

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ERICA PEREZ MARSON

Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte compostas

ERICA PEREZ MARSON

Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte compostas

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

Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. José Bento Serman Ferraz

FICHA CATALOGRÁFICA

preparada pela

Biblioteca da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo

M373c	<p>Marson, Erica Perez</p> <p>Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte compostas / Erica Perez Marson</p> <p>Pirassununga, 2005.</p> <p>87 f.</p> <p>Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.</p> <p>Departamento de Ciências Básicas.</p> <p>Área de Concentração: Qualidade e Produtividade Animal.</p> <p>Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz.</p> <p>Unitermos: 1. Precocidade sexual 2. LHR 3. FSHR 4. RFLP 5. Novilhas compostas I. Título.</p>
-------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

DEDICATÓRIA

A Juan Carlos,

Por ser único, intenso, presente!

Minha razão, meu por que!

“**Amor**, quantos caminhos até chegar a um beijo, que solidão errante até a tua companhia!...Mas tu e eu, amor meu, estamos juntos, juntos desde a roupa às raízes, juntos de outono, de água, de quadris, até ser somente tu, somente eu, juntos.... Pensar que custaram tantas pedras que leva o rio a desembocar a água..., pensar que separados por trens e nações, tu e eu tínhamos que nos amarmos, simplesmente...”

Pablo Neruda

À minha amada família, por ser responsável

pelo que há de melhor em mim!

E não poderia ter sido diferente.

AGRADECIMENTOS

Eu não poderia deixar de agradecer a grandes personagens que fizeram diferença neste período, até a concretização de um grande sonho, por assim dizer:

Ao meu orientador, **Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz** por oferecer uma oportunidade única de enriquecimento, não somente por sua visão otimista e motivadora, como também por seu empenho em valorizar o tempo todo, nossas conquistas. Jb, não são nossas habilidades que mostram o que realmente somos, mas sim nossas escolhas!

A quem eu tomo a liberdade de chamar de grande amigo e dedico todos os méritos deste trabalho: **Prof. Dr. Júlio Balieiro**. Jovialidade, bom humor e disponibilidade sem igual que realmente fizeram uma grande diferença. Sou eternamente grata!

Ao Prof. **Dr. Flávio Meirelles**, que em muitas oportunidades conseguiu dar um novo significado a este trabalho, mantendo a motivação tão importante à condução do mesmo. Por ter disponibilizado o laboratório de forma irrestrita e informal. Aprendi muito!

Ao **Prof. Dr. Joanir Eler** pelas valiosas sugestões, sempre proferidas nos momentos mais informais, nos intervalos entre uma análise genética e outra.....

À **Elisângela, Giovana e Luciane** (em ordem alfabética para não haver brigas), três grandes mulheres que me ensinaram não somente, como posso assim dizer, noções de FoxPro, de PCR, de Vida... devo a vocês tudo o que eu consegui mostrar de melhor durante nossa convivência. Sentirei muitas saudades!

À “nova” e “velha” equipe do **Grupo de Melhoramento Animal (GMA)**, em nome de todos aqueles que contribuíram não somente na execução deste trabalho, mas também com meu aperfeiçoamento profissional e pessoal, de tal forma que me senti realmente em casa desde quando aqui cheguei.

Aos colegas do **Laboratório de Morfofisiologia Molecular e Desenvolvimento (LMMD)**, com os quais pude conviver e interagir durante um bom tempo no período experimental laboratorial.

À **Agro-pecuária CFM Ltda.** e a **Someco S/A**, pelo apoio demonstrado e por fornecerem, sem dúvida, o material mais valioso que eu poderia dispor para execução deste trabalho: “minhas novilhas”.

Ao **Prof. Dr. José Fernando** da Unesp de Araçatuba e ao **Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lôbo** da FMRP de Ribeirão Preto, por terem se mostrado tão solidários à idéia e condução inicial deste estudo, fornecendo inclusive o material laboratorial para que o mesmo

tão logo fosse conduzido. Nesse sentido, também quero agradecer à **Marcela Milazzotto e Francine Campagnari** cuja pesquisa serviu de embasamento ao nosso trabalho e também à **Maria Vanderly Andréa**, com quem tive a oportunidade de trabalhar pessoalmente.

À **Flávia Providelo**, que colaborou intensivamente, sempre com muita disponibilidade na condução das análises de simulação, sem a qual essas inovações não poderiam ter sido incorporadas.

A **Prof^a. Clarisse Garcia Borges Demétrio** da ESALQ/USP e ao **Prof. Dr. César Gonçalves de Lima**, da FZEA/USP pela colaboração e valiosa troca de informações tão pertinentes à interpretação, em nível estatístico, dos resultados aqui obtidos. Também não poderia deixar de expressar meus agradecimentos ao **Prof. Dr. Guilherme Rosa**, Michigan State University, que via email, forneceu sugestões valiosíssimas à condução de análise estatística a ser incorporada neste trabalho.

Ao **Gilson e Arnaldo**, por sempre me “socorrerem” quando o computador não mais atendia ao meu comando...

Aos meus amigos de hoje e de sempre, **Helen, Ivan, Laura, Luz e Zé Henrique** pelos bons momentos vivenciados juntos, que tornaram meus dias mais felizes em Pirassununga...

À **Fapesp**, que proporcionou não somente minha bolsa de estudos, mas todo o apoio financeiro indiscutivelmente necessário à condução deste trabalho, colaborando também ao meu aperfeiçoamento junto ao meio acadêmico.

À **Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos**, USP de Pirassununga, pelo apoio tanto em nível estrutural como em nível pessoal, junto aos Professores e funcionários que sempre nos auxiliam, de alguma forma, à condução do curso de pós-graduação, bem como do projeto experimental.

Finalizando, gostaria de deixar aqui registrado o meu MUITO OBRIGADA a todos aqueles que de qualquer forma, inexpressiva ou não me auxiliaram na condução deste trabalho tornando-o uma prova real, para nós pesquisadores, de que a palavras sucesso e conquista parecem ser “altamente e positivamente correlacionadas” com um fator chamado união de forças e mentes, para um objetivo comum. E eu fui testemunha disso!

EPÍGRAFE

“Hay que endurecerse, pero sin perder la ternura jamás.”

Ernesto ‘Che’ Guevara (1928-1967)

“Não há paz sem justiça, não há paz sem perdão.”

Papa João Paulo II (1920 - 2005)

...àqueles que não tiveram medo de usar a “liberdade” de expressão:
mesmo sendo reprimidos, mesmo nem sendo sempre compreendidos!

RESUMO GERAL

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

Os genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e folículo estimulante (FSHR), conhecidos por sua influência na manifestação da puberdade, foram avaliados por análise PCR-RFLP em uma população de 370 novilhas de corte compostas, de diferentes composições raciais Europeu-Zebu. Os objetivos foram caracterizar geneticamente a população investigada, utilizando-se de frequências genótípicas e alélicas e estimativas de variabilidade e diversidade gênica; avaliar o efeito dos marcadores sobre a precocidade sexual, caracterizada pela probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta (PP), e estimar a proporção da variância genética total da variável PP atribuída aos marcadores investigados, bem como a herdabilidade da característica pelo método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML) sob modelo animal e sob modelo touro. Constatou-se elevada frequência de animais heterozigotos em quase todas as composições raciais investigadas, para ambos os genes, com um valor médio de heterozigosidade de 57%, resultados estes que refletem a elevada variabilidade genética desta população híbrida. As novilhas heterozigotas apresentaram maiores taxas de prenhez (67 e 66% respectivamente, para os genes do LHR e FSHR), entretanto não se constataram efeito dos polimorfismos RFLP LHR ($P=0,9188$) e FSHR ($P=0,8831$) sobre a manifestação deste evento. As estimativas de herdabilidade obtidas para a PP foram de 0,21 e 0,41, respectivamente sob modelo animal e sob modelo touro. A magnitude das estimativas dos componentes de (co)variância atribuídas aos efeitos dos marcadores se mostrou muito baixa, constatando-se a pequena contribuição destes marcadores na proporção da variância total da prenhez, indicando ser esta uma característica de herança poligênica. Os resultados aqui demonstrados indicam que a seleção de novilhas para a precocidade sexual, com base em sua informação genotípica para os marcadores RFLP LHR e FSHR, não se justifica em programas de melhoramento genético animal, sugerindo-se a investigação de outros genes igualmente importantes, envolvidos na manifestação deste evento. Contudo, os marcadores avaliados se mostraram informativos, sendo indicados em estudos de caracterização genética em outras

populações bovinas. A elevada heterozigosidade verificada na população composta estudada viabiliza a exploração destes animais em cruzamentos.

Palavras-chave: precocidade sexual, LHR, FSHR, RFLP, novilhas de corte compostas

ABSTRACT

MARSON, E.P. **Heterozygosity frequency characterization in genes related to sexual precocity in composite beef heifers.** 2005. 87 f. PhD Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2005.

The luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle-stimulating receptor (FSHR) genes, known for their influence on the onset of puberty were evaluated by PCR–RFLP analysis in a population of 370 European-Zebu composite beef heifers from different breed contributions. The objectives were to genetically characterize the investigated population using genotype and allelic frequencies values besides on variability and gene diversity estimates; to evaluate the effect of markers on sexual precocity, characterized as the probability of pregnancy during the first breeding season (PP); and to estimate the proportion of total genetic variance in the PP related to the investigated markers, as well as the heritability estimate for PP by the Restricted Maximum Likelihood (REML) method for animal and sire models. The high number of heterozygous animals observed in almost all breed compositions studied for both loci, with average heterozygosity values of 57%, showed the high genetic variability on this hybrid population. Higher pregnancy rates were observed in heterozygous heifers (67% and 66% for LHR and FSHR genes, respectively), however, no effect of RFLP polymorphism for LHR ($P=0.9188$) and FSHR ($P=0.8831$) on pregnancy rate was observed. The heritability estimates for PP were 0.21 and 0.41, using the animal and sire model, respectively. The small magnitude of the (co)variance components estimates related to random effects of LHR and FSHR, showed their small contribution in the proportion of total variance of pregnancy, indicating a polygenic inheritance for this trait. The results found in this work indicate that selection of beef heifers in animal genetic breeding programs for sexual precocity based on the inclusion of genotype information on RFLP for LHR e FSHR markers is not recommended. The investigation of other important genes related to puberty

onset in heifers is necessary. However, the evaluated markers were informative and may be indicated for genetic characterization studies in other bovine populations. The high heterozygosity observed on the studied composite population maximizes the exploration of these animals in crossbreeding.

Keywords: sexual precocity, LHR, FSHR, RFLP, composite beef heifers

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de formação dos animais compostos Montana Tropical 18

CAPÍTULO II: EFEITO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO LHR E DO FSHR SOBRE A PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo apresentando os padrões de fragmentos dos produtos de amplificação (ND1 e ND2) e dos produtos de digestão dos genes do LHR (TT, CT e CC) e FSHR (GG, CG e CC) por PCR-RFLP..... 57

Figura 2 – Frequências genotípicas para o gene do LHR em novilhas compostas Europeu- Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080) 58

Figura 3 – Frequências alélicas para o gene do LHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080) 59

Figura 4 – Frequências genotípicas para o gene do FSHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080) 60

Figura 5 – Frequências alélicas para o gene do FSHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080) 62

APÊNDICE A

Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo apresentando os padrões de fragmentos dos produtos de amplificação dos genes da P450aro e P450scc por PCR-RFLP. Na parte superior da figura: PM100 – marcador de peso molecular em escala de 100pb; 1 – produto amplificado de 502pb para o gene da P450scc; 2 – produto amplificado de 278pb para o gene da P450aro

ANEXO A

Figura 1 – Densidades *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a probabilidade de prenhez (PP), determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística, incluindo-se os efeitos dos marcadores RFLP LHR e FSHR, sem o PES390 como covariável

ANEXO B

Figura 2 – Densidades *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a probabilidade de prenhez (PP), determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística, incluindo-se os efeitos dos marcadores RFLP LHR e FSHR e do PES390 como covariável

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição das novilhas compostas Montana Tropical (4444, 4804, 4840 e 4840_2), ½ Nelore x ½ Europeu (8008 e 8080), de acordo com a composição racial, no sistema de tipos biológicos NABC (N = Zebu; A = Adaptado; B = Britânico e C = Continental) e fazenda de origem (RG ou Posses; SO ou Someco)	17
Tabela 2 –	Descrição dos genes investigados e seus respectivos cromossomos e exons, bem como as referências dos grupos de pesquisadores que trabalharam com os mesmos	20
Tabela 3 –	Seqüência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (<i>primers</i>) para cada gene estudado e sua referência no Genbank®	22
Tabela 4 –	Número de observações (N) para a probabilidade de prenhez (PP), efeitos dos marcadores moleculares (LHR e FSHR), classe de idade de mãe ao parto (CIMP) e grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP)	32
Tabela 5 –	Número de observações (N), médias, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para peso ajustado aos 205 dias (PES205) e peso ajustado aos 390 dias (PES390)	33

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS COMPOSTOS EUROPEU-ZEBU UTILIZANDO MARCADORES RFLP

Tabela 1 –	Número de novilhas (n) e origem de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC	41
Tabela 2 –	Descrição dos marcadores RFLP analisados	42
Tabela 3 –	Freqüências alélicas estimadas e probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (<i>P</i>) para o loco LHR e FSHR nas diferentes composições raciais de novilhas compostas Europeu-Zebu	45
Tabela 4 –	Estimativas de variabilidade genética populacional: heterozigosidade observada (<i>H_o</i>) e heterozigosidade esperada (<i>H_e</i>), para os locos LHR e FSHR, de acordo com as diferentes composições raciais de novilhas compostas Europeu-Zebu	46
Tabela 5 –	Estimativas de diversidade gênica total (<i>HT</i>), diversidade gênica dentro de população (<i>HS</i>) e coeficiente de diferenciação gênica entre populações (<i>GST</i>) para os marcadores RFLP LHR e FSHR	48

CAPÍTULO II: EFEITO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO LHR E DO FSHR SOBRE A PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU

Tabela 1 –	Número de novilhas (n), distribuídas de acordo com a fazenda de origem (RG ou SO) e descrição de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC	53
Tabela 2 –	Descrição dos marcadores RFLP analisados	54
Tabela 3 –	Frequências genótípicas e alélicas para o gene do LHR nos touros genotipados, agrupados por composição racial	61
Tabela 4 –	Frequências genótípicas e alélicas para o gene do FSHR nos touros genotipados, agrupados por composição racial	61

CAPÍTULO III: INCLUSÃO DO EFEITO DE MARCADORES RFLP SOBRE ESTIMATIVAS DE COMPONENTES DE (CO)VARIÂNCIA E PARÂMETROS GENÉTICOS EM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVA E PRODUTIVA EM NOVILHAS DE CORTE COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU

Tabela 1 –	Número de novilhas (n) e origem de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC	71
Tabela 2 –	Frequências genótípicas encontradas nas diferentes composições raciais estudadas de novilhas compostas (4444, 4804, 4840 e 4840_2) e ½ Nelore x ½ Europeu (8008 e 8080) para os genes do LHR e FSHR	72
Tabela 3 –	Componentes de variância e parâmetros genéticos para a probabilidade de prenhez (PP) em análise uni-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos aleatórios	76
Tabela 4 –	Componentes de variância e parâmetros genéticos para a característica probabilidade de prenhez (PP) em análise uni-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos fixos	80
Tabela 5 –	Componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a característica probabilidade de prenhez (PP), peso ajustado aos 205 dias (PES205) e peso ajustado aos 390 dias (PES390) em análise bi-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos fixos	82
Tabela 6 –	Resumo da análise de variância para a probabilidade de prenhez (PP), para as diferentes fontes de variação (FV), sob modelo touro	83

Tabela 7 – Componentes de variância e parâmetros genéticos para a probabilidade de prenhez (PP) estimados pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo touro, incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR)	84
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Precocidade sexual em novilhas de corte	3
2.1.1 Uma visão conceitual e endócrina	3
2.1.2 Uma visão genética quantitativa	4
2.1.3 Uma visão genética molecular	6
2.2 Genes envolvidos na manifestação da puberdade	7
2.2.1 O papel das enzimas esteroidogênicas e dos hormônios gonadotróficos	7
2.2.2 Relatos de polimorfismos	8
2.3 Marcadores moleculares: aplicações e estratégias de avaliações	10
2.4 O bovino composto Montana Tropical	12
3. OBJETIVOS	15
4. HIPÓTESES	16
5. MATERIAL E MÉTODOS	17
5.1 MATERIAL	17
5.1.1 Animais	17
5.1.2 Manejo	19
5.1.3 Descrição dos genes investigados	19
4.2 MÉTODOS	20
4.2.1 Extração de DNA de amostras de sangue	20
4.2.2 Extração de DNA de amostras de sêmen	21
4.2.3 Reação de amplificação em PCR	22
4.2.4 Eletroforese em gel de agarose	23
4.2.5 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”)	24
4.2.5.1 Identificação dos genótipos do LHR	24
4.2.5.2 Identificação dos genótipos do FSHR	24
4.2.5.3 Identificação dos genótipos da P450aro	25
4.2.5.4 Identificação dos genótipos da P450scc	25

4.2.6	Caracterização da estrutura genética da população	26
4.2.6.1	Determinação das frequências genóticas e alélicas	26
4.2.6.2	Estimativas de variabilidade genética populacional e diversidade gênica	27
4.2.7	Efeito dos marcadores RFLP sobre a precocidade sexual	28
4.2.8	Estimativas de componentes de (co)variância e parâmetros genéticos	30
4.2.8.1	Descrição e estruturação do banco de dados	30
4.2.8.2	Simulação dos genótipos na população de meio-irmãs	31
4.2.8.3	Descrição dos modelos matemáticos e estatísticos	31
4.2.8.4	Modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)	32
4.2.8.4.1	Modelos matemáticos uni-característica	34
4.2.8.4.2	Modelos matemáticos bi-características	35
4.2.8.5	Modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)	37
	CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS COMPOSTOS	
	EUROPEU-ZEBU UTILIZANDO MARCADORES RFLP	38
	RESUMO	38
	ABSTRACT	39
	1. INTRODUÇÃO	40
	2. MATERIAL E MÉTODOS	41
	2.1 Animais	41
	2.2 Marcadores	41
	2.3 Genotipagem	41
	2.4 Análise dos resultados	42
	3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
	3.1 Frequências genóticas e alélicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg	44
	3.2 Estimativas de heterozigosidade	46
	3.3 Estimativas de diversidade gênica e índices de fixação	47
	4. CONCLUSÕES	49
	CAPÍTULO II: EFEITO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO LHR E DO	
	FSHR SOBRE A PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS DE	
	CORTE COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU	50
	RESUMO	50
	ABSTRACT	51

1. INTRODUÇÃO	51
2. MATERIAL E MÉTODOS	53
2.1 Animais	53
2.2 Genotipagem	54
2.3 Análise dos resultados	55
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
4. CONCLUSÕES	66
CAPÍTULO III: INCLUSÃO DO EFEITO DE MARCADORES RFLP SOBRE ESTIMATIVAS DE COMPONENTES DE (CO)VARIÂNCIA E PARÂMETROS GENÉTICOS EM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVA E PRODUTIVA EM NOVILHAS DE CORTE COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU	67
RESUMO	67
ABSTRACT	68
1. INTRODUÇÃO	69
2. MATERIAL E MÉTODOS	70
2.1 Descrição dos dados	70
2.2 Descrição dos modelos matemáticos e estatísticos	73
2.2.1 Modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)	73
2.2.2 Modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)	74
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
3.1 Componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a PP no modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)	75
3.2 Componentes de (co)variância e herdabilidade para a PP no modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)	83
4. CONCLUSÕES	86
6. CONCLUSÕES GERAIS	91
REFERÊNCIAS	
APÊNDICES	
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A pecuária de corte nacional, em seus setores de produção e comercialização, tem procurado se adequar aos efeitos da globalização que tornaram o mercado altamente competitivo e exigente. Para acompanhar toda essa evolução e os investimentos que acarreta, tornou-se essencial a mudança de hábitos do produtor, o que proporcionou a introdução de novas tecnologias, suportada pelo acesso à riqueza de informações técnicas e científicas atualmente disponíveis.

Todas estas mudanças têm em comum o mesmo ponto de partida, os baixos índices que limitam a produção de carne no Brasil, dentre os quais a mortalidade de bezerras, a manifestação tardia da puberdade e primeiro parto das fêmeas e o abate tardio dos animais. Estes fatores demonstram a necessidade da obtenção de um sistema de produção que seja altamente eficiente, mas que também mantenha os baixos custos de produção hoje existentes.

O advento dos cruzamentos inter-raciais gerou um grande impacto na pecuária de corte, o que elevou a qualidade e aceitabilidade dos nossos produtos no mercado externo. Reunindo características desejáveis como adaptabilidade aos trópicos, precocidade sexual e de acabamento, o bovino composto Montana Tropical veio consolidar este avanço. Desenvolvido em condições tropicais brasileiras, a partir da contribuição de várias raças, tendo como ponto de partida, fêmeas *Bos indicus* da raça Nelore, esses compostos podem reter elevados níveis de heterose em sua descendência.

A precocidade sexual de fêmeas bovinas, avaliada por meio da idade à puberdade constitui-se um dos parâmetros mais confiáveis quando se deseja mensurar e elevar a eficiência reprodutiva do rebanho. Em virtude deste fato e adicionado à existência de moderada e até mesmo elevada herdabilidade para esta característica, a idade à puberdade pode ser adotada como critério de seleção de novilhas, privilegiando-se aquelas que a manifestam o mais precocemente possível.

Considerando-se as diferenças existentes entre raças para características de desempenho, quer sejam produtivas ou reprodutivas, um conhecimento criterioso da variabilidade genética e da inter-relação entre genótipo e fenótipo poderá ser viabilizado por meio de estudos fisiológicos, genéticos e biológicos. O uso de técnicas de biologia molecular para identificação de animais quanto a características economicamente interessantes, podem promover ganhos rápidos e substanciais na taxa de progresso genético e no potencial reprodutivo. A associação entre informações moleculares, oriundas de genes individuais ou locos cromossômicos, relacionados com características quantitativas de interesse econômico,

juntamente com análise genética quantitativa, permite maior intensidade de seleção dos animais, promovendo elevação do mérito genético nas futuras gerações.

Embora o estudo de marcadores moleculares para locos de características quantitativas (QTL's) encontra-se em fase de elevada ascensão, observa-se um maior interesse sobre aquelas de desempenho produtivo em detrimento às reprodutivas, como a precocidade sexual, por exemplo. Até o momento, não se dispõe de relatos que procuraram caracterizar a heterozigose e conhecer a estrutura genética, estimada mediante análise molecular, de populações bovinas de origem composta, como o Montana Tropical.

Conseqüentemente, investigações dos genes relacionados e que expliquem em sua maioria as variações fenotípicas observadas na característica precocidade sexual, podem fornecer informações valiosas a respeito da transmissão e manifestações da mesma nas gerações futuras. A decisão e a oportunidade de utilização de fêmeas sexualmente precoces terá reflexos diretos na eficiência, rentabilidade e competitividade do sistema produtivo.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Precocidade sexual em novilhas de corte

2.1.1 *Uma visão conceitual e endócrina*

Moran, Quirke e Roche (1989) definem a puberdade como sendo o momento da manifestação do primeiro estro, associado com uma ovulação potencialmente fértil, seguida por uma fase luteal de duração normal.

Relatos disponíveis na literatura permitem inferir que a idade de manifestação da puberdade em novilhas é bastante variável, geralmente oscilando entre 6 a 24 meses, com um peso corporal entre 250 e 300 kg (KINDER et al., 1995). Esta amplitude está intimamente associada à influência de diversos fatores, dentre os quais de natureza genética ou nutricional.

Em novilhas compostas $\frac{1}{4}$ Angus x $\frac{1}{4}$ Hereford x $\frac{1}{4}$ Red Poll x $\frac{1}{4}$ Pinzgauer, a puberdade foi atingida aos 12,4 e 14,5 meses ($P < 0,003$), respectivamente, para novilhas suplementadas com elevados e baixos níveis energéticos (BERGFELD et al., 1994). Diferenças entre composições raciais foram constatadas por Marson (2000) que relataram manifestação da puberdade aos 14,4 e 13,3 meses de idade ($P < 0,05$), respectivamente, em novilhas compostas Montana Tropical e $\frac{1}{2}$ Zebu x $\frac{1}{2}$ Red Angus, por meio de detecção diária de estro e dosagem hormonal de progesterona (P4), não se verificando, todavia, diferenças entre estas fêmeas com aquelas de composição $\frac{1}{2}$ Zebu x $\frac{1}{2}$ South Devon (13,9 meses).

Embora a visão conceitual referente ao evento puberdade em fêmeas bovinas seja relativamente simples, os mecanismos endócrinos envolvidos no processo de transformações graduais que culminarão na maturidade sexual são complexos (SCHILLO; HALL; HILEMAN, 1992).

De acordo com Garverick e Smith (1993), a fase pré-puberal envolve as principais alterações endócrinas que irão desencadear a puberdade, sendo caracterizada pela ausência de secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) pelo hipotálamo. Este fenômeno é explicado pela ação do estradiol, exercendo *feedback* negativo sobre o hipotálamo/hipófise (KINDER et al., 1995).

A diminuição deste *feedback* negativo, no final da fase pré-puberal, promove a secreção normal do GnRH que por sua vez se liga a seus receptores na adenohipófise, provocando aumento na frequência de liberação dos pulsos do hormônio luteinizante (LH), considerado o fator endócrino primário, pré-requisito para o desencadeamento da puberdade em novilhas (MORAN; QUIRKE; ROCHE, 1989; KINDER et al., 1995).

A liberação do LH nesta fase afeta a secreção de andrógenos que são os precursores do estradiol no ovário, sendo que o aumento das concentrações deste facilita o desenvolvimento folicular. A secreção pulsátil do hormônio folículo estimulante (FSH) também é estimulada, exercendo função importante na regulação do número e diâmetro dos folículos em cada aparecimento de uma onda de desenvolvimento folicular (EVANS; ADAMS; RAWLINGS, 1994). Por sua vez, a ação combinada do FSH com o LH resulta na diferenciação de um dos folículos inicialmente recrutados em folículo pré-ovulatório, que sofrerá ruptura liberando o óvulo, promovendo a ovulação, com posterior aumento nas concentrações de P4.

Para Glencross (1984), embora seja provável a ação inibitória do estradiol sobre o hipotálamo/hipófise, é necessário estímulo prévio com a P4, durante a fase pré-puberal, para que o estro puberal se manifeste por meio de sinais externos, e seja seguido de ovulação. Evans, Adams e Rawlings (1994) afirmaram que estas concentrações pré-puberais de P4 são responsáveis pelo desencadeamento da primeira ovulação, por meio da sensibilização dos ovários à ação do LH.

2.1.2 Uma visão genética quantitativa

Segundo Fries (1999) e Bergmann (1999) na maioria dos programas de avaliação genética, os critérios de seleção que são estabelecidos estão relacionados às características de desempenho ponderal, em detrimento às de natureza reprodutiva, mesmo sendo a eficiência reprodutiva um índice de peso na avaliação do sistema produtivo.

As baixas estimativas de herdabilidade encontradas para a maioria das características de fertilidade, tais como taxa de parição (0,19) e dificuldade ao parto (0,18), estudadas por Splan, Cundiff e Van Vleck (1998) e idade ao primeiro parto (0,19) e duração da gestação (0,26), avaliadas por Pereira et al. (2002), explicam esta tendência. Entretanto isto não significa que não ocorra melhoramento genético da fertilidade, mas sim que o progresso genético esperado é pequeno, acumulando-se lentamente na população, geração após geração, sendo altamente influenciado pelo efeito do ambiente (BARBOSA, 1997).

As práticas de seleção comumente utilizadas pelos criadores para características reprodutivas envolvem o descarte de fêmeas não prenhes no final da estação de monta e a mensuração da circunferência escrotal dos machos, por sua correlação genética favorável (-0,20) com a idade à puberdade nas fêmeas (FERRAZ; ELER, 1999; ELER et al., 2004).

A idade à puberdade se destaca dentre as características reprodutivas, por ser considerada um dos parâmetros mais confiáveis quando se deseja mensurar e elevar a eficiência reprodutiva do rebanho. Lesmeister, Burfening e Blackwell (1973) já haviam

concluído que novilhas que se reproduzem com um ano de idade, parindo com dois anos produzem um bezerro a mais em toda sua vida em comparação a novilhas que parem pela primeira vez aos três anos. Posteriormente, Byerley et al. (1987) demonstraram que a fertilidade das novilhas que se reproduziam no estro à puberdade era menor do que daquelas que se reproduziam no terceiro estro. Por conseguinte, as novilhas precisam atingir a puberdade um a três meses antes da estação de monta, ou seja, antes de estarem aptas à reprodução, para melhorar suas chances de produzirem suas crias o mais precocemente possível (HESS, 2002).

Estes dados demonstram a necessidade de se adotar a idade à puberdade, indicadora da precocidade sexual, como critério de seleção nos programas de melhoramento genético. Ao contrário das demais características de fertilidade, a herdabilidade estimada para a idade à puberdade é considerada moderada até mesmo elevada (0,31 de acordo com LASTER et al., 1979; 0,40 para MARTIN et al., 1992; 0,47 para SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998), significando que esta idade pode ser reduzida por meio da seleção genética permitindo a escolha de raças ou de animais mais precoces.

Entretanto, os critérios de seleção genética para se reduzir a idade à puberdade não são facilmente caracterizados, sendo este evento de difícil mensuração, principalmente em condições extensivas, envolvendo laboriosas avaliações para coleta de informações (ALBUQUERQUE; FRIES, 1997), como detecção do primeiro estro, palpações retais ou ultra-sonografia e até mesmo dosagem circulante de P4 para confirmação da primeira ovulação. Diante desses entraves, utiliza-se a idade ao primeiro parto como reflexo da idade à puberdade e como característica indicadora do início da atividade reprodutiva das fêmeas. Contudo, um fator limitante da utilização desta idade é o tempo demandado para a sua expressão (LANNA; DELGADO, 2000).

Deste modo, Eler et al. (2000) recomendam a inclusão de outras características medidas diretamente nas fêmeas, como a probabilidade de prenhez aos 14 meses (PP14), definida como a probabilidade de uma novilha se tornar prenhe após o final da estação de monta quando é exposta ao touro ou inseminada aos 14 meses de idade. Estimativas de herdabilidade de $0,57 \pm 0,10$ (ELER et al., 2002), $0,61 \pm 0,10$ e $0,68 \pm 0,09$, incluindo-se ou não, respectivamente, o grupo de manejo das novilhas no grupo de contemporâneo (ELER et al., 2004) foram obtidos para a PP14 em novilhas da raça Nelore.

Estimativas de herdabilidade mais baixas para a PP14 têm sido relatadas para novilhas *Bos taurus*: de $0,14 \pm 0,09$ (EVANS et al., 1999) a $0,21 \pm 0,12$ (DOLEY et al., 2000). Uma das razões que explicam esta diferença em relação às estimativas relatadas para novilhas

zebuínas refere-se a idade à puberdade, que já é normalmente atingida precocemente em taurinos (em média, aos 14 meses de idade), o que reduz a variabilidade genética para esta característica nestes animais.

Face às dificuldades operacionais para implementação de programas de seleção para idade à puberdade, Bergmann (1999) ressaltou a importância em se utilizar de características indicadoras de precocidade sexual que apresentem variabilidade genética adequada, que sejam de mensuração fácil e econômica e que sejam geneticamente correlacionadas com idade à puberdade, o que é possivelmente obtido com avaliações moleculares em genes a ela relacionados.

2.1.3 Uma visão genética molecular

De acordo com Beuzen, Stear e Chang (2000) a avaliação genética clássica inicia-se pela análise do fenótipo, identifica influências genéticas e fornece métodos para maximizar a resposta à seleção, ao passo que a genética molecular frequentemente se inicia com o conhecimento dos alelos ou sequência de DNA, examina sua influência no fenótipo, gerando contribuições diretas à produção animal, a partir de uma melhor compreensão da estrutura e expressão dos genes.

O procedimento a ser utilizado para a exploração da precocidade sexual, por exemplo, consiste inicialmente no estudo de genes potencialmente envolvidos na manifestação da característica em questão (genes candidatos), buscando a identificação dos genótipos que a codifica e as possíveis variações existentes entre eles na expressão desta característica (UNANIAN, 1997). Os marcadores moleculares que constituem qualquer variação ou polimorfismo molecular de segmentos codificáveis ou não do DNA podem ser indicados para este fim.

Marcadores RFLP (*Restriction fragment length polymorphism* ou polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição) são identificados por enzimas de restrição, produzidas por bactérias como um mecanismo de defesa contra fagos, capazes de cortar o DNA. Deste modo algumas mutações em genes candidatos podem alterar sequências especificamente reconhecidas por estas enzimas. A técnica combinada PCR (*Polimerase chain reaction* ou Reação em cadeia da polimerase) + RFLP promoverá a amplificação de um segmento específico do DNA, contendo o polimorfismo escolhido e delimitado pelos oligonucleotídeos iniciadores ou *primers*, cujo produto será posteriormente submetido à digestão com a enzima de restrição adequada ao sítio proposto.

Os efeitos de polimorfismos em genes são mais freqüentemente estudados em características produtivas do que reprodutivas. Uma das razões, como salientado anteriormente, se refere às baixas estimativas de herdabilidade normalmente relatadas para características de fertilidade, entretanto moderadas a elevadas herdabilidades têm sido encontradas para a idade à puberdade.

Outro fator importante se refere à natureza poligênica destas características, significando que mais de um gene tem sido implicado na expressão das mesmas. Finalmente, as metodologias empregadas para se avaliar efeitos de marcadores são mais fáceis de serem executadas quando se analisam características de natureza contínua, como pesos corporais, por exemplo, que geralmente seguem uma distribuição normal, ao contrário daquelas de natureza categórica ou discreta, como a prenhez, nos quais os procedimentos de análise são mais complexos.

Por estas razões, consideram-se escassos os relatos de literatura de resultados de polimorfismos para características reprodutivas, em especial, para a puberdade em animais de produção.

2.2 Genes envolvidos na manifestação da puberdade

2.2.1 O papel das enzimas esteroideogênicas e dos hormônios gonadotróficos

Qualquer estudo que, em seu desenvolvimento, apresente algum tipo de investigação genético-molecular, pressupõe-se um conhecimento prévio dos mecanismos fisiológicos pelos quais participam os principais genes envolvidos na manifestação da característica que se quer avaliar. A estratégia consiste em pesquisar variações especificamente nestes genes, nos indivíduos que apresentarem fenótipos distintos (WOMACK, 1993).

A manifestação da puberdade, segundo Thibault, Levasseur e Hunter (1993), ocorre, basicamente, em virtude do ajustamento gradual entre o aumento da atividade dos hormônios gonadotróficos hipofisários, somado à habilidade das gônadas em assumir simultaneamente a esteroideogênese e a gametogênese. A regulação da esteroideogênese ovariana é mantida pelos hormônios FSH e LH, bem como por outros fatores, envolvidos na expressão de genes que codificam as enzimas esteroideogênicas (LAUBER et al, 1993).

Como salientado anteriormente a P4 exerce função preponderante no desencadeamento da puberdade em fêmeas bovinas. No complexo mecanismo enzimático envolvido na esteroideogênese, verifica-se que a enzima mitocondrial citocromo P450 *side-chain cleavage* (P450_{scc}) é limitante na síntese de P4, portanto o estudo da expressão gênica

desta enzima, associado à possível ocorrência de mutações nos genes que a codifica, pode fornecer informações valiosas sobre a manifestação precoce da puberdade em novilhas. A enzima P450 aromatase (P450aro), enzima chave na biossíntese do estradiol 17- β , o mais potente dos esteróides produzidos pelo ovário, também exerce função preponderante no desencadeamento dos eventos reprodutivos.

Os hormônios LH e FSH são produzidos nas células gonadotróficas localizadas na hipófise anterior, sendo constituídos por duas subunidades: uma comum a ambos (subunidade α) e outra exclusiva para cada um destes hormônios (subunidades LH β ou FSH β). As três subunidades são sintetizadas como precursores e codificadas por diferentes genes (COUNIS, 1990). Assim como as enzimas esteroideogênicas, os hormônios gonadotróficos LH e FSH, também exercem papel preponderante na função reprodutiva, particularmente na diferenciação sexual e na função gonadal, em ambos os sexos.

Por sua vez, a ação dos hormônios gonadotróficos é dependente da ligação aos seus receptores específicos, presentes na superfície da membrana plasmática das células alvo nas gônadas (THIBAULT; LEVASSEUR; HUNTER, 1993). De acordo com Aittomaki et al. (1995), deleções ou mutações nos genes de receptores podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transmissão do sinal endocrinológico, podendo interferir na resposta esperada. Assim a estratégia de avaliação dos hormônios LH e FSH deve estar associada ao estudo dos genes dos seus receptores de membrana, respectivamente o LHR e o FSHR.

2.2.2 Relatos de polimorfismos

Em coelhos, Yang et al. (1993) associaram ocorrência de mutação na P450scc com a ausência da expressão gênica desta enzima, resultando na forma letal de feminização da hiperplasia lipóide adrenal congênita (CAH), uma anomalia genética causada por distúrbios na esteroideogênese, provocando produções inadequadas de glicocorticóides e/ou esteróides gonadais. Em humanos, mutações no gene da P450scc não têm sido descritas e provavelmente são incompatíveis com a gestação a termo (MILLER, 1998).

Stratakis et al. (1998) relataram aumentos da atividade da enzima P450aro associado à identificação de um novo exon do gene que a codifica em uma família com histórico de feminização e puberdade precoce.

Na espécie bovina, Vanselow et al. (1999) identificaram três sítios polimórficos RFLP no gene da P450aro (CYP19), na região promotora 1.1 da placenta. Andréa et al. (2000) fizeram uma breve referência a respeito de marcadores moleculares associados à precocidade

sexual em novilhas da raça Nelore, elegendo os genes das enzimas P450_{scc} e P450_{aro}, além do hormônio prolactina, por sua ação conhecida na lactação e no crescimento dos folículos ovarianos. Os resultados preliminares obtidos por Andréa (2002) mostraram a ocorrência de padrões distintos de polimorfismos SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism* ou Polimorfismo Conformacional de Fita Simples) os quais, entretanto, não foram correlacionados com a característica precocidade sexual.

Alterações reprodutivas importantes em humanos foram relacionadas às disfunções dos receptores de LH e FSH. Chan (1998); Themmen, Martens e Brunner (1998) enfatizaram que mutações nos genes destes receptores levam à sua ativação ou inativação, promovendo respostas variadas.

No gene do FSHR foram descritas, até o momento, uma mutação ativadora e três inativadoras (LEVALLET; PAKARINEN; HUHTANIEMI, 1999). A mutação ativadora foi identificada por Gromoll et al. (1996) em um homem hipofisectomizado, devido a um tumor na adenohipófise, que apesar de apresentar concentrações séricas não detectáveis de FSH, possuía parâmetros seminais normais.

As mutações inativadoras foram relatadas por Aittomaki et al. (1995) e Gromoll et al. (1996), sendo unânime a constatação do papel relevante do FSH na fertilidade em mulheres, principalmente diante dos casos observados, como ovários subdesenvolvidos, insensíveis ao estímulo ao FSH, além de amenorréia primária e até infertilidade.

Mais três polimorfismos no FSHR em humanos foram identificados por Simoni et al. (1999), mas segundo estes autores, nenhuma mudança funcional deste receptor foi observada, ratificando os resultados encontrados por Campagnari (2002) que descreveu uma mutação pontual por SSCP nesta mesma região do gene homólogo bovino. Outras quatro mutações pontuais e uma silenciosa, além de três pontos polimórficos na região não traduzida 3' (3' UTR) foram relatadas por esta autora no exon 10 do FSHR, entretanto somente uma das variantes moleculares observadas nesta última região, foi correlacionada significativamente com o fenótipo precocidade sexual em novilhas da raça Nelore. É relevante citar também os achados de Rahal et al. (2000) que já haviam identificado, em fêmeas Nelore, duas regiões polimórficas SSCP no gene do FSHR, que podem ser consideradas como marcadores potenciais para características reprodutivas.

Para o gene do LHR há uma quantidade expressiva de relatos de mutações ativadoras e inativadoras disponíveis na literatura. Em humanos, as mutações ativadoras do LHR parecem ser mais frequentes no sexo masculino, sendo que as primeiras a serem identificadas foram confirmadas em pacientes com puberdade precoce familiar associada ao sexo masculino

(FMPP – *familial male precocious puberty*). Essas mutações faziam com que os meninos se tornassem púberes antes dos quatro anos de idade e apresentasse aumento do pênis, produção de testosterona e hiperplasia das células de Leydig (SHENKER et al., 1993).

As mutações inativadoras do LHR por sua vez, são mais variáveis e incluem a síndrome da resistência às gonadotrofinas (DAVID et al., 1984), hipoplasia das células de Leydig e hipogonadismo ou pseudohermafroditismo masculino (WU; CHAN, 1999). Em mulheres, os sintomas incluem alterações menstruais e infertilidade (ARNHOLD et al, 1999), além de ovários policísticos e amenorréia primária.

Diante destes relatos, acrescentam-se as interpretações de Heger, Sippell e Partsch (2005) que, revisando o tema puberdade precoce em humanos apontam ser esta uma importante disfunção hormonal que deve ser cuidadosamente avaliada e tratada, principalmente por envolver crianças entre oito e nove anos, o que gera um desajustamento psicossocial, além de outras conseqüências como desenvolvimento acelerado de características sexuais secundárias e maturação óssea.

Em novilhas da raça Nelore, Milazzotto (2001) relatou cinco mutações pontuais e uma silenciosa, além de dois pontos polimórficos na região não traduzida 3' UTR do gene do LHR por SSCP. Apesar de não ter demonstrado efeito dos polimorfismos encontrados sobre a precocidade sexual, a autora supracitada confirmou que este evento está associado a fatores genéticos, indicando a continuidade dos estudos que buscam marcadores moleculares para tal característica.

Embora os polimorfismos SSCP observados por Milazzotto (2001), Campagnari (2002) e Andréa (2002) não tenham sido associados com o fenótipo precocidade sexual na espécie bovina, estes resultados servem como material a ser futuramente explorado com outras metodologias, mais específicas, tais como a RFLP, de tal forma que se possa se caracterizar não somente a frequência de indivíduos heterozigotos, bem como estabelecer grupos de animais portadores de diferentes haplótipos.

2.3 Marcadores moleculares: aplicações e estratégias de avaliações

O estudo de marcadores moleculares possibilita a identificação de paternidade, construção de mapas genéticos, diagnóstico de doenças e identificação de locos responsáveis por características quantitativas (QTL), entre outros (TAMBASCO-TALHARI, 2003). Além dessas aplicações ressaltam-se as importantes contribuições que os marcadores podem fornecer aos estudos genéticos quantitativos e de caracterização genética de populações, tais

como a estimação de medidas ou parâmetros populacionais, predição de heterose e de relações genéticas em espécies animais e vegetais.

Marcadores microssatélites e RFLP apresentam um elevado grau de polimorfismo e vêm sendo amplamente empregados para investigar as propriedades genéticas de populações e identificar genes importantes na determinação de características de interesse (ALMEIDA et al., 2000; TAMBASCO et al., 2000). Os marcadores RFLP apresentam as vantagens de serem numerosos ao longo do genoma, permitir o monitoramento de regiões não codificadoras e possuírem expressão codominante.

A caracterização genética de populações, raças e espécies permitem acessar a variabilidade genética, informação essencial na determinação de estratégias de cruzamento e de programas de conservação genética. Medidas de variabilidade populacionais, como grau de heterozigose ou heterozigosidade, diversidade gênica, distância genética, entre outros têm sido avaliadas em vários estudos envolvendo marcadores moleculares (MACHADO et al., 2003; VASCONCELLOS et al., 2003).

Outra aplicação mais recente viabilizada pelos marcadores moleculares refere-se à incorporação de resultados moleculares em programas de avaliação genética quantitativa. Davis e DeNise (1998) ressaltaram que quando informações obtidas pela análise dos genes para determinada característica são combinadas com informações fenotípicas e de pedigree, obtém-se maximização da avaliação genética. Em posse destas informações, o sucesso no melhoramento genético dos animais será o resultado futuro de seleção e cruzamento de indivíduos geneticamente superiores, no que se denomina seleção assistida por marcadores moleculares ou MAS.

Esta melhoria é traduzida por melhores taxas de ganho genético e acurácia de seleção, por permitir a investigação de características em animais jovens (mesmo em embriões), o que reduz o intervalo de gerações, assim como em animais cujo sexo não permite a expressão da característica, ou para aquelas expressas tardiamente na vida do animal, difíceis de serem mensuradas ou com herdabilidades baixas (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998; BENNEWITZ et al., 2004).

Informações moleculares vêm sendo incorporadas em sistemas de equações que se utiliza de metodologias de análise poderosas para estimação de componentes de variância e parâmetros genéticos, como herdabilidades e correlações genéticas (KENNEDY; QUINTON; van ARENDONK, 1992; NOTTER, COCKETT; HADFIELD, 2003). Métodos alternativos que se diferenciam nas variáveis dependentes avaliadas, nas categorias dos indivíduos

genotipados e nos modelos estatísticos utilizados têm sido propostos nestes casos (ISRAEL; WELLER, 1998).

Para estimação de parâmetros genéticos de características reprodutivas de natureza categórica, por exemplo, diferentes modelos (misto linear ou não linear, sob modelo animal ou touro), sob diferentes distribuições vêm sendo comparados (MATOS et al., 1997a; SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998; PHOCAS; LALOË, 2003) não havendo uma posição unânime entre os autores na escolha do melhor modelo, por haver variações no tamanho do banco de dados, no software computacional utilizado e no tempo despendido para gerar os resultados.

Kennedy, Quinton e van Arendonk (1992) mostraram que estimativas não-viesadas de efeitos de genes podem ser obtidas em análise de modelos mistos sob modelo animal, pelo método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML), incluindo-se os genótipos como efeitos fixos, se todos os indivíduos da população forem genotipados. Entretanto, geralmente somente uma pequena fração da população é genotipada, face aos custos e dificuldades operacionais envolvidos. Mas para Israel e Weller (1998) programas tradicionais de análise genética podem ser facilmente modificados para estimação dos efeitos de genes candidatos, independente de quais indivíduos (touro, vaca ou produto) foram genotipados. No entanto, estratégias de simulação de genótipos podem maximizar estas análises permitindo a incorporação de expressivo número de animais dotados de informações (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998; TESS; KOLSTAD, 2000).

Notter, Cockett e Hadfield (2003) sugerem que o método REML, sob modelo animal tem sido o mais apropriado para detecção de efeitos genotípicos por permitir tanto a incorporação destes efeitos como o dos aditivos e residuais, respeitando-se o relacionamento de parentesco entre os animais a serem incluídos na análise. Estes autores constataram uma contribuição de 23,8% do gene do receptor da melatonina na estimativa total da variância genética aditiva da fertilidade em ovelhas, recomendando a inclusão deste marcador em programas de seleção para a fertilidade em fêmeas ovinas, considerando-se ser esta característica de baixa herdabilidade e limitada ao sexo.

2.4 O bovino composto Montana Tropical

A formação de raças bovinas compostas é um procedimento relativamente simples que promove a obtenção de elevados níveis de heterose, tendo como vantagem, além da utilização de diferenças raciais ou da complementaridade entre raças (combinação de características de cada raça que se completam), a oportunidade de obtenção de animais geneticamente

superiores, que apresentarão elevado desempenho para a maioria das características produtivas (GREGORY; CUNDIFF, 1999; FERRAZ; ELER; GOLDEN, 1999a), mantendo a harmonia com o ambiente produtivo e os requerimentos do mercado atual.

De acordo com Bourdon (1999b) e Gregory e Cundiff (1999) os animais compostos exibem consideráveis percentuais de heterose ou vigor híbrido que é, por sua vez, linearmente associado com a retenção de heteroziguidade, que será dependente do número e proporção de componentes raciais neste animal em particular.

Como já salientado, a caracterização da frequência da heterozigose em uma população bovina composta pode fornecer informações valiosas referentes à forma como determinada característica se expressa em seus descendentes. Portanto, a identificação de genes que se manifestam em homozigose ou heterozigose e a correlação destas informações com aquelas de natureza fenotípica de interesse resultaria em maior acurácia, o que justifica as proposições impostas no presente trabalho. Cundiff e Gregory (1999) ressaltam ainda, que as diferenças genéticas entre raças podem ser exploradas, com um maior nível de precisão em populações compostas, visando otimizar o desempenho dos animais.

Em 1994 a Agro-Pecuária CFM Ltda. e a Leachman Cattle Co., estabeleceram a CFM-Leachman Pecuária Ltda., baseando-se nos estudos clássicos de formação de bovinos compostos, desenvolvidos pelo Meat Animal Research Center (MARC), de Clay Center, Nebraska, EUA. Nesta instituição, as pesquisas clássicas de formação de bovinos compostos iniciaram-se no final dos anos 40, chegando-se à produção de três diferentes populações de bovinos compostos: MARC I ($\frac{1}{4}$ Charolês x $\frac{1}{4}$ Limousin x $\frac{1}{4}$ Braunvieh x $\frac{1}{8}$ Hereford x $\frac{1}{8}$ Angus); MARC II ($\frac{1}{4}$ Gelbvieh x $\frac{1}{4}$ Simental x $\frac{1}{4}$ Hereford x $\frac{1}{4}$ Angus) e MARC III ($\frac{1}{4}$ Pinzgauer x $\frac{1}{4}$ Red Poll x $\frac{1}{4}$ Hereford x $\frac{1}{4}$ Angus) desenvolvendo até o momento presente, pesquisas importantes referentes ao desempenho dos animais destas três populações.

Por sua vez, a CFM-Leachman Pecuária Ltda. iniciou o desenvolvimento, em condições tropicais e subtropicais brasileiras um programa de formação de um bovino composto, o Montana Tropical, visando a exploração dos efeitos da heterose e complementaridade de raças com a utilização de touros aptos à cobertura à campo. As metas do composto Montana Tropical se apóiam em uma composição racial de no mínimo quatro raças, embasadas no percentual de heterose demonstrado por Gregory, Cundiff e Koch (1991), de 75%, podendo chegar até 87,5% se forem utilizadas oito ou mais raças na formação desses animais.

Este programa de cruzamento é caracterizado como um sistema do tipo “aberto”, ou seja, permitindo a introdução de novo material genético, a qualquer momento, sem

estabelecimento rígido de raças a serem utilizadas, definindo somente os tipos biológicos, isto é, grupos de diferentes raças, de acordo com suas semelhanças de tipo, função, aspectos de crescimento e reprodução (FERRAZ; ELER; GOLDEN, 1999b; FERRAZ; ELER, 2000).

Os tipos biológicos adotados na formação do Montana são classificados de acordo com o sistema NABC, sempre nesta ordem, em que:

- **Grupo N:** representado pelos animais *Bos taurus indicus*, incluindo-se as raças já adaptadas no Brasil (Nelore, Gir, Guzerá), sendo o Nelore a raça predominante. Estes animais contribuem para o programa com sua alta rusticidade, resistência a parasitas e rendimento de carcaça;
- **Grupo A:** taurinos de origem européia, adaptados aos trópicos, como as raças Belmont Red, Bonsmara, Caracu, Senepol, etc. Fornecem características relevantes, como alto grau de adaptabilidade ao clima tropical e fertilidade, além de outras relacionadas à qualidade de carne;
- **Grupo B:** *Bos taurus taurus* de origem britânica, como os das raças Aberdeen Angus, South Devon, Red Angus, etc. Contribuem com sua precocidade sexual e de acabamento, além de características de conformação, qualidade de carcaça, carne e crescimento;
- **Grupo C:** taurinos de origem européia continental, citando-se as raças Charolesa, Limousin, Pardo-Suíço, Simental, etc. Apresentam elevado potencial de crescimento e rendimento, além de qualidade de carcaça e habilidade materna.

Cada letra terá um número correspondente a ela, que equivale ao percentual de contribuição genética de cada grupo e a soma total dos números será 16, representando 100%. Assim o número 2 equivale a 12,5% (2/16), o 4 representa 25% (4/16), e assim por diante.

A predição do desempenho de um determinado cruzamento requer avaliações experimentais que, além do longo tempo despendido, apresentam um custo elevado. Resultados experimentais têm demonstrado que a máxima heterose em bovinos é observada em cruzamentos que envolvem animais com elevada divergência genética, como os cruzamentos entre raças zebuínas e taurinas. O emprego de marcadores moleculares para caracterizar a frequência de heterozigose nestes cruzamentos, bem como identificar as raças mais divergentes, auxiliando na escolha dos materiais genéticos a serem utilizados em cruzamentos, deve contribuir para a redução do tempo despendido nessas avaliações.

3. HIPÓTESES

- Animais compostos Europeu-Zebu, desenvolvidos a partir da contribuição de diferentes raças, conseguem reter níveis consideráveis de heterose ou vigor híbrido, apresentando, como resultado, freqüências elevadas de heterozigose em nível de genes;
- A retenção de heterose será refletida no desempenho dos animais para a maioria das características produtivas e reprodutivas. Considerando-se este efeito, novilhas heterozigotas serão mais precoces sexualmente, apresentando melhores probabilidades de prenhez por ocasião de sua primeira estação reprodutiva, em relação às novilhas homozigotas;
- A idade à puberdade, característica indicadora da precocidade sexual de novilhas, tem apresentado estimativas de herdabilidade elevadas, significando que grande parte de sua variação advém do efeito de genes.

4. OBJETIVOS

Considerando-se a escassez de estudos de polimorfismos de genes sobre características reprodutivas, como a precocidade sexual, e a possibilidade que uma população de bovinos compostos Europeu-Zebu oferece para exploração da heterozigose em nível de genes, o presente estudo teve como objetivos:

- Caracterizar geneticamente uma população de novilhas de corte compostas Europeu-Zebu, com o intuito de conhecer a composição e variabilidade genética deste rebanho híbrido;
- Avaliar os efeitos dos polimorfismos nos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e do folículo-estimulante (FSHR) e das enzimas esteroideogênicas P450 *side chain cleavage* (P450scc) e P450 aromatase (P450aro), por análise PCR-RFLP sobre a precocidade sexual, utilizando-se como característica indicadora deste evento a probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta;
- Avaliar a incorporação dos efeitos dos marcadores RFLP investigados, em diferentes modelos estatísticos, e estimar a proporção de variação genética total da variável prenhez atribuída aos mesmos pelo método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML), sob modelo animal e sob modelo touro.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

5.1.1 Animais

Foram avaliadas 370 novilhas, nascidas entre agosto de 2001 e janeiro de 2002, sendo 259 compostas Montana Tropical (MT) e 111 $\frac{1}{2}$ *Bos indicus* x $\frac{1}{2}$ *Bos taurus*, distribuídas em seis composições raciais, de acordo com os diferentes percentuais de contribuição racial de origem Zebu (N), Adaptados às condições tropicais (A), Europeu Britânico (B) e Europeu Continental (C), constituindo o sistema de caracterização NABC, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição das novilhas compostas Montana Tropical (4444, 4804, 4840 e 4840_2), $\frac{1}{2}$ Nelore x $\frac{1}{2}$ Europeu (8008 e 8080), de acordo com a composição racial, no sistema de tipos biológicos NABC (N = Zebu; A = Adaptado; B = Britânico e C = Continental) e fazenda de origem (RG ou Posses; SO ou Someco)

NABC	Origem	n ¹		Total
		RG	SO	
4444	25% Zebu x 25% Adaptado x 25% Britânico x 25% Continental	02	20	22
4804	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental	31	07	38
4840	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico	51	50	101
4840_2	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico (2ª geração)	-	98	98
8008	50% Zebu x 50% Continental	10	48	58
8080	50% Zebu x 50% Britânico	53	-	53
Total Geral		147	223	370

¹ número de animais

Os animais, caracterizados pelo sistema de tipos biológicos NABC, anteriormente especificado, eram provenientes de duas fazendas, a Posses, de propriedade da CFM Ltda, localizada no município de Guaraci-SP, antiga sede do núcleo de animais compostos Montana que identifica os seus animais com a sigla RG e a Someco, fazenda franqueada da CFM, localizada no município de Ivinhema-MS, de sigla SO. Novilhas Montana 4840 de 2ª geração, originadas do acasalamento entre fêmeas e touros Montana de NABC 4840, foram

identificadas pelo NABC 4840_2 para não haver confundimento com as MT 4840 de 1ª geração.

A Figura 1 ilustra, de acordo com o sistema de tipos biológicos NABC, os acasalamentos que originam o composto Montana Tropical, nas diversas composições raciais possíveis.

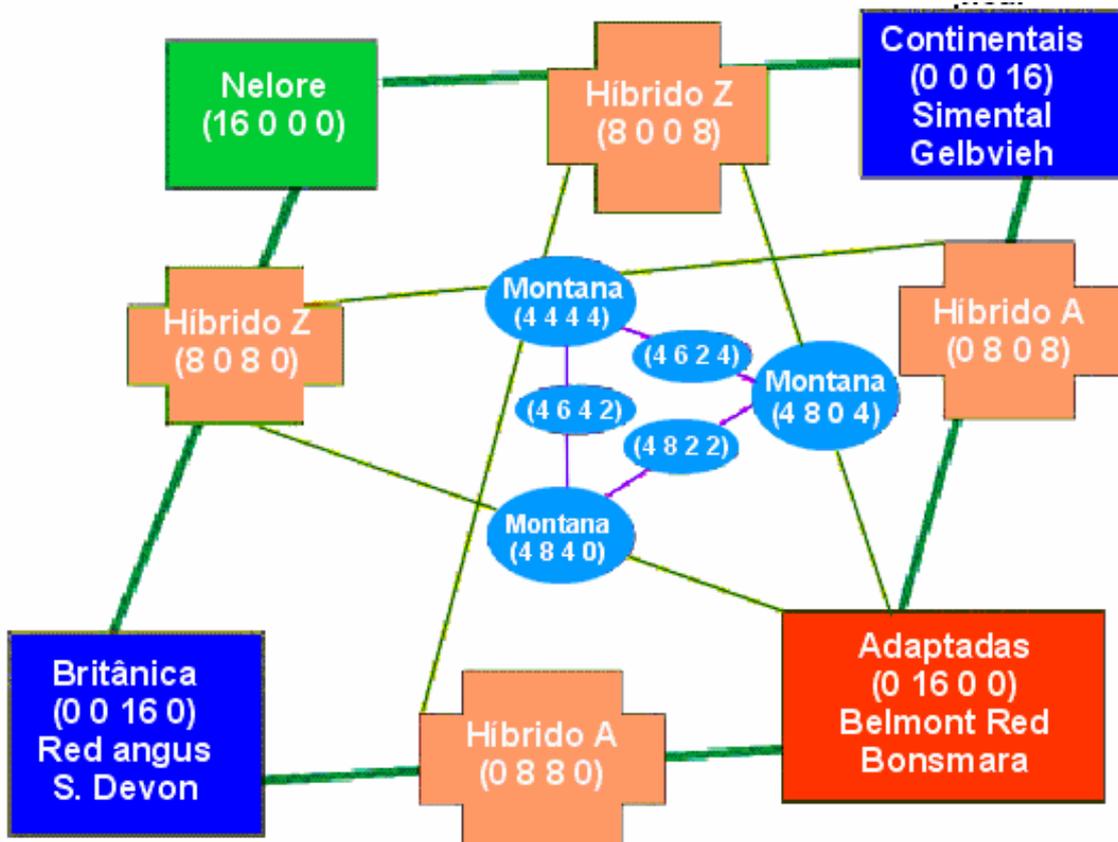


Figura 1 – Esquema de formação dos animais compostos Montana Tropical

Fonte: Eler, 2001.

O banco de dados da população envolvida na formação dos animais Montana investigados neste estudo conta, atualmente, com cerca de 200.000 registros de produção. Os registros de pedigree são controlados desde a fundação do atual rebanho, remontando a dados de meados da década de 1970 e os registros de desenvolvimento ponderal, desde o ano de 1994. O controle zootécnico das fazendas participantes do programa traz dados genealógicos e de produção que compõem um enorme banco de dados, de mais de 400.000 registros de pedigree.

5.1.2 *Manejo*

As fazendas contam com excelentes práticas de manejo e com boa infra-estrutura de pastagens, havendo, entretanto, algumas diferenças entre elas, na condução dos manejos nutricional, sanitário e reprodutivo. As fazendas são distribuídas em retiros e os pastos, de tamanhos variados, contam com abastecimento de água e cocho para sal mineral. As pastagens predominantes são de *Panicum maximum* (Colonião) e *Brachiaria sp.* referentes a, respectivamente, cerca de 65% e 35% das pastagens disponíveis. Em geral, o manejo alimentar restringe-se ao fornecimento de pastagens de boa qualidade e suplementação mineral adequada, seguindo as necessidades de cada retiro, definidas após análise do solo e da qualidade das pastagens. O manejo sanitário segue todas as recomendações técnicas básicas relativas a vacinações e vermifugações dos animais, e o estado sanitário dos mesmos é sempre verificado e mantido no nível mais alto possível.

Por sua vez, o manejo reprodutivo envolve controle das condições sanitárias e do desenvolvimento reprodutivo dos animais jovens. A estação de monta para as novilhas compostas tem duração variável de três a seis meses, dependendo do manejo de cada fazenda.

Na fazenda Someco, o peso corporal mínimo de 295 é a condição exigida para que as novilhas sejam submetidas à inseminação artificial. Todas as novilhas inseminadas são submetidas ao repasse com touros a campo, independente se retornaram ao estro ou não após a IA. As que não atingem o peso de 295 kg são submetidas à monta natural e as que apresentarem um peso bem inferior ao mínimo exigido são descartadas, juntamente com as novilhas que não conceberam até o final da estação, mediante o resultado do diagnóstico de gestação. Já na fazenda Posses, todas as novilhas são expostas ao redor dos 14 meses à estação de monta, pelo sistema de monta natural.

5.1.3 *Descrição dos genes investigados*

Procedeu-se a investigação de quatro genes, que codificam para dois receptores de hormônios gonadotróficos e duas enzimas esteroideogênicas, em toda a população de novilhas proposta para este estudo. Os genes foram previamente escolhidos por suas funções na manifestação da puberdade, característica indicadora da precocidade sexual, a partir de pesquisas anteriores que se dedicaram ao estudo dos mesmos em novilhas *Bos indicus* da raça Nelore (Tabela 2).

Tabela 2 – Descrição dos genes investigados e seus respectivos cromossomos e exons, bem como as referências dos grupos de pesquisadores que trabalharam com os mesmos

Cromossomos	Exons	Genes	Referências
11	11	Receptor do Hormônio Luteinizante (LHR)	Milazzotto (2001)
11	10	Receptor do Hormônio Folículo Estimulante (FSHR)	Campagnari 2002)
10	1	Enzima esteroidogênica aromatase (P450aro)	Andréa (2002)
21	1	Enzima esteroidogênica <i>side chain cleavage</i> (P450scc)	Andréa (2002)

4.2 MÉTODOS

4.2.1 *Extração de DNA de amostras de sangue*

Amostras de 5,0 ml de sangue periférico foram colhidas por meio de punção da veia jugular em tubos para coleta à vácuo (“vacuotainer”), contendo 7,5 mg de anticoagulante EDTA. O sangue foi homogeneizado por inversões do tubo, sendo este último devidamente identificado e mantido sob refrigeração em caixa de isopor com gelo até a chegada ao laboratório, onde foi acondicionado à 4° C em geladeira até o momento da extração do DNA, sendo processado em no máximo dois dias.

O DNA foi extraído empregando-se o método de extração e precipitação em NaCl, descrito por Olerup e Zetterquist (1992). Ao volume de 1.000 µl de sangue, foi adicionado 450 µl de solução tampão de lise de hemácias (Sacarose 0,32 mM, Tris-HCl 12 mM, MgCl₂ 5mM e 1% de Triton), em microtubos do tipo “eppendorf” de 1,5 ml. As amostras foram centrifugadas à 13.000 rpm por 1 minuto, o sobrenadante descartado e o procedimento repetido até a obtenção de um sedimento branco, sendo então lavado em 1.000 µl de água ultrapura.

O sobrenadante foi ressuspenso em 80 µl da solução de tampão de Proteinase K (NaCl 0,375mM e EDTA 0,12 mM), 20% SDS, 280 µl de água ultrapura e Proteinase K a uma concentração final de 200ug/ml, sendo incubado à 55°C por 3 horas. Após este período, o material foi mantido à 4°C durante 15 minutos. Adicionou-se então NaCl a 1,0 M e após agitação por 15 segundos a amostra foi centrifugada à 13.000 rpm por 5 minutos, para precipitação da proteína.

O sobrenadante foi transferido para tubo limpo, sendo o DNA precipitado pela adição 2,5 volumes de etanol absoluto à -20°C, homogeneizado, mantido à -80°C durante 15 minutos e centrifugado por 10 minutos à 14.000 rpm à uma temperatura de 4°C e posteriormente lavado com etanol 70%. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento restante, desidratado em dessecador durante 30 minutos e ressuscitado em 50 µl de água ultrapura.

O DNA foi diluído em temperatura de 37°C por 1 hora, sendo finalmente acondicionado em freezer à -80°C até o momento da sua utilização. A cada reação de amplificação foi adicionado 0,50 µl de DNA por amostra.

4.2.2 *Extração de DNA de amostras de sêmen*

Para confirmação dos resultados obtidos com as novilhas, um total de 33 touros, pais de algumas novilhas avaliadas neste estudo tiveram seus genótipos caracterizados, quanto aos mesmos genes. Não foi possível avaliar todos os pais, por não haver mais disponibilidade de material para extração de DNA, obtido de amostras de sêmen nas fazendas de origem.

O DNA foi extraído a partir de uma palheta de sêmen por animal, segundo método descrito por Regitano (2001). Cada palheta de sêmen foi centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos em microtubos do tipo “ependorf” de 1,5 ml de capacidade. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi ressuscitado em 1 ml de PBS (2,7 mM KCl, 1,5 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 8 mM Na₂HPO₄, pH 7,0) e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. Esse procedimento foi realizado cinco vezes, para a obtenção de um sedimento livre de diluentes e crioprotetores. O sedimento foi ressuscitado em 100 µl de PBS e 400 µl de solução de lise (2% de β-2-mercaptoetanol, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA pH 8,0 e 0,5% SDS) e incubado a 50°C por 30 minutos. Adicionou-se Proteinase K a uma concentração final de 100 µg/ml e incubou-se por mais 16 horas a 50°C.

As proteínas foram precipitadas pela adição de NaCl a uma concentração final de 1,0 M, sendo o conteúdo agitado vigorosamente e centrifugado a 14.000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi recuperado e o DNA precipitado pela adição de 2,5 volumes de etanol absoluto, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos à 14.000 rpm, sendo posteriormente lavado com etanol 70%. Finalmente, o sobrenadante foi descartado e o sedimento restante, desidratado em capela de fluxo laminar e ressuscitado em 100 µl de água ultrapura.

O DNA foi diluído em temperatura de 37°C por 1 hora, sendo finalmente acondicionado em freezer à -80°C até o momento da sua utilização.

4.2.3 Reação de amplificação em PCR

As reações de amplificação foram conduzidas com o máximo de cuidado para não contaminar as soluções estoque ou o meio de reação, utilizando-se pipetadores exclusivos para o preparo do meio de reação em aparelho termociclador modelo MJ Researcher[®], PTC-100 (Programmable Thermal Controller). Todos os reagentes utilizados foram de qualidade própria para Biologia Molecular. As soluções aquosas foram preparadas com água ultra-pura, obtida em equipamento modelo Easy pure[®] UV/UF da Barnstead. Os reagentes para PCR e oligonucleotídeos foram obtidos da Life Technologies[®] e as enzimas de restrição da Life Technologies[®] e New England Biolabs[®] Inc.

Cada reação foi constituída de aproximadamente 200 ng de DNA, em um volume final de reação de 25 µl, contendo 10x PCR Buffer (20 mM Tris-HCl – pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ (2,0 mM para o FSHR; 3,5 mM para os demais genes), 0,5 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados), 0,4 µM de cada um dos *primers* (Tabela 3) e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase. Em todas as reações foi incluído um controle negativo de amplificação contendo todos os reagentes e substituindo o DNA por água, com o intuito de monitorar possíveis contaminações por DNA exógeno.

Tabela 3 – Sequência de bases dos oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*) para cada gene estudado e sua referência no Genbank[®]

Genes	Sequência ¹	Referências no Genbank ^{® 2}
LHR	F: CAAACTGACAGTCCCCGCTTT R: CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC	Lussier et al. (dados não publicados)
FSHR	F: CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC R: AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGGG	Houde et al. (1994)
P450aro	F: TCTCTGAACCTGCAATGCCTTT R: GGTGCCATTTCTGCTCCA	Furbass, Kalbe e Vanselow (1997)
P450scc	F: CAGGCCAGCTCCGACGACTGT R: CCTCAATGCACCCTGAGGAG	Ahlgren et al. (1990)

¹ F (forward): sentido 5'-3'; R (reverse): sentido 3'-5';

²Genbank[®]: banco de dados online de seqüências genéticas, disponíveis publicamente: <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>

Os ciclos de temperatura foram adequados para cada gene estudado, com base na temperatura ótima de anelamento para o par de oligonucleotídeos empregados, determinados nas referências citadas na Tabela 2. Para os genes do LHR e FSHR, as reações de amplificação incluíram desnaturação inicial de 5 minutos a 95°C, seguida de 30 ciclos de amplificação, sendo cada ciclo de 1 minuto a 95°C (desnaturação), 30 segundos a 58°C (anelamento) e 2 minutos a 72°C (extensão), com uma extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para o gene da P450aro empregou-se desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 36 ciclos, adotando-se para cada ciclo as mesmas condições de tempo e temperatura para a desnaturação (45 segundos, 94°C) e extensão (45 segundos, 72°C), diminuindo-se a temperatura de anelamento a cada série de ciclos, iniciando nesta ordem: 5 ciclos a 64°C, 5 ciclos a 62°C, 5 ciclos a 60°C, 7 ciclos a 58°C e, finalmente, 14 ciclos a 56°C, sendo o tempo de 30 segundos para todos os ciclos. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C.

Finalmente, para o gene da P450scc empregou-se desnaturação inicial de 4 minutos a 94°C, seguida de 38 ciclos, adotando-se para cada ciclo as mesmas condições de tempo e temperatura para a desnaturação (45 segundos, 94°C) e extensão (45 segundos, 72°C), diminuindo-se a temperatura de anelamento a cada série de ciclos, iniciando nesta ordem: 8 ciclos a 64°C, 20 ciclos a 62°C e, finalmente, 10 ciclos a 60°C, sendo o tempo de 30 segundos para todos os ciclos. A extensão final foi de 10 minutos a 72°C.

4.2.4 Eletroforese em gel de agarose

Para conferir os produtos de amplificação do DNA realizou-se eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (5µg/ml), utilizando-se 5 µl do produto de PCR e 0,5 µl de corante Xilenocianol durante uma hora a 95 V em tampão Tris-Borato-Edta (TBE) a 1%, sendo posteriormente avaliados em Scanner Laser¹ sob excitação com comprimentos de onda de 520 nm e emissão com comprimentos de onda de 580 nm.

Os produtos das amplificações, no volume de 20 µl, foram posteriormente digeridos com enzimas de restrição (5 unidades), específicas para cada gene (veja item 4.2.5), sendo a solução misturada levemente e incubada à 37°C durante 3 horas em Shaker Orbital², modelo 420. Os fragmentos resultantes foram separados e visualizados seguindo o mesmo procedimento efetuado para verificação da amplificação, utilizando-se neste caso 10 µl da solução submetida à digestão e 1,0 µl de corante Xilenocianol durante duas horas a 65 V.

¹ Fujifilm Fla 3000G

² Forma Scientific

O padrão de tamanho de DNA dupla fita (100 bp DNA ladder³) foi utilizado para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos. Após visualização dos fragmentos digeridos, com base no tamanho da região amplificada, em pares de bases, foi possível caracterizar os animais em homozigotos ou heterozigotos.

4.2.5 Polimorfismo de tamanho de fragmentos de restrição (RFLP – “Restriction Fragment Length Polymorphism”)

4.2.5.1 Identificação dos genótipos do LHR

A estratégia escolhida por Milazzotto (2001) para a análise do exon 11 do gene do LHR foi a de SSCP, técnica que permitiu a triagem dos animais para posterior caracterização genotípica através do seqüenciamento do DNA, que possibilitou a identificação de seis regiões onde houve troca de nucleotídeos. Com base nestes resultados e de acordo com a estratégia de análise proposta para o presente estudo, a de RFLP, escolheu-se uma região de 303 pares de bases deste gene (Tabela 3) que contém uma mutação pontual resultante da substituição da base nucleotídica citosina (C), contida na seqüência parcial do DNA genômico previamente descrita para bovinos taurinos e depositada no Genbank® (LUSSIER et al.; dados não publicados – GenBank U20504) pela base timina (T) na posição 1328, reconhecida pela alteração de sítio de restrição para a enzima *HhaI*.

A escolha da enzima de restrição atendeu a dois princípios: a não dependência de metilação para a enzima atuar e que ela promovesse o reconhecimento de uma seqüência específica presente naquela depositada no GenBank® e o não reconhecimento na seqüência polimórfica, ou vice-verso, justamente possibilitando que os animais heterozigotos pudessem ser identificados.

4.2.5.2 Identificação dos genótipos do FSHR

A estratégia escolhida por Campagnari (2001) para a análise do exon 10 do gene do FSHR também foi a de SSCP, o que possibilitou a identificação de quatro regiões onde houve troca de nucleotídeos. Utilizando-se o mesmo procedimento para o gene do LHR, elegeu-se uma região de 306 pares de bases deste gene, cuja seqüência descrita pela autora encontra-se delimitada pelo par de *primers* descritos na Tabela 3, e que contém alteração de sítio de

³ Life Technologies®

restrição para a enzima *AluI*, resultante da substituição da base nucleotídica citosina (C), contida na seqüência parcial do DNA genômico previamente descrita para bovinos taurinos e depositada no Genbank® (HOUDE et al., 1994 – GenBank L22319) pela base guanina (G) na posição 1973.

4.2.5.3 Identificação dos genótipos da P450aro

Para a análise do exon 1 do gene da P450aro, na região escolhida de 278 pares de base, delimitada pelo par de *primers* descritos na Tabela 3, Andréa (2002) escolheu, após a amplificação, o sequenciamento direto, que possibilitou a identificação de trocas de nucleotídeos. Deste modo elegeu-se uma mutação pontual, localizada na posição 586, caracterizada pela substituição da base nucleotídica timina (T), contida na seqüência parcial do DNA genômico previamente descrita para bovinos taurinos e depositada no Genbank® (FURBASS; KALBE; VANSELOW, 1997 – GenBank Z69241) pela base citosina (C), sendo reconhecida pelas enzimas *AluI* e *Fn4HI*.

4.2.5.4 Identificação dos genótipos da P450scc

A estratégia utilizada para a análise do exon 1 do gene da P450scc, na região composta por 502 pares de base, delimitada pelo par de *primers* descritos na Tabela 3, foi a de SSCP (ANDRÉA, 2002) que possibilitou a identificação de trocas de nucleotídeos. Deste modo elegeu-se uma mutação pontual, localizada na posição 610, caracterizada pela substituição da base nucleotídica timina (T), contida na seqüência parcial do DNA genômico previamente descrita para bovinos taurinos e depositada no Genbank® (AHLGREN et al., 1990 – GenBank J05245) pela base guanina (G), sendo esta alteração reconhecida pela enzima de restrição *BglII*.

Torna-se importante ressaltar que a metodologia RFLP aqui investigada não forneceu os resultados esperados para os genes das enzimas esteroideogênicas P450aro e P450scc. Embora a amplificação dos fragmentos escolhidos por PCR, para ambos os genes, tenha sido possível (APÊNDICE A; Figura 1), as trocas de nucleotídeos identificadas nestas duas regiões não foram reconhecidas pelas enzimas de restrição posteriormente escolhidas para as respectivas seqüências.

Deste modo, os resultados de RFLP envolvendo as regiões previamente estabelecidas por Andréa (2002) com base nas seqüências que apresentaram variação de conformação na técnica de SSCP (para o gene da P450aro) e por sequenciamento direto (para o gene da P450scc) em novilhas da raça Nelore, demonstraram ausência de polimorfismos nos sítios de

restrição propostos, o que impossibilitou a identificação dos genótipos para os animais aqui estudados e conseqüentemente, a caracterização da heterozigose. Por esta razão, os genes da P450aro e P450scc foram excluídos de todas as análises posteriormente efetuadas no presente estudo.

4.2.6 Caracterização da estrutura genética da população

4.2.6.1 Determinação das freqüências genotípicas e alélicas

As freqüências alélicas e genotípicas dos resultados obtidos por PCR-RFLP foram estimadas para cada loco (LHR e FSHR) e composição racial estudada, por contagem simples dos alelos e dos diferentes genótipos, respectivamente, conforme descrito por Falconer e Mackay (2001). Entende-se aqui por freqüência alélica a proporção dos diferentes alelos de um gene na população, enquanto que freqüência genotípica, a proporção dos genótipos.

Para cálculo das freqüências genotípicas [f(ii)], empregou-se a seguinte equação:

$$f(ii) = \frac{n_{ii}}{n}$$

A partir destes resultados, foi possível a obtenção das freqüências alélicas [f(i)], empregando-se:

$$f(i) = \frac{2n_{ii} + \sum n_{ij}}{2n}$$

em que:

- n_{ii} = número de indivíduos homozigotos observados para o alelo i ;
- n_{ij} = número de indivíduos heterozigotos;
- n = número total de indivíduos analisados.

De acordo com Eler (2001), assumindo-se que a população esteja em equilíbrio de Hardy-Weinberg, as frequências genóticas esperadas (FE), para ambos os genes estudados, é dada por:

$$FE = p^2 + 2pq + q^2$$

em que:

- p^2 = frequência do genótipo ii ;
- $2pq$ = frequência do genótipo ij ;
- q^2 = frequência do genótipo jj .

A probabilidade de presença ou desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg associada às frequências genóticas observadas foi comprovada pelo teste exato de probabilidade, o χ^2 (Qui-quadrado), para cada loco e composição racial estudada, dada a ocorrência de alelos com frequências muito baixas ou iguais a zero, considerando como hipótese H_0 os acasalamentos ocorrendo ao acaso, visualizado como a união ao acaso de gametas. Os testes exatos foram desenvolvidos com a ajuda do programa estatístico GENEPOP versão web (RAYMOND; ROUSSET, 1995), para computar as estimativas da probabilidade exata (valores de P) (GUO; THOMPSON, 1992).

4.2.6.2 Estimativas de variabilidade genética populacional e diversidade gênica

Foram calculadas as medidas de heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), como medidas de variabilidade genética populacional (WEIR, 1996), para cada loco e composição racial estudada.

A H_o reflete a quantidade de heterozigotos observados, sendo calculada por contagem direta da frequência de heterozigose:

$$H_{o1} = \sum_{i \neq j} \frac{N_{1ij}}{N}$$

em que:

N_{1ij} é o número de indivíduos heterozigotos no loco 1;

N é o número total de indivíduos analisados.

A H_e é obtida a partir das frequências alélicas observadas:

$$H_{e1} = 1 - (p_{1i}^2 + q_{1j}^2)$$

em que:

p_{1i} é a frequência do alelo i no loco 1;

q_{1j} é a frequência do alelo j no loco 1;

Para descrever a estrutura genética da população e quantificar o grau de diversidade gênica entre indivíduos dentro da população e entre populações (composições raciais) para cada loco estudado, empregou-se as estimativas geradas pela estatística de Nei (NEI, 1973), baseadas nas diferenças encontradas nas frequências alélicas: H_T (diversidade gênica total), obtida a partir da média das frequências alélicas observadas na população, H_S (diversidade gênica dentro de população ou intrapopulacional), calculada da mesma forma que a H_e e G_{ST} (coeficiente de diferenciação gênica entre populações ou interpopulacional), calculado por $1 - \frac{H_S}{H_T}$.

As estimativas de heterozigosidade e diversidade gênica possibilitaram, por sua vez, a análise da estatística F de Wright, indicada para populações subdivididas, em seus coeficientes ou índices de fixação F_{IT} (endogamia total ou desvio de panmixia da população total), F_{IS} (endogamia intrapopulacional ou desvio de panmixia dentro de subpopulação) e F_{ST} (endogamia interpopulacional ou devido à subdivisão), calculado da mesma forma que o G_{ST} (informação verbal)*.

Os programas estatísticos GENEPOP versão web (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e TFPGA - *Tools for Population Genetic Analysis* (MILLER, 1997) foram utilizados para auxiliar na estimação dos parâmetros citados.

4.2.7 *Efeito dos marcadores RFLP sobre a precocidade sexual*

Para mostrar as implicações dos resultados moleculares sobre a característica de interesse precocidade sexual, empregou-se os dados zootécnicos referentes ao diagnóstico de gestação por palpação retal por ocasião da primeira estação de monta em que as novilhas

* Informação fornecida por Maria Imaculada Zucchi (ESALQ/USP) no 50º Congresso Brasileiro de Genética, em 2004.

foram submetidas. Estas informações forneceram o resultado de prenhez ou probabilidade de prenhez (PP), que foi avaliada como uma característica binária, com valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião.

Utilizou-se o programa estatístico computacional *Statistical Analysis Systems* (SAS, 2000), empregando-se a metodologia de Modelos Lineares Generalizados (DEMÉTRIO, 2002), pelo procedimento PROC GENMOD do SAS, admitindo-se distribuição Binomial com função de ligação logística. O teste da razão de verossimilhanças foi empregado para avaliar o efeito dos marcadores moleculares (LHR e FSHR) sobre a ocorrência de PP, considerando significativo os valores de $P < 0,05$.

Deve-se ressaltar que nesta análise estatística foi necessária a exclusão de 41 animais, para que todas as subclasses testadas (combinação dos níveis de cada fator do modelo) apresentassem a informação 0 e 1 para PP. Portanto o número total de animais avaliados foi reduzido para 329.

O peso corporal, por ser um dos fatores determinantes à manifestação da puberdade, foi incluído nesta análise. Utilizou-se o peso ajustado aos 390 dias (PES390), calculado a partir do peso obtido de cada animal entre 360 e 420 dias de idade. Este efeito foi incluído no modelo como covariável, em seus efeitos linear e quadrático, mantido na análise por ter sido significativo. A associação entre os genótipos encontrados para o gene do LHR e do FSHR e a PP foi estimada a partir do seguinte modelo estatístico:

$$Y_{(i)jklm} = g(x) = \mu + F_i + R_{(i)j} + GL_k + GF_l + b_1(P_{(i)jklm} - \bar{P}) + b_2(P_{(i)jklm} - \bar{P})^2 + e_{(i)jklm}$$

em que:

$Y_{(i)jklm}$ representa a característica (PP) do (i)jklm^{ésimo} animal; $g(x)$, a função de ligação (logística); μ representa a média populacional da característica; F_i , $R_{(i)j}$, GL_k , GF_l , efeitos fixos associados ao i^{ésima} fazenda, j^{ésima} composição racial aninhada dentro de fazenda, k^{ésimo} genótipo LHR, l^{ésimo} genótipo FSHR; b_1 e b_2 , coeficientes linear e quadrático do peso ajustado aos 390 dias de idade, incluído no modelo como covariável; $P_{(i)jklm}$ é o peso ajustado aos 390 dias de idade do (i)jklm^{ésimo} animal; \bar{P} é a média dos pesos ajustados aos 390 dias de idade; $e_{(i)jklm}$ = efeito do erro aleatório associado à (i)jklm^{ésima} observação.

Para testar a associação entre haplótipos (cada combinação genotípica única considerando os dois locos analisados) e a PP adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = g(x) = \mu + F_i + H_j + b_1(P_{ijk} - \bar{P}) + b_2(P_{ijk} - \bar{P})^2 + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} representa a característica (PP) do $ijk^{\text{ésimo}}$ animal; $g(x)$, a função de ligação (logística); μ representa a média populacional da característica; F_i , H_j , efeitos fixos associados ao $i^{\text{ésima}}$ fazenda, $j^{\text{ésimo}}$ haplótipo; b_1 e b_2 , coeficientes linear e quadrático do peso ajustado aos 390 dias de idade, incluído no modelo como covariável; P_{ijk} é o peso ajustado aos 390 dias de idade do $ijk^{\text{ésimo}}$ animal; \bar{P} é a média dos pesos ajustados aos 390 dias de idade; e_{ijk} = efeito do erro aleatório associado à $ijk^{\text{ésima}}$ observação.

4.2.8 Estimativas de componentes de (co)variância e parâmetros genéticos

4.2.8.1 Descrição e estruturação do banco de dados

As informações de genótipos, identificados pela análise PCR-RFLP para os marcadores LHR e FSHR foram incorporados em análise genética para estimação dos componentes de (co)variância e parâmetros genéticos da variável PP, avaliada como uma característica binária, com o valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes por palpação retal e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião.

No banco de dados, constituído pela população inicial de 370 novilhas genotipadas, foi incorporado todas as suas meio-irmãs, por parte de touro, desde que apresentassem as mesmas composições raciais, mesma safra, independente de fazenda de origem. O objetivo desta estratégia foi gerar posteriormente, por simulação, os genótipos destas fêmeas, aumentando o número de animais dotados de informações.

Após a incorporação das meio-irmãs, o banco de dados ficou constituído por 6.972 animais nascidos em 2001, sendo submetido a várias restrições e eliminações pertinentes à PP para que todos os efeitos incluídos no modelo apresentassem o número mínimo de observações, eliminando-se grupos de contemporâneo sem nenhuma variação. Após este filtro o banco ficou constituído de 4.374 informações válidas. Deste número total, 1.776 (40,6%) e 2.598 fêmeas (59,4%) foram 1 e 0, respectivamente para a PP. A matriz de parentesco foi construída pelo pedigree dos animais na população base, num total de 33.869 animais.

4.2.8.2 Simulação dos genótipos na população de meio-irmãs

A probabilidade de geração aleatória dos genótipos a serem distribuídos na população de meio-irmãs respeitou as frequências genotípicas obtidas para ambos os genes, obedecendo aos valores obtidos para cada composição racial investigada. Esta estratégia foi adotada após a verificação do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) em cada composição racial, as quais se mostraram em equilíbrio, com exceção das composições $\frac{1}{2}$ Zebu x $\frac{1}{2}$ Europeu (8008 e 8080). De acordo com Falconer e Mackay (2001) uma população em equilíbrio de HW apresenta frequências genotípicas e alélicas constantes. Como as frequências genotípicas dos filhos são determinadas pelas frequências alélicas de seus pais, a frequência genotípica na geração dos filhos será a mesma da geração parental.

Respeitando-se esta condição, os genótipos das meio-irmãs foram simulados, utilizando-se um programa de simulação na linguagem computacional FORTRAN 90. O método empregado foi o de Simulação Monte Carlo (SMC), pelo qual se constrói uma cadeia de Markov (GAMERMAN, 1997). Esta se constitui em uma regra para gerar sucessivas configurações, sendo que uma nova configuração do sistema é obtida a partir unicamente da configuração presente, o que a torna muito apropriada para sistemas finitos e discretos, como uma população de bovinos (PROVIDELO, 2005). O gerador de números aleatórios é a base de uma SMC, gerando uma distribuição uniforme e sua qualidade foi testada previamente e posteriormente, mediante o quanto é aleatória a seqüência gerada (PROVIDELO, 2005).

Para as composições raciais $\frac{1}{2}$ Zebu x $\frac{1}{2}$ Europeu (8008 e 8080) que não se apresentaram em equilíbrio de HW, empregaram-se os dados de frequências genotípicas encontrados por Milazzotto (2001) e Campagnari (2002), respectivamente para os genes do LHR e FSHR na população de fêmeas Nelore, provenientes do mesmo rebanho de origem da geração materna parental das novilhas 8008 e 8080 investigadas neste estudo.

4.2.8.3 Descrição dos modelos matemáticos e estatísticos

Estruturado o banco de dados, foram definidos os efeitos bem como as covariáveis a serem incluídas em cada modelo de análise para obtenção das estimativas.

A variável PP foi submetida à análise genética mediante duas abordagens diferentes: a primeira que considerou a PP como uma variável dependente contínua e a segunda, como uma variável dependente categórica. Dois modelos mistos distintos foram empregados para que a PP pudesse ser avaliada como descrito.

4.2.8.4 Modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)

No LMA a PP foi avaliada como uma variável dependente contínua em análise uni e bi-característica. Em análise uni-característica diferentes modelos foram testados, diferindo, basicamente pela inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR, ora como efeitos fixos ora como aleatórios. Efeitos de grupo contemporâneo à prenhez (GCPP; n=10), constituído por fazenda, ano de nascimento e grupo de manejo antes e após a desmama, além da classe de idade da mãe ao parto (CIMP) foram mantidos em todos os modelos como efeitos fixos. A estrutura do banco de dados e a descrição dos efeitos incluídos no modelo para análise da PP encontram-se na Tabela 4.

Tabela 4. Número de observações (N) para a probabilidade de prenhez (PP), efeitos dos marcadores moleculares (LHR e FSHR), classe de idade de mãe ao parto (CIMP) e grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP)

Características	Descrição	N¹
PP	0 = Vazia	2.598
	1 = Prenhe	1.776
LHR	1 = Genótipo TT	161
	2 = Genótipo CT	2.409
	3 = Genótipo CC	1.804
FSHR	1 = Genótipo GG	874
	2 = Genótipo CG	2.724
	3 = Genótipo CC	776
CIMP	1 = > 0 e < 28 meses	921
	2 = > 27 e < 42 meses	1011
	3 = > 41 e < 60 meses	650
	4 = > 59 e < 120 meses	1.529
	5 = > 119 e < 144 meses	163
	6 = > 143 e < 168 meses	44
	7 = > 167	48
	8 = 0	8
GCPP	1	404
	2	403
	3	552
	4	122
	5	441
	6	143
	7	458
	8	1.234
	9	130
	10	487

¹ Total de observações no banco de dados = 6.972; total de dados válidos = 4.374

O PES390 foi incluído no modelo como covariável (efeito linear e quadrático), por sua influência na manifestação da prenhez. Em virtude das diferentes composições raciais presentes na população composta em estudo, todas as combinações possíveis entre o percentual de contribuição das raças de origem N (Zebu), A (Adaptado às condições tropicais), B (Britânico) e C (Continental), além da heterose materna foram incluídas no modelo como covariáveis.

Foram realizadas também análises uni-característica para peso ajustado aos 205 dias de idade (PES205), calculado a partir do peso obtido por ocasião da desmama e para PES390, a fim de se conhecer os componentes de variância e a herdabilidades para estas duas características. Para PES205 incluiu-se os efeitos fixos de grupo de contemporâneo a desmama (GCDES; n=256), constituído por fazenda, ano de nascimento, estação e grupo de manejo a desmama, além da CIMP e para o PES390, efeitos fixos de grupo de contemporâneo aos 12 meses (GC12; n=23), constituído por fazenda, ano de nascimento, estação de nascimento e grupo de manejo antes e após a desmama, além da CIMP. A Tabela 5 reúne o número de informações, médias, desvio-padrão, além de coeficiente de variação, mínimo e máximo das características PES205 e PES390.

Tabela 5. Número de observações (N), médias, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores mínimo (MIN) e máximo (MAX) para peso ajustado aos 205 dias (PES205) e peso ajustado aos 390 dias (PES390)

Características	N	Médias	DP	CV	MIN	MAX
PES390 (kg)	3.667	254,57	39,20	15,43	113,30	372,20
PES205 (kg)	6.566	185,50	29,06	15,66	69,60	314,00

Posteriormente, empregando-se as estimativas de componentes de variâncias obtidos nas análises uni-características, análise bi-característica foi utilizada para analisar simultaneamente a PP com PES205 e com PES390, incluindo-se ou não os efeitos dos genótipos dos marcadores LHR e FSHR, como efeitos fixos, permitindo a estimação das co(variâncias) e correlações genéticas entre estas características.

4.2.8.4.1 Modelos matemáticos uni-característica

Em notação matricial, o modelo de análise uni-característica pode ser descrito como:

$$Y = Xb + Za + Wnr + e$$

em que:

Y = é um vetor de observações;

b = é um vetor de efeitos fixos;

a = é um vetor de efeitos aleatórios de animal;

nr = é um vetor de efeitos aleatórios dos marcadores, não relacionado com os efeitos de a ;

e = é um vetor de efeitos aleatórios residuais;

X , Z e W são matrizes de incidência relativa aos registros, para os efeitos fixos, de animal e de efeitos não correlacionados, respectivamente.

Note que o vetor a somente inclui o efeito aleatório de animal, conseqüentemente, os efeitos genéticos não-aditivos são incluídos no termo nr . É assumido que os efeitos dos marcadores e o efeito residual são independentemente distribuídos, com média zero e variância σ_{nr}^2 e σ_e^2 , respectivamente, e não correlacionados com o efeito de animal a . Além disso,

$$\text{var}(nr) = I\sigma_{nr}^2$$

$$\text{var}(e) = I\sigma_e^2 = R$$

$$\text{var}(a) = A\sigma_a^2$$

$$\text{var}(y) = ZAZ'\sigma_a^2 + WI\sigma_{nr}^2W' + R$$

As equações de modelos mistos (EMM) para o melhor estimador linear não viesado (BLUE) das funções estimáveis de b e o melhor preditor linear não viesado (BLUP) de a e nr são dados pela solução do sistema abaixo:

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z & X'W \\ Z'X & Z'Z + A^{-1}\alpha_1 & Z'W \\ W'X & W'Z & W'W + I\alpha_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b \\ a \\ nr \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \\ W'y \end{bmatrix}$$

em que,

$$\alpha_1 = \sigma_e^2 / \sigma_a^2$$

$$\alpha_2 = \sigma_e^2 / \sigma_{nr}^2$$

4.2.8.4.2 Modelos matemáticos bi-características

Modelos bi-características, contemplando mais de uma característica em conjunto, são aqui empregados devidos a sua utilidade. Este tipo de análise apresenta vantagens como considerar as correlações entre as características, diminuindo os erros das predições, e mais ainda, considera o efeito de seleção eventualmente praticada sobre uma das características.

No desenvolvimento das análises bi-característica, foram usados os mesmos modelos da análise univariada pertinente à cada uma das variáveis estudadas. Visando diminuir ao máximo o número de iterações quando da avaliação da função de verossimilhança, as análises bi-características foram executadas tendo como “valores iniciais”, os componentes de variância (σ_i^2 e σ_j^2), resultantes das análises uni-características. Os valores iniciais do componente de covariância (σ_{ij}) foram estimados, fixando-se os componentes de variância de cada uma das variáveis (σ_i^2 e σ_j^2), obtidas das análises uni-características, após o que, procedia-se uma análise para obtenção desta estimativa (σ_{ij}), dado que os dois componentes de variância (σ_i^2 e σ_j^2) estavam fixos. As análises finais foram conduzidas, sem se fixar qualquer componente do modelo proposto (σ_i^2 , σ_{ij} e σ_j^2). O critério de convergência adotado foi o de que a variância do simplex atingisse 10^{-9} .

Em notação matricial, o modelo para análise bi-característica para a PP, considerando o efeito dos marcadores RFLP e para PES205, é usualmente descrito da seguinte maneira:

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} W_1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} nr_1 \\ 0 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix}$$

em que:

Y_i = é um vetor de observações para a i ^{ésima} característica;

b_i = é um vetor de efeitos fixos para a i ^{ésima} característica;

a_i = é um vetor de efeitos aleatórios de animal para a i ^{ésima} característica;

nr_1 = é um vetor de efeitos dos marcadores para a característica 1;

e_i = é um vetor de efeitos aleatórios residuais para a i ^{ésima} característica;

X_i , Z_i e W_i são matrizes de incidência relativa aos registros de produção da i ^{ésima} característica, para os efeitos fixos, de animal e de marcadores, respectivamente.

É assumido que:

$$\text{var} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \\ pe_1 \\ pe_2 \\ e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} g_{11}A & g_{12}A & 0 & 0 & 0 & 0 \\ g_{21}A & g_{22}A & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & q_{11} & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & r_{11} & r_{12} \\ 0 & 0 & 0 & 0 & r_{21} & r_{22} \end{bmatrix}$$

Na equação acima,

g_{ij} são elementos de G , os quais representam a covariância genética aditiva entre as variáveis i e j ;

q_{ij} são elementos de Q , matriz de variância para efeitos dos marcadores;

r_{ij} são elementos de R , a matriz de variâncias e covariâncias para efeitos residuais.

A obtenção do BLUP de a e nr e o BLUE das funções estimáveis de b é dado pela solução do sistema da EMM abaixo:

$$\begin{bmatrix} X'R^{-1}X & X'R^{-1}Z & X'R^{-1}W \\ Z'R^{-1}X & Z'R^{-1}Z + k & Z'R^{-1}W \\ W'R^{-1}X & W'R^{-1}Z & W'R^{-1}W + I \otimes Q^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} b \\ a \\ nr \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'R^{-1}y \\ Z'R^{-1}y \\ W'R^{-1}y \end{bmatrix}$$

em que:

$$y = \begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix}; b = \begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix}; a = \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix}; nr = \begin{bmatrix} nr_1 \\ 0 \end{bmatrix};$$

$$X = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix}; Z = \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix}; W = \begin{bmatrix} W_1 & 0 \\ 0 & 0 \end{bmatrix}$$

$$k = G^* \otimes A^{-1}, \text{ com } G = \begin{bmatrix} g_{11} & g_{12} \\ g_{21} & g_{22} \end{bmatrix}; \therefore G^* = G^{-1} = \begin{bmatrix} g^{11} & g^{12} \\ g^{21} & g^{22} \end{bmatrix}$$

Nas expressões ou equações acima, \otimes denota o produto direto entre as matrizes concernentes.

Para estimação dos componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a variável PP, o modelo não linear emprega o metodologia de máxima verossimilhança restrita (REML), utilizando-se o programa MTDFREML – *Multiple Trait Derivative Free Restricted Maximum Likelihood* (BOLDMAN et al., 1995), sob modelo animal.

4.2.8.5 Modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)

No NLMT a PP foi analisada como uma variável dependente categórica, admitindo-se distribuição binomial com função logística e com efeito residual binomialmente distribuído (1 = novilhas prenhes *versus* 0 = novilhas não prenhes).

Diferentes modelos matemáticos foram testados, os quais se diferenciaram pela inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR e do PES390. Efeitos de GCPP e CIMP foram mantidos em todos os modelos como efeitos fixos e como covariáveis, além do PES390 (efeito linear e quadrático), foram contempladas todas as combinações possíveis entre o percentual de contribuição das raças de origem N, A, B e C e a heterose materna.

As soluções das equações dos diferentes modelos foram obtidas pelo método REML, sob modelo touro, por meio dos procedimentos PROC MIXED do programa SAS (SAS, 2000). Estas análises foram realizadas com auxílio da macro GLIMMIX junto ao programa supracitado. As estimativas dos componentes de (co)variância e de herdabilidade para a PP, foram obtidas por metodologia de análise de componentes de variância bayesiana não-conjugada (NBVC = *nonconjugate bayesian analysis of variance components*).

A NBVC, descrita detalhadamente por Wolfinger e Kass (2000), emprega a metodologia de SMC com *priors* Jeffrey e algoritmo de cadeia independente, para gerar uma amostragem aleatória dos componentes de variância, repetido 10.000 vezes, a partir do conjunto de dados observados. Estas estimativas são então usadas para estimar a função de densidade, que se aproxima dos dados observados para aferir a densidade da distribuição *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a PP, determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística. Por sua vez, para as características PES205 e PES390, a herdabilidade é estimada empregando-se o modelo de distribuição normal, com função de ligação identidade.

Este novo conjunto de dados é utilizado para construir os gráficos da distribuição *a posteriori* da herdabilidade em função da densidade. Para o cálculo da herdabilidade da PP, o valor de variância residual foi corrigido por $\pi^2/3$ como proposto por Southey, Rodrigues-Zaz e Leymaster (2003).

CAPÍTULO I: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA DE BOVINOS COMPOSTOS EUROPEU-ZEBU UTILIZANDO MARCADORES RFLP

RESUMO

Uma população de 370 novilhas de corte compostas Europeu-Zebu, distribuídas em seis diferentes composições raciais foi caracterizada geneticamente, utilizando-se os marcadores RFLP nos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e do folículo estimulante (FSHR). Os objetivos foram caracterizar geneticamente esta população e conhecer a estrutura e variabilidade genética deste rebanho híbrido. Os genótipos foram determinados por meio de PCR seguido por digestão com endonucleases de restrição. A análise PCR-RFLP possibilitou a identificação dos genótipos para o LHR e FSHR, bem como a caracterização da frequência de heterozigose, que se mostrou elevada em todas as composições raciais para ambos os locos, exceto em duas composições para o LHR. A heterozigosidade observada (H_o) foi menor que a esperada (H_e) nas composições 4840 (para o LHR) e 4444 e 4840_2 (para o FSHR), entretanto na população como um todo, a H_o apresentou-se superior à H_e (em média, 57% contra 46%, respectivamente), refletindo a elevada variabilidade genética nesta população e também o valor informativo dos marcadores RFLP investigados, que podem ser indicados em estudos de caracterização genética populacional. A análise do grau de estruturação genética da população, estimados pela estatística de Nei, para ambos os locos, mostrou uma elevada diversidade gênica total ($H_T = 47\%$), sendo que a maior proporção desta variabilidade foi atribuída à diversidade dentro de população ($H_S = 46\%$), com baixo grau de diferenciação genética entre as seis composições raciais estudadas ($G_{ST} = 1,2\%$). As estimativas geradas pela estatística F de Wright indicaram a presença de uma população não endogâmica, com excessiva quantidade de heterozigotos ($F_{IT} = -0,22$), condição também observada em nível intrapopulacional ($F_{IS} = -0,23$). Os resultados encontrados fornecem evidências de que a seleção genética aplicada à população composta Europeu-Zebu não afetou a elevada variabilidade genética esperada para este tipo de cruzamento, o que viabiliza a exploração destes animais, visando à obtenção de características produtivas e reprodutivas de interesse econômico.

Palavras-chave: bovinos compostos de corte, RFLP, DNA, caracterização genética

ABSTRACT

A population of 370 European-Zebu composite beef heifers formed from six different breed compositions was genetically characterized for RFLPs in the luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle-stimulating receptor (FSHR) genes. The objectives were to genetically characterize this population to know the structure and genetic variability of this hybrid herd. The genotypes were determined using PCR followed by digestion with restriction endonucleases. It was possible to identify the genotypes for LHR and FSHR and to characterize the heterozygosity frequency by PCR-RFLP analysis. Higher frequency of heterozygous animal was observed in all breed compositions for both loci, except for two compositions regarding LHR. The observed heterozygosity (H_o) was lower than the expected heterozygosity (H_e) in compositions 4840 (for LHR) and 4444 and 4840_2 (for FSHR). However, the average value for H_o was higher than H_e in all population (57% *versus* 46%, respectively) showing the high genetic variability in this population and the informative value of the investigated RFLP markers that can be used for population genetic characterization studies. Nei's statistics performed to evaluate the genetic structure of the population for the two loci showed high genic diversity in the total population ($H_T = 47\%$) and most of this variability was attributed to genic diversity within populations ($H_S = 46\%$) followed by low degree of genetic differentiation between the six studied breed compositions ($G_{ST} = 1.2\%$). Wright's F-statistical estimates indicated the presence of a population without inbreeding and with excessive amount of heterozygous animals ($F_{IT} = -0.22$) and this condition was also observed within populations ($F_{IS} = -0.23$). The results found provide evidence that the genetic selection applied to the European-Zebu composite population has not affected the high genetic variability expected for this kind of crossbreeding and may maximize the exploration of these animals to obtain productive and reproductive traits of economical interests.

Key words: composite beef cattle, RFLP, DNA genetic characterization

1. INTRODUÇÃO

A obtenção de bovinos de corte em sistemas de cruzamento que envolve raças de diferentes aptidões encontra-se cada vez mais em expansão no Brasil. O objetivo desta abordagem é combinar melhores características otimizando os efeitos da heterose e complementaridade de raças. Seguindo esta linha de raciocínio, o cruzamento entre animais de origem zebuína (Nelore) e europeus britânicos ou europeus continentais, incluindo-se também animais adaptados às condições tropicais (como o Senepol e Caracu) origina o bovino composto que apresentará diferentes composições raciais, de acordo com o percentual de contribuição de cada raça usada em sua formação. Esta estratégia fornece material significativamente valioso para exploração da heterozigose e variabilidade genética em locos específicos ou ligados a características quantitativas (QTL) de interesse econômico, utilizando-se de diferentes técnicas de biologia molecular.

Os marcadores moleculares, como os microssatélites e os polimorfismos de comprimento de fragmento de restrição (RFLP) apresentam um elevado grau de polimorfismo e vêm sendo amplamente empregados para investigar as propriedades genéticas de populações e identificar genes importantes na determinação de características de interesse (TAMBASCO et al., 2000; ALMEIDA et al., 2000; MACHADO et al., 2003).

Vários aspectos podem ser úteis na caracterização de uma determinada raça ou população, incluindo características fenotípicas, fisiológicas e reprodutivas, origem, habitat, distribuição geográfica e parâmetros genéticos (VASCONCELLOS et al., 2003). A caracterização da estrutura genética de populações, raças e espécies fornecem informações essenciais na determinação de estratégias em programas de cruzamento, pois possibilita o estudo da variabilidade genética, informação importante a ser considerada também em programas de conservação genética, e na complementação de conceitos genéticos quantitativos, que permite assessorar e intensificar os métodos tradicionais de seleção.

Este trabalho teve como objetivos caracterizar geneticamente uma população de novilhas de corte compostas Europeu x Zebu, oriunda de diferentes composições raciais, com o intuito de conhecer a estrutura e a variabilidade genética deste rebanho híbrido, utilizando-se de dois marcadores moleculares RFLP nos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e do hormônio folículo estimulante (FSHR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Amostras de sangue para extração de DNA foram obtidas de 370 novilhas de corte compostas, provenientes de duas regiões brasileiras e distribuídas em seis composições raciais (Tabela 1), de acordo com o percentual de contribuição de raças de origem Zebu (N), Adaptados às condições tropicais (A), Europeu Britânico (B) ou Europeu Continental (C), constituindo o sistema de caracterização de tipos biológicos NABC.

2.2 Marcadores

Com base nos resultados de polimorfismos obtidos por SSCP (Polimorfismo conformacional de fita simples) nos genes do LHR (MILAZZOTTO, 2001) e do FSHR (CAMPAGNARI, 2002), elegeram-se, respectivamente, dois fragmentos de interesse (Tabela 2) que foram submetidos à análise PCR-RFLP. Os genótipos foram posteriormente identificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% pela ausência ou presença do sítio de restrição, reconhecido pelas endonucleases de restrição específicas *HhaI* e *AluI*, respectivamente, para os genes do LHR e do FSHR.

Tabela 1 – Número de novilhas (n) e origem de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC

Composição racial	n	Origem
4444	22	25% Zebu x 25% Adaptado x 25% Britânico x 25% Continental
4804	38	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental
4840	101	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico
4840_2	98	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico (2a geração)
8008	58	50% Zebu x 50% Continental
8080	53	50% Zebu x 50% Britânico

2.3 Genotipagem

O DNA genômico foi extraído empregando-se o método de extração e precipitação em NaCl, descrito por Olerup e Zetterquist (1992). As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador modelo MJ Researcher[®], PTC-100 (Programmable Thermal

Controller), seguindo-se as condições tempo e temperatura de cada ciclo, propostas por Milazzotto (2001) para o LHR e por Campagnari (2002), para o FSHR.

Cada reação de PCR foi constituída de aproximadamente 200 ng de DNA, em um volume final de reação de 25 µl, contendo 10x PCR Buffer (20 mM Tris-HCl – pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ (3,5 mM para o LHR; 2,0 mM para o FSHR), 0,5 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados), 0,4 µM de cada um dos *primers* e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Tabela 2 – Descrição dos marcadores RFLP analisados

Gene	Natureza	Crom.1	Exon	Seqüência ²	Ref. ³
LHR	RFLP4	11	11	F: CAAACTGACAGTCCCCCGCTTT	1
	<i>HhaI</i>			R: CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC	
FSHR	RFLP	11	10	F: CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC	2
	<i>AluI</i>			R: AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGGG	

¹Cromossomo; ²F (forward) - sentido 5'-3', R (reverse) - sentido 3'-5'; ³Referências: 1. Lussier et al. (dados não publicados), 2. Houde et al. (1994); ⁴RFLP: Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição.

Os produtos das ampliações foram posteriormente digeridos com as enzimas de restrição correspondentes à cada marcador, sendo a solução e incubada à 37°C durante 3 horas. Os fragmentos resultantes foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (5ug/ml), em tampão Tris-Borato-Edta (TBE) a 1%, a 65 V, sendo posteriormente avaliados em Scanner Laser⁴ sob excitação com comprimentos de onda de 520 nm e emissão com comprimentos de onda de 580 nm. O padrão de tamanho de DNA dupla fita (100 bp DNA ladder⁵) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos.

2.4 Análise dos resultados

A análise dos resultados envolveu a estimação das freqüências alélicas e genotípicas, respectivamente, por contagem alélica e dos diferentes genótipos para cada loco estudado (WEIR, 1996). A probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HW) associada às freqüências genotípicas observadas foi obtida pelo teste exato de probabilidade, o χ^2 (Qui-

⁴ Fujifilm Fla 3000G

⁵ Life Technologies®

quadrado), para cada composição racial estudada, dada a ocorrência de alelos com frequências muito baixas ou iguais a zero, gerando as estimativas da probabilidade exata (valores de P) (GUO; THOMPSON, 1992). Considerando-se como hipótese H_0 a união ao acaso dos gametas (equilíbrio de HW), os valores significativos ($P < 0,05$) rejeitam H_0 e os não significativos a aceitam.

Foram calculadas medidas de variabilidade genética populacional (WEIR, 1996), para cada loco e composição racial. A heterozigosidade observada (H_o) foi calculada por contagem direta da frequência de heterozigose:

$$H_{o1} = \sum_{i \neq j} \frac{N_{1ij}}{N}$$

em que:

N_{1ij} é o número de indivíduos heterozigotos no loco 1;

N é o número total de indivíduos analisados.

Por sua vez, a heterozigosidade esperada (H_e) foi calculada a partir das frequências alélicas observadas:

$$H_{e1} = 1 - (p_{1i}^2 + q_{1j}^2)$$

em que:

p_{1i} é a frequência do alelo i no loco 1;

q_{1j} é a frequência do alelo j no loco 1;

Para descrever a estrutura genética da população e quantificar o grau de diversidade gênica empregou-se as estimativas geradas pela estatística de Nei (NEI, 1973), baseadas nas diferenças existentes entre frequências alélicas: diversidade gênica total (H_T), dentro de população ou intrapopulacional (H_S) e entre populações (G_{ST} ou coeficiente de diferenciação gênica interpopulacional), calculado por $1 - \frac{H_S}{H_T}$.

As estimativas de heterozigosidade e diversidade gênica possibilitaram, por sua vez, a análise da estatística F de Wright, indicada para populações subdivididas, em seus

coeficientes ou índices de fixação F_{IT} (endogamia total ou desvio de panmixia da população total), F_{IS} ou f (endogamia intrapopulacional ou desvio de panmixia dentro de subpopulação) e F_{ST} (endogamia interpopulacional ou devido à subdivisão) (informação verbal) *.

Os programas estatísticos GENEPOP versão web (RAYMOND; ROUSSET, 1995) e TFPGA - *Tools for Population Genetic Analysis* (MILLER, 1997) foram utilizados para auxiliar na estimação dos parâmetros citados.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 *Freqüências genotípicas e alélicas e equilíbrio de Hardy-Weinberg*

A análise PCR-RFLP possibilitou a identificação de três genótipos para cada gene estudado. Para o LHR/*HhaI* foram encontrados os genótipos TT, CT e CC e para o FSHR/*AluI*, os genótipos GG, CG e CC.

As freqüências genotípicas observadas para o gene do LHR variaram de 0 a 0,091; 0,366 a 0,849 e 0,151 a 0,574, respectivamente, para os genótipos TT, CT e CC, nas seis diferentes composições raciais, registrando-se maior freqüência de heterozigose em todos os animais, excetuando-se os de composição 4804 e 4840. Valores superiores de TT (0,540) e inferiores de CC (0,030) aos aqui relatados foram encontrados por Milazzotto (2001) em uma população de animais Nelore.

Para o gene do FSHR, as freqüências genotípicas observadas variaram de 0,075 a 0,347; 0,455 a 0,792 e 0,132 a 0,273, respectivamente, para os genótipos GG, CG e CC, registrando-se maior freqüência de heterozigose em todas as composições raciais estudadas. Campagnari (2002) encontrou valores superiores aos aqui encontrado para o genótipo GG (0,490), não constatando, porém a presença do genótipo CC em uma população Nelore, o que estimula pesquisas adicionais em outras populações bovinas.

Na Tabela 3 observa-se a predominância do alelo C em relação ao T em todos os animais aqui genotipados para o LHR, situação inversa a encontrada nos animais Nelore (0,755 para o T contra 0,245 para o C), investigados por Milazzotto (2001). Esta diferença na proporção dos alelos T e C em animais Nelore e Europeu-Zebu sugerem estudos similares em outras populações bovinas. Para o FSHR os valores das freqüências alélicas se mostraram similares entre as diferentes composições raciais estudadas, enquanto que nos animais Nelore, Campagnari (2002) constatou superioridade do alelo G (0,745) em relação ao C (0,255).

* Informação fornecida por Maria Imaculada Zucchi (ESALQ/USP) no 50º Congresso Brasileiro de Genética, em 2004.

Tabela 3 – Frequências alélicas estimadas e probabilidade de equilíbrio de Hardy-Weinberg (*P*) para o loco LHR e FSHR nas diferentes composições raciais de novilhas compostas Europeu-Zebu

Loco	Alelo	4444 (n = 22)	4804 (n = 38)	4840 (n = 101)	4840_2 (n = 98)	8008 (n = 58)	8080 (n = 53)
LHR	T	0,364	0,263	0,243	0,337	0,319	0,425
	C	0,636	0,737	0,757	0,663	0,681	0,575
P		0,4644	0,6528	0,9353	0,0701	0,0004*	0,0000*
FSHR	G	0,500	0,566	0,490	0,582	0,474	0,472
	C	0,500	0,434	0,510	0,418	0,526	0,528
P		0,5922	0,1777	0,6515	0,6873	0,0097*	0,0000*

n = número de animais genotipados; * Significativo ao nível de 5%.

Considera-se uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg quando as frequências alélicas (p e q) e genotípicas (p^2 , $2pq$ e q^2) permanecem constantes de uma geração a outra, atribuído a união ao acaso dos gametas. De acordo com Tambasco et al. (2000) e Vasconcellos et al. (2003) certos eventos como acúmulo de certos genótipos, subdivisão da população, mutação, seleção, migração ou endogamia podem gerar um estado de desequilíbrio na população. Ambos os locos LHR e FSHR desviaram-se do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,05$) na população como um todo, o que pode ser explicado pela baixa frequência de homozigotos T observada para o LHR (4%), além da elevada proporção de heterozigotos para o LHR (54%) e também para o FSHR (58%). Outra razão que deve ser ressaltada refere-se à pressão de seleção que esta população de animais compostos vem sendo submetida, desde sua formação, para características de interesse, com o emprego de touros, previamente submetidos a avaliação genética e reprodutiva em programas de acasalamento direcionados por meio de inseminação artificial ou monta natural.

Por sua vez, presença de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi observada em todas as composições raciais estudadas, para ambos os locos, excetuando-se as composições 8008 e 8080 (Tabela 3), provavelmente por serem provenientes de duas populações divergentes (50% Zebu x 50% Europeu) e caracterizados por elevada proporção de heterozigotos.

3.2 Estimativas de heterozigosidade

As estimativas de H_o e H_e são comumente investigadas para estimar a extensão da variabilidade genética em uma população, o que contribui na seleção dos animais a serem empregados como genitores nas próximas gerações. Os valores médios da H_o e H_e para a população composta em estudo, considerando os dois locos estudados, foram de 57 e 46%, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4 – Estimativas de variabilidade genética populacional: heterozigosidade observada (H_o) e heterozigosidade esperada (H_e), para os locos LHR e FSHR, de acordo com as diferentes composições raciais de novilhas compostas Europeu-Zebu

Composições raciais	Locos				Médias	
	LHR		FSHR		Ho	He
	Ho	He	Ho	He		
4444	0,5455	0,4628	0,4545	0,5000	0,5000	0,4814
4804	0,4211	0,3878	0,6053	0,4913	0,5132	0,4395
4840	0,3663	0,3675	0,5248	0,4998	0,4455	0,4336
4840_2	0,5306	0,4467	0,4694	0,4867	0,5000	0,4667
8008	0,6379	0,4345	0,6724	0,4987	0,6552	0,4666
8080	0,8491	0,4886	0,7925	0,4984	0,8208	0,4935
Médias gerais	0,5584	0,4313	0,5865	0,4958	0,5724	0,4635

Investigando nove microssatélites, Machado et al. (2003) relataram valores médios de 35% e 53%, respectivamente, de H_o e H_e em duas populações de animais *Bos indicus* e *Bos taurus*. Em uma população híbrida 3/8 Nelore x 5/8 Aberdeen Angus (Brangus Ibagé) por sua vez, Almeida et al. (2000), avaliando quatro microssatélites, constataram uma H_o média de 54%, enquanto que recentemente, Duarte et al. (2005) encontraram uma elevada H_e média de 77% neste mesmo tipo de cruzamento, em três microssatélites ligados ao gene do hormônio folículo estimulante, cadeia b (FSH β).

Quando avaliados separadamente os locos forneceram mais do que 50%, em média, de H_o (56% para o LHR e 59% para o FSHR) e mais do que 40%, em média, de H_e (43% para o LHR e 50% para o FSHR), podendo ser considerados informativos para descrever uma população. Esta peculiaridade, aliado as frequências alélicas bem distribuídas faz com que um

loco seja um bom candidato para ser usado em testes de paternidade e em análises de segregação (MACHADO et al., 2003).

De acordo com Moioli, Napolitano e Catillo (2004) a H_e é um ótimo indicador de quanto um marcador é apropriado para descrever a variabilidade genética de populações de animais domésticos e sua mensuração considera não somente o número de alelos (quanto mais, melhor) como também as diferenças nas frequências alélicas entre raças. Vasconcellos et al. (2003) ressaltaram que menores valores de H_e são esperados para marcadores dialélicos em relação aos multialélicos, como os microssatélites, por exemplo. Estes autores relataram valores de 87% H_e para um marcador microssatélite contendo 12 alelos, contra 25%, para um marcador RFLP contendo dois alelos.

Sendo o valor da H_o uma medida de variabilidade que traduz a heterozigosidade observada e o valor de H_e , a heterozigosidade esperada, maior discrepância destes parâmetros para determinado loco reflete o desequilíbrio genotípico da amostra (TAMBASCO et al., 2000). As maiores diferenças entre estas estimativas foram observadas para os animais de composições 8008 e 8080, possivelmente devido à ausência do genótipo TT para o loco LHR e do excesso de heterozigotos identificados, para ambos os locos estudados.

Para o LHR todas as composições raciais avaliadas apresentaram maiores valores de H_o e H_e , com exceção dos animais de composição 4840, cujos valores se mostraram similares. Já para o loco FSHR apenas duas composições (4444 e 4840_2) apresentaram valores de H_e superiores aos de H_o . Estes resultados refletem a presença de elevada variabilidade genética nesta população de bovinos compostos, oriundos a partir da contribuição de diferentes raças, o que viabiliza a exploração destes animais para a obtenção de características de interesse econômico, visto que o conhecimento e a manutenção da variabilidade genética e da frequência de genótipos superiores é crucial à seleção de animais para novas características.

Segundo Machado et al. (2003) a menor ocorrência de H_o em relação à H_e numa determinada população pode sugerir a presença de certo grau de endogamia, o que pode ser resultado de um processo de seleção intensa. Entretanto, a comparação entre os valores médios de H_o e H_e obtidos na população total, não sugerem tal redução da variabilidade genética na população estudada.

3.3 Estimativas de diversidade gênica e índices de fixação

A Tabela 5 reúne as estimativas geradas pela estatística de Nei (NEI, 1973), baseadas nas diferenças nas frequências alélicas observadas, para quantificar o grau de diversidade

gênica ou a distribuição da variação gênica total (H_T), dentro de população (ou composição racial) (H_S) e entre populações (G_{ST}), para os marcadores RFLP LHR e FSHR.

Tabela 5 – Estimativas de diversidade gênica total (H_T), diversidade gênica dentro de população (H_S) e coeficiente de diferenciação gênica entre populações (G_{ST}) para os marcadores RFLP LHR e FSHR

Marcadores	H_T	H_S	G_{ST}
LHR	0,4387	0,4315	0,016
FSHR	0,4996	0,4956	0,008
Médias	0,4691	0,4635	0,012

O valor médio encontrado para H_T , para ambos os locos foi de 47%, atribuindo-se muito mais da diversidade gênica total à porção intrapopulacional do que a interpopulacional. O valor médio de H_S reflete expressiva diferenciação dentro de cada subpopulação ou composição racial, pelo elevado percentual observado de diversidade gênica intrapopulacional encontrado (46%). De acordo com Almeida et al. (2000) elevada diversidade intrapopulacional é esperada quando se comparam grupos raciais de mesma espécie. Estes autores encontraram apenas 7% diversidade devido à variabilidade interpopulacional ao comparar animais Brangus Ibagé com Red Angus.

Por sua vez, a comparação interpopulacional neste estudo mostrou haver a presença de frequências alélicas similares entre si, para ambos os locos investigados, o que provocou uma diminuição do grau de diferenciação gênica entre as seis composições raciais estudadas, resultando em um G_{ST} médio de 1,2%. Considerando que os genes LHR e FSHR estão relacionados, dentre outros igualmente importantes, com a manifestação da puberdade, uma característica reprodutiva, comumente referenciada por apresentar herdabilidades moderadas a elevadas (0,31 segundo LASTER et al., 1979; 0,47 relatado por SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998), justifica-se a constatação de frequências alélicas similares entre as diferentes composições raciais e, conseqüentemente, baixa variabilidade interpopulacional.

Além da estatística de Nei, utilizada para estimar o grau de estruturação genética de populações por meio de marcadores moleculares, indica-se também a estatística F de Wright, para análise dos índices de fixação ou coeficientes de endogamia total (F_{IT}), dentro de subpopulação (F_{IS}) e entre subpopulações (F_{ST} , calculado da mesma forma que o G_{ST}) obtidos pelos valores de heterozigidades e diversidades gênicas. Para o LHR, os valores de F_{IT} e F_{IS}

foram negativos, de -0,27 e -0,29, respectivamente, e para o FSHR, de -0,18 e -0,17, respectivamente, o que indica a presença de uma população não endogâmica, com excessiva quantidade de heterozigotos.

Os resultados aqui mostrados permitem afirmar que a seleção genética direcionada a esta população bovina composta não tem afetado a variabilidade genética esperada para este tipo de cruzamento entre raças de origem *Bos indicus* e *Bos taurus* de diferentes aptidões, o que condiz com o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e com as estimativas de heterozigosidade na população como um todo. Conhecendo-se a variabilidade genética e a estrutura da diferenciação gênica dentro e entre as populações torna-se mais fácil estabelecer novas estratégias de seleção em programas de melhoramento animal e definir novas fontes genéticas para as futuras gerações.

4. CONCLUSÕES

A análise PCR-RFLP possibilitou a identificação dos genótipos para os genes do LHR e FSHR, bem como a caracterização da heterozigose, que se mostrou elevada em quase todas as composições raciais Europeu-Zebu, para ambos os locos. Os marcadores RFLP LHR e FSHR foram considerados informativos sendo, portanto, indicados em estudos de caracterização genética em outras populações.

Os valores médios de heterozigosidade observada apresentaram-se superiores aos da esperada, para ambos os locos estudados, refletindo a presença de elevada variabilidade genética nestes animais, sendo que a maior proporção desta variabilidade foi atribuída à diversidade dentro de população, resultando em um baixo grau de diferenciação gênica entre populações, condições estas que permitem caracterizar a população composta investigada como não endogâmica com excessiva quantidade de heterozigotos.

Os resultados encontrados possibilitam afirmar que a população estudada não se mostrou afetada pela seleção direcionada à que é continuamente submetida, em relação à variabilidade genética, o que viabiliza a exploração destes animais em cruzamentos, visando à obtenção de características produtivas e reprodutivas de interesse econômico. O conhecimento da variabilidade genética e da frequência dos genótipos na população auxiliará o processo de seleção dos melhores animais, definindo potenciais fontes genéticas para as futuras gerações.

CAPÍTULO II: EFEITO DOS POLIMORFISMOS DOS GENES DO LHR E DO FSHR SOBRE A PRECOCIDADE SEXUAL EM NOVILHAS COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU

RESUMO

Os efeitos dos polimorfismos dos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e folículo estimulante (FSHR), avaliados por PCR-RFLP, foram investigados sobre a precocidade sexual em 370 novilhas de corte compostas Europeu-Zebu, distribuídas em seis diferentes composições raciais. A análise dos sítios polimórficos oriundos da digestão com as endonucleases de restrição *HhaI* e *AluI*, possibilitou, respectivamente, a identificação dos genótipos para o LHR (TT, CT e CC) e FSHR (GG, CG e CC). Foram estimadas as frequências genotípicas e alélicas para avaliação da estrutura genética da população estudada. A frequência de animais heterozigotos mostrou-se elevada, para ambos os genes, em relação aos homozigotos, em todas as composições raciais, exceto em duas destas para o LHR. Para avaliar os efeitos dos polimorfismos sobre a precocidade sexual empregou-se como característica indicadora a probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta (PP), sendo avaliada como uma característica binomial, com valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes por palpação retal e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião. As novilhas heterozigotas apresentaram maiores taxas de prenhez (67 e 66%, respectivamente para os genes do LHR e FSHR) em relação às homozigotas, entretanto não se constatou efeito significativo dos polimorfismos RFLP dos genes do LHR ($P = 0,9188$) e FSHR ($P = 0,8831$) sobre a PP. Os resultados obtidos não justificam a inclusão dos marcadores RFLP LHR e FSHR em programas de seleção para a precocidade sexual em novilhas de corte. Entretanto, estes marcadores poderão ser investigados em outras populações bovinas, visando conhecer a estrutura genética destas.

Palavras-Chave: LHR, FSHR, precocidade sexual, RFLP, novilhas compostas

ABSTRACT

The effects of polymorphisms for luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle-stimulating receptor genes, evaluated by PCR-RFLP, were investigated in 370 European-Zebu composite beef heifers from six different breed compositions. The polymorph sites analysis from digestion with *HhaI* and *AluI* restriction endonucleases allow the genotype identification for LHR (TT, CT and CC) and FSHR (GG, CG and CC) genes. The genotype and allele frequencies were estimated to provide the genetic structure evaluation of the population. High frequency of heterozygous animals was recorded in all breed compositions for both genes, except in two compositions for LHR. The probability of pregnancy at first breeding (PP) was used to evaluate the polymorphism effect on sexual precocity. The PP was analyzed as a binary trait, with a value of 1 (success) assigned to heifers that were diagnosed pregnant by rectal palpation and a value of 0 (failure) assigned to those that were not pregnant at that time. Heterozygous heifers showed higher pregnancy rate (67% and 66%, respectively for LHR and FSHR genes), but no significant effects were observed for the studied genes ($P = 0.9188$ and $P = 0.8831$, respectively for LHR and FSHR) on the PP. These results do not justify the inclusion of LHR and FSHR RLPF markers in selection programs for sexual precocity in beef heifers. Nevertheless, these markers may be used in additional studies to evaluate the genetic structure in other bovine populations.

Keywords: LHR, FSHR, sexual precocity, RFLP, composite heifers

1. INTRODUÇÃO

Os bovinos compostos, formados a partir da contribuição de diversas raças de origem *Bos indicus* e *Bos taurus*, de diferentes aptidões, cuja utilização encontra-se atualmente em expansão no Brasil, são uma evolução dos sistemas de cruzamento. Esta abordagem reforça uma das tendências da moderna pecuária de corte que busca a exploração de animais cruzados para capitalização dos efeitos da heterose e complementaridade de raças, incluindo os efeitos da heterozigose dos diversos *loci* envolvidos em características de interesse econômico, condicionadas, em sua maioria, por poligenes, o que dificulta a identificação dos melhores genótipos.

Entretanto as pesquisas dedicadas ao estudo dos genes em animais domésticos, viabilizada por diferentes técnicas de biologia molecular, têm possibilitado conhecer, através de diferentes marcadores moleculares, as propriedades genéticas de populações e identificar genes importantes na determinação destas características de interesse, incrementando os tradicionais métodos de seleção animal e aumentando o ganho genético nas futuras gerações (UNANIAN, 1997).

Dentre estes marcadores, destacam-se os polimorfismos de fragmentos de restrição (RFLP) que podem reconhecer seqüências específicas alteradas por mutações em genes candidatos, isto é, genes que apresentam efeito sobre a expressão de uma característica, possibilitando ainda a identificação dos indivíduos heterozigotos.

A manifestação precoce da puberdade em novilhas de corte é desejável em sistemas de produção, pois assim como outros indicadores da eficiência reprodutiva, a precocidade sexual torna-se um dos requisitos a serem atendidos para se elevar a produtividade. Hess (2002) ressalta que as novilhas precisam atingir a puberdade um a três meses antes de serem introduzidas na estação de monta, para melhorar suas chances de concepção e de produzirem suas crias. Em virtude deste fato e adicionado à existência de moderada até mesmo elevada herdabilidade para esta característica (0,31 de acordo com LASTER et al., 1979; 0,47 para SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998), a precocidade sexual deve ser adotada como critério de seleção em sistemas de produção de novilhas de corte.

Diferentemente dos bovinos, a ocorrência precoce da puberdade não é desejável na espécie humana, onde se concentra a maior parte dos estudos relacionados a este tema. Diversas mutações inativadoras e ativadoras já foram descritas para os genes dos receptores dos hormônios gonadotróficos, como o luteninizante (LHR) (SHENKER et al., 1993; WU; CHAN, 1999) e folículo estimulante (FSHR) (GROMOLL et al., 1996), considerados candidatos à manifestação da puberdade. Estas mutações têm provocado alterações fisiológicas muito importantes, como alterações menstruais e infertilidade, má formação de características sexuais secundárias e puberdade precoce em meninos, entre outras.

Na espécie animal são poucos os relatos de literatura com descrição de resultados de polimorfismos para estes dois genes. Milazzotto (2001) embora não tivesse conseguido estabelecer uma associação entre os polimorfismos SSCP (Polimorfismo Conformacional de Fita Simples) encontrados no gene do LRH com a precocidade sexual em novilhas da raça Nelore, sugeriu fortes indícios de que este evento esteja associado a fatores genéticos, confirmando a importância da continuidade dos estudos que buscam marcadores moleculares para tal característica. Campagnari (2002) explorando a mesma técnica, raça e característica

de interesse investigada pela autora supracitada, conseguiu correlacionar significativamente a presença de uma variante molecular na região não traduzida 3' (3' UTR) do gene do FSHR com o fenótipo precocidade sexual, sugerindo que essa região, apesar de não traduzida, possa estar implicada nos mecanismos de regulação e expressão deste gene.

Considerando-se a escassez de estudos de polimorfismos de genes sobre características reprodutivas, como a precocidade sexual e a possibilidade que uma população híbrida oferece para exploração da heterozigose, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos de polimorfismos RFLP nos genes do LHR e FSHR sobre a precocidade sexual de novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais, utilizando-se como característica indicadora deste evento a probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Animais

Amostras de sangue para extração de DNA foram obtidas de 370 novilhas de corte compostas, provenientes de duas regiões brasileiras (fazendas RG e SO) e distribuídas em seis composições raciais (Tabela 1), de acordo com o percentual de contribuição de raças de origem Zebu (N), Adaptados às condições tropicais (A), Europeu Britânico (B) ou Europeu Continental (C), constituindo o sistema de caracterização de tipos biológicos NABC.

Tabela 1 – Número de novilhas (n), distribuídas de acordo com a fazenda de origem (RG ou SO) e descrição de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC

Composição racial	n		Origem
	RG	SO	
4444	02	20	25% Zebu x 25% Adaptado x 25% Britânico x 25% Continental
4804	31	07	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental
4840	51	50	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico
4840_2	-	98	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico (2a geração)
8008	10	48	50% Zebu x 50% Continental
8080	53	-	50% Zebu x 50% Britânico

Um total de 33 touros, de diferentes composições raciais, pais de algumas novilhas avaliadas neste estudo também tiveram seus genótipos caracterizados. Não foi possível avaliar todos os pais, por não haver mais disponibilidade de material para extração de DNA, obtido de amostras de sêmen nas fazendas de origem.

2.1 Genotipagem

Nas fêmeas, o DNA genômico foi extraído de amostras de sangue empregando-se o método de extração e precipitação em NaCl, descrito por Olerup e Zetterquist (1992). Nos touros, extraiu-se o DNA de uma palheta de sêmen por animal, de acordo com o método proposto por Regitano (2001).

Com base nos resultados de polimorfismos por SSCP (Polimorfismo conformacional de fita simples) nos genes do LHR (MILAZZOTO, 2001) e do FSHR (CAMPAGNARI, 2002), elegeram-se, respectivamente, dois fragmentos de interesse (Tabela 2) que foram submetidos à análise PCR-RFLP.

Tabela 2 – Descrição dos marcadores RFLP analisados

Gene	Natureza	Crom. ¹	Exon	Seqüência ²	Ref. ³
LHR	RFLP4 <i>HhaI</i>	11	11	F: CAAACTGACAGTCCCCCGCTTT R: CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC	1
FSHR	RFLP <i>AluI</i>	11	10	F: CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCTC R: AGTTCTTGGCTAAATGTCTTAGGGGG	2

¹Cromossomo; ²F (forward) - sentido 5'-3', R (reverse) - sentido 3'-5'; ³Referências: 1. Lussier et al. (dados não publicados), 2. Houde et al. (1994); ⁴RFLP: Polimorfismo de tamanho de fragmento de restrição.

As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador modelo MJ Research[®], PTC-100 (Programmable Thermal Controller), seguindo-se as condições de tempo e temperatura de cada ciclo propostas por Milazzotto (2001) para o LHR e por Campagnari (2002) para o FSHR. Cada reação de PCR foi constituída de aproximadamente 200 ng de DNA, em um volume final de reação de 25 µl, contendo 10x PCR Buffer (20 mM Tris-HCl – pH 8.4, 50 mM KCl), MgCl₂ (3,5 mM para o LHR; 2,0 mM para o FSHR), 0,5 mM de cada dNTP (desoxinucleotídeos trifosfatados), 0,4 µM de cada um dos *primers* e 1 unidade de *Taq* DNA polimerase.

Os produtos das ampliações foram posteriormente digeridos com as enzimas de restrição específicas *HhaI* e *AluI*, respectivamente, para os genes do LHR e do FSHR, sendo a solução incubada à 37°C durante 3 horas. Os fragmentos resultantes foram separados em eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídeo (5ug/ml), em tampão Tris-Borato-Edta (TBE) a 1%, a 65 V, sendo posteriormente avaliados em Scanner Laser⁶, sob excitação com comprimentos de onda de 520 nm e emissão com comprimentos de onda de 580 nm. O padrão de tamanho de DNA dupla fita (100 bp DNA ladder⁷) foi utilizado em cada gel para permitir o cálculo do tamanho dos fragmentos, sendo os genótipos identificados pela ausência ou presença do sítio de restrição reconhecido pelas enzimas de restrição.

2.2 Análise dos resultados

Para avaliação da estrutura genética da população investigada, bem como de cada composição racial, estimou-se as frequências alélicas e genotípicas, respectivamente, por contagem alélica e dos diferentes genótipos (WEIR, 1996) para ambos os genes investigados.

Para mostrar as implicações dos resultados moleculares sobre a característica de interesse precocidade sexual, empregou-se os dados zootécnicos referentes ao diagnóstico de gestação por palpação retal por ocasião da primeira estação de monta em que as novilhas foram submetidas. Deste modo, a avaliação dos efeitos dos marcadores foi sobre a probabilidade de prenhez (PP), avaliada como uma característica binária, com valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião.

Adotou-se um modelo que considerou os efeitos dos genótipos, para ambos os genes estudados, ou dos haplótipos (cada combinação genotípica única considerando os dois locos analisados); fazenda de origem dos animais; composição racial dentro de fazenda de origem e a covariável peso ajustado aos 390 dias de idade (PES390) (efeitos linear e quadrático), além do efeito residual. O PES390, calculado a partir do peso obtido de cada animal entre 360 e 420 dias de idade foi incluído nesta análise, por ser o peso corporal um dos fatores que influenciam a manifestação da puberdade.

Empregou-se a metodologia de Modelos Lineares Generalizados, pelo procedimento PROC GENMOD do programa estatístico computacional *Statistical Analysis System* versão 8.0 (SAS Inst., Inc., Cary NC), admitindo-se distribuição binomial com função de ligação logística. O teste da razão de verossimilhanças foi utilizado para avaliar o efeito dos

⁶ Fujifilm Fla 3000G

⁷ Life Technologies®

marcadores RFLP (LHR e FSHR) sobre a ocorrência da PP, considerando significativos os valores de $P < 0,05$. Foram excluídos 41 animais nesta análise, para que todas as subclasses testadas (combinação dos níveis de cada fator do modelo) apresentassem a informação 0 e 1 para PP, reduzindo-se a população total de 370 para 329 animais.

O efeito dos genótipos identificados para o gene do LHR e do FSHR sobre a PP foi estimado a partir do seguinte modelo estatístico:

$$Y_{(i)jklm} = g(x) = \mu + F_i + R_{(i)j} + GL_k + GF_l + b_1(P_{(i)jklm} - \bar{P}) + b_2(P_{(i)jklm} - \bar{P})^2 + e_{(i)jklm}$$

em que:

$Y_{(i)jklm}$ representa a característica (PP) do $(i)jklm$ ^{ésimo} animal; $g(x)$, a função de ligação (logística); μ representa média populacional da característica; F_i , $R_{(i)j}$, GL_k , GF_l , efeitos fixos associados ao i ^{ésima} fazenda, j ^{ésima} composição racial aninhada dentro de fazenda, k ^{ésimo} genótipo LHR, l ^{ésimo} genótipo FSHR, b_1 e b_2 , coeficientes linear e quadrático do peso ajustado aos 390 dias de idade, incluído no modelo como covariável; $P_{(i)jklm}$ é o peso ajustado aos 390 dias de idade do $(i)jklm$ ^{ésimo} animal; \bar{P} é a média dos pesos ajustados aos 390 dias de idade; $e_{(i)jklm}$ = efeito do erro aleatório associado à $(i)jklm$ ^{ésima} observação.

Para testar o efeito dos haplótipos sobre a PP adotou-se o seguinte modelo estatístico:

$$Y_{ijk} = g(x) = \mu + F_i + H_j + b_1(P_{ijk} - \bar{P}) + b_2(P_{ijk} - \bar{P})^2 + e_{ijk}$$

em que:

Y_{ijk} representa a característica (PP) do ijk ^{ésimo} animal; $g(x)$, a função de ligação (logística); μ representa média populacional da característica; F_i , H_j , efeitos fixos associados ao i ^{ésima} fazenda, j ^{ésimo} haplótipo; b_1 e b_2 , coeficientes linear e quadrático do peso ajustado aos 390 dias de idade, incluído no modelo como covariável; P_{ijk} é o peso ajustado aos 390 dias de idade do ijk ^{ésimo} animal; \bar{P} é a média dos pesos ajustados aos 390 dias de idade; e_{ijk} = efeito do erro aleatório associado à ijk ^{ésima} observação.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No gene do LHR, Milazzotto (2001) relatou uma substituição de base nucleotídica citosina (C) por timina (T), que por sua vez, resultou na substituição do aminoácido alanina por valina, caracterizando uma mutação pontual. A análise PCR-RFLP proposta no presente estudo possibilitou a identificação desta variação porque a enzima de restrição *HhaI* reconhece o sítio de restrição GCGC presente no alelo C, mas ausente no alelo T. Assim na Figura 1, o genótipo CC pode ser identificado pelo fragmento de 155/148 pb, que não se separam no gel de agarose, enquanto que o genótipo TT que não é digerido pela enzima *HhaI*, é caracterizado pelo fragmento total de 303 pb. O genótipo heterozigoto CT, por sua vez, é reconhecido pela presença dois fragmentos, um de 303pb e o outro de 155/148 pb.

Campagnari (2002) relatou a substituição da base citosina (C) pela guanina (G) no gene do FSHR, que por sua vez, resultou na substituição do aminoácido treonina por leucina, também caracterizando uma mutação pontual. Assim como para o LHR, foi possível identificar esta variação pelo reconhecimento do sítio de restrição AGCT presente em dois locais no alelo G e em um local no alelo C. Na Figura 1, o genótipo GG pode ser identificado pela presença de dois fragmentos, um de 193 pb e outro de 63/50 pb, que não se separam no gel de agarose, o genótipo CC, também por dois fragmentos, um de 243 e outro de 63/50 pb e finalmente o heterozigoto, pela presença de três fragmentos de 243, 193 e de 63/50 pb.

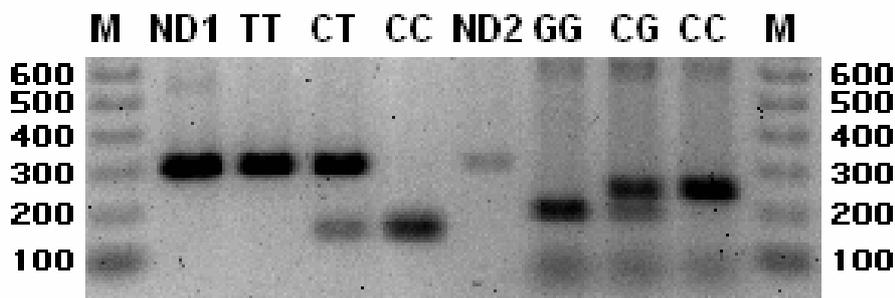


Figura 1 – Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo apresentando os padrões de fragmentos dos produtos de amplificação (ND1 e ND2) e dos produtos de digestão dos genes do LHR (TT, CT e CC) e FSHR (GG, CG e CC) por PCR-RFLP.

Na parte superior da figura: M – marcador de peso molecular em escala de 100pb; ND1 – produto não digerido do LHR (303pb); TT (303pb); CT (303pb e 155/148pb); CC (155/148pb); ND2 – produto não digerido do FSHR (306pb); GG (193pb e 63/50pb); CG (243/193pb e 63/50pb); CC (243 e 63pb)

No presente estudo, registrou-se maior frequência de heterozigose em todas as composições raciais para o gene do LHR, excetuando-se os animais de composição 4804 e 4840 (Figura 2), aspecto relevante tendo em vista a origem híbrida da população aqui investigada.

Quando computadas as frequências genóticas considerando-se separadamente a população de fêmeas compostas (4444, 4804, 4840 e 4840_2) e a população de 50% Zebu x 50% Europeu ou F1 (8008 e 8080), obteve-se maior frequência de homozigose (CC; 0,483) em relação à de heterozigose (0,452) para as fêmeas compostas, enquanto que para a população F1 a maior frequência observada foi a de animais heterozigotos (0,740). Valores inferiores de heterozigose, de 0,430 e 0,174 foram encontrados, respectivamente por Milazzotto (2001) e Carvalho et al. (2004) em fêmeas da raça Nelore.

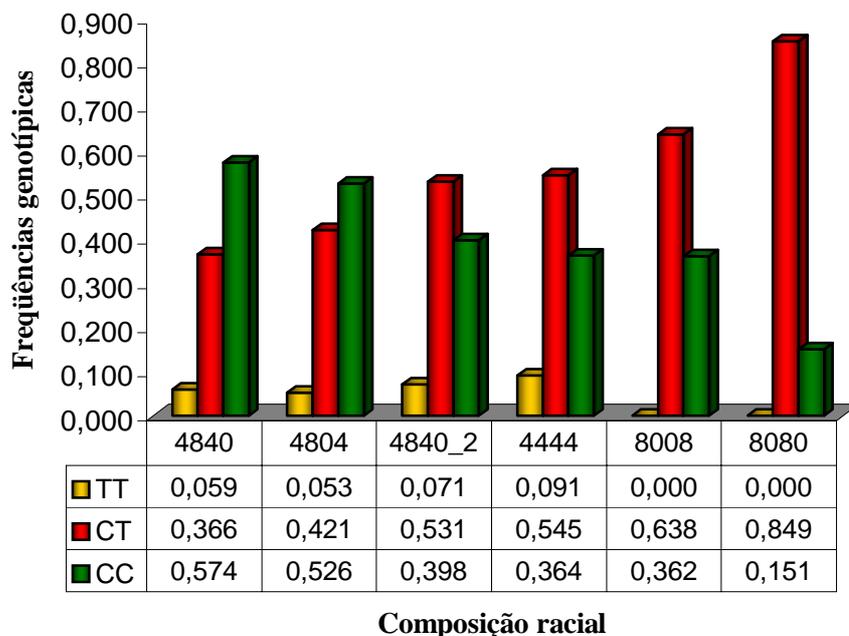


Figura 2 - Frequências genóticas para o gene do LHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080)

A superioridade na população Nelore em relação à população bovina composta investigada neste estudo revelou-se na frequência de animais homozigotos TT, de 0,540 e 0,783, respectivamente para Milazzotto (2001) e Carvalho et al. (2004). Estes dados tornam-se relevantes quando se consideram as interpretações de Milazzotto (2001) que assumiram ser o genótipo TT característico de animais de origem *Bos indicus*, pelo fato do genótipo CC ter sido identificado em fêmeas da raça Limousin na frequência de 100% (n=10) e por estar

presente na seqüência depositada no Genbank®⁸ (LUSSIER et al.; dados não publicados – GenBank U20504). Estas afirmações confirmam os resultados aqui encontrados para as novilhas F1 (8008 e 8080), que apresentaram somente os genótipos CT ou CC (Figura 2).

Entretanto, além do genótipo TT foram identificados animais CT e CC na população Nelore, gerando uma freqüência gênica de 0,245 (MILAZZOTTO, 2001) e 0,130 (CARVALHO et al., 2004) para o alelo C, sugerindo-se uma participação de animais europeus segregando nesta população zebuína, em algum momento de sua formação, o que estimula estudos adicionais para o gene do LHR em outras populações bovinas. Entre as novilhas compostas aqui estudadas, o alelo C predominou em todos os animais genotipados (Figura 3), mostrando freqüências alélicas que variaram de 0,575 a 0,757 contra 0,243 a 0,425 para o alelo T.

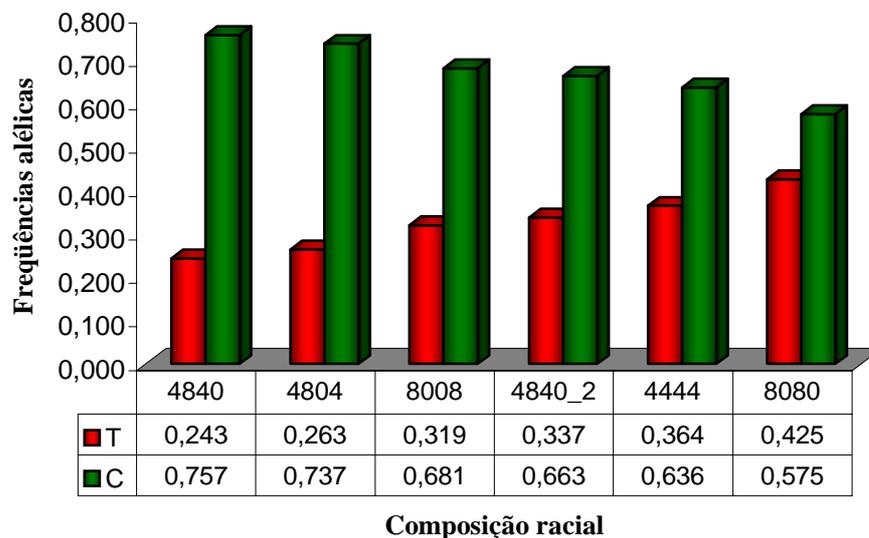


Figura 3 - Freqüências alélicas para o gene do LHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080)

Para o gene do FSHR registrou-se maior freqüência de heterozigose em todas as composições raciais investigadas (Figura 4). Na raça Nelore a freqüência de heterozigose relatada por Campagnari (2002), de 0,510 foi igual à calculada para o grupo de fêmeas compostas (4444, 4804, 4840 e 4840_2) e inferior ao obtido entre as fêmeas F1 (8008 e 8080; de 0,730). De acordo com autora supracitada, o genótipo GG é característico de animais de

⁸ Genbank®: banco de dados online de sequencias genéticas, disponíveis publicamente: <http://www.ncbi.nih.gov/Genbank/>

origem *Bos indicus*, atribuindo-se aos animais *Bos taurus* o genótipo CC, por ter sido este identificado em fêmeas da raça Limousin na frequência de 100% (n=10) e por estar presente na seqüência depositada no Genbank® (HOUDE et al., 1994 – GenBank L22319).

Seguindo-se esta linha de raciocínio, fêmeas F1 (8008 e 8080), advindas do cruzamento Zebu x Europeu, somente poderiam apresentar os genótipos CG ou CC, o que não foi constatado neste estudo (Figura 4). Entretanto deve-se ressaltar que na população Nelore estudada por Campagnari (2002), constatou-se maior frequência de CG em relação ao GG (0,510 contra 0,490), dado este que aliado ao pequeno número amostral de fêmeas Limousin genotipadas não fornecem subsídios consistentes para contradizer os resultados aqui obtidos.

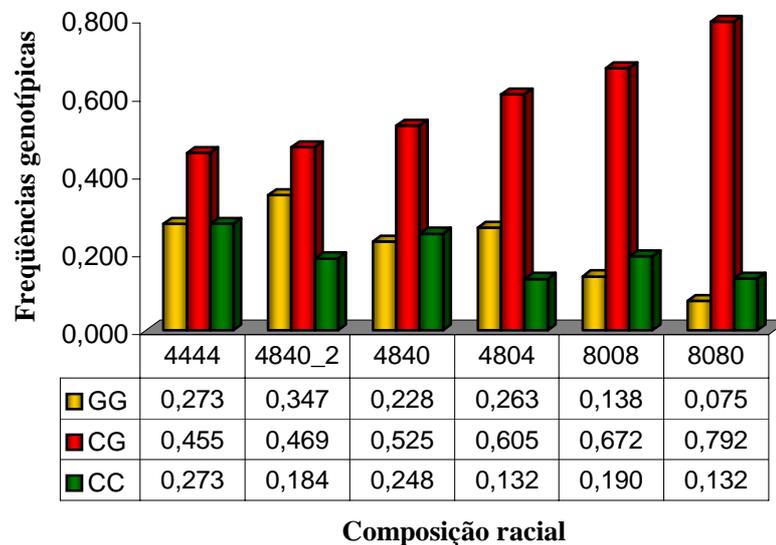


Figura 4 - Frequências genotípicas para o gene do FSHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080)

Para suportar estas afirmações procedeu-se a genotipagem de alguns touros, pais das novilhas aqui estudadas, com o objetivo de se investigar a presença ou não do alelo G nos animais *Bos taurus*, progenitores das fêmeas de composição 8008 e 8080 que apresentaram o genótipo GG. Foram genotipados 33 touros, correspondendo a 78% do total de touros presentes na população, que contribuíram com aproximadamente 83,5% dos descendentes investigados na população como um todo.

As Tabelas 3 e 4 descrevem as frequências genotípicas e alélicas calculadas para os touros genotipados, agrupados por composição racial, respectivamente para os genes do LHR e FSHR.

Tabela 3 – Frequências genotípicas e alélicas para o gene do LHR nos touros genotipados, agrupados por composição racial

Touros	n ¹	Frequências genotípicas			Frequências alélicas		ndes/tot ² (%)
		TT	CT	CC	T	C	
100% Adaptado	14	0	0,428	0,571	0,214	0,785	36,5
100% Europeu Britânico	8	0	0	1,000	0	1,000	13,2
100% Europeu Continental	3	0	0	1,000	0	1,000	8,4
50% Adaptado x 50% Britânico	2	0	0	1,000	0	1,000	2,4
50% Adaptado x 50% Continental	1	0	1,000	0	0,500	0,500	1,9
25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico	4	0	0,500	0,500	0,250	0,750	21,0
25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental	1	0	0	1,000	0	1,000	0,27

¹ número de animais; ² ndes/tot = número de descendentes por touros sobre o número total de animais presentes na população

A análise dos touros confirmou os genótipos que seriam esperados pela composição racial dos mesmos para o gene do LHR. Observa-se, por exemplo, que os touros europeus britânicos ou continentais apresentaram somente o genótipo CC (dados realçados na Tabela 3).

Tabela 4 – Frequências genotípicas e alélicas para o gene do FSHR nos touros genotipados, agrupados por composição racial

Touros	n ¹	Frequência genotípica			Frequências alélicas	
		GG	CG	CC	G	C
100% Adaptado	14	0,214	0,571	0,214	0,500	0,500
100% Europeu Britânico	8	0	0,250	0,750	0,125	0,875
100% Europeu Continental	3	0,333	0,333	0,333	0,500	0,500
50% Adaptado x 50% Britânico	2	0	0,500	0,500	0,250	0,750
50% Adaptado x 50% Continental	1	0	1,000	0	0,500	0,500
25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico	4	0,250	0,500	0,250	0,500	0,500
25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental	1	0	1,000	0	0,500	0,500

¹ número de animais

Já para o gene do FHSR a genotipagem dos touros permitiu a confirmação desta análise adicional, ao se constatar a presença do genótipo CG ou mesmo GG (realçados na Tabela 4) em touros europeus britânicos das raças Red Angus e South Devon e em europeus continentais como o Simental. Também em touros Adaptados da raça Senepol constatou-se a presença do genótipo GG.

É possível admitir a ocorrência de segregação de *Bos indicus* na população *Bos taurus* em algum momento de sua formação ou considerar outras possibilidades: (i) estes touros possam ter sido obtidos por cruzamento absorvente; (ii) atribuir os resultados observados a erros de natureza técnica, ocorridos durante a genotipagem dos animais; (iii) acesso ao banco de dados contendo informações de paternidade incorretas. Deste modo, pesquisas adicionais para o gene do FSHR em diferentes raças bovinas de origem zebuína e taurina poderiam contribuir para uma melhor compreensão dos resultados aqui observados.

Na Figura 5 observa-se a distribuição das frequências gênicas para o gene do FSHR nas diferentes composições raciais de novilhas compostas Europeu-Zebu, havendo superioridade do alelo C em relação ao G em todos os animais, excetuando-se os de composição 4804 e 4840_2 e também 4444, onde as frequências de C e G foram iguais. Frequências superiores e inferiores de G e C às aqui verificadas foram constatadas na população Nelore estudada por Campagnari (2002): 0,745 contra 0,255, respectivamente.

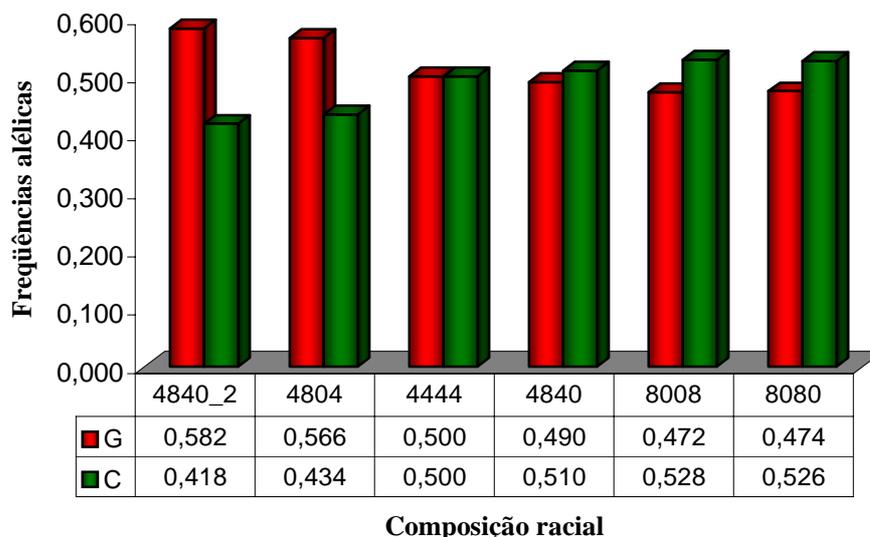


Figura 5 - Frequências alélicas para o gene do FSHR em novilhas compostas Europeu-Zebu, de diferentes composições raciais (4444; 4804; 4840; 4840_2; 8008; 8080)

A identificação dos genótipos, inclusive dos heterozigotos, que por sua vez possibilitou a estimação das frequências genotípicas e alélicas na população em estudo, permite indicar a investigação dos marcadores genéticos para o LHR e FSHR em estudos adicionais visando a avaliação da estrutura genética em outras populações bovinas.

Para mostrar as implicações dos resultados moleculares observados sobre a característica de interesse precocidade sexual, empregaram-se as informações fenotípicas geradas pelo diagnóstico de gestação conduzido em todas as fêmeas, após o período de estação de monta. Em posse destas informações, a avaliação dos efeitos dos marcadores foi verificada sobre a probabilidade de prenhez (PP) com o valor 1 para prenhez positiva e 0, para ausência de prenhez, variável caracterizada, portanto como uma característica binária.

A taxa de prenhez geral calculada para a população de novilhas compostas investigada foi de 63,5%, resultado bastante interessante, considerando a idade média destas fêmeas ao entrarem em sua primeira estação de monta (13,5 meses). As novilhas heterozigotas (CT e CG) apresentaram taxas de prenhez de 67 e 66%, enquanto que as homozigotas (TT e GG) apresentaram taxas de 65 e 58% e as homozigotas CC, de 58 e 64%, respectivamente para os genes do LHR e FSHR. Entretanto, não se constatou efeito do gene do LHR ($P=0,9188$) ou do FSHR ($P=0,8831$) sobre a ocorrência de prenhez nas diferentes composições raciais pelo teste da razão de verossimilhanças.

O peso ajustado aos 390 dias de idade (PES390), incluído no modelo como covariável mostrou-se significativo tanto para o efeito linear ($P=0,0417$) como quadrático ($P=0,0148$), confirmando a importância de se incluir esta fonte de variação no modelo, por ser o peso corporal, um dos fatores que influenciam a obtenção de melhores taxas de prenhez. Constatou-se efeito de fazenda de origem dos animais sobre a PP ($P=0,0014$), apresentando-se a fazenda RG com maior percentual de fêmeas precoces, isto é, maior taxa de prenhez (70%) em relação à SO (59%). Explica-se esta diferença provavelmente pelo fato que todas as novilhas RG foram submetidas à monta natural, enquanto que mais do que 80% das novilhas SO foram submetidas à inseminação artificial.

Efeito significativo de composição racial dentro de fazenda também foi observado sobre a PP ($P=0,0398$), procedimento este adotado devido à distribuição desproporcional das composições raciais, nas duas fazendas de origem, havendo superioridade dos animais de composição 8080 da fazenda RG, com taxa de prenhez de 92%, sobre a maior parte das demais composições analisadas (resultados não mostrados).

Embora o modelo de distribuição binomial proposto para o conjunto de dados disponíveis parece ter sido adequado, algumas hipóteses justificariam a ausência do efeito dos

marcadores RFLP investigados sobre a precocidade sexual. Uma delas refere-se ao número total de animais analisados e à distribuição desproporcional entre as composições raciais nas duas fazendas de origem envolvidas, embora se tenha tomado o cuidado de agrupar os animais dentro de fazenda.

Outro dado que merece ser apontado é que além do LHR e FHSR, outros genes igualmente importantes relacionados à manifestação da puberdade, devem contribuir na expressão desta característica, portanto estudos adicionais que permitam este tipo de exploração poderiam auxiliar na inclusão de marcadores moleculares em programas de seleção para a precocidade sexual em novilhas de corte.

Finalmente, torna-se relevante destacar que, como salientado anteriormente a herdabilidade estimada para a idade à puberdade é considerada moderada até mesmo elevada (0,31 para LASTER et al., 1979; 0,47 para SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998), significando que este evento reprodutivo também sofre a influência de fatores não genéticos. Esta peculiaridade também é observada em outras características reprodutivas que, diferentemente da idade à puberdade, apresentam baixas herdabilidades, como, por exemplo, taxa de parição e dificuldade ao parto (0,19 e 0,18, respectivamente, segundo SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998). Estas são algumas das razões pelas quais os estudos dos efeitos de polimorfismos de genes são mais freqüentes sobre características produtivas do que reprodutivas.

Estudos anteriores também não demonstraram efeito dos genes do LHR (MILAZZOTTO, 2001) e do FSHR (CAMPAGNARI, 2002) sobre a precocidade sexual em novilhas da raça Nelore, avaliada pela comparação entre a freqüência de fêmeas precoces ou não precoces aos 14 meses, utilizando o teste de χ^2 (Qui-quadrado).

Sutarno, Greeff e Lymbery (2002) encontraram efeito significativo de duas regiões do DNA mitocondrial que apresentaram polimorfismos RFLP sobre a taxa de parição, definida pela média de bezerros nascidos vivos por ano durante 4 anos, em fêmeas bovinas Hereford e Compostas (¼ Brahman, Charolês e Holandês x 1/8 Angus e Hereford). Estes resultados são importantes principalmente quando se considera que esta característica apresenta baixa herdabilidade, como citado anteriormente.

Por sua vez Almeida et al. (2003) relataram efeitos significativos de dois marcadores, LEPSau3AI (RFLP) e IDVGA-51 (STRs ou *short tandem repeat*) para o gene da leptina sobre características reprodutivas e produtivas, respectivamente, como intervalo de partos (IP) e peso ao primeiro parto (PPP), em fêmeas 5/8 Aberdeen Angus x 3/8 Nelore. Aumento do IP

em pelo menos dois meses foi constatado pelo efeito dos dois marcadores, enquanto que o PPP foi influenciado positivamente pelo marcador LEPSau3AI em até 27 kg. Diante destes resultados, os autores recomendaram uma seleção contra o marcador RFLP LEPSau3AI seguido por uma suplementação nutricional durante o período gestacional.

Recentemente, Duarte, Moraes e Weimer (2005) avaliaram a ocorrência de possíveis associações entre três marcadores microssatélites (ILSTS027; MBO22 e BM4325) ligados ao gene do hormônio folículo estimulante, subunidade β (FSH β) sobre características de desempenho reprodutivo, como IP e PPP em fêmeas Brangus Ibagé.

Nenhum efeito significativo foi observado pelos autores supracitados entre cada um dos marcadores investigados sobre o PPP, enquanto que o IP mostrou-se ser influenciado pelo marcador BM4325, visto que os animais detentores do alelo 101 para este marcador apresentaram IP ($525,3 \pm 113,5$ dias) de 54 dias menor ($P=0,035$) em relação aos demais ($579,5 \pm 142,1$ dias). De acordo com os autores estes resultados indicam a utilização do marcador BM4325 para o gene do FSH na seleção assistida por marcadores, visando melhorias no desempenho reprodutivo de fêmeas bovinas, pelo menos no rebanho Brangus Ibagé, sugerindo-se, no entanto a confirmação das informações obtidas em outros rebanhos.

No presente estudo, após análise individual de cada genótipo encontrado, procedeu-se à montagem dos haplótipos (cada combinação genotípica única considerando os dois locos analisados) para cada animal estudado. Esta estratégia foi realizada com o objetivo de verificar possível efeito dos haplótipos sobre a PP, não detectado anteriormente quando os genótipos foram analisados separadamente. Foram constatadas oito combinações genotípicas distintas (TT/GG; TT/CG; CT/GG; CT/CG; CT/CC; CC/GG; CC/CG e CC/CC), não se constatando a ocorrência do haplótipo TT/CC.

O haplótipo CT/CG ou duplo heterozigoto foi o que mais prevaleceu na população estudada confirmando a superioridade da frequência de heterozigose neste rebanho híbrido, excetuando-se os animais de composição 4804 e 4840, que apresentaram maiores ocorrências do haplótipo CC/CG. As novilhas identificadas pelos haplótipos CT/CC e duplas heterozigotas, foram as que apresentaram maiores taxas de prenhez, de 79% ($n=28$) e 70% ($n=116$), respectivamente. Entretanto, não se constatou efeito dos haplótipos sobre a PP na população composta investigada ($P=0,7886$).

O PES390, incluído no modelo como covariável mostrou-se significativo para o efeito quadrático ($P=0,0273$), confirmando a importância de isolar este fator de variação no modelo. Constatou-se também efeito de fazenda de origem dos animais sobre a PP ($P=0,0004$), tal como observado na avaliação do efeito dos genes LHR e FSHR.

O emprego de marcadores moleculares para caracterizar a frequência de heterozigose em populações híbridas, bem como identificar as raças mais divergentes, auxiliando na escolha dos materiais genéticos a serem utilizados em cruzamentos, deve contribuir para a redução do tempo despendido nas avaliações experimentais de predição do desempenho.

4. CONCLUSÕES

A análise PCR-RFLP para os genes do LHR e FSHR possibilitou a identificação dos genótipos, bem como a caracterização da heterozigose, permitindo conhecer a estrutura genética na população estudada.

A frequência de heterozigose se mostrou elevada para ambos os genes o que viabiliza a exploração destes animais em cruzamentos. As diferenças observadas nas frequências genotípicas e alélicas entre as diferentes composições raciais estudadas, sugerem pesquisas adicionais, para os mesmos genes investigados, em outros rebanhos bovinos.

Não se constatou efeito dos polimorfismos RFLP aqui investigados, nos genes do LHR e FSHR sobre a precocidade sexual, caracterizada pela probabilidade de prenhez na primeira estação de monta. Estes resultados sugerem que a seleção de novilhas precoces, com base em sua informação genotípica para os genes aqui explorados, não se justifica em programas de melhoramento genético na população composta Europeu-Zebu aqui estudada.

CAPÍTULO III: INCLUSÃO DO EFEITO DE MARCADORES RFLP SOBRE ESTIMATIVAS DE COMPONENTES DE (CO)VARIÂNCIA E PARÂMETROS GENÉTICOS EM CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVA E PRODUTIVA EM NOVILHAS DE CORTE COMPOSTAS EUROPEU-ZEBU

RESUMO

Os marcadores RFLP dos genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e folículo estimulante (FSHR) sobre a precocidade sexual, avaliada pela probabilidade de prenhez (PP) por ocasião da primeira estação de monta, foram investigados em uma população de novilhas de corte compostas Europeu-Zebu por modelos mistos sob modelo animal e touro. Os objetivos foram estimar a proporção de variação genética total da variável prenhez atribuída aos efeitos dos marcadores LHR e FSHR, bem como a herdabilidade (h^2) da característica. O banco de dados constituiu-se de 370 novilhas genotipadas por PCR-RFLP, para ambos os genes, e suas meio-irmãs, por parte de touro, as quais tiveram seus genótipos simulados pelo método de simulação de Monte Carlo, resultando num total de 4.374 informações válidas. A PP foi analisada como uma característica binária, com o valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes por palpação retal e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião. As estimativas dos componentes de (co)variância e h^2 para a PP foram obtidos pelo método de Máxima Verossimilhança Restrita (REML) sob modelo animal e sob modelo touro, empregando-se um modelo misto linear e não linear, respectivamente. A h^2 estimada para a PP em análise uni-característica, sob modelo animal, incluindo-se ou não os marcadores LHR e FSHR como efeitos aleatórios ou fixos foi de 0,21. Por sua vez, a h^2 estimada para a PP sob modelo touro, incluindo-se ou não os efeitos fixos de marcadores foi de 0,41. A magnitude das estimativas dos componentes de (co)variância atribuídas aos efeitos aleatórios dos marcadores se mostrou muito baixa, constatando-se a pequena contribuição destes na proporção da variância total da prenhez, indicando ser esta uma característica de herança poligênica. A inclusão do peso ajustado aos 390 dias de idade (PES390) como covariável reduziu a herdabilidade da PP de 0,21 para 0,16 e de 0,41 para 0,18, respectivamente, sob modelo animal e sob modelo touro, sugerindo que o peso corporal é um dos fatores que influenciam a prenhez. Estes resultados, associado às altas correlações

genéticas encontradas entre PP e PES390 (0,56), em análise bi-característica sob modelo animal, justificam a adoção de estratégias de manejo nutricional para manutenção de pesos corporais adequados antes e após a desmama, visando obter melhor desempenho reprodutivo das novilhas por ocasião de sua primeira estação de monta.

Palavras-chave: prenhez, marcadores RFLP, novilhas de corte compostas, parâmetros genéticos

ABSTRACT

The influence of RFLP markers for luteinizing hormone receptor (LHR) and follicle-stimulating receptor (FSHR) genes on the sexual precocity was evaluated as the probability of pregnancy at first breeding season (PP) in 370 European-Zebu composite beef heifers using mixed model procedure for animal and sire models. The objectives were to estimate the proportion of the total genetic variance in pregnancy related to LHR and FSHR markers as well as the heritability (h^2) estimated for PP. The data file used was composed of 370 records of heifers genotyped by PCR-RFLP for both genes and their half-sibs from the same sire. The half-sibs had their genotypes simulated by Monte Carlo's simulation method resulting in a final data file with 4.374 valid records. The PP was analyzed as a binary trait, with a value of 1 (success) assigned to heifers that were diagnosed pregnant by rectal palpation and a value of 0 (failure) assigned to those that were not pregnant at that time. The estimates of (co)variance components and h^2 for PP were evaluated using the Restricted Maximum Likelihood method (REML) for animal and sire models, using a mixed linear and nonlinear model, respectively. The estimate of h^2 for PP in single-trait analysis for animal model was 0.21 using or not the LHR and FSHR markers as random or fixed effects. The h^2 estimated for PP for sire model was 0.41 using or not the RFLP markers as fixed effects. The small magnitude of the (co)variance components estimation related to random effects of LHR and FSHR showed their little contribution for the proportion of total variance for pregnancy indicating a polygenic inheritance for this trait. The adjusted 390-d weight when incorporated as a covariate in single-trait analysis decreased the heritability estimate of PP from 0.21 to 0.16 for animal model and from 0.41 to 0.19 for sire model, suggesting that body weight is one of the factors influencing pregnancy rate. These results associated with the high genetic correlation

found between PP and PES390 (0.56) in two-trait analysis for animal model justifies the use of strategic feeding management to keep appropriated body weight before and after weaning to improve the reproductive performance of heifers at first breeding season.

Keywords: pregnancy, RFLP markers, composite beef heifers, genetic parameters

1. INTRODUÇÃO

A probabilidade de prenhez aos 14 meses (PP14), definida como a probabilidade de uma novilha se tornar prenhe após o final da estação de monta quando é exposta ao touro ou inseminada aos 14 meses de idade é uma característica medida diretamente nas fêmeas, sendo indicadora da idade à puberdade.

Evans et al. (1999) estimaram uma herdabilidade de $0,14 \pm 0,09$ para a PP14 em novilhas Hereford. Mas as estimativas elevadas de herdabilidade obtidas posteriormente, de $0,21 \pm 0,12$ (DOYLE et al., 2000) e $0,55 \pm 0,10$ (ELER et al, 2002), respectivamente em novilhas Angus e Nelore, encorajaram os autores a indicarem a PP14 como critério de seleção de novilhas para a precocidade sexual.

Características ligadas à produção animal são expressas como variáveis contínuas ou categóricas. Falconer e Mackai (2001) ressaltam que muitas características categóricas, além de estarem sobre o controle poligênico sofrem a influência dos efeitos aleatórios de ambiente, sendo a variável prenhez um exemplo destes casos. Além disso, as variáveis categóricas são, na maioria das vezes, erroneamente assumidas como contínuas e analisadas como tal o que provoca erros de interpretação dos resultados, visto que os modelos de análise para respostas contínuas são considerados inadequados para respostas categóricas (GIANOLA, 1980).

Israel e Weller (1998) recomendam que de acordo com a natureza da variável dependente a ser avaliada e com as fontes de variação a serem consideradas, diferentes modelos estatísticos e matemáticos, os quais se diferenciam pelas funções de distribuição (normal, binomial, poisson) e de ligação (identidade, logística, logarítmica) podem ser usados na avaliação genética. Para estimação de parâmetros genéticos de características reprodutivas categóricas, por exemplo, diferentes modelos (misto linear ou não linear, sob modelo animal ou touro), sob diferentes distribuições vêm sendo comparados (MATOS et al., 1997a; SPLAN; CUNDIFF; VAN VLECK, 1998; PHOCAS; LALOË, 2003) não havendo uma posição unânime entre os autores na escolha do melhor modelo, por haver variações no

tamanho do conjunto de dados, no *software* computacional utilizado e no tempo despendido para gerar os resultados.

Kennedy, Quinton e van Arendonk (1992) mostraram que estimativas não-viesadas de efeitos de genes podem ser obtidas em análise de modelos mistos sob modelo animal, incluindo-se os genótipos como efeitos fixos, se todos os indivíduos da população forem genotipados. Entretanto, geralmente somente uma pequena fração da população é genotipada, face aos custos envolvidos. Estratégias de simulação podem maximizar estas análises permitindo a incorporação de expressivo número de animais dotados de informações, o que melhora significativamente não somente a convergência do modelo como também a confiabilidade nos resultados obtidos (MONTALDO E MEZA-HERRERA, 1998).

Os genes dos receptores do hormônio luteinizante (LHR) e folículo estimulante (FSHR), envolvidos na manifestação da puberdade, foram investigados por RFLP (polimorfismos de tamanho de fragmento de restrição) em uma população de novilhas de corte compostas de diferentes composições raciais Europeu-Zebu. Os objetivos deste trabalho foram avaliar a inclusão dos efeitos dos marcadores LHR e FSHR em diferentes modelos estatísticos e estimar os parâmetros genéticos para a probabilidade de prenhez (PP) e algumas características produtivas, como pesos corporais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Descrição dos dados

Foram avaliadas 370 novilhas de corte compostas, distribuídas em seis composições raciais, de acordo com os diferentes percentuais de contribuição racial de origem Zebu (N), Adaptados às condições tropicais (A), Europeu Britânico (B) e Europeu Continental (C), constituindo o sistema de caracterização de tipos biológicos NABC (Tabela 1). As novilhas, nascidas entre agosto de 2001 e janeiro de 2002, pertencentes à safra 2001 eram provenientes de duas fazendas brasileiras.

Todos os animais têm identificação única e perfeito controle de sua composição racial, em percentuais de cada raça que participou de sua formação. O manejo alimentar restringe-se ao fornecimento de pastagens de boa qualidade e suplementação mineral adequada.

Amostras de sangue para extração de DNA foram obtidas de cada novilha e submetidas à análise PCR-RFLP, com base nos resultados de polimorfismos nos genes do LHR (MILAZZOTO, 2001) e do FSHR (CAMPAGNARI, 2002). Os genótipos foram

posteriormente identificados por eletroforese em gel de agarose a 1,5% pela ausência ou presença do sítio de restrição, reconhecido pelas endonucleases de restrição específicas *HhaI* e *AluI*, respectivamente, para os genes do LHR e do FSHR.

O resultado do diagnóstico de gestação por palpação retal por ocasião da primeira estação de monta em que as novilhas foram submetidas, forneceu a característica de interesse, a probabilidade de prenhez (PP) que foi avaliada como uma característica binária, com o valor 1 (sucesso) para novilhas diagnosticadas prenhes por palpação retal e 0 (fracasso) para novilhas não prenhes nesta mesma ocasião.

Tabela 1 – Número de novilhas (n) e origem de cada composição racial investigada neste estudo, no sistema NABC

NABC	Origem	n ¹		Total
		RG	SO	
4444	25% Zebu x 25% Adaptado x 25% Britânico x 25% Continental	02	20	22
4804	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Continental	31	07	38
4840	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico	51	50	101
4840_2	25% Zebu x 50% Adaptado x 25% Britânico (2 ^a geração)	-	98	98
8008	50% Zebu x 50% Continental	10	48	58
8080	50% Zebu x 50% Britânico	53	-	53
Total Geral		147	223	370

¹n = número de animais

O banco de dados foi formado inicialmente pelas 370 novilhas genotipadas, sendo posteriormente incorporadas suas meio-irmãs, por parte de touro, que apresentassem as mesmas composições raciais, mesma safra, independente de fazenda de origem. O objetivo desta estratégia foi gerar posteriormente, por simulação, os genótipos destas fêmeas, aumentando o número de animais dotados de informações.

Após a incorporação destes animais, o banco de dados ficou constituído de 6.972 animais, sendo submetido a várias restrições e eliminações pertinentes à PP para que todos os efeitos incluídos no modelo apresentassem um número mínimo de observações, eliminando-se grupos de contemporâneo sem nenhuma variação. Após este filtro o banco ficou constituído de 4.374 informações válidas. Deste número total, 1.776 (40,6%) e 2.598 fêmeas (59,4%) foram, respectivamente 1 e 0 para PP. A matriz de parentesco foi construída pelo pedigree dos animais na população base, num total de 33.869 animais.

A obtenção das frequências genóticas para cada genótipo identificado (TT, CT, CC para o LHR) e (GG, CG, CC para o FSHR) possibilitou a verificação do equilíbrio de Hardy Weinberg (HW) em todas as composições raciais estudadas, as quais se apresentaram em equilíbrio, para ambos os genes, com exceção das composições 8008 e 8080. A probabilidade de presença ou desvio do equilíbrio de HW associada às frequências genóticas observadas foi obtida pelo teste exato de probabilidade, o χ^2 (Qui-quadrado).

A probabilidade de geração dos genótipos a serem distribuídos na população de meio-irmãs respeitou as frequências genóticas encontradas para cada composição racial estudada, em equilíbrio de HW, para ambos os genes investigados (Tabela 2). De acordo com Falconer e Mackay (2001) uma população em equilíbrio de HW apresenta frequências genóticas e alélicas constantes. Como as frequências genóticas dos filhos são determinadas pelas frequências alélicas de seus pais, a frequência genotípica geração dos filhos será a mesma da geração parental.

Tabela 2 – Frequências genóticas encontradas nas diferentes composições raciais estudadas de novilhas compostas (4444, 4804, 4840 e 4840_2) e ½ Nelore x ½ Europeu (8008 e 8080) para os genes do LHR e FSHR

Composição racial ¹	Frequências genóticas					
	LHR			FSHR		
	TT	CT	CC	GG	CG	CC
4444	9%	55%	36%	27%	46%	27%
4804	5%	42%	53%	26%	61%	13%
4840	6%	37%	57%	23%	52%	25%
4840_2	7%	53%	40%	35%	47%	18%
8008	54%	43%	3%	49%	51%	0
8080	54%	43%	3%	49%	51%	0

Obedecendo-se a esta condição, os genótipos das meio-irmãs foram simulados, utilizando-se um programa de simulação na linguagem computacional FORTRAN 90, empregando-se o método de Simulação Monte Carlo (SMC), pelo qual se constrói uma cadeia de Markov (GAMERMAN, 1997) para geração dos números aleatórios, originando uma distribuição uniforme, sendo sua qualidade testada previamente e posteriormente, mediante o quanto é aleatória a seqüência gerada (PROVIDELO, 2005).

Para as composições raciais $\frac{1}{2}$ Nelore x $\frac{1}{2}$ Europeu (8008 e 8080) que não se apresentaram em equilíbrio de HW, empregaram-se os dados de frequências genóticas encontrados por Milazzotto (2001) e Campagnari (2002), respectivamente para os genes do LHR e FSHR na população de fêmeas Nelore, provenientes do mesmo rebanho de origem da geração materna parental das novilhas 8008 e 8080 investigadas neste estudo.

2.2 Descrição dos modelos matemáticos e estatísticos

2.2.1 Modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)

No LMA a PP foi avaliada como uma variável dependente contínua em análise uni e bi-característica. Em análise uni-característica diferentes modelos foram testados, diferindo, basicamente pela inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR, ora como efeitos fixos ora como aleatórios. Efeitos de grupo contemporâneo à prenhez (GCPP; n=10), constituído por fazenda, ano de nascimento e grupo de manejo antes e após a desmama, além da classe de idade da mãe ao parto (CIMP) foram mantidos em todos os modelos como efeitos fixos.

Os efeitos de covariáveis incluídos no modelo foi o peso ajustado aos 390 dias (PES390) (efeito linear e quadrático), calculado a partir do peso obtido entre 360 e 420 dias de idade, além de todas as combinações possíveis entre o percentual de contribuição das raças de origem N (Zebu), A (Adaptados às condições tropicais), B (Britânicos) e C (Continentais) e a heterose materna, em virtude das diferentes composições raciais presentes na população composta em estudo.

Foram realizadas também análises uni-característica para peso ajustado aos 205 dias de idade (PES205), calculado a partir do peso obtido por ocasião da desmama e para PES390, a fim de se conhecer os componentes de variância e a herdabilidades para estas duas características. Para PES205 incluíram-se os efeitos fixos de grupo de contemporâneo a desmama (GCDES; n=256), constituído por fazenda, ano de nascimento, estação de nascimento e grupo de manejo a desmama, além da CIMP e para o PES390, efeitos fixos de grupo de contemporâneo aos 12 meses (GC12; n=23), constituído por fazenda, ano de nascimento, estação de nascimento e grupo de manejo antes e após a desmama, além da CIMP.

A fim de se obter estimativas de (co)variâncias e correlações genéticas, a PP foi analisada simultaneamente com PES205 e com PES390, em análise bi-característica, incluindo-se ou não os efeitos dos marcadores LHR e FSHR, como efeitos fixos, empregando-se as estimativas de componentes de variâncias obtidos nas análises uni-características.

No modelo misto linear os componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a PP foram estimados pelo método de máxima verossimilhança restrita (REML) utilizando-se o programa MTDFREML – *Multiple Trait Derivative Free Restricted Maximum Likelihood* (BOLDMAN et al., 1995), sob modelo animal.

2.2.2 *Modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)*

No NLMT a PP foi analisada como uma variável dependente categórica, admitindo-se distribuição binomial com função logística e com efeito residual binomialmente distribuído (1 = novilhas prenhes *versus* 0 = novilhas não prenhes).

Diferentes modelos matemáticos foram testados, os quais se diferenciaram pela inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR e do PES390. Efeitos de GCPP e CIMP foram mantidos em todos os modelos como efeitos fixos e, como covariáveis, além do PES390 (efeito linear e quadrático), foram contempladas todas as combinações possíveis entre o percentual de contribuição das raças de origem N, A, B e C e a heterose materna.

As soluções das equações dos diferentes modelos foram obtidas pelo método REML, sob modelo touro, por meio dos procedimentos PROC MIXED do programa SAS (SAS Inst., Inc., Cary NC). Estas análises foram realizadas com auxílio da macro GLIMMIX junto ao programa supracitado. As estimativas dos componentes de (co)variância e de herdabilidade para a PP, foram obtidas por metodologia de análise de componentes de variância bayesiana não-conjugada (NBVC = *nonconjugate bayesian analysis of variance components*).

A NBVC, descrita detalhadamente por Wolfinger e Kass (2000) emprega a metodologia de SMC com *priors* Jeffrey e algoritmo de cadeia independente, para gerar uma amostragem aleatória dos componentes de variância, repetido 10.000 vezes, a partir do conjunto de dados observados. Estas estimativas são então usadas para estimar a função de densidade, que se aproxima dos dados observados para aferir a densidade da distribuição *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a PP, determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística. Por sua vez, para as características PES205 e PES390, a herdabilidade é estimada empregando-se o modelo de distribuição normal, com função de ligação identidade.

Este novo conjunto de dados é utilizado para construir os gráficos da distribuição *a posteriori* da herdabilidade em função da densidade. Para o cálculo da herdabilidade, o valor de variância residual foi corrigido por $\pi^2/3$ como proposto por Southey, Rodrigues-Zaz e Leymaster (2003).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a PP no modelo misto linear, sob modelo animal (LMA)

O objetivo principal deste estudo foi explorar a metodologia REML para quantificar a aparente contribuição de dois marcadores RFLP na variação genética total da característica probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta em novilhas compostas Europeu-Zebu. Na Tabela 3 são mostrados os componentes de variância e parâmetros genéticos para a PP, assumindo-se no modelo a inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR como efeitos aleatórios.

A baixa magnitude observada das estimativas dos componentes de variância mostra que a contribuição dos marcadores RFLP na proporção da variância total da característica fenotípica de interesse, a PP, é muito pequena. Estes resultados indicam que a precocidade sexual estaria mais enquadrada dentro de uma herança poligênica, portanto, outros genes igualmente importantes, além do LHR e FSHR parecem estar envolvidos na manifestação deste evento.

Estas informações são condizentes com resultados anteriores que relataram ausência do efeito de polimorfismos SSCP e RFLP nos genes do LHR e FSHR sobre a precocidade sexual (MILAZZOTTO, 2001; CAMPAGNARI, 2002; MARSON et al., 2004). De acordo com Campagnari (2002) a importância crucial do funcionamento correto destes receptores para a atuação nos mecanismos fisiológicos da reprodução é explicada por se tratar de regiões bastante conservadas entre as espécies domésticas, o que impede alterações fisiológicas importantes mesmo na presença de polimorfismos.

Para Wright (1922), apesar da identificação de genes associados com características de interesse econômico apresentar papel fundamental no melhoramento genético de animais, mesmo que esses apresentem um grande efeito sobre a característica, parte da sua variação deve ser atribuída a outros locos, não sendo, portanto, de herança mendeliana simples. Israel e Weller (1998) acrescentam que assumindo-se que cada loco individual é responsável por somente uma pequena fração da variância genética, um grande número de animais deveria ser genotipado para se detectar um locus de característica quantitativa (QTL), o que se torna inviável frente aos custos e aos procedimentos operacionais envolvidos.

Tabela 3. Componentes de variância e parâmetros genéticos para a probabilidade de prenhez (PP) em análise uni-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos aleatórios

Modelos*	$\hat{\sigma}_a^2$	$\hat{\sigma}_{c1}^2$	$\hat{\sigma}_{c2}^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	$\hat{\sigma}_p^2$	\hat{h}_a^2	\hat{c}_1^2	\hat{c}_2^2	\hat{e}^2
PP	0,05	-	-	0,18	0,23	0,21	-	-	0,79
PP + LHR + FSHR	0,05	0,34E-07	0,24E-07	0,18	0,23	0,21	0,15E-06	0,10E-06	0,79
PP + LHR + FSHR + PES390**	0,03	0,35E-07	0,30E-07	0,17	0,20	0,16	0,18E-06	0,15E-06	0,84

* inclusão dos efeitos fixos de grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP) e classe de idade de mãe ao parto (CIMP) em todas as análises

** inclusão do peso aos 390 dias (PES390) como covariável

$\hat{\sigma}_a^2$ = componente de variância genética aditiva direta;

$\hat{\sigma}_{c1}^2$ = componente de variância associado ao efeito aleatório do marcador LHR;

$\hat{\sigma}_{c2}^2$ = componente de variância associado ao efeito aleatório do marcador FSHR;

$\hat{\sigma}_e^2$ = componente de variância ambiental;

$\hat{\sigma}_p^2$ = componente de variância fenotípica;

\hat{h}_a^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade para efeitos genéticos diretos;

\hat{c}_1^2 = proporção da variância aleatória não correlacionada devida ao efeito do marcador LHR em relação à variância fenotípica;

\hat{c}_2^2 = proporção da variância aleatória não correlacionada devida ao efeito do marcador FSHR em relação à variância fenotípica;

\hat{e}^2 = proporção da variância fenotípica devida ao ambiente.

A simulação computacional ou modelagem matemática vem ao encontro desta problemática servindo como uma ferramenta de alto desempenho e baixo custo, promovendo melhor eficiência em sistemas de produção complexos, onde maiores informações são necessárias à melhor compreensão da análise do impacto nas diferentes estratégias de manejo utilizadas (TESS; KOLSTAD, 2000). De acordo com estes autores, os resultados utilizando-se a técnica SMC têm mostrado que o modelo executa aceitavelmente os tipos de situações para os quais foi projetado, sendo já empregado na predição de características genéticas e determinação de estratégias de seleção.

No presente trabalho, as condições previamente estabelecidas no programa para simular os genótipos das meio-irmãs por Monte Carlo foram testadas posteriormente, já que as informações são distribuídas aleatoriamente ao longo do conjunto de dados. Embora não se tenha demonstrado uma influência significativa dos marcadores RFLP na expressão da característica PP, a simulação promoveu um aumento considerável no banco de dados inicial, o que provavelmente tenha contribuído à obtenção de estimativas mais confiáveis de h^2 , passíveis de serem interpretadas biologicamente.

Recentemente Providelo (2005) desenvolveu um modelo computacional de um rebanho de corte virtual pelo método de Monte Carlo. Os resultados obtidos por esta autora sugerem que o programa de SMC permite o estudo da dinâmica de produção de animais de maneira similar ao que acontece na realidade, sendo um procedimento bastante simples possibilitando simular efetivamente uma população de animais em condições de criação brasileiras.

Recentemente Notter, Cockett e Hadfield (2003) avaliaram a contribuição do gene do receptor da melatonina (MTNR1A) em ovelhas sobre a variação genética da característica fertilidade, caracterizada pelo percentual de fêmeas que pariram, em relação às expostas na estação reprodutiva. Os genótipos para o MTNR1A, identificados por PCR-RFLP, foram incluídos na análise genética como efeitos fixos, sob metodologia de REML, sendo responsáveis por uma contribuição de 23,8% na estimativa total da variância genética aditiva da fertilidade. A h^2 estimada pelos autores para a fertilidade, considerando-se a população de ovelhas adultas (com idade superior a 3 anos ou mais) foi de 0,07.

Em posse destes resultados, os autores supracitados recomendam a inclusão do marcador MTNR1A em programas de seleção para a fertilidade em fêmeas ovinas, considerando-se ser esta

característica de baixa h^2 e limitada ao sexo. Além disso, os autores indicam a utilização do método REML, sob modelo animal, por ter sido o mais apropriado na detecção de efeitos genotípicos e por permitir tanto a incorporação destes efeitos como o dos aditivos e dos residuais, respeitando-se o relacionamento de parentesco entre os animais a serem incluídos na análise.

A herdabilidade de efeito aditivo direto (\hat{h}_a^2) estimada no presente estudo para a PP por LMA foi de 0,21, podendo ser considerada moderada, mesmo diante do limitado número de informações contido no banco de dados avaliado. Evans et al. (1999), no entanto, embora tenham pregado um procedimento analítico mais adequado do que o LMA para variáveis categóricas, encontraram uma herdabilidade menor, de $0,14 \pm 0,09$ para a PP14 em novilhas Hereford.

Algumas justificativas auxiliam na compreensão destes resultados. O modelo animal, embora não seja considerado o mais apropriado para análise de dados categóricos pode ser utilizado para este fim porque incorpora, em sua estrutura, todas as informações do pedigree dos animais, condição esta não observada quando se emprega o modelo touro.

Outro dado muito importante refere-se ao conceito explicado pelo Teorema Central do Limite (TCL), que preconiza que à medida em que o tamanho da amostra aumenta, a distribuição amostral das médias amostrais tende para uma distribuição normal (TRIOLA, 1998), o que explica o aparecimento frequente desta distribuição na natureza. Adotando-se o procedimento descrito por Triola (1998) de aproximação da distribuição binomial por uma normal, no conjunto de dados aqui investigados, constatou-se que a variável aleatória binomial PP estudada apresenta distribuição aproximadamente normal, confirmando a adequação dos dados ao modelo misto linear explorado.

Martinez et al. (2003) reportaram baixas estimativas de h^2 ($0,16 \pm 0,04$) para a idade à puberdade, obtida pela idade por ocasião do primeiro estro ovulatório, em novilhas taurinas puras e compostas, pelo método REML, sob modelo animal, sugerindo que o ambiente e possivelmente fontes de variação genéticas não aditivas exercem maiores influências na expressão desta característica.

Splan, Cundiff e Van Vleck (1998) não conseguiram explicar as diferenças obtidas nas estimativas de h^2 encontradas para duas características categóricas, avaliadas em uma escala normal e binomial, pelo método REML sob modelo touro. Tanto para taxa de parição (TP; caracterizada como 1 para novilhas que pariram um bezerro vivo e 0, para aquelas que falharam),

como para dificuldade ao parto (DP, classificada como 0 para as novilhas que não mostraram dificuldades no momento do parto e 1 para aquelas que requereram alguma intervenção) as h^2 encontradas por estes autores foram mais elevadas quando expressas em uma escala normal (0,19 e 0,18) do que quando expressas em escala binomial (0,09 e 0,11), respectivamente para a TP e DP.

Para Matos et al. (1997b) os modelos mistos não lineares de limiar (*threshold*), embora apresentem uma vantagem teórica sobre os modelos mistos lineares para características discretas, podem não produzir melhores estimativas. Matos et al. (1997b) acrescentam que a ocorrência de diferentes escalas numéricas entre os modelos para dados contínuos e para dados binários, dificulta a comparação entre eles.

Em um rebanho da raça Charolesa, Phocas e Laloë (2003) investigaram dois modelos mistos, o linear e o não linear (*threshold*) para comparar estimativas de h^2 e predição de valores genéticos para a DP. As herdabilidades encontradas sob o modelo linear e o *threshold* foram de 0,14 e 0,27, respectivamente. Embora o melhor modelo sob um ponto de vista teórico frente à característica categórica analisada seja o *threshold*, o modelo linear foi escolhido entre os autores como a melhor escolha prática para predição dos efeitos genéticos diretos da DP, por gerar estimativas menos viesadas quando da análise de rebanhos pequenos.

Enquanto que os dados de parição somente são fornecidos após o parto, as informações de prenhez são conhecidas em até 60 dias após a estação reprodutiva, por ocasião do diagnóstico de gestação. Eler et al. (2004) ressaltam que os dados de prenhez têm se mostrado melhores que os dados parição como critério de seleção para a precocidade sexual devido a sua elevada herdabilidade e mensuração precoce.

A inclusão do PES390 como efeito de covariável no modelo reduziu a estimativa de h^2 da PP de 0,21 para 0,16 (Tabela 3), sugerindo que peso corporal é um dos fatores que influenciam a prenhez e portanto, torna-se importante controlar seu efeito no modelo. De acordo com Marson, Guimarães e Tamires Neto (2004) a manutenção de ganhos de peso adequados antes e após a desmama torna-se prioritário à manifestação precoce da puberdade, bem como de subseqüentes ciclos estrais normais, otimizando a probabilidade da novilha se tornar prenhe durante sua primeira estação de monta.

Pela análise da Tabela 4 observa-se que a inclusão dos marcadores RFLP LHR e FSHR na análise da PP, como efeitos fixos, gerou estimativas de componentes de variância e h^2 exatamente similares às aquelas encontradas quando os mesmos foram incluídos como efeitos aleatórios (Tabela 3).

Interpretando resultados obtidos por simulação computacional, Kennedy, Quinton e van Arendonk (1992) relataram conclusões importantes para estudos que avaliam os efeitos de genes. Segundo estes autores tais estudos podem envolver populações fechadas, onde a seleção pode ser praticada, e para características quantitativas alvo, influenciadas de uma forma poligênica, entretanto a análise usual de tais dados, por mínimos quadrados ordinários pode gerar efeitos significativos de genes, quando na verdade eles não existiriam.

O viés observado nestes casos depende da herdabilidade da característica poligênica, da intensidade de seleção, do modo de herança, da magnitude do efeito do gene, da frequência gênica e estrutura dos dados, ressaltam os autores supracitados. Deste modo, quando se consegue trabalhar com informações de genótipos de todos os indivíduos com observações da característica, o uso de modelo misto sob modelo animal tratando os efeitos de genes como efeitos fixos podem fornecer estimativas não viesadas dos efeitos dos genes (KENNEDY; QUINTON; van ARENDONK, 1992).

Tabela 4. Componentes de variância e parâmetros genéticos para a característica probabilidade de prenhez (PP) em análise uni-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos fixos

Modelos*	$\hat{\sigma}_a^2$	$\hat{\sigma}_e^2$	$\hat{\sigma}_p^2$	\hat{h}_a^2	\hat{e}^2
PP	0,05	0,18	0,23	0,21	0,79
PP + LHR + FSHR	0,05	0,18	0,23	0,21	0,79
PP + LHR + FSHR + PES390**	0,03	0,17	0,20	0,16	0,84

* inclusão dos efeitos fixos de grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP) e classe de idade de mãe ao parto (CIMP) em todas as análises;

** inclusão do peso aos 390 dias (PES390) como covariável

$\hat{\sigma}_a^2$ = componente de variância genética aditiva direta; $\hat{\sigma}_e^2$ = componente de variância ambiental; $\hat{\sigma}_p^2$ = componente de variância fenotípica; \hat{h}_a^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade para efeitos genéticos diretos; \hat{e}^2 = proporção da variância fenotípica devida ao ambiente.

Os componentes de (co)variâncias e parâmetros genéticos (herdabilidades e correlações genéticas) estimados em análise bi-característica por REML entre PP e pesos corporais (PES205 e PES390), incluindo-se ou não os efeitos de marcadores são mostrados na Tabela 5.

A inclusão dos marcadores LHR e FSHR em análise bi-característica também não modificou as magnitudes dos componentes de variância e h^2 obtidos quando os mesmos não foram incluídos. As estimativas de h^2 para a PP com o PES205 e com o PES390, foram de 0,19 e 0,20, respectivamente, ligeiramente menores do que a observada em análise uni-característica (0,21). Entretanto, esta pequena diferença não inviabiliza a possibilidade de se avaliar a PP por análise bi-característica, principalmente quando se observa a h^2 mais baixa (0,16), obtida na análise uni-característica quando incluiu-se o efeito do PES390 como covariável. Estes resultados sugerem a avaliação da característica PP incluindo-se o PES390 como âncora em análise bi-característica.

Eler et al. (2004) também recomendaram a análise bi-característica, sob modelo animal, incorporando-se a medida de circunferência escrotal (CE) de machos, para aumentar a acurácia de predição de estimativas para a PP14 na raça Nelore. As estimativas de h^2 obtidas por estes autores, pelo Método \mathfrak{R} , em análise uni-característica foram de $0,61 \pm 0,10$ e $0,68 \pm 0,09$, respectivamente, incluindo-se (CG2) ou não (CG1) o grupo de manejo da novilha no grupo de contemporâneo. Por sua vez, quando análise bi-característica foi efetuada, os autores obtiveram h^2 mais elevadas, de $0,63 \pm 0,08$ e $0,69 \pm 0,09$, respectivamente para CG2 e CG1.

Verificou-se no presente estudo que a h^2 estimada para o PES390 foi menor (0,22) do que a obtida para o PES205 (0,46) (Tabela 5), entretanto a correlação genética entre PP e PES390 foi mais elevada (0,56) do que a correlação entre PP e PES205 (0,45). Estes resultados confirmam a influência positiva do peso corporal à obtenção de melhores taxas de prenhez, o que justifica a adoção de estratégias de manejo nutricional que viabilizem a obtenção de ganhos de pesos adequados antes e após a desmama em sistemas de produção de novilhas de corte.

Tabela 5. Componentes de (co)variância e parâmetros genéticos para a característica probabilidade de prenhez (PP), peso ajustado aos 205 dias (PES205) e peso ajustado aos 390 dias (PES390) em análise bi-característica, pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo animal, incluindo-se os marcadores RFLP (LHR e FSHR) como efeitos fixos

Modelos*	$\hat{\sigma}_{a1}^2$	$\hat{\sigma}_{a2}^2$	$\hat{\sigma}_{a1a2}^2$	$\hat{\sigma}_{e1}^2$	$\hat{\sigma}_{e2}^2$	$\hat{\sigma}_{e1e2}^2$	$\hat{\sigma}_{p1}^2$	$\hat{\sigma}_{p2}^2$	$\hat{\sigma}_{p1p2}^2$	\hat{h}_{a1}^2	\hat{h}_{a2}^2	\hat{r}_{a1a2}	\hat{e}_{a1}^2	\hat{e}_{a2}^2	\hat{r}_{e1e2}
PES205 + PP	231,58	0,04	1,41	266,59	0,18	0,48	498,17	0,23	1,88	0,46	0,19	0,45	0,54	0,81	0,07
PES390 + PP	131,44	0,05	1,39	471,56	0,18	0,70	603,01	0,23	2,10	0,22	0,20	0,56	0,78	0,80	0,08
PES205 + PP + LHR + FSHR	231,89	0,04	1,40	266,36	0,18	0,48	498,25	0,23	1,88	0,47	0,19	0,45	0,53	0,81	0,07
PES390 + PP + LHR + FSHR	131,81	0,05	1,39	471,31	0,18	0,70	603,12	0,23	2,10	0,22	0,20	0,56	0,78	0,80	0,08

* inclusão dos efeitos fixos de grupo de contemporâneo a desmama (GCDES) e classe de idade de mãe ao parto (CIMP) na característica PES205; inclusão dos efeitos fixos de grupo de contemporâneo aos 12 meses (GC12) e CIMP na característica PES390; inclusão dos efeitos fixos de grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP) e CIMP na PP.

$\hat{\sigma}_{a1}^2$ = componente de variância genética aditiva direta de pesos (PES205 ou PES390);

$\hat{\sigma}_{a2}^2$ = componente de variância genética aditiva direta de PP;

$\hat{\sigma}_{a1a2}^2$ = covariância entre os efeitos genéticos aditivos de pesos e PP;

$\hat{\sigma}_{e1}^2$ = componente de variância ambiental de pesos;

$\hat{\sigma}_{e2}^2$ = componente de variância ambiental de PP;

$\hat{\sigma}_{e1e2}^2$ = covariância entre os efeitos ambientais de pesos e PP;

$\hat{\sigma}_{p1}^2$ = componente de variância fenotípica de pesos;

$\hat{\sigma}_{p2}^2$ = componente de variância fenotípica de PP;

$\hat{\sigma}_{p1p2}^2$ = covariância entre os efeitos fenotípicos de pesos e PP;

\hat{h}_{a1}^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade para efeito genético direto de pesos;

\hat{h}_{a2}^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade para efeito genético direto de PP;

\hat{r}_{a1a2} = correlação genética entre efeitos genéticos direto de pesos e PP;

\hat{e}_{a1}^2 = proporção da variância fenotípica devida ao ambiente de pesos;

\hat{e}_{a2}^2 = proporção da variância fenotípica devida ao ambiente de PP;

\hat{r}_{e1e2} = correlação genética entre efeitos fenotípicos devida ao ambiente de pesos e PP

3.2 Componentes de (co)variância e herdabilidade para a PP no modelo misto não linear, sob modelo touro (NLMT)

No NLMT, a PP foi analisada como uma característica categórica, admitindo-se uma distribuição binomial, sob diferentes modelos matemáticos, que diferiram, basicamente, pela inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR. A Tabela 6 apresenta o resumo da análise de variância para a variável PP estimada por meio do PROC MIXED, pelo método REML, no modelo mais completo avaliado, incluindo-se todas as fontes de variação testadas, excetuando-se as diferentes combinações N, A, B e C.

Tabela 6. Resumo da análise de variância para a probabilidade de prenhez (PP), para as diferentes fontes de variação (FV), sob modelo touro

FV ¹	PP	
	GL ²	F ³
TOUROS	41	--
LHR	2	1,22 ^{ns}
FSHR	2	0,21 ^{ns}
GCPP	9	6,80*
CIMP	7	0,00 ^{ns}
PES390	1	50,75*
PES390_2	1	40,52*
Hetmat	1	0,82 ^{ns}
RESÍDUO	2.627	--

¹ Fontes de variação testadas no modelo: LHR e FSHR = marcadores RFLP, respectivamente para os genes LHR e FSHR; GCPP = grupo de contemporâneo à prenhez; CIMP = classe de idade da mãe ao parto; PES390 = peso ajustado aos 390 dias de idade (covariável, efeito linear); PES390_2 = peso ajustado aos 390 dias de idade (covariável, efeito quadrático); Hetmat = heterose materna (covariável)

² Graus de liberdade

³ Valores de F para testar os efeitos fixos

* Significativo ($P < 0,05$); ns = não significativo ($P > 0,05$)

Dentre os efeitos fixos testados apenas o GCPP se mostrou significativo, não se constatando efeito dos marcadores RFLP LHR e FSHR para a variável PP. O PES390, adotado como covariável, foi significativo, em ambos efeitos linear e quadrático, sendo mantido em todas as análises efetuadas.

Na Tabela 7 são mostrados os componentes de variância e parâmetros genéticos para PES205 e PES390 e para a PP, assumindo-se no modelo a inclusão ou não dos marcadores LHR e FSHR, bem como a da covariável PES390. A h^2 estimada para a PP, sob NLMT foi de 0,41, apresentando-se bem mais elevada do que a obtida na análise via LMA, como também

constatado pelas estimativas h^2 obtidas para PES205 (0,64) e PES390 (0,26) no NLMT. Similarmente ao constatado no modelo linear, constatou-se que as estimativas de h^2 obtidas no modelo não linear não se alteraram, quando procedeu-se à inclusão ou não dos marcadores RFLP no modelo.

É importante ressaltar que no modelo animal, toda a matriz de parentesco é considerada, enquanto que no modelo touro somente o parentesco entre touros é considerado, o que pode gerar estimativas de h^2 superestimadas.

Tabela 7. Componentes de variância e parâmetros genéticos para o peso ajustado aos 205 dias de idade (PES205), peso ajustado aos 390 dias de idade (PES390) e probabilidade de prenhez (PP), incluindo-se ou não os marcadores RFLP (LHR e FSHR), estimados pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML), sob modelo touro

Modelos*	$\hat{\sigma}_A^2$	$\hat{\sigma}_E^2$	\hat{h}^2
PES205*	361,4600	470,30	0,64
PES390*	155,0044	564,86	0,26
PP*	1,5044	3,2865	0,41
PP + PES390**	0,6324	3,2865	0,18
PP + LHR + FSHR	1,5044	3,2865	0,41
PP + LHR + FSHR + PES390**	0,6324	3,2865	0,18

* inclusão dos efeitos fixos de classe de idade de mãe ao parto (CIMP) em todos os modelos e de grupo de contemporâneo à desmama (GCDES) para o PES205; grupo de contemporâneo aos 12 meses (GC12) para o PES390 e grupo de contemporâneo à prenhez (GCPP) para a PP;

** inclusão do peso aos 390 dias (PES390) como covariável

$\hat{\sigma}_A^2$ = componente de variância genética aditiva direta; $\hat{\sigma}_E^2$ = componente de variância ambiental; \hat{h}^2 = estimativa do coeficiente de herdabilidade

A inclusão do PES390 como efeito de covariável no modelo reduziu a h^2 da PP de 0,41 para 0,18 (Tabela 7), concordando com os resultados obtidos na análise sob LMA, confirmando novamente a importância de se controlar o peso corporal na avaliação da PP.

As Figuras mostradas em ANEXOS A e B, revelam as densidades *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a probabilidade de prenhez (PP), no modelo que inclui os marcadores RFLP LHR e FSHR (Figura 1) e no modelo que inclui os efeitos de marcadores RFLP e o PES390, como covariável (Figura 2). Ressalta-se que as h^2 visualizadas nas figuras supracitadas, referem-se às médias de 10.000 estimativas de distribuições *a posteriori* dos componentes de variância de touro e erro, obtidos por amostragem de cadeia independente.

Estimativas de h^2 mais elevadas são esperadas quando se utilizam de procedimentos analíticos adequados para variáveis de natureza categórica. Esta foi a conclusão comum relatada por vários autores que trabalharam com a característica PP14 em novilhas, empregando-se um modelo de limiar (*threshold*) ou probit de máximo *a posteriori* (GIANOLA; FOULLEY, 1983), sob modelo animal e o Método \Re (REVERTER et al., 1994), para estimação dos componentes de variância (EVANS et al., 1999; DOYLE et al., 2000; ELER et al., 2002 e ELER et al., 2004).

De acordo com Gianola e Fouley (1983) o modelo *threshold* trata-se de um modelo linear generalizado, ligado a uma distribuição binomial com uma função de ligação probit, que pode ser implementado no SAS com a ajuda da macro GLIMMIX. Modelos *threshold* têm se mostrado mais adequados, pelo menos teoricamente, à análise de dados categóricos, sendo capazes de capturar uma maior proporção da variação genética do que seria possível com a metodologia linear (MATOS et al., 1997a)

Para Evans et al. (1999) a PP14 pode ser considerada uma característica de herdabilidade moderada na raça Hereford, ao relatarem valores de $0,14 \pm 0,09$ para esta estimativa. Contudo, as estimativas mais elevadas de h^2 que foram sendo posteriormente obtidas ($0,21 \pm 0,12$ por DOYLE et al., 2000 em novilhas Angus; $0,57 \pm 0,10$ por ELER et al., 2002 e $0,68 \pm 0,09$ por ELER et al., 2004, ambos na raça Nelore), motivaram os autores a indicarem a PP14 como critério de seleção de novilhas para a precocidade sexual.

Eler et al. (2002) explicam que estimativas de h^2 mais elevadas para a PP14 são esperadas na raça Nelore em comparação à população de origem *Bos taurus*. Uma das razões refere-se a idade à puberdade que já é atingida precocemente em taurinos, em média, aos 14 meses de idade, o que reduz a variabilidade genética para esta característica, ao contrário do que se observa na raça Nelore, que devido a manifestação mais tardia da puberdade, apresentará maior variabilidade genética para este evento.

Esta diferença pode ser constatada quando se compara o percentual de novilhas prenhes aos 14 meses de idade (probabilidade de sucesso ou 1) nas populações Hereford (78%) e Angus (89%) investigadas por Evans et al. (1999) e Doyle et al. (2000), respectivamente, com o percentual obtido por Eler et al. (2002), de 20% na população de novilhas Nelore. Deste modo compreende-se que na presença de pequena variância genética aditiva, baixas h^2 são esperadas.

Neste raciocínio, torna-se conveniente também comparar o número total de informações, ou seja, o tamanho do banco de dados utilizado pelos diferentes autores supracitados para estimação dos parâmetros genéticos para a PP14 (861, 1299 e 11.487 animais avaliados, respectivamente, para EVANS et al., 1999; DOYLE et al., 2000 e ELER et al., 2002), que seguramente influencia a confiabilidade dos resultados encontrados. Assim, torna-se importante lembrar que a herdabilidade não é só uma propriedade da característica, mas também da população, assim como das condições ambientais em que os indivíduos se desenvolvem e da forma como se avalia o fenótipo (FALCONER; MACKAI, 2001).

Os esforços gerados pelas pesquisas atuais têm mostrado uma nova tendência de integração de informações fenotípicas, de pedigree e moleculares por meio de análise de segregação por modelos mistos. Estes podem conter efeitos de genes ou de QTL (por meio dos marcadores) para características sob herança poligênica, associados ao uso de métodos poderosos e flexíveis de estimação e simulação (MONTALDO; MEZA-HERRERA, 1998).

É importante ressaltar as considerações de Bourdon (1999a) que admitem que as características de herança poligênica tenham sido selecionadas por seleção natural ou artificial há muito tempo, o que favorece a presença de elevada frequência de genes favoráveis, os quais contribuirão muito pouco para a variação da característica, tornando menos ineficazes os programas de seleção com base em informações de marcadores.

4. CONCLUSÕES

As estimativas de herdabilidade obtidas para a probabilidade de prenhez por ocasião da primeira estação de monta, por modelo misto linear ou não linear foram consideradas moderadas a elevadas, indicando-se a inclusão desta característica em programas de seleção de novilhas para a precocidade sexual.

Entretanto, não se sugere a inclusão dos marcadores RFLP LHR e FSHR nestas avaliações, pela pequena contribuição dos mesmos à variação genética total da prenhez, na população composta Europeu-Zebu aqui estudada, indicando ser a prenhez uma característica de herança poligênica. Deste modo, outros genes igualmente importantes devem estar relacionados à manifestação fisiológica deste evento.

O peso corporal influencia positivamente à obtenção de melhores taxas de prenhez, o que justifica a adoção de estratégias de manejo nutricional que viabilizem a obtenção de ganhos de pesos adequados antes e após a desmama em sistemas de produção de novilhas de corte.

6. CONCLUSÕES GERAIS

A variabilidade genética observada na população de novilhas compostas Europeu-Zebu, constatada pelo elevado número de animais heterozigotos observados e pelos valores médios obtidos de heterozigosidade, viabiliza a exploração destes animais em cruzamentos.

A precocidade sexual, caracterizada pela probabilidade de prenhez na primeira estação de monta, não se mostrou influenciada pelo efeito dos polimorfismos RFLP aqui investigados, nos genes do LHR e FSHR, resultados que não justificam a seleção de novilhas precoces, com base em sua informação genotípica para estes genes em programas de melhoramento genético na população composta Europeu-Zebu aqui estudada. A pequena contribuição dos marcadores RFLP LHR e FSHR na variação genética total desta característica, ratifica estas afirmações.

Contudo, a metodologia PCR-RFLP possibilitou a identificação dos genótipos, bem como a caracterização da heterozigose, indicando-se a exploração dos marcadores LHR e FSHR, considerados informativos, em estudos de caracterização genética em outras populações. As diferenças observadas entre frequências alélicas nas diferentes composições raciais Europeu-Zebu estudadas, reforçam o interesse de investigação destes marcadores em diferentes rebanhos bovinos.

REFERÊNCIAS

- AHLGREN, R. et al. Characterization of the promoter/regulatory region of the bovine CYP11A (P-450-scc) gene: Basal and cAMP-dependent expression. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v.265, n.6, p.3313-3319, Feb. 1990. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>; Genbank accession number: J05245. Acesso em: 20 nov. 2002.
- AITTOMAKI, K. et al. Mutation in FSH receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. **Cell**, Cambridge, v.82, n.6, p.959-968, Sept. 1995.
- ALBUQUERQUE, L.G.; FRIES, L.A. Precocidade: estratégias de seleção. In: SIMPÓSIO O NELORE DO SÉCULO XXI, 4., 1997, Uberaba. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1997. p.164-179.
- ALMEIDA, S.E.M. et al. Genetic diversity in Brazilian bovine herd based on four microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.23, n.2, p.345-350, June 2000.
- _____. Molecular markers in the *LEP* gene and reproductive performance of beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v.120, n.2, p.106-113, Apr. 2003.
- ANDRÉA, M.V. **Marcadores moleculares associados à precocidade sexual de novilhas da raça Nelore**. Ribeirão Preto: FMRP-USP, 2002. Relatório parcial de pesquisa em nível Pós Doutorado.
- ANDRÉA, M.V. et al. Marcadores moleculares associados à precocidade sexual de novilhas da raça Nelore. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3., 2000, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2000. p.427-429.
- ARNHOLD, I.J.P. et al. Menstrual disorder and infertility caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v.71, n.4, p.597-601, Apr. 1999.
- BARBOSA, P.F. Critérios de seleção para a raça Canchim. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 3., 1997, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA-CPPSE; ABCCAN, 1997. p.47-76.
- BENNEWITZ, J. et al. Top down preselection using marker assisted estimates of breeding values in dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v.121, n.5, p.307-318, Oct. 2004.

- BERGFELD, E.G.M. et al. Ovarian follicular development in prepubertal heifers is influenced by level of dietary energy intake. **Biology of Reproduction**, Champaign, v.51, n.5, p.1051-1057, Nov. 1994.
- BERGMANN, J.A.G. Seleção de zebuínos para precocidade sexual. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., 1999, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 1999. p.51-64.
- BEUZEN, N.D.; STEAR, M.J.; CHANG, K.C. Molecular markers and their use in animal breeding. **Veterinary Journal**, London, v.160, n.1, p.42-52, July 2000.
- BISHOP, M.D.; HAWKINS, G.A.; KEEFER, C.L. Use of DNA markers in animal selection. **Theriogenology**, Los Altos, v.43, n.1, p.61-70, Jan. 1995.
- BOLDMAN, K. et al. **A manual for use for MTDFREML**. A set of programs to obtain estimates of variance and covariance. Lincoln: USDA/Agricultural Research Service, 1995.
- BOURDON, R. Biotechnology and composite cattle breeding. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.118-120, abr./jun.1999a.
- _____. Composites 101. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.122-127, abr./jun. 1999b.
- BYERLEY, D.J. et al. Pregnancy rates of beef heifers bred either on puberal or third estrus. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.65, n.3, p.645-650, Sept. 1987.
- CAMPAGNARI, F. **Novas variantes moleculares dos genes dos receptores do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio folículo estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.
- CARVALHO, M.E. et al. Caracterização da heterozigose no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) em animais da raça Nelore. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004. CD-ROM.
- CHAN, W.Y. Molecular genetic, biochemical, and clinical implications of gonadotropin receptor mutations. **Molecular and Genetics and Metabolism**, San Diego, v.63, n.2, p.75-84, Feb. 1998.

COUNIS, R. Les gènes des hormones gonadotropes hypophysaires et leurs régulations. **Annales D' Endocrinologie**, Paris, v.51, n.1, p.72-81, 1990.

CUNDIFF, L.V.; GREGORY, K.E. Searching for new genetic resources for composite populations. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.4, p.549-563, out./dez. 1999.

DAVID, R. et al. A syndrome of gonadotropin resistance possibly due to a luteinizing hormone receptor defect. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Baltimore, v.59, n.1, p.156-160, July 1984.

DAVIS, G.P.; DeNISE, S.K. The impact of genetic markers on selection. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.76, n.9, p.2331-2339, Sept. 1998.

DEMÉTRIO, C.G.B. **Modelos lineares generalizados em experimentação agrônômica**. Piracicaba: ESALQ-USP, 2002. Apostila.

DOYLE, S.P. et al. Additive genetic parameter estimates for heifer pregnancy and subsequent reproduction in Angus females. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, n.8, p.2091-2098, Aug. 2000.

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

ELER, J.P. **Teorias e métodos em melhoramento genético animal**. Pirassununga: FZEA-USP, 2001. Apostila.

ELER, J.P. et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.82, n.9, p.2519-2527, Sept. 2004.

_____. Genetic evaluation of the probability of pregnancy at 14 months for Nelore heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.80, n.4, p.951-954, Apr. 2002.

_____. Precocidade sexual na raça Nelore - DEPs para probabilidade de prenhez de novilhas. In: SEMINÁRIO PROGRAMA DE MELHORAMENTO DA RAÇA NELORE, 9., 2000, Ribeirão Preto. **Anais...** Ribeirão Preto: FMRP-USP, 2000. CD-ROM.

EVANS, A.C.O.; ADAMS, G.P.; RAWLINGS, N.C. Endocrine and ovarian follicular changes leading up to the first ovulation in prepubertal heifers. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.100, n.1, p.187-194, Jan. 1994.

EVANS, J.L. et al. Additive Genetic Relationships Between Heifer Pregnancy and Scrotal Circumference in Hereford Cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.77, n.10, p.2621-2628, Oct. 1999.

FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introducción a la genética cuantitativa**. 4.ed. Zaragoza: Ed. Acribia, 2001.

FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P. Desenvolvimento de bovinos de corte compostos no Brasil: o desafio do projeto Montana Tropical. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 3., 2000, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: FEPMVZ, 2000. p.100-104.

_____. Seleção de zebuínos para características produtivas. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., 1999, Viçosa, MG. **Anais...** Viçosa: UFV, 1999. p.29-50.

FERRAZ, J.B.S.; ELER, J.P.; GOLDEN, B.L. A formação do composto Montana Tropical. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.115-117, abr./jun. 1999a.

_____. Análise genética do composto Montana Tropical. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.111-113, abr./jun. 1999b.

FRIES, L.A. Prenhez aos catorze meses: presente e futuro. Elementos do componente genético. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 36., 1999, Porto Alegre. **Anais...** Porto Alegre: SBZ, 1999. CD-ROM.

FURBASS, R.; KALBE, C.; VANSELOW, J. Tissue-specific expression of the bovine aromatase-encoding gene uses multiple transcriptional start sites and alternative first exons. **Endocrinology**, Baltimore, v.138, n.7, p.2813-2819, July 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>; Genbank accession number: Z69250. Acesso em: 20 nov. 2002.

GAMERMAN, D. **Markov Chain Monte Carlo Stochastic Simulation for Bayesian Inference**. London: Chapman & Hall, 1997.

GARVERICK, H.A.; SMITH, M. Female reproductive physiology and endocrinology of cattle. **The Veterinary Clinics of North America**. Food Animal Practice, Philadelphia, v.9, n.2, p.223-246, July 1993.

GIANOLA, D. Genetic evaluation of animals for traits with categorical responses. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.51, n.6, p.1272-1276, Dec. 1980.

GIANOLA, D.; FOULLEY, J.L. Sire evaluation for ordered categorical data with a threshold model. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.15, n.2, p.201-224, 1983.

GLENCROSS, R.G. A note on the concentrations of plasma oestradiol -17 β and progesterone around the time of puberty in heifers. **Animal Production**, Edinburgh, v.39, n.1, p.137-140, 1984.

GREGORY, K.E.; CUNDIFF, L.V. Breeding programs to use heterosis and breed complementarity. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.23, n.2, p.65-77, abr./jun. 1999.

GREGORY, K.E.; CUNDIFF, L.V.; KOCH, R.M. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for growth traits in both sexes of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.69, n.8, p.3202-3212, Aug. 1991.

_____. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for reproduction and maternal traits of beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.3, p.656-672, Mar. 1992.

GROMOLL, J. et al. Functional and clinical consequences of mutations in FSH receptor. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.125, n.1-2, p.177-182, Dec. 1996.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, Washington, v.48, n.2, p.361-372, June 1992.

HEGER, S.; SIPPELL, W.G.; PARTSCH, C.J. Gonadotropin-releasing hormone analogue treatment for precocious puberty. Twenty years of experience. **Endocrine Development**, Basel, v.8, p.94-125, 2005.

HESS, B.W. Estratégias para antecipar a puberdade em novilhas. In: NOVOS ENFOQUES NA PRODUÇÃO E REPRODUÇÃO DE BOVINOS, 6., 2002, Uberlândia. **Anais...** Uberlândia: CONAPEC Jr., 2002. p.118-126.

HOUDE, A. et al. Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v.39, n.2, p.127-135, Oct. 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>; Genbank accession number: L22319. Acesso em: 20 nov. 2002.

ISRAEL, C.; WELLER, J.I. Estimation of candidate gene effects in dairy cattle populations. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.81, n.6, p.1653-1662, June 1998.

KENNEDY, B.W.; QUINTON, M.; VAN ARENDONK, J.A.M. Estimation of effects of single genes on quantitative traits. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.7, p.2000-2012, July 1992.

KINDER, J.E. et al. Endocrine basis for puberty in heifers and ewes. **Journal of Reproduction and Fertility: Supplement**, Oxford, v.49, p.393-407, 1995.

LANNA, D.P.; DELGADO, E.F. Eficiência biológica e econômica de bovinos de corte. In: CONVENÇÃO NACIONAL DA RAÇA CANCHIM, 4., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: EMBRAPA-CPPSE; ABCCAN, 2000. p.14-39.

LASTER, D.B. et al. Characterization of biological types of cattle (cycle II). II. Postweaning growth and puberty of heifers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.48, n.3, p.500-508, Mar. 1979.

LAUBER, M.E. et al. cAMP-dependent and tissue-specific expression of genes encoding steroidogenic enzymes in bovine luteal and granulosa cells in primary culture. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Ireland, v.93, n.2, p.227-233, June 1993.

LESMEISTER, J.L.; BURFENING, P.J.; BLACKWELL, R.L. Date of first calving in beef cows and subsequent calf production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.36, n.1, p.1-6, Jan. 1973.

LEVALLET, J.; PAKARINEN, P.; HUHTANIEMI, I.T. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. **Archives of Medical Research**, Mexico, v.30, n.6, p.486-494, Nov./Dec. 1999.

LUSSIER, J.G. et al. Complementary DNA structure of the bovine LH receptor. Dados não publicados. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide>>, Genbank accession number: U20504. Acesso em: 20 nov. 2002

MACHADO, M.A. et al. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.32, n.1, p.93-98, fev. 2003.

MARSON, E.P. **Características reprodutivas e produtivas em novilhas compostas Montana Tropical**. 2000. 177 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2000.

MARSON, E.P.; GUIMARÃES, J.D.; MIRANDA NETO, T. Puberdade e maturidade sexual em novilhas de corte. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.28, n.1, p.36-12, jan./mar. 2004.

MARSON, E.P. et al. Efeito dos polimorfismos dos genes do LHR e do FSHR sobre a precocidade sexual em novilhas de corte de diferentes composições raciais. In: SIMPÓSIO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MELHORAMENTO ANIMAL, 5., 2004, Pirassununga. **Anais...** Pirassununga: SBMA, 2004. CD-ROM.

MARTIN, L.C. et al. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.12, p.4006-4017, Dec. 1992.

MATOS, C.A.P. et al. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: I. Estimation of genetic parameters. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p.76-87, Jan. 1997a.

_____. Genetic analysis of discrete reproductive traits in sheep using linear and nonlinear models: II. Goodness of fit and predictive ability. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 78, p.88-94, Jan. 1997b.

MEUWISSEN, T.H.E.; GODDARD, M.E. The use of marker-haplotypes in animal breeding schemes. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v.28, n.1, p.161-176, Jan./Feb. 1996.

MILAZZOTTO, M.P. **Mutações no gene do receptor do hormônio luteinizante (LHR) bovino e associação com precocidade sexual em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. 2001. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2001.

MILLER, M.P. **Tools for population genetic analyses (TFPGA) (version 1.3)**: a Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. [S.l.: s.n.], 1997. Computer software distributed by author.

MILLER, W.L. Molecular biology of steroid hormone synthesis. **Endocrine Reviews**, Baltimore, v.9, n.3, p.295-318, Aug. 1998.

MOIOLI, B.; NAPOLITANO, F.; CATILLO, G. Genetic diversity between Piedmontese, Maremmana, and Podolica cattle breeds. **Journal of Heredity**, Washington, v.95, n.3, p.250-256, May/June 2004.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnoloty**, Valparaíso, v.1, n.2, p.83-89, Ago. 1998.

MORAN, C.; QUIRKE, S.J.; ROCHE, J.F. Puberty in heifers: a review. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.18, n.1-3, p.167-182, Feb. 1989.

NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.70, n.12, p.3321-3323, Dec. 1973.

NOLAN, C.J.; PAYNE, A.H. Genotype at the P450scc locus determines differences in the amount of P450scc protein and maximal testosterone production in mouse Leydig cells. **Molecular Endocrinology**, Bethesda, v.4, n.10, p.1459-1464, Oct. 1990.

NOTTER, D.R.; COCKETT, N.E.; HADFIELD, T.S. Evaluation of *melatonin receptor 1a* as a candidate gene influencing reproduction in an autumn-lambing sheep flock. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.4, p.912-917, Apr. 2003.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens**, Copenhagen, v.39, n.5, p.225-235, May 1992.

PEREIRA, E.; ELER, J.P.; FERRAZ, J.B.S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, vol.37, n.5, p.703-708, maio, 2002.

PHOCAS, F.; LALOË, D. Evaluation models and genetic parameters for calving difficulty in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.4, p.933-938, Apr. 2003.

PROVIDELO, F.D. **Modelo computacional de um rebanho bovino de corte virtual utilizando simulação Monte Carlo e redes neurais artificiais.** 2005. 104f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, SP, 2005.

RAHAL, P. et al. Polymorphism in the bovine follicle-stimulating hormone receptor gene. **Animal Genetics**, Oxford, v.31, n.4, p.280-281, Aug. 2000.

RAYMOND, M.; ROUSSET, F. GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **The Journal of Heredity**, Washington, v.86, n.3, p.248-249, May, 1995.

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal.** Brasília: Embrapa informação tecnológica, 2001. p.179-186.

REVERTER, A. et al. Method R variance components procedure: Application of the simple breeding value model. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.72, n.9, p.2247–2253, Sep. 1994.

SAS INSTITUTE INC. **User's guide.** Cary, NC, 2000. Version 8.

SCHILLO, K.K.; HALL, J.B.; HILEMAN, S.M. Effects of nutrition and season on the onset of puberty in the beef heifer. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.12, p.3994-4005, Dec. 1992.

SHENKER, A. et al. A constitutively activating mutation of the luteinizing hormone receptor in familial male precocious puberty. **Nature**, London, v.365, n.6447, p.652-654, Oct. 1993.

SIMONI, M. et al. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptors isoforms. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Lawrence, v.84, n.2, p.751-755, Feb. 1999.

SOUTHEY, B.R.; RODRIGUES-ZAZ, S.L.; LEYMASTER, K.A. Discrete time survival analysis of lamb mortality in a terminal sire composite population. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.81, n.6, p.1399-1405, Jun. 2003.

SPLAN, R.K.; CUNDIFF, L.V.; VAN VLECK, L.D. Genetic parameters for sex-specific traits in beef cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.79, n.9, p.2272-2278, Sept. 1998.

STRATAKIS, C.A. et al. The aromatase excess syndrome is associated with feminization of both sexes and autosomal dominant transmission of aberrant P450 aromatase gene transcription. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, Lawrence, v.83, n.4, p.1348-1357, Apr. 1998.

SUTARNO, J.M.; GREEFF, J.; LYMBERY, A.J. Mitochondrial DNA polymorphisms and fertility in beef cattle. **Theriogenology**, Los Altos, v.57, n.6, p.1603-1610, Apr. 2002.

TAMBASCO, D.D. et al. Caracterização molecular de animais da raça Nelore utilizando microssatélites e genes candidatos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v.29, n.4, p.1044-1049, jul./ago. 2000.

TAMBASCO-TALHARI, D. **Avaliação da distância genética multilocos entre raças de bovinos e sua correlação com heterozigose e desempenho**. 2003. 88 f. Tese (Doutorado) – Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2003.

TESS, M.W.; KOLSTAD, B.W. Simulation of cow-calf production systems in a range environment: II. Model evaluation. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.78, n.5, p.1170-1180, May. 2000.

THEMMEN, A.P.N.; MARTENS, J.W.M.; BRUNNER, H.G. Activating and inactivating mutations in LH receptors. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Amsterdam, v.145, n.1-2, p.137-142, Oct. 1998.

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

TRIOLA, M.F. **Introdução à Estatística**. 7.ed. Rio de Janeiro: LTC - Livros Técnicos e Científicos Editora S.A., 1998.

UNANIAN, M.M. A procura de marcadores de precocidade em gado Nelore. In: SIMPÓSIO O NELORE DO SÉCULO XXI, 4., 1997, Uberaba. **Anais...** Uberaba: ABCZ, 1997. p.51-57.

VANSELOW, J. et al. Three PCR/RFLPs identified in the promoter region 1'1 of the bovine aromatase gene (*CYP19*). **Animal Genetics**, Oxford, v.30, n.3, p.232-233, June 1999.

VASCONCELLOS, L.P.M.K. et al. Genetic characterization of Aberdeen Angus cattle using molecular markers. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.26, n.2, p.133-137, 2003.

WEIR, B.S. **Genetic data analysis**: methods for discrete population genetic data. 2.ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 1996.

WOLFINGER, R.D. Nonconjugate Bayesian Analysis of Variance Component Models. **Biometrics**, Washington, v.56, n.3, p.768-774, Sep. 2000.

WOMACK, J.E. The goals and status of the bovine gene map. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v.76, n.4, p.1199-1203, Apr. 1993.

WRIGHT, S. The effect of inbreeding and crossbreeding on guinea pigs. III. Crosses between highly inbred families. **Bulletin/United States Department of Agriculture**, Washington, n.1121, p.1-60, 1922.

WU, S.M.; CHAN, W.Y. Male pseudohermaphroditism due to inactivating luteinizing hormone receptor mutations. **Archives of Medical Research**, Mexico, v.30, n.6, p.495-500, Nov./Dec. 1999.

YANG, X. et al. Inherited congenital adrenal hyperplasia in the rabbit is caused by a deletion in the gene encoding cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme. **Endocrinology**, Springfield, v.132, n.5, p.1977-1982, May 1993.

APÊNDICE A

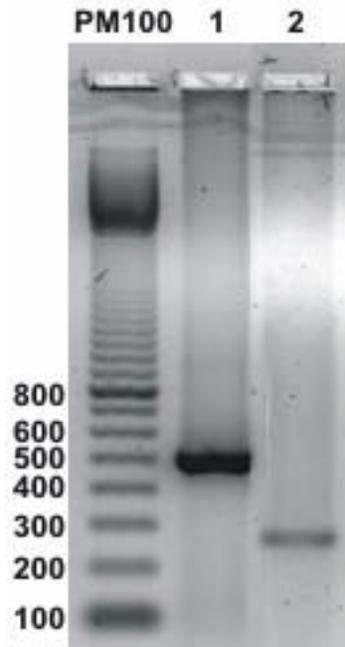


Figura 1 - Eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídeo apresentando os padrões de fragmentos dos produtos de amplificação dos genes da P450aro e P450scc por PCR-RFLP. Na parte superior da figura: PM100 – marcador de peso molecular em escala de 100pb; 1 – produto amplificado de 502pb para o gene da P450scc; 2 – produto amplificado de 278pb para o gene da P450aro

ANEXO A

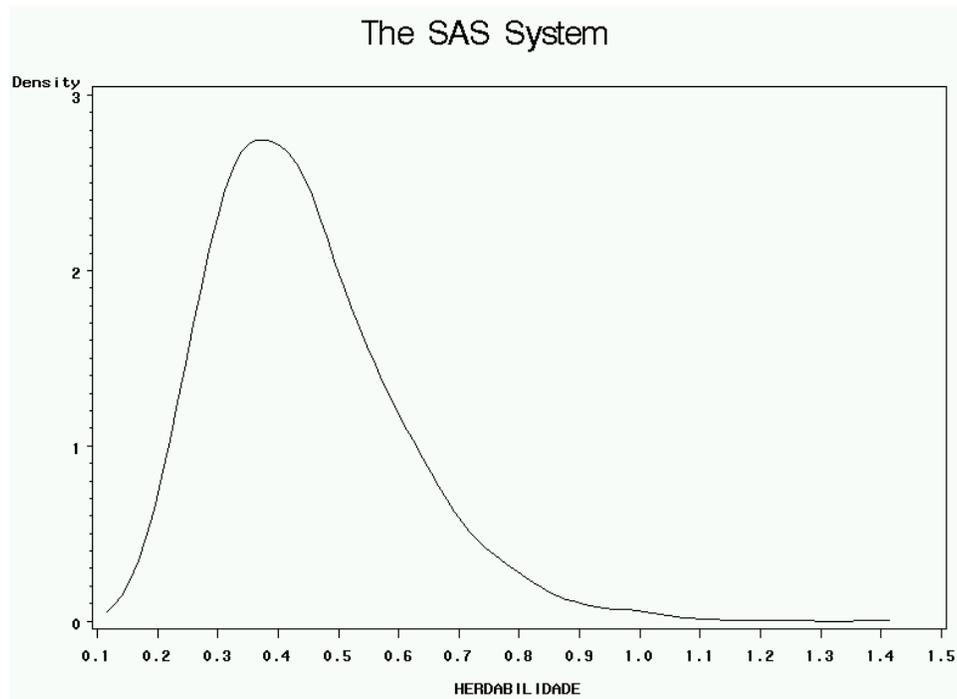


Figura 1 – Densidades *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a probabilidade de prenhez (PP), determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística, incluindo-se os efeitos dos marcadores RFLP LHR e FSHR, sem o PES390 como covariável

ANEXO B

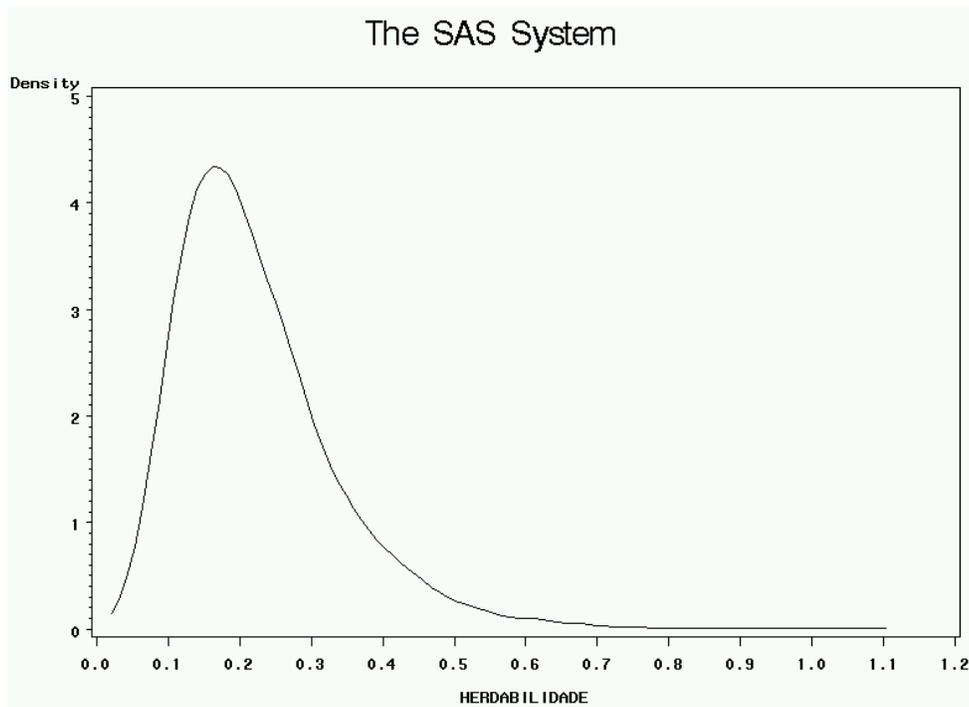


Figura 2 – Densidades *a posteriori* das estimativas de herdabilidade para a probabilidade de prenhez (PP), determinado pelo modelo de distribuição binomial, com função de ligação logística, incluindo-se os efeitos dos marcadores RFLP LHR e FSHR e do PES390 como covariável