande variabilidade relatada nos estudos apresentados na Tabela 3 para estas características sugere participação multifatorial (doadora, técnico, e de laboratório, entre outros), e justifica a avaliação de correlações fenotípicas entre essas características para seleção individual.

Camargo et al, (2006) relataram baixa eficiência da técnica OPU-PIVE, com apenas 30-40% dos oócitos com desenvolvimento até blastocistos. Análise dos resultados de 4518 sessões OPU-PIV apresentados na Tabela 3 mostram o desempenho para esta variável (PTembD7) nas doadoras Gir de 43,6%, um resultado que ilustra o aperfeiçoamento da técnica, no período de tempo avaliado.

3.2. Correlações fenotípicas

O objetivo final da técnica de OPU-PIVE é aumentar o número de prenhez para cada transferência de embrião; assim, as correlações entre as taxas de prenhez com outras características são importantes como estratégia de melhoramento genético. Por exemplo, a seleção direta para PPrD30 ou PPrD60, ou seleção indireta através de outras características.

Bosselmann, et al. (2005) sugeriu, no caso de transferência de embriões produzidos por ovulação múltipla, a seleção direta no número de embriões

transferíveis (TE) ou através de seleção indireta sobre número de estruturas recuperadas após lavado ou Ova Flushing (FO).

As correlações fenotípicas entre NPrD30, PPrD30, NPrD60 e PPrD60 com características de OPU-PIV são apresentados na Tabela 4. As magnitudes das correlações fenotípicas entre as características foram favoráveis e moderadas e moderadamente altas. Em geral, as correlações fenotípicas entre características numéricas mostraram-se de moderada a moderadamente alta magnitude.

As correlações observadas entre NVcoc com NcleavD4 e com NTembrD7 (0.71 e 0.42 respectivamente), indicam que, em um lote de embriões o animal com maior produção de oócitos viáveis tem 71% mais chances de alcançar um elevado número de ovócitos clivados ao dia 4, e 42% de chance de conseguir uma maior quantidade de embriões transferíveis no dia 7 de cultivo.

Por outro lado, não foi encontrada correlação fenotípica significativa entre as características de proporção como PcleavD4, PTembD7, PPrD30 e PPrD60 e NVcoc. Isso indica que as taxas citadas são independentes de NVcoc, sugerindo outros componentes com o maior impacto no seu desempenho.

Tabela 4. Correlações fenotípicas entre características de produção in vitro de embriões usando OPU e número e proporção de prenhezes em vacas Gir.

	NVcoc	PVcoc	NcleavD4	PcleavD4	NTembD7	PTembD7	NPrD30	NPrD60	PPrD30
NVcoc	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PVcoc	0,24**	-	-	-	-	-	-	-	-
NcleavD4	0,71**	0,25**	-	-	-	-	-	-	-
PcleavD4	0,058	0,17*	0,46**	-	-	-	-	-	-
NTembD7	0,42**	0,09	0,65**	0,45**	-	-	-	-	-
PTembD7	0,014	0,04	0,19**	0,50**	0,71**	-	-	-	-
NPrD30	0,14*	0,12	0,34**	0,32**	0,57**	0,49**	-	-	-
NPrD60	0,13	0,12	0,32**	0,31**	0,57**	0,51**	0,98**	-	-
PPrD30	-0,035	0,15*	0,16*	0,39**	0,30**	0,43**	0,67**	0,64**	-
PPrD60	-0,015	0,17*	0,15*	0,35**	0,33**	0,47**	0,65**	0,70**	0,91**

*Correlações significativas ao nível de 0.05. ** Correlação significativa ao nível 0.001

(** **NVcoc** e **PVcoc**, número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis; **Ncleavd4** e **Pcleavd4**, o número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura; **NTembd7** e **PTembd7**, o número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura; **NPrD30** e **PPrD30** número e proporção de prenhezes no dia 30 após a transferência e **NPrD60** e **PPrD60**, número e proporção de prenhezes no dia 60 após a transferência.

Há poucos estudos que descrevem as correlações fenotípicas e genéticas em características OPU-PIV em vacas. No entanto Merton et al, 2009 (em vacas da raça Holandesa) encontraram correlações fenotípicas entre NVcoc com NcleavD4 e com NTembrD7 (0.85 e 0.52, respectivamente,), semelhante aos resultados encontrados neste estudo. Os mesmos autores encontraram baixa herdabilidade para NVcoc, NcleavD4, PcleavD4 e PTembrD7, (0.25, 0.19, 0.07 e 0.10 respectivamente), correlações genéticas foram em linha com as correlações fenotípicas. Eles concluem que a correlação de ambiente foi a principal contribuição para a correlação fenotípica.

Percentagens de correlação fenotípica significativos entre as características numéricas e de proporção dentro da mesma fase do desenvolvimento embrionário ou fetal, apresentando correlação moderadamente alta e alta, por exemplo, PcleavD4 com PTembrD7 foi de 0.50. No estudo conduzido por Merton et al. (2009) esta correlação fenotípica apresentou valor de 0.86.

A obtenção de altas taxas de clivagem no dia 4 de cultivo também está relacionada com altas taxas de embrião no dia 7.

Por outro lado, correlação moderada entre as características NVcoc e NTembrD7 (0.42) e, moderadamente alta para NTembrD7 e PTembrD7 (0.71), sugerem que vacas com alta taxa de oócitos viáveis também terão altas taxas de embriões com desenvolvimento até blastocisto no dia 7 de cultivo.

Repetibilidade para alguns das características foi calculada. A repetibilidade é utilizada em melhoramento genético como o limite superior da herdabilidade. Isso é explicado por variações dadas pelo genótipo e as alterações permanentes causadas pelo ambiente (Cruz, et ai., 2004), e é definida como a correlação de registros diferentes para um caráter particular, ou de expressão do mesmo caráter em diferentes momentos na vida de um mesmo indivíduo. (Ossa, 2003)

Neste estudo, a repetibilidade foi zero ou negativa na maioria dos casos (Tabela 5), exceto para NVcoc (0.66). Isso mostrou que as vacas doadoras analisadas têm a probabilidade média de repetir o valor obtido na variável NVcoc quando submetido a outras sessões de OPU-PIV.

Tabela 5. Valores médios da repetibilidade para características de OPU-PIVE em vacas Gir doadoras de oócitos

Característica	Repetibilidade
NVcoc	0.66
PVcoc (%)	-0.03
NcleavD4	0.044
PcleavD4 (%)	0.07
NTembD7	0.025
PTembD7 (%)	0.019
NPrD30	0.03

Características de PTembD7 e NPrD30 apresentaram baixa ou nenhuma repetibilidade (0.025 e 0.03) e correlação fenotípica moderada (0.47). Isto sugere que a correlação ambiental é a principal fonte para a contribuição fenotípica. Portanto, ações voltadas à melhoria do ambiente para o desenvolvimento do embrião até estágio de blastocisto seria traduzido em um aumento na taxa de prenhez destes embriões.

Situação semelhante foi mostrado nos programas de Transferência de Embriões por Ovulação Múltipla (MOET) (Ireland, et al., 2007), onde, em geral, um maior número de embriões por lavado, também resultou em um maior número de embriões transferíveis, o que corrobora com a correlação moderada encontrada neste estudo entre características numéricas.

O presente estudo mostrou que as características OPU-PIVE podem ser aplicadas para a seleção pelo fenótipo com o intuito de melhorar a produção *in vitro* de embriões por doadora.

Em conclusão, é plausível a otimizar o processo de OPU-PIVE através do uso das correlações fenotípicas que mostram significância moderada, moderadamente alta e alta na seleção de doadoras de oócitos. A característica número de complexos cumulus-oócito (NVcoc) mostrou uma alta repetibilidade (0,66) e correlação moderada e moderadamente alta com características de proporção diretamente relacionadas com as taxas de prenhez neste programa.

Agradecimentos

Os autores agradecem às empresas (Embrapa Gado de Leite - CESM e PECGEN-Embriões) pela cessão dos dados utilizados para a presente pesquisa, assim como a Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF pela bolsa de estudos do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Abdoon, A., K. O., Otoi, T., & Suzuki, T. (2001). Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Animal Reproduction Science*, 65 - 215–223.
- Bosselmann, F., König, S., & Simianer., H. (2005). Genetic effects of embryo transfer in dairy cows. *56th Annual Meeting of Eur. Uppsala, Sweden: Assoc. Anim. Prod.*,.
- Camargo, L., J.Viana, ..., Sá, W., Ferreira, A., Ramos, A., & Vale Filho, V. (2006). Factors influencing *in vitro* embryo production. *Anim. Reprod.*, , v.3, n.1, p.19-28 .
- Camargo, L., Viana, J., Ramos, A., Serapião, R., Sa, W. d., Ferreira, A., y otros. (2007). Developmental competence and expression of the Hsp 70.1 gene in oocytes obtained from *Bos indicus* and *Bos taurus* dairy cows in a tropical environment. *Theriogenology* , 68- 626–632.
- Coimbra, J., Guidolin, A., ALMEIDA, M. d., Sangoi, L., Ender, M., & Merotto Júnior, A. (2004). Análise de trilha dos componentes do rendimento de grãos em genótipos de canola. *Ciência Rural*, , v.34, p.1421-1428.
- Cruz, C., Regazzi, A., & Carneiro, P. (2004). *Modelos biométricos aplicados ao melhoramento genético* (1 ed., Vol. v.1.). Viçosa: 3.ed UFV.
- Edmonson, A. L. (1989). A body condition scoring chart for Holstein dairy cows. *J. Dairy Sci.* , 72, 68–78.
- Farin, P., Crosier, A., & Farin, C. (2001). Influence of *in vitro* Systems on embryo survival and fetal development in cattle . *Theriogenology* , 55: 151-170.,.
- Grázia, J., Tavares, L., Palhão, M., Camargo, L., & Viana, J. (2012). Eficiência na produção *in vitro* de embriões mestiços F1 utilizando-se doadoras das raças

Gir (*Bos taurus indicus*) ou Holandesa (*Bos taurus taurus*)., (pág. XXVI Reunião anual da sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões). Foz do Iguaçu

- Hasler, J. F. (2000). In-vitro production of cattle embryos: problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, Vol. 15, (Suppl. 5) pp. 47-58.
- IETS statistics. (2012). *The year 2011 worldwide statistics of embryo transfer in domestic farm animals*.
- Ireland, J., F. W., F. J.-K., Ireland, J., Smith, G., Lonergan, P., y otros. (2007). Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportions of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum Reprod*, 22:1687–95.
- Khosla, S., Dean, W., Brown, D., Reik, W., & Feil, R. (2001). Culture of Preimplantation Mouse Embryos Affects Fetal Development and the Expression of Imprinted Genes. *BIOLOGY OF REPRODUCTION* , 64, 918–926 .
- Lonergan, P., & Fair, T. (2008). *In vitro*-produced bovine embryos: dealing with the warts. *Theriogenology* , 69 (1): 17 - 22.
- Machado, S., Reichenbach, H., Weppert, M., Wolf, E., & P.B, G. (2006). The variability of ovum pick-up response and *in vitro* embryo production from monozygotic twin cows. *Theriogenology*, 65:573–83.
- Malekshah, A. K., & Moghaddam, A. E. (2005). The effect of culture medium volume on *in vitro* development of mouse embryos . *Iranian Journal of Reproductive Medicine* , Vol.3. No.2 pp:79-82.
- Merton, J., Ask, B., Onkundi, D., Mullaart, E., Colenbrander, B., & Nielen, M. (2009). Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–*in vitro* production embryo-production program. *Theriogenology*, 885–893
- Oliveira, C. S., Serapião, R. V., Camargo, A. J., & Brandão, M. (2013). Produção *in vitro* de embriões bovinos F1 a partir de doadoras de oócitos da raça Gir Leiteiro e. *X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal*. Uberaba.
- Ossa, G. (2003). *Mejoramiento genético aplicado a los sistemas de producción de carne* (1 edit ed.). Bogota, Colombia.: Produmedios.
- Pereira, J. (2012). Aplicação da biotecnologia reprodutiva no melhoramento animal. Em J. PEREIRA, *Melhoramento Genético aplicado á produção animal* (págs. 602-603). Belo Horizonte: FEPMVZ.
- Peterson, A., & Lee, R. (2003). Improving successful pregnancies after embryo transfer. *Theriogenology*, 59(2): 687-97.

- Pontes, J., Nonato-Junior, I., Sanches, B., Ereno-Junior, J., Uvoa, S., Barreiros, T., and others.. (2009). Comparison of embryo yield and pregnancy rate between *in vivo* and *in vitro* methods in the same Nelore (*Bos indicus*) donor cows. *Theriogenology*, 71 690–697.
- Pontes, J., Silva, K., Basso, A., Rigo, A., Ferreira, C., Santos, G., y otros. (2010). Large-scale *in vitro* embryo production and pregnancy rates from *Bos taurus*, *Bos indicus*, and *indicus-taurus* dairy cows using sexed sperm. *Theriogenology*, 74 1349–1355.
- Pontes, J., Melo, F. S., Basso, A., Ferreira, C., Sanches, B., . Rubin, K., y otros. (2011). Ovum pick up, *in vitro* embryo production, and pregnancy rates from a large-scale commercial program using Nelore cattle (*Bos indicus*) donors. *Theriogenology*, 75 : 1640–1646.
- Rizos, D. M., Bermejo-Alvarez, P., Fuente, J. d., Lonergan, P., & Gutiérrez-Adán., A. (2008). Consequences of *in vitro* culture conditions on embryo development and quality. *Reproduction in Domestic Animals*, 43(4): 44-50.
- Silva, A., Mello, R., Ferreira, J., Mascarenhas, L., Cardoso, B., Ferreira, V., y otros. (2012). Efeito da raça da doadora na produção *In vitro* de embriões bovinos. *XXVI Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Tecnologia de Embriões*. Foz do Iguaçu.
- Siqueira, L., Fonseca, J., Camargo, L., & Viana, J. (2012). Factores que afetam a eficiência da fertilização *in vitro* em bovinos. *SPERMOVA*, 2(1): 10 - 12.
- Thibier. (2008). The worldwide activity in farm animals embryo. *Embryo Transfer Newsletter (IETS)*, 26(4):4–9.
- Vega, W.H.O, Pacheco, A., Mogollon, W. M., Valbuena, D., Rua, S., & Quirino, C. (2013). Efeito do número de punções foliculares sobre o desenvolvimento embrionário, número de embriões transferíveis e taxa de gestação em um Programa de Transferência de embriões bovinos na Colômbia. *CONGRESSO INTERNACIONAL DE ZOOTECNIA*, 23. Foz do Iguaçu:: Associação Brasileira de Zootecnia.
- Viana, J., Palhão, M., Siqueira, L., Fonseca, J., & Camargo, L. ((2010)). Ovarian follicular dynamics, follicle deviation, and oocyte yield in Gyr breed (*Bos indicus*) cows undergoing repeated ovum pick-up. *Theriogenology*, 73 : 966–972.
- Viana, J., Siqueira, L., Palhão, M., & Camargo., L. (2010 (b)). Use of *in vitro* fertilization technique in the last decade and its effect on Brazilian embryo industry and animal production. *Acta Scientiae Veterinariae*, 38: 661-674.

CAPITULO 3. ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMO NO GENE *BMP4* E CARACTERÍSTICAS DE OPU-PIVE EM VACAS GIR

RESUMO

Numerosos genes candidatos e seus polimorfismos têm sido avaliados em relação às características de interesse econômico, mostrando resultados animadores para o melhoramento genético de características complexas. A Proteína Morfogênica do Osso 4 (*BMP4*) é um membro do fator de crescimento transformante beta (TGF β); superfamília que controla inúmeros eventos do desenvolvimento embrionário, fetal e até mesmo de adultos em todos os vertebrados. O objetivo deste estudo foi avaliar o grau de associação entre um polimorfismo no gene *BMP4* e características relacionadas à produção de embriões *in vitro*, bem como a prenhez após transferência. O DNA foi extraído do folículo piloso de 50 vacas Gir doadoras de oócitos, a genotipagem foi realizada por PCR-RFLP. Foram coletados dados de 212 sessões de OPU-IPV. As características da OPU-PIVE associadas ao marcador SNP foram: número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis, número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura, número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura, número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência e, número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência. O polimorfismo foi significativamente associado ($P < 0,01$) com número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis e proporção de prenhez aos 30 dias. O genótipo GT afetou negativamente características como número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis e proporção de prenhez aos 30 dias. Este resultado é uma possível indicação do efeito genético destas características.

Palavras chave: SNP , mutação sinónima, OPU-PIVE.

1. INTRODUÇÃO

Uma ampla variedade de fatores epigenéticos, incluindo íons, substratos de energia, aminoácidos, vitaminas, fatores de crescimento, citocinas e hormônios desempenham um papel importante no desenvolvimento embrionário precoce (Abdoon et al., 2001). A Proteína Morfogênica do Osso 4 (*BMP4*) é um membro do fator de crescimento transformante beta (TGF- β); superfamília que controla numerosos eventos de desenvolvimento embrionário, fetal e mesmo em adultos em todos os vertebrados (Chen, et al., 2004).

Vários BMPs têm sido implicados nos níveis autócrino / parácrino do desenvolvimento folicular ovariano, como demonstrado pela expressão de *BMP4* e *BMP7* nas células da teca em camundongos (Shimasaki et al., 1999). Têm surgido novas evidências apoiando a teoria de que *BMP4* e *BMP7* originados das células da teca e do estroma, promovem a transição inicial de folículos primordiais para melhorar a sobrevivência do folículo (Phil & Claire, 2006). Além disso, em fases posteriores de desenvolvimento, *BMP4* induz a formação de mesoderma embrionário e extra embrionário adicionalmente (Degrelle, et al., 2011). Está também relacionado com a vasculogênese (Astorga & Carlsson, 2007) no embrião e na placenta em desenvolvimento. Como resultado; BMPs tem grande importância para o sucesso da prenhez (La Rosa, et al, 2011.). Estes autores também concluíram que *BMP4* está implicado na maturação de oócitos bovinos com efeitos sobre as taxas de clivagem e estado pluripotente da célula embrionária.

O gene *BMP4* é expresso primeiro nas células do estroma e depois no, desenvolvimento folicular, nas células da teca. Seus receptores encontram-se nas células da granulosa, assim como, no próprio oócito (Glister, et al., 2004; Fatehi, et al., 2005). É responsável pela transição do folículo primordial para folículo primário, estimula a proliferação das células da granulosa, o crescimento folicular pré-antral, sobrevivência folicular e regula esteroideogênese nas células da granulosa (Knight & Glister de 2006).

Estudos anteriores relataram associação entre Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (SNP) no gene *BMP4* e taxa de blastocistos em vacas da raça Holandesa avaliadas por modelo *in vitro* (Li et al., 2012).

As diferenças genéticas entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* são confirmadas nos estudos de associação genômica para diferentes características de interesse econômico, quando SNPs associados com locus de características quantitativas (QTLs) no grupo taurino, não são significativos no grupo indicus. (Fortes, et al., 2010, Canavez, et al., 2012, Höglund, et al., 2012).

Não existe nenhuma pesquisa envolvendo polimorfismo no gene *BMP4* e características de produção *in vitro* de embriões (OPU -PIVE) em vacas da raça Gir brasileira, o que é o objetivo do presente estudo.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Amostras de DNA e coleta de dados

O DNA foi extraído a partir de folículos capilares por método alcalino de acordo com o procedimento padrão (adaptado a partir de Coelho, 2001). As concentrações de DNA foram medidas utilizando um espectrofotômetro NanoDrop[™] 2000 (Thermo Science). Foram coletados dados de 212 OPU-IPVE sessões de 50 doadoras de oócitos Gir durante os anos de 2012 e 2013 no estado do Rio de Janeiro, Brasil. Os procedimentos de OPU-PIVE foram realizados por duas empresas com ampla experiência na área de produção *in vitro* de embriões.

As características da OPU-PIVE associadas ao marcador SNP foram: Número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis (Nvcoc e Pvcoc) classe I, II e III, que foram maturados com sucesso, fertilizados e cultivados *in vitro*, 2. Número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura (Ncleavd4 e Pcleavd4), 3. Número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura (Ntembd7 e Ptembd7) como proporção do Nvcoc, segundo a classificação IETS como estágio 4 (mórula), grau 1 (excelente ou bom), e estágios 5 - 7 (blastocisto inicial, blastocisto e blastocisto expandido), grau 1 e 2 (excelente e regular). Número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência (NPrD30 e PPrD30) e 5. Número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência (NPrD60 e

PPrD60). Todas as características são dadas por sessão de OPU-IPVE. Os dados de todas as características foram registrados e cedidos para fins de pesquisa.

2.2. Análise do polimorfismo de um único nucleotídeo

A detecção de polimorfismo no gene *BMP4* foi realizado de acordo com Li et al. (2012). Um segmento do gene *BMP4* (exon 2, SNP rs109778173) foi amplificado por PCR com primers específicos (Tabela 1). A reação de PCR foi realizada em um volume final de 20 µl, utilizando tampão 1x PCR [10 mM Tris-HCl (incluindo Mg⁺²)], 0,5 mM de dNTP mix Promega®, 1U de Taq DNA polimerase Promega®, 0,5 mM de cada primer - Invitrogen®, e água deionizada, obtida a partir de 50 ng de extração de DNA. Para cada réplica de reação de PCR foi feito um controle negativo.

Tabela 1. Condições do primer utilizado na amplificação do SNP rs109778173 no gene *BMP4*

Gene	Sequência do primer 5'-3'	Temperatura anelamento (°C)	Tamanho produto PCR(pb)	Referência
<i>BMP4</i>	F 5' TAGAACATCTGGAGAACATC	55	190	Li, 2012
	R 5' GGCTTCATAACCTCATAAATG			

As condições de ciclo consistiram de um estágio inicial de 95 °C durante 1 minuto, seguido por 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, anelamento dos primers a 55 °C durante 1 minuto e extensão a 72 °C durante 1 minuto. Após o último ciclo, as reações foram sujeitas a um passo final de 7 minutos a 72 °C para a extensão final das fitas. Para confirmar a amplificação, o produto foi separado por gel de poliacrilamida (8%) corado com nitrato de prata.

Reação em cadeia da polimerase de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP) foi utilizada para a genotipagem de amostras amplificadas. *HinfI* (newengland BioLabs®). Foi usada a enzima de restrição que reconhece e cliva a sequência 5' G[~]ANTC 3' (Tabela 2) foi usada. Esta enzima

reconhece apenas um local de clivagem no fragmento amplificado, sendo os produtos da reação dois fragmentos com tamanhos de 80pb e 110bp. O resultado esperado foi a clivagem das amostras que não apresentam a mutação G > T. A reação de clivagem com enzimas de restrição foi efetuada num volume final de 20 µl, sendo usado 1x de tampão específico para a enzima de restrição, 5U da enzima de restrição, 4µl do produto de PCR e água deionizada.

Tabela 2. SNP no gene BMP4 e informação da endonuclease de restrição

GENE	número SNP no NCBI	Sequência do SNP	Enzima de restrição	T _m -RFLP (°C)
		GGGCCCTGGTCCACCTGCT		
BMP4	rs109778173	CCCGGAA[G/T]AGTCGAAGC TCGGCAGACGAGATCA	<i>HinfI</i>	37

T_m = Temperatura de fusão

Para confirmar a reação de digestão, o produto foi separado em gel de poliacrilamida (8%) e corado com nitrato de prata. Após esta visualização, as amostras foram submetidas à eletroforese capilar, usando o equipamento *Fragment Analyzer™* (Advanced Analytical) para a discriminação alélica por tamanho e identificação do polimorfismo.

2.3. Análise Estatística

Frequência genotípica, frequência alélica, probabilidade do equilíbrio Hardy-Weinberg (P-HW), heterozigosidade observada (H_o), heterozigosidade esperada (H_e), número efetivo de alelos (N_e) e conteúdo de informação polimórfica (PIC), foram analisados estatisticamente de acordo com as abordagens de Nei e Roychoudhury (1974) e Nei e Li (1979). Estas análises foram feitas no software PowerMarker v.3.25.

A associação entre o marcador de DNA, e características da OPU-PIVE e taxas de prenhez foi determinada pela análise de variância de dados repetidos usando o seguinte modelo:

$$Y_{ij} = \mu + E_i + \varepsilon_{ij}$$

onde Y_{ij} é a observação para as características de OPU-PIVE; μ é a média para cada característica; E_i é o efeito do genótipo e ε_{ij} é o erro aleatório. Este modelo foi considerado utilizando o procedimento PROC GLIMMIX do SAS 9.2.

3. RESULTADOS

O domínio da proteína codificante do gene *BMP4* está localizado no exon 2. Nós amplificamos um fragmento da sequência de DNA no exon 2, onde previamente uma mutação o SNP número rs109778173 foi identificado em vacas da raça Holandesa por Li, et. al., (2012). Procuramos a mutação G > T em vacas da raça Gir, utilizando PCR-RFLP e métodos de eletroforese capilar. Três genótipos foram identificados (GG, TT e GT) com frequências genótípicas de 0.64, 0.32 e 0.04, respectivamente; frequências alélicas e probabilidade de equilíbrio Hardy-Weinberg na Tabela 3.

Tabela 3. Frequências genotípica e alélica no gene BMP4 para o SNP utilizado no teste de associação em bovinos da raça Gir

Polimorfismo	Frequência genotípica (número)	Frequência alélica	P-HW* (Qui-quadrado)
Exon 2 -SNP rs109778173	GG 0,64 (32)	0,8 ± 0,03 G	0,53205
	TT 0,32 (16)	0,2 ± 0,04 T	
	GT 0,04 (2)		

*A probabilidade de equilíbrio Hardy-Weinberg foi testada ao 5% (Valores de Qui-quadrado > 0,05 significam que o SNP esta em desequilíbrio).

O resultado na Tabela 4 mostra heterozigosidade, conteúdo de informação polimórfica e número efetivo de alelos com valores médios, mostrando que os níveis de polimorfismo e variação genética foram médios; isto de acordo com

a classificação do PIC (baixo polimorfismo se o valor PIC $< 0,25$, polimorfismo médio se o valor encontra-se entre 0.25 e 0.5, e alto polimorfismo se o valor PIC > 0.5). O teste qui-quadrado mostrou que as distribuições genotípicas na população estudada concordaram com o princípio de Hardy-Weinberg ($P > 0,05$).

Valores médios de polimorfismo SNP para as características acima mencionadas indicam sua possível utilização como um marcador molecular. (Fu, et al., 2013).

Tabela 4. Índices genéticos da população na região do exon 2 do gene *BMP4* (187 pb)

Posição	Heterozigosidade observada (H_o)	Heterozigosidade esperada (H_e)	Número efetivo de alelos (N_e)	Conteúdo de Informação Polimórfica (PIC)
rs109778173	0.3016	0.36	1.562	0.266

Gel de eletroforese capilar e eletroferograma da mutação G>T no gene *BMP4* são mostrados na Figura 1. Os alelos de 75pb e 105pb foram obtidos após clivagem com a enzima de restrição *HinfI*; o alelo mutante não foi clivado porque o local de reconhecimento estava ausente e o tamanho do alelo foi 187pb, portanto, conclue-se que a mutação foi apresentada em heterozigose.

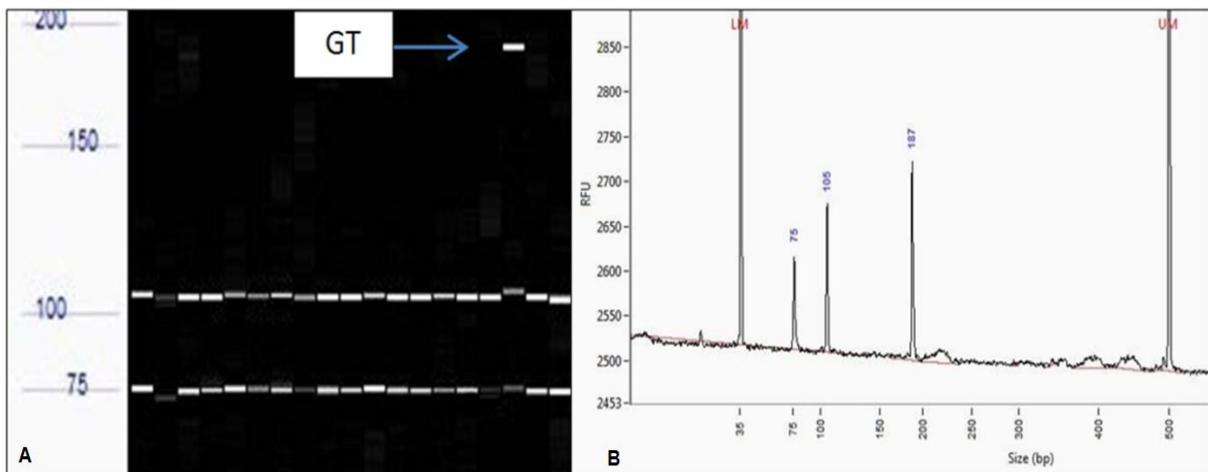


Figura 1. Gel de eletroforese capilar (A) e eletroferograma (B) de PCR-RFLP com *HinfI*. O genótipo GT mostra dois fragmentos para o alelo clivado (75pb e 105pb) e um no alelo não clivado 187pb. (Mutação em heterozigose).

A análise de variância do Polimorfismo para as características de OPU-PIVE e as taxas de prenhez no locus rs109778173 – exon 2 do gene *BMP4* (187pb) mostrou efeito significativo para o genótipo (GT) nas características número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis (Nvcoc e Pvcoc) e, proporção de prenhez aos 30 dias (PPrD30). Médias para o genótipo GT apresentaram desempenho inferior nas características acima anotadas no nível de probabilidade de 1%, (Tabela 5). O genótipo GT pode ser um genótipo desfavorável.

Os valores médios para as demais características avaliadas não mostraram efeito significativo do genótipo, embora todos eles foram numericamente inferiores no genótipo mutante quando comparado com outros genótipos (GT vs GG e TT). Os genótipos GG e TT não mostraram efeito significativo sobre as características OPU-PIVE e as taxas de prenhez.

Tabela 5. Associação entre o SNP (rs109778173) genótipo do gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em vacas da raça Gir

Característica* /(média ± EP)	Genótipos (número/OPU-PIVE sessões)		
	GG (32/157)	TT(16/44)	GT(2/11)
NVcoc	10.01 ± 6.95^a	9.25 ± 6.03^a	5.72 ± 4.51^b
PVcoc	75.82 ± 20.46^a	76.73 ± 18.26^a	60.50 ± 28.69^b
NcleavD4	6.25 ± 4.72	7.2 ± 5.24	4.27 ± 4.73
PcleavD4	64.59 ± 34.68	74.13 ± 30.12	67.17 ± 37.27
NTembD7	2.56 ± 2.78	2.90 ± 3.65	1.45 ± 2.38
PTembD7	36.91 ± 35.40	32.84 ± 33.26	26.90 ± 35.27
NPrD30	0.68 ± 1.17	0.59 ± 0.87	0.18 ± 0.60
PPrD30	29.27 ± 39.15^a	32.65 ± 43.25^a	6.09 ± 64.20^b
NPrD60	0.64 ± 1.12	0.50 ± 0.82	0.18 ± 0.60
PPrD60	27.07 ± 37.97	25.45 ± 39.61	6.09 ± 20.20

^{ab} Médias entre os genótipos para o SNP com letras diferentes sobrescritas são significativamente diferentes (P <0,01).

* **NVcoc** e **PVcoc**, número e proporção dos complexos cumulus-oócitos viáveis; **Ncleavd4** e **Pcleavd4**, o número e proporção de embriões clivados no dia 4 de cultura; **Ntembd7** e **Ptembd7**, o número e proporção de embriões transferíveis no dia 7 de cultura; **NPrD30** e **PPrD30** número e proporção de prenhez no dia 30 após a transferência e **NPrD60** e **PPrD60**, número e proporção de prenhez no dia 60 após a transferência

4. DISCUSSÃO

O gene *BMP4* está localizado no cromossomo 10, é conservado em humano, chimpanzé, macaco rhesus, cão, rato, e peixe-zebra. *Bos taurus* é um das 65 espécies ortólogas para o gene *BMP4* humano (Waterhouse et al, 2011).

A participação das proteínas morfogênicas do osso nos processos de desenvolvimento dos tecidos embrionários tem sido documentada desde o processo de gastrulação. A gastrulação é um processo altamente dinâmico, mas conservado, que permite dois grandes eventos de desenvolvimento inicial dos vertebrados: I) o estabelecimento de morfologicamente visível antero-posterior (ou de cabeça-cauda) e do eixo da medula dorso-ventral (ou boca-espinhal), que o esboço futuro do corpo; e II) a especificação e padronização precoce das camadas germinativas, especialmente da mesoderma. (Downs e Davies, 1993).

Os mutantes para o processo de gastrulação revelaram recentemente que a especificação eixo do embrião propriamente dito é uma sequência de interações recíprocas entre tecidos embrionários e extraembrionários, de modo que os genes envolvidos nestas interações pode agora contribuir para o desenvolvimento morfogênico no embrião. (Pfister, et al, 2007;. Tam & Loebel, 2007).

A mutação G > T no gene *BMP4* encontrada neste estudo mostra menos eles 4.29 oócitos viáveis em comparação com o genótipo GG, 16.23% menor proporção de oócitos viáveis que o genótipo TT, e os embriões transferidos de vacas com genótipo GT tiveram 26.5% menor taxa de prenhez aos 30 dias, em comparação com o genótipo TT.

Li, et al., (2012), utilizando modelo *in vitro* em vacas Holandesas mostraram resultados similares para a mutação G>T no gene *BMP4*. Eles concluíram que os embriões produzidos a partir de vacas genótipo TT apresentaram 10.5 e 16.1% taxas de blastocisto mais altas do que as vacas GG e GT, respectivamente. Os mesmos autores mostraram que a taxa de blastocistos foi significativamente associada com SNP rs109778173 de *BMP4* (P = 0,006), enquanto que a associação com a taxa de fertilização não foi estatisticamente significativa (P = 0.095).

La Rosa et al (2011) mostraram que *BMP4* diminui o desenvolvimento apenas para embriões fertilizados *in vitro*, e concluiu que ele está implicado na maturação de oócitos bovinos com efeitos sobre as taxas de clivagem e estado pluripotente de células embrionárias, o que sugere que um equilíbrio na sinalização das BMPs é necessário para o desenvolvimento adequado e pré-implantação de embriões bovinos.

As frequências genóticas na população de vacas Gir estudados apresentaram valores de 0.64, 0.32 e 0.04 para os genótipos GG, TT e GT respectivamente, concluindo que a presença do genótipo GT é baixa, em contraste com as frequências genóticas observadas na população estudada por Li et al , onde para os mesmos genótipos e na mesma ordem apresentaram valores de 0.56, 0.05 e 0.37 (calculado a partir da informação fornecida pelo autor no artigo), indicando, assim, uma maior proporção de animais com o genótipo GT do gene *BMP4* em vacas da raça Holandesa em comparação com vacas da raça Gir estudadas neste trabalho.

Os valores de probabilidade para o equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P > 0.05$) nas duas populações mostram desequilíbrio com o SNP avaliado, e, portanto, possuem capacidade de segregar. (Ardlie et al., 2002).

Nossa hipótese é que a diferença entre as frequências genóticas para GT nas duas populações pode estar associada ao processo de seleção para as características de produção em bovinos leiteiros. No entanto, os estudos em ambas as populações (Holandesa e Gir) envolvendo SNPs relacionados com a produção de leite e fertilidade devem ser realizados para testar a hipótese de segregação conjunta.

O uso generalizado da inseminação artificial em bovinos Red nórdicos resultou em aumento da intensidade de seleção, o que levou ao aumento da produtividade. No entanto, a fertilidade da vaca tem diminuído severamente concomitantemente. Kadri, et al., (2014) identificaram uma deleção de 660 kb abrangendo quatro genes como a causa de variação. Eles mostraram que a deleção é uma mutação recessiva letal embrionariamente. Este estudo demonstra que as mutações embrionárias letais representam uma fração não desprezível do declínio

da fertilidade em gado doméstico, e que os efeitos positivos associados à produção de leite podem ser responsáveis de parte da correlação genética negativa.

A mutação G>T no SNP rs109778173 é classificada como sinônima ou silenciosa, dado que a substituição de uma guanina por uma timina em codons de nucleotídeos (CTG por CTT) não altera a sequência de aminoácidos da proteína (no caso da proteína codificante do gene *BMP4* é leucina). Isto é muitas vezes referido como redundância do código genético.

Apesar da redundância do código genético, codons sinônimos não são usados com igual frequência, um fenômeno conhecido como *codon bias*. (Ikemura, 1981). Se o *codon bias* é o resultado da seleção natural, uma alteração de um codon preferido, para um não preferido pode conduzir a uma redução nos níveis de expressão de proteínas, causada por uma diminuição da eficácia, ou a fidelidade da tradução, ou uma combinação de ambos (Bulmer, 1991). Adoligbe, et al., (2012) mostraram efeito significativo para a mutação sinônima no gene *GDF10* com características de comprimento do corpo em bovinos crioulos chineses.

Quando uma mutação sinônima ou silenciosa ocorre, a mudança é muitas vezes assumida como neutra, o que significa que ela não afeta a aptidão do indivíduo portador de um novo gene para sobreviver e se reproduzir. Alterações sinônimas não podem ser neutras, porque certos codons são mais eficientemente traduzidos (mais rápida e/ou com mais precisão) do que outros. (Carlini & Stephan, 2003).

5. CONCLUSÃO

A associação entre o polimorfismo do gene *BMP4* e características de OPU-PIVE em bovinos da raça Gir estudados, confirma a influência deste gene no desenvolvimento do embrião e taxas de fertilização após a transferência de embriões. O genótipo GT afeta negativamente as características como o número e proporção de complexos cumulus-oócitos viáveis, e proporção de prenhez no dia

30 após a transferência. Este achado poderia ser uma indicação de um efeito genético nessas características.

A mutação sinônima G>T no gene *BMP4* deve ser estudada para elucidar os mecanismos envolvidos na alteração dos índices de desenvolvimento embrionário e de prenhez em vacas da raça Gir doadoras de oócitos.

Estudos envolvendo outros SNPs associados às características de reprodução e produção são necessários para estudar as interações genéticas com características da OPU-PIVE.

Agradecimentos

Os autores agradecem as empresas (Embrapa Gado de Leite - CESM e PECGEN-Embriões) pela cessão dos dados utilizados para a presente pesquisa, assim como a Universidade Estadual do Norte Fluminense - UENF pela bolsa de estudos do primeiro autor.

REFERÊNCIAS

- Abdoon, A., K. O., Otoi, T., & Suzuki, T. (2001). Influence of oocyte quality, culture media and gonadotropins on cleavage rate and development of *in vitro* fertilized buffalo embryos. *Animal Reproduction Science*, 65 - 215–223.
- Adoligbe, C., Zan, L., Farougou, S., Wang, H., & Ujjan, J. A. (2012). Bovine GDF10 gene polymorphism analysis and its association with body measurement traits in Chinese indigenous cattle. *Mol Biol Rep*, 39:4067–4075
- Ardlie, K. G., Kruglyak, L., & Seielstad, M. (2002). Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. *NATURE REVIEWS | GENETICS*, 3: 299–309.
- Astorga, J., & Carlsson, P. (2007). Hedgehog induction of murine vasculogenesis is mediated by Foxf1 and Bmp4. *Development*, 134(20):3753-3761.
- Bulmer, M. (1991). The selection-mutation-drift theory of synonymous codon usage. *Genetics*, 129: 897–907.

- Canavez, F., Luche, D., Stothard, P., Leite, K., Sousa-Canavez, J., Plastow, G., y otros. (2012). Genome sequence and assembly of *Bos indicus*. *J. J. Heredity*, 103, 342–348.
- Carlini, D. B., & Stephan, W. (2003). In Vivo Introduction of Unpreferred Synonymous Codons Into the *Drosophila* ADH Gene Results in Reduced Levels of ADH Protein. *Genetics*, 163: 239–243 .
- Chen, D., Zhao, M., & Mundy, G. R. (December 2004). Bone Morphogenetic Proteins. *Growth Factors*, Vol. 22 (4), pp. 233–241
- Coelho, G. A. (2001). Análise quali quantitativa de técnicas para extração de DNA de sangue sêmen e pêlos. Belo Horizonte, Minas Gerais: UFMG.
- Degrelle, S. A., Cao, K.-A. L., Heyman, Y., Everts, R. E., Champion, E., Richard, C., y otros. (2011). A small set of extra-embryonic genes defines a new landmark for bovine embryo staging. *Reproduction*, 141 79–89.
- Downs, K., & Davies, T. (1993). Staging of gastrulating mouse embryos by morphological landmarks in the dissecting microscope. *Development*, 118 1255–1266.
- Fatehi, A., van den Hurk, R., Colenbrander, B., AJ, D., van Tol, H., Monteiro, R., and others. (2005). Expression of bone morphogenetic protein2 (BMP2), BMP4 and BMP receptors in the bovine ovary but absence of effects of BMP2 and BMP4 during IVM on bovine oocyte nuclear maturation and subsequent embryo development. *Theriogenology*, 63(3):872-89.
- Fortes, M. R., Reverter, A., Zhang, Y., Collis, E., Nagaraj, S. H., Jonsson, N. N., y otros. (2010). Association weight matrix for the genetic dissection of puberty in beef cattle. *PNAS*, vol. 107 no. 31 13647.
- Fu, C., Wang, H., Mei, C., Wang, J., Jiang, B., Ma, X., y otros. (2013). SNPs at 3'-UTR of the bovine CDIPT gene associated with Qinchuan cattle meat quality traits. *Genetics and Molecular Research*, 12 (1): 775-782 .
- Glistler, C., Kemp, C., & Knight, P. (2004). Bone morphogenetic protein (BMP) ligands and receptors in bovine ovarian follicle cells: actions of BMP-4, -6 and -7 on granulosa cells and differential modulation of Smad-1 phosphorylation by follistatin. *Reproduction*, 127(2):239-54.
- Höglund, J. K., Guldbandsen, B., Lund, M. S., & Sahana, G. (2012). Analyses of genome-wide association follow-up study for calving traits in dairy cattle. *BMC Genetics*, 13:71.
- Ikemura, T. (1981). Correlation between the abundance of *Escherichia coli* transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in its protein genes: a proposal for a synonymous codon choice that is optimal for the *E. coli* translational system. *J. Mol. Biol.*, 151: 389–409
- Kadri, N. K., Sahana, G., Charlier, C., Iso-Touru, T., Guldbandsen, B., Karim, L., y otros. (2014). A 660-Kb Deletion with Antagonistic Effects on Fertility and Milk

Production Segregates at High Frequency in Nordic Red Cattle: Additional Evidence for the Common Occurrence of Balancing Selection in Livestock. *PLOS Genetics*, Volume 10 | Issue 1.

- Knight, P., & Glister, C. (2006). TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction.*, Aug;132(2):191-206.
- La Rosa, I., Camargo, L. S., . Pereira, M. M., Fernandez-Martin, R., Paz, D. A., & Salamone, D. F. (2011). Effects of bone morphogenic protein 4 (BMP4) and its inhibitor, Noggin, on *in vitro* maturation and culture of bovine preimplantation embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9:18.
- Li, G.; Khateeb, K.; Schaeffer, E.; Zhang, B.; Khatib, H. Genes of the transforming growth factor-beta signaling pathway are associated with pre-implantation embryonic development in cattle. *Journal of Dairy Research* 79 310–317, 2012
- Nei, M., & Li, W. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 76: 5269-5273.
- Nei, M., & Roychoudhury, A. (1974). Sampling variances of heterozygosity and genetic distance. *Genetics*, 76: 379-390.
- Pfister, S., Steiner, K., & Tam, P. (2007). Gene expression pattern and progression of embryogenesis in the immediate post-implantation period of mouse development. *Gene Expression Patterns*, 7 558–573.
- Phil, G. K., & Claire, G. (2006). TGF-b superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* , 132 191–206.
- Shimasaki S, Z. R. (1999). A functional bone morphogenetic protein system in the ovary. *PNAS* , 96 7282–7287.
- Tam, P., & Loebel, D. (2007). Gene function in mouse embryogenesis: get set for gastrulation. *Nature Reviews. Genetics*, 8 368–381.
- Waterhouse et al, . (2011). *the hierarchical catalog of eukaryotic orthologs in 2011*. Recuperado el 11 de February de 2014, de Zdobnov's computational evolutionary Genomics Group: <http://cegg.unige.ch/orthodb5/results?level=Vertebrata&tree=Vert&searchtext=NCBI:407216>