



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

**CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE OVELHAS DA RAÇA
SANTA INÊS COM MUTAÇÃO NO GENE GDF-9**

BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2010**



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

**CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE OVELHAS DA RAÇA
SANTA INÊS COM MUTAÇÃO NO GENE GDF-9**

Aluna: Bianca Damiani Marques Silva

Orientador: Jairo Pereira Neves

TESE DE DOUTORADO EM CIÊNCIAS ANIMAIS

PUBLICAÇÃO: 34D/2010

**BRASÍLIA/DF
JUNHO DE 2010**

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA E CATALOGAÇÃO

SILVA, B.D.M. **Caracterização reprodutiva de ovelhas da raça Santa Inês com mutação no gene GDF-9**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 76p. Tese de Doutorado.

Documento formal, autorizando reprodução desta tese de doutorado para empréstimo ou comercialização, exclusivamente para fins acadêmicos, foi passado pelo autor à Universidade de Brasília e acha-se arquivado na Secretaria do Programa. Nenhuma parte desta tese de doutorado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor ou do seu orientador. Citações são estimuladas desde que citadas as fontes.

FICHA CATALOGRÁFICA

SILVA, B.D.M. **Caracterização reprodutiva de ovelhas da raça Santa Inês com mutação no gene GDF-9**. Brasília: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2010, 76 p. Tese (Doutorado em Ciências Animais) – Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária da Universidade de Brasília, 2010.

1. *Ovis aries* 2. Fator de crescimento. 3. Prolificidade
4. ovulação 5. Superovulação. I. Título

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

**CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS
COM MUTAÇÃO NO GENE GDF-9**

BIANCA DAMIANI MARQUES SILVA

**TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS ANIMAIS COMO PARTE DOS
REQUISITOS NECESSÁRIOS À
OBTENÇÃO DO GRAU DE DOUTOR EM
CIÊNCIAS ANIMAIS.**

APROVADA POR:

JAIRO PEREIRA NEVES, Doutor (UnB)

ALEXANDRE FLORIANI RAMOS, Doutor (EMBRAPA)

MAURÍCIO MACHAIM FRANCO, Doutor (EMBRAPA)

JOSÉ ROBSON BEZERRA SERENO, Doutor (EMBRAPA)

HÉLIO BLUME, Doutor (UPIS)

BRASÍLIA/DF, 28 de JUNHO de 2010.

AGRADECIMENTOS

À minha família, minha mãe, meu pai, minha irmã, minha vó e meu tio de onde vim e tenho orgulho.

À minha “família brasileira” que me adotou desde o início e esteve sempre ao meu lado.

Ao professor Jairo Pereira Neves, por ter me aceitado desde o início dessa jornada, foi ótimo trabalharmos juntos. Agradeço pelos conhecimentos transmitidos, que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente.

Ao Dr. Eduardo Melo que me incluiu neste projeto, pela confiança e pela grande evolução que fizemos juntos.

Ao Dr. Roberto Sartori por ter me ajudado e apoiado nos estudos.

A UnB e ao programa de pós graduação de Ciências Animais pela oportunidade.

Ao CMO (Centro de Manejo de Ovinos- UnB) e aos funcionários por terem me acolhido e aberto as portas para o meu trabalho.

A Embrapa Cenargen por fazer parte deste projeto maravilhoso.

Ao CNPq e a FAPDF- Pronex pelo suporte financeiro.

Aos amigos que deixei no Rio de Janeiro e aos que fiz em Brasília.

Aos amigos Alexandre e Katlen pelo apoio e por estarem presentes em momentos pessoais e profissionais.

Aos mestrandos e estagiários que sempre que precisei de uma força “braçal” estiveram lá pra me ajudar.

À minha família canina, pois eu podia estar sorrindo ou podia estar chorando eles estavam do meu lado me apoiando.

Às ovelhas, pois sem elas não existiria este trabalho.

Por último, mas o mais importante ao Thiago Silva, pelo amor e carinho, por ter estado do meu lado em todos os momentos e por nos transformarmos nessa família linda.

A uma pessoa que ainda não está nesse mundo, mas que já é muito amada, Júlia.

Enfim, a todos que contribuíram e estiveram do meu lado.

ÍNDICE

Capítulos/Sub-capítulos	Página
RESUMO	viii
ABSTRACT	x
LISTA DE ILUSTRAÇÕES	xii
LISTA DE TABELAS	xiii
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES	xiv
CAPÍTULO 1	1
INTRODUÇÃO	2
Objetivo Geral	4
Objetivos Específicos	4
Hipótese	5
REVISÃO DE LITERATURA	6
Raça Santa Inês	6
O GENE GDF-9	8
Indução/Sincronização de Estro	10
Transferência de Embriões	13
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	17
CAPÍTULO 2	25
RESUMO	26
ABSTRACT	27
TEXTO PRINCIPAL	28
INFORMAÇÕES ADICIONAIS	32
Material e Métodos	32
Prospecção de polimorfismos	32
Genotipagem para a mutação FecG ^E	32
Dados de taxa de ovulação	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41
CAPÍTULO 3	44
RESUMO	45

ABSTRACT	47
INTRODUÇÃO	49
MATERIAL E MÉTODOS	51
Análise Estatística	52
RESULTADOS	53
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÃO	58
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
CAPÍTULO 4	61
Considerações Finais	61

RESUMO

CARACTERIZAÇÃO REPRODUTIVA DE OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM MUTAÇÃO NO GENE GDF-9

No primeiro experimento foi encontrado um novo alelo do GDF-9, nomeado FecG^E (Embrapa), que leva a uma substituição da fenilalanina por uma cisteína em uma posição conservadora do peptídeo maduro do gene. Para investigar a associação entre os genótipos FecG^E e a taxa de ovulação, 39 ovelhas (15 FecG^{+/+}, 15 FecG^{+/E} e 9 FecG^{E/E}) foram selecionadas dos rebanhos genotipados, e submetidas a dois protocolos de sincronização de estro (PGF2 α e MAP + eCG). A taxa de ovulação foi maior ($P < 0,001$) no grupo homocigoto mutante (E/E) o qual mostrou um aumento de 82% na média de CL ($2,22 \pm 0,12$), assim como a frequência mais elevada (96,3%) de ovelhas com múltipla ovulação, quando comparado ao grupo +/E e +/+. O grupo heterocigoto (+/E) não apresentou nenhuma diferença ($P = 0,612$) na média de CL ($1,34 \pm 0,08$), ou na frequência (31,8%) de ovelhas com ovulações múltiplas, quando comparado as ovelhas do tipo selvagem ($1,22 \pm 0,11$ e 14,6%, respectivamente). Foi observado efeito do genótipo no número de gêmeos por ovelha ($P = 0,0136$); as ovelhas E/E tiveram 44% de prenhez gemelar, +/E 14% e +/+ 0%. Em conclusão, as ovelhas homocigotas para a mutação tiveram maior taxa de ovulação e prolificidade que as heterocigotas e selvagens. No segundo trabalho foi realizado a superovulação e coleta de embriões de 18 ovelhas (6 +/+, 6 +/E e 6 E/E) para comparação da resposta ovulatória. Foram utilizados dois protocolos de superovulação: protocolo tradicional e protocolo Dia 0. A IA foi realizada com sêmen fresco de um único carneiro, de fertilidade comprovada. Cinco dias após a IA os embriões foram recuperados cirurgicamente, através de laparotomia. Dentre os parâmetros avaliados não houve diferença ($P > 0,05$) entre o protocolo Dia 0 (CL totais $9,8 \pm 5,3$; estruturas totais $4,5 \pm 4,6$; estruturas viáveis $1,6 \pm 2,0$) e o protocolo tradicional (CL totais

10,0 ± 6,0; estruturas totais 3,5 ± 4,3; estruturas viáveis 1,7 ± 2,4). Para quantidade de corpos lúteos nos ovários (E/E 9,0±6,3; +/E 10,1 ±5,3; +/+ 10,5±5,3), estruturas totais coletadas (E/E 4,9±5,0; +/E 3,1±3,1; +/+ 4,1±5,2), e viáveis (E/E 1,9±2,1; +/E 2,2±2,6; +/+ 0,9±1,7), não houve diferença ($P>0,05$) entre os diferentes genótipos. Foi observado maior número de animais respondendo ao tratamento superovulatório quando utilizado o protocolo Dia 0 (10/18) em comparação ao protocolo tradicional (6/18). Quando se comparou a quantidade de ovelhas que responderam aos protocolos de superovulação, pelo genótipo não houve diferença significativa: E/E 6/12; +/E 5/12 e +/+ 5/12. Não foi observada alteração nos ovários, no crescimento folicular e nem na produção de embriões viáveis quando se comparou os genótipos. Os dois protocolos foram eficientes em estimular a superovulação e produção de embriões, mas não houve diferença entre os genótipos avaliados quanto a taxa de ovulação.

Palavras-chave: *Ovis aries*, fator de crescimento, prolificidade, ovulação, superovulação.

ABSTRACT

REPRODUCTIVE CHARACTERIZATION OF SANTA INÊS EWES WITH MUTATION ON GENE GDF-9

In the first experiment was found a new allele of GDF-9, named *FecGE* (Embrapa), which leads to a substitution of a phenylalanine by a cysteine in a conservative position of the mature peptide in the gene. To investigate the association between the *FecGE* genotypes (E/E, +/E, and +/+) and the ovulation rate, 39 ewes (15 *FecG*+/+, 15 *FecG*+/E and 9 *FecGE*/E) were selected from the genotyped flocks, and submitted to two estrus synchronization protocol (PGF2 α and MPA + eCG). The ovulation rate was greater ($P < 0.001$) in the homozygote mutant (E/E) group which showed an 82% increase in CL average (2.22 ± 0.12), as well as the highest frequency (96.3%) of multiple-ovulating ewes, when compared to +/E and +/+ groups. The heterozygote group (+/E) presented no difference ($P = 0.612$) in CL average (1.34 ± 0.08), or in the frequency (31.8%) of ewes with multiple ovulations, when compared to the wild-type ewes (1.22 ± 0.11 and 14.6%, respectively). Was observed a genotype effect on the number of twins per ewe ($P = 0.0136$); E/E ewes showed 44% of twin-pregnancy, +/E 14% e +/+ 0%. In conclusion, the homozygote ewes had higher ovulation rate and prolificacy than heterozygote and the wild-types. In second experiment the superovulation and embryo recovery was made in 18 ewes (6 +/+, 6 +/E e 6 E/E) to compare ovarian response among genotype. Two protocols of superovulation were used: traditional protocol and Day 0 protocol. Was used fresh semen for AI of one male with proved fertility. Five days after AI the embryos were recovered cirurgically, by laparotomy. There was no difference among evaluated parameters ($P > 0.05$) between Day 0 protocol (total CL 9.8 ± 5.3 ; total structures 4.5 ± 4.6 ; viable structures 1.6 ± 2.0) and traditional protocol (total CL 10.0 ± 6.0 ; total structures 3.5 ± 4.3 ; viable structures 1.7 ± 2.4). Corpora lutea in the ovaries (E/E

9.0±6.3; +/E 10.1 ±5.3; +/+ 10.5±5.3), total structure recovered (E/E 4.9±5.0; +/E 3.1±3.1; +/+ 4.1±5.2), and viable embryos (E/E 1.9±2.1; +/E 2.2±2.6; +/+ 0.9±1.7), there was no difference ($P>0.05$) among groups of genotype animals. Was observed higher number of animals answering the superovulation treatment when used Day 0 protocol (10/18) in comparison with traditional protocol (6/18). The ewes that answered to superovulation protocol, by genotype, there were no significative difference E/E 6/12; +/E 5/12 e +/+ 5/12. Was not observed alteration in ovaries, in follicular growth and neither in viable embryo production when compare among genotypes. Both protocols were efficient in superovulation and embryo production, but there were no difference among evaluated genotypes in ovulation rate.

Key words: *Ovis aries*, Growth Factor, prolificacy, ovulation, superovulation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 2

FIGURA 2.1 - O efeito do genótipo na ovulação:

A - Média de número de corpos lúteos por ovelha em cada genótipo: E/E (FecG^E em homozigose) n=9, +/E (FecG^E em heterozigose) n=15, and +/+ (sem alelo FecG^E) n=15. Os dados de CL são apresentados como média±DP. Grupos com diferentes letras diferem (P<0.001).....36

FIGURA 2.1 - O efeito do genótipo na ovulação:

B - Frequência de ovulações múltiplas (≥ 2 CL) nas ovelhas de cada genótipo como descrito em (A). Grupos com diferentes letras diferem (P<0.001).....37

FIGURA 2.1 - O efeito do genótipo na ovulação:

C - Frequência de gestação gemelar avaliada por ultrassonografia aos 45 dias de gestação em cada genótipo: E/E (n=9), +/E (n=14), e +/+ (n=14). Grupos com diferentes letras diferem (P<0.001).....38

FIGURA 2.2: **Alinhamento das sequências do GDF-9 e as mutações.** O alinhamento do GenBank para as sequências de proteínas do GDF-9 de *Ovis aires* (AAC28089), *Bos taurus* (NP777106), *Homo sapiens* (AAC08450), and *Mus musculus* (AAH52667). Os polimorfismos não conservados (GV e GVI), o FecG^E (deste trabalho) e FecG^H (Hanrahan et al., 2004) estão destacados na figura. As seis cisteínas que formam a estrutura Knot estão sublinhados. O local de segmentação, que determina o começo do peptídeo maduro, está marcado em cinza. Aminoácidos são identificados por asteriscos. As substituições conservadas e semi-conservadas são identificadas por um e dois pontos, respectivamente.....39/40

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

TABELA 2.1 - Genótipo e frequência alélica de FecG^E no rebanho Santa Inês.....35

TABELA 2.2 – Efeito do FecG^E na prolificidade das ovelhas Santa Inês.....35

TABELA 2.3 - Polimorfismos de nucleotídeos únicos encontrados no GDF-9 de ovelhas Santa Inês prolíficas (*Ovis aries*).....35

CAPÍTULO 3

TABELA 3.1 – Quantidade de corpos lúteos no ovário esquerdo (CL OE), no ovário direito (CL OD), quantidade de corpos lúteos totais (CL TOTAL), número de estruturas totais e números de estruturas viáveis quando comparados dois protocolos de superovulação, o protocolo Dia 0 e o protocolo Tradicional em ovelhas da raça Santa Inês (média ± DP).....53

TABELA 3.2 - Quantidade de corpos lúteos no ovário esquerdo (CL OE), no ovário direito (CL OD), quantidade de corpos lúteos totais (CL TOTAL), número de estruturas totais e números de estruturas viáveis quando comparados ovelhas da raça Santa Inês com diferentes genótipos do gene GDF-9: homozigotas mutante (E/E), heterozigotas (+/E) e selvagem (+/+) (média ± DP).....54

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

- E/E: homozigota mutante para $FecG^E$
+/E: heterozigota para $FecG^E$
+/: homozigota selvagem para $FecG^E$
BMP15: bone morphogenetic protein 15
BMPR1B: bone morphogenetic protein receptor 1B
BMPR II: bone morphogenetic protein receptor II
CIDR: dispositivo intravaginal de liberação lenta de progesterona
CL: corpo lúteo
eCG: gonadotrofina coriônica equina
D0: protocolo Dia 0
FAP: acetato de fluorogestona
 $FecX^I$: polimorfismo da raça Inverdale
 $FecB^B$: polimorfismo da raça Booroola
 $FecG^E$: polimorfismo Embrapa, raça Santa Inês
 $FecG^H$: polimorfismo da raça Cambridge e Belclare
 $FecX^H$: polimorfismo da raça Hanna
FSH: hormônio folículo estimulante
g: grama
GnRH: hormônio liberador de gonadotrofinas
GDF-9: growth and differentiation factor 9 (fator de crescimento e diferenciação 9)
IA: inseminação artificial
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
i.m.: intramuscular
LH: hormônio luteinizante
Kg: quilograma
MAP: acetato de medroxiprogesterona
mg: miligrama
mm: milímetros
 $MgCl_2$: Cloreto de magnésio
OD: ovário direito
OE: ovário esquerdo

PCR: reação em cadeia da polimerase

P₄: progesterona

PGF_{2α}: prostaglandina F_{2α}

RFLP: Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismos de comprimento de fragmentos gerados por enzimas de restrição)

SI: Santa Inês

SNP: single nucleotide polymorphism (polimorfismo de nucleotídeo único)

TE: transferência de embriões

TGFβ: fator de crescimento transformante beta

μL: microlitros

μM: micrometros

UI: unidade internacional

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

A ovinocultura no Brasil tem 16,6 milhões de cabeças, a qual aumentou 2,4% entre 2007 e 2008. Todas as regiões brasileiras mostraram crescimento no rebanho de ovinos desde 1995 até agora, exceto a região Sul, sendo a região Sudeste foi a que mais cresceu (76%) (IBGE, 2008). Essa espécie vem despertando interesse de produtores e órgãos governamentais, sendo uma alternativa desejável para o incremento da atividade pecuária no país, contribuindo para uma melhor distribuição de renda.

Apesar da ausência de dados oficiais, o potencial de crescimento da ovinocultura é evidenciado pelo crescimento do número de abates anuais, da importação de carne ovina e do número de pontos de venda do produto. De acordo com o censo, apenas a região Sul apresentou redução do rebanho ovino desde 1995, da ordem de 32%, reflexo ainda da crise da lã e do redirecionamento da aptidão dos animais. O nordeste, detentor do maior rebanho do país, teve aumento de 15%, sendo que apenas na Bahia a variação positiva foi de 32,7%. A região Norte está investindo no setor e seu rebanho aumentou 46%, impulsionado principalmente pelo Pará, que quase dobrou seu rebanho nos últimos 10 anos. O Centro-Oeste teve aumento de 40%, em especial no estado do Mato Grosso, onde o crescimento foi de 117%. A região Sudeste apresentou maior crescimento relativo no período (76%) incentivado provavelmente pelo maior potencial de capital investidor e por um mercado consumidor de maior poder aquisitivo. Apesar das evidências do crescimento a atividade se encontra com carência de informações técnicas e de mercado, causada principalmente pela informalidade (Anualpec, 2008).

A utilização das diversas biotécnicas disponíveis, associadas a programas de melhoramento genético tem permitido significativos avanços no aumento da produtividade animal. O Brasil é um ótimo mercado consumidor da carne ovina, mas ainda não tem um

sistema de produção sólido e bem distribuída ao longo das estações do ano. Tem-se observado um crescimento da cadeia produtiva pela intensificação da pesquisa voltada para a produção de animais e beneficiamento de seus produtos; pelo crescimento do nível de organização dos produtores e do uso de novas tecnologias; pelo maior acesso ao crédito; e pelo aumento da demanda por produtos derivados de caprinos e ovinos (Sebrae, 2010). Com o incremento da potencialidade reprodutiva dos rebanhos haverá maior estímulo para a produção de animais capazes de aumentarem a produção de carne, incentivando os pequenos e médios produtores a investirem, assim também como os abatedouros e frigoríficos.

Com o crescimento desse mercado, existe o interesse em intensificar sua exploração econômica, com programas de melhoramento genético animal, testes de progênie e aplicação de biotécnicas reprodutivas, em raças ovinas adaptadas as condições ambientais de cada região, para o aumento do índice produtivo desses animais. Das biotécnicas reprodutivas há a IA como ferramenta de difusão de características desejáveis de animais geneticamente superiores, contribuindo para a melhoria do nível zootécnico do rebanho. A multiplicação de genes superiores da linhagem materna pode ser realizada com a TE, consorciada com mais algumas biotécnicas como a sincronização de estro, IA e superovulação.

A observação de rebanhos com alta prolificidade tem sido constatada ao redor do mundo por algum tempo. Muitos destes rebanhos foram identificados como segregando genes de efeito principal na taxa de ovulação e tipo de parto. Algumas raças de ovelhas são naturalmente prolíficas e são importantes para o estudo da genética e fisiologia da reprodução. Embora a Santa Inês não seja uma raça muito prolífica, não é raro achar uma alta taxa de gêmeos em algumas populações. O aumento da prolificidade das ovelhas aliada ao melhor manejo do rebanho de cria tem o potencial para duplicar o número de cordeiros desmamados quando comparado com os índices usualmente obtidos nos sistemas de criação extensivos aplicados no Brasil.

A genética tem feito parte do estudo junto à reprodução com o objetivo de se obter um maior conhecimento em alguns eventos fisiológicos ainda não tão explicados como, por exemplo, na fase de foliculogênese independente de gonadotrofinas e na maturação precoce do desenvolvimento folicular devido ao aumento da resposta ao FSH e aquisição precoce de receptores de LH nas células da granulosa (Henderson et al., 1987) e assim conseguir um aumento na produção. Com o estudo dos genes GDF-9 e BMP-15 envolvidos na foliculogênese pode-se obter maior conhecimento sobre quais fatores estão envolvidos nesta fase.

Os polimorfismos já descritos no BMP-15 e no GDF-9 levam ao mesmo fenótipo, ou seja, ovelhas homozigotas para a mutação são estéreis e ovelhas heterozigotas possuem taxa de ovulação aumentada. Juengel et al. (2004a) avaliaram se a imunização de ovelhas contra o GDF-9 e o BMP-15 poderia levar a uma resposta superovulatória dos animais, resultar em perda da qualidade dos oócitos e habilidade reduzida de levar uma prenhez a termo, mas não observaram nenhuma alteração. A descrição da mutação FecG^E no gene GDF-9 poderá ter implicações importantes na conservação e melhoramento da raça Santa Inês, que por sua vez apresenta grande relevância econômica para a ovinocultura nacional, além de trazer mais conhecimento sobre a fisiologia reprodutiva.

Objetivos:

Objetivo geral:

- Estabelecer relação entre a presença do alelo FecG^E do gene GDF-9 e a reprodução em ovelhas da raça Santa Inês.

Objetivos específicos:

- Verificar a existência de relação entre a presença do alelo FecG^E e a taxa de ovulação de ovelhas da raça Santa Inês previamente genotipadas frente à utilização de dois protocolos de indução/sincronização de estro;

- Avaliar a fertilidade, através de monta natural, em ovelhas que possuem a mutação $FecG^E$ no gene GDF-9;
- Investigar a existência de relação entre a presença do alelo $FecG^E$ e a resposta superovulatória e qualidade embrionária de ovelhas da raça Santa Inês frente à utilização de dois protocolos de superovulação e coleta de embriões.

Hipótese:

As ovelhas da raça Santa Inês portadoras do polimorfismo $FecG^E$ no gene GDF-9 apresentam maior taxa de ovulação, tanto em ciclo natural, sincronizado ou quando submetidas a superovulação.

REVISÃO DE LITERATURA

Raça Santa Inês

A raça nordestina Santa Inês, oriunda provavelmente do estado da Bahia, esta presente no Nordeste, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, e encontra-se em fase de expansão visto ser um dos grupos de ovinos com maior importância econômica em função do seu porte e adaptação ao ambiente. Seus ancestrais provavelmente foram de tipos nativos vindos da África e, ao longo dos anos, houve seleção para ausência de lã destes animais (Paiva, 2005).

É uma raça desenvolvida no nordeste brasileiro, resultante do cruzamento intercorrente das raças Bergamácia, Morada Nova, Somalis e outros ovinos sem raça definida. Sendo as características atuais um produto da seleção natural e dos trabalhos de técnicos e criadores fixando-as através de seleção por genealogia. A tese de sua origem é confirmada pelas suas características. O porte do Santa Inês, o tipo de orelhas, o formato da cabeça e os vestígios de lã evidenciam a participação do Bergamácia, bem como a condição de deslanado e as pelagens, correspondem ao Morada Nova. A participação do Somalis é evidenciada pela apresentação de alguma gordura em torno da implantação da cauda, quando o animal está muito gordo. São animais deslanados, com pêlos curtos e sedosos, de grande porte com média de peso para macho de 80 a 120 Kg e para as fêmeas de 60 a 90 Kg, com excelente qualidade de carne e baixo teor de gordura, pele de altíssima qualidade, rústicos e precoces, adaptáveis a qualquer sistema de criação e pastagem, e às mais diversas regiões do país. Fêmeas prolíferas e com boa habilidade materna e excelente capacidade leiteira (ARCO, 2008).

Apesar dos poucos estudos envolvendo a raça Santa Inês, ela tem demonstrado ser uma excelente alternativa para incrementar a produção de carne ovina nas principais

regiões do país, considerando sua capacidade reprodutiva, resistência a parasitas gastrointestinais, qualidade de pele e poder adaptativo, além de boa taxa de crescimento. No entanto, limitações em algumas características de carcaça, quando comparadas com as raças especializadas em carne, são atributos restritivos à raça, que, no entanto, não a compromete como opção viável à oferta de carne (Sousa et al., 2008).

A avaliação do potencial de ovulações múltiplas e da habilidade em responder às biotécnicas de reprodução assistida se torna imprescindível para que estas técnicas sejam aplicadas com o objetivo de maximizar a utilização de indivíduos geneticamente superiores por meio da disseminação de seu material genético. Silva et al. (1987) observaram existir influência da raça, do manejo alimentar e da época do ano sobre a taxa de ovulação total em ovinos deslanados. A taxa média de ovulação total na raça Santa Inês foi de 1,2 corpos lúteos. A média da frequência e da taxa de ovulação nesta raça foi, respectivamente, de 76% e 1,3 em pastagem nativa e de 67% e 1,2 em confinamento. O número médio de folículos de 2 a 6 mm nos ovários foi de 2,7 no ovário esquerdo e 2,5 no ovário direito. Deve ser ressaltado que não houve diferença na frequência de ovulações de um ovário em relação ao outro. No que se refere a ovulações múltiplas, 47,4 % apresentaram uma única ovulação e 34,4 % apresentaram ovulações duplas. A raça Santa Inês apresenta índices médios iguais a 302 dias de idade a puberdade; 496 dias de idade ao primeiro parto; 303 dias de intervalo de parto; 86,9% de fertilidade ao parto; 150 dias de período de gestação; 1,24 de prolificidade e 80% de sobrevivência das crias até o desmame (Sousa et al., 2008).

Quesada et al. (2002) avaliando o fenótipo sobre características de produção e reprodução em ovinos deslanados no Distrito Federal observaram um índice de prolificidade do Santa Inês de 1,27, peso ao nascer de 3,07 Kg, peso aos 120 dias de 20,10 Kg, intervalo entre partos de 325,02 dias e idade ao primeiro parto de 551,13 dias. Avaliaram também o efeito do tipo de parto em relação ao peso ao nascer, houve diferença nos pesos ao nascer em relação ao parto simples (3,12 Kg), parto duplo (2,90 Kg) e parto triplo (1,85Kg), mas quando comparado o peso desses animais aos 120 dias não foi observado diferença.

Animais Santa Inês têm desempenho inferior ao de raças melhoradas européias, sendo, contudo, satisfatório, por exemplo, o peso ao nascer entre 3,5-4,0 kg, peso ao desmame (45 a 60 dias) entre 13-16 kg e ganhos de peso diários de 220 e 200 g nos períodos de pré e pós desmame, respectivamente. Os cordeiros Santa Inês podem apresentar características de carcaça inferiores em relação às raças melhoradas. Por outro lado, as ovelhas Santa Inês possuem características extremamente interessantes como maior rusticidade, menores exigências nutricionais, acentuada habilidade materna, além de não

apresentarem estacionalidade reprodutiva. Outra característica de extremo interesse é a acentuada habilidade materna das ovelhas, que favorece a sobrevivência peri-natal dos cordeiros, aumentando assim a disponibilidade de animais para abate, e ainda por ter tido em sua formação a influência de diversas raças, entre as quais a Bergamácia, apresentam boa capacidade leiteira (Bueno et al., 2006).

O GENE GDF-9

O crescimento dos folículos ovarianos é controlado da forma endócrina clássica através do estímulo das gonadotrofinas hipofisárias (FSH e LH) que são reguladas por retroalimentação pelos hormônios produzidos pelo ovário, notadamente os esteróides e a inibina. Entretanto a foliculogênese também sofre regulação parácrina através de fatores de crescimento produzidos dentro do próprio ovário pelos diversos tipos celulares nele contidos. Desde o início desta década fatores de crescimento da família das BMPs que são membros da superfamília do TGF β estão sendo apontados como chaves no controle local do crescimento folicular ovariano e da determinação da taxa de ovulação (Souza et al., 2009).

A maior parte das características de interesse econômico são quantitativas sendo conseqüentemente controladas por vários genes, cujos efeitos se somam para constituir o fenótipo manifestado efetivamente. Entretanto, sabe-se que certos genes tem um efeito majoritário na expressão dessas características, por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados por isso como genes principais (adaptado do termo em inglês: *major genes*) (Montaldo & Meza-Herrera, 1998).

A fisiologia reprodutiva animal não é uma exceção, e durante muitos anos geneticistas tem procurado por genes principais que controlam o desenvolvimento folicular e ovulação em mamíferos (Fabre et al., 2006). Nesse aspecto algumas raças prolíficas naturais de ovelhas têm sido bastante informativas e o primeiro gene principal associado com prolificidade foi mapeado em um “lócus” ligado ao cromossomo X na raça Inverdale (Davis et al., 1991).

Além das atividades do GDF-9 e do BMP-15 durante a expansão das células do cumulus, maturação oocitária e ovulação (Elvin et al. 1999; Elvin et al. 2000; Gui & Joyce

2005; Yoshino et al. 2006), esses dois fatores parácrinos participam de importantes papéis durante vários passos do desenvolvimento folicular. Eles influenciam o crescimento folicular (Dong et al. 1996; Nilsson & Skinner 2002), proliferação das células do cumulus e granulosa (Hayashi et al. 1999; Gilchrist et al. 2006; Spicer e al. 2006), sobrevivência celular prevenindo a apoptose (Hussein et al.2005; Orisaka et al. 2006), inibem a expressão de receptores de LH (Guéripel et al., 2006) e agem como moduladores de muitos outros fatores de crescimento e hormônios endócrinos (Juengel et al. 2004b).

Nos ovinos, o RNA para o GDF-9 está localizado nos ovócitos dos folículos desde o estágio primordial até folículo antral grande (Bodensteiner et al., 1999), enquanto que a expressão de RNAm do BMP-15 começa nos oócitos dos folículos primários (Galloway et al., 2000).

O gene GDF-9 codifica uma cadeia polipeptídica de 453 aminoácidos, que depois de processada dá origem a um peptídeo maduro com 135 aminoácidos. Ao se dimerizar, o peptídeo maduro gera o hormônio GDF-9, que é sintetizado e secretado pelo oócito e está presente no fluido folicular (Hanrahan et al., 2004).

O mecanismo geral da foliculogênese ovariana em mamíferos implica uma complexa comunicação endócrina entre o sistema nervoso central e o ovário e várias regulações parácrinas intraovarianas, mas o conhecimento sobre o mecanismo de controle do número de folículos ovulatórios em cada ciclo estral ainda não está bem esclarecido (Fabre et al., 2006). A transição dos estágios iniciais de desenvolvimento folicular pode ser observada e assim esse processo não requer gonadotrofinas hipofisárias. Portanto, fatores parácrinos como o GDF-9, secretado pelo oócito, foram recentemente evidenciados como participantes essenciais no desenvolvimento folicular (Shimizu, 2006).

Muitas raças já foram identificadas com mutações pontuais nos dois genes de fatores de crescimento, BMP-15 e GDF-9. Cinco diferentes mutações foram identificadas no gene BMP-15 e uma no gene GDF-9. Animais heterozigotos para essas mutações ou heterozigotos para duas dessas mutações têm maior taxa de ovulação do que o tipo selvagem (Shimizu, 2006).

O BMP-15, membro da família TGF β , foi o primeiro gene a ser associado com aumento da taxa de ovulação em Inverdale (FecX^I-polimorfismo) e Hanna (FecX^H) (Galloway et al. 2000). Logo depois, a variação Booroola (FecB^B) foi encontrada no gene BMPR1B na raça Merino Booroola (Souza et al. 2001; Wilson et al. 2001; Mulsant et al. 2001). O BMPR1B, junto com o BMPRII, é responsável pelo sinal do BMP-15 nos folículos ovarianos (Moore et al. 2003). O último gene principal associado com fenótipo prolífico foi o GDF-9,

no qual um polimorfismo (FecG^H) achado nas raças Cambridge e Belclare é responsável por um aumento na taxa de ovulação em heterozigose e esterilidade em homozigose, de uma maneira muito semelhante as variações no BMP-15 (Hanrahan et al. 2004; Bodin et al. 2007; Monteagudo et al. 2008; Martinez-Royo et al. 2008).

Todas as mutações no BMP-15 e no GDF-9 descritas têm o mesmo fenótipo: os animais heterozigotos são prolíficos, com aumento da taxa de ovulação acima do tipo selvagem variando entre 35 a 95% (McNatty et al., 2005) e os animais homozigotos para a mutação são estéreis, devido a um bloqueio do desenvolvimento folicular (Davis et al., 1992; Hanrahan et al., 2004; Bodin et al., 2007).

Em ovelhas, o RNAm GDF-9 está presente em células germinativas antes e depois da formação folicular, assim como por todo o desenvolvimento folicular; e estimula o crescimento das células da granulosa e da teca. Ambas as proteínas do GDF-9 e BMP-15 estão presentes no fluido folicular indicando que são produtos secretados pelo oócito. Pela avaliação de fenótipos das mutações nos genes GDF-9 e BMP-15 e estudos fisiológicos, está claro que esses genes são essenciais para o desenvolvimento folicular e ovulação e/ou formação do corpo lúteo em ovelhas. A mutação já conhecida no gene GDF-9 em ovelhas da raça Belclare quando ocorre em homozigose promove esterilidade, mas em animais heterozigotos proporciona uma taxa de ovulação média de 2.0, maior que a do tipo selvagem (McNatty et al., 2005).

As causas prováveis de alta taxa de ovulação em animais heterozigotos para as mutações no BMP-15 e no GDF-9 e homozigotos para a mutação no BMP1B estão na maturação precoce do desenvolvimento folicular devido ao aumento da resposta ao FSH e aquisição precoce de receptores de LH nas células da granulosa (Henderson et al., 1987).

Indução/Sincronização de Estro

A sincronização de estros em ovinos é uma biotécnica reprodutiva que permite a concentração da IA e da parição em épocas desejáveis dentro dos sistemas de produção (Evans & Maxwell, 1987), e para isso é importante ter um conhecimento aprofundado sobre a fisiologia reprodutiva.

O ciclo estral é o período compreendido entre dois estros, durante o qual ocorrem profundas modificações hormonais em todo o organismo, particularmente sobre o

aparelho reprodutor e comportamento da fêmea. Nas ovelhas, esse período tem duração de 17 ± 2 dias, sendo dividido em uma fase luteal com duração de 13 dias e uma fase folicular com quatro dias de duração (Rubianes, 2000).

Os maiores folículos que cresceram durante o fim da fase luteal não produzem altas concentrações de estrógeno, provavelmente devido às altas concentrações de P_4 a qual reduz a pulsatilidade da secreção de LH, levando a baixos níveis de estimulação dos folículos em desenvolvimento. Mas o estrógeno produzido pelo maior folículo da onda ovulatória faz um pico dois dias antes da ovulação (Rubianes & Menchaca, 2003). O aumento da secreção de estradiol é o primeiro sinal para o pico pré-ovulatório de GnRH e LH, e esse aumento é responsável pelas manifestações do estro (Rawlings & Cook, 1992).

O pico pré-ovulatório de LH, é responsável pela ovulação e pela luteinização do folículo, e subsequente formação do corpo lúteo. Com o desenvolvimento do corpo lúteo a concentração de P_4 secretada por ele aumenta (Rubianes, 2000). A ovulação é espontânea e ocorre próxima ao fim do estro, aproximadamente 24 a 27 horas após o início do estro e pode ocorrer uma ou mais ovulações durante o estro; variando conforme a raça, a idade, o peso, a condição corporal e o genótipo (Jainudeen et al., 2004).

A dinâmica folicular é um processo contínuo de crescimento e regressão dos folículos antrais que permitem o desenvolvimento do folículo pré-ovulatório (Lucy et al., 1992). Uma onda folicular foi definida como a emergência de um grupo de pequenos folículos antrais, com um ou dois folículos atingindo um diâmetro de 5 mm ou mais; o crescimento folicular ocorre em padrão de ondas nos ovinos na estação de acasalamento (Evans et al., 2000) e na estação de anestro (Barrett et al., 2004).

As características mais freqüentes das ondas foliculares segundo Rubianes & Menchaca (2003) são as seguintes: pelo menos um folículo atingi o diâmetro ≥ 5 mm por onda; o maior folículo de cada onda cresce por 5-7 dias, com uma taxa de crescimento de 1mm/dia; o diâmetro máximo do maior folículo difere entre ondas; à medida que a fase luteal avançou a concentração plasmática de P_4 eleva-se, facilitando a renovação dos folículos; os maiores folículos presentes nos ovários no dia da luteólise são aqueles que ovularam; na maioria dos ciclos com duas ovulações os folículos ovulatórios emergiram como parte da mesma onda folicular. Segundo Barrett et al. (2004), em alguns casos os folículos ovulatórios podem ter emergido de ondas foliculares diferentes.

As $PGF2\alpha$ têm ação como fator luteolítico que induz a regressão prematura do corpo lúteo por meio da interrupção da fase progestacional do ciclo estral, iniciando assim, novo ciclo (Herrera et al., 1990). As $PGF2\alpha$ utilizadas também na forma de análogos

sintéticos, como D-Cloprostenol, servem para lisar os corpos lúteos que possam interferir na sincronização, durante a estação de monta, em ovelhas que estejam ciclando e apresentem um corpo lúteo funcional nos ovários (Moraes et al., 2002).

Baird & Scaramuzzi (1976), após utilização de um análogo sintético da prostaglandina como injeção única intramuscular, observaram que a regressão luteal foi seguida de uma elevação na concentração basal de LH e aumento da secreção de estradiol. Em cinco das seis ovelhas tratadas foi verificada uma descarga de LH com pico ocorrendo de 36-78 horas depois da injeção de PGF2 α ; a secreção de estradiol declinou nas 24 horas seguintes ao pico de LH. A administração de PGF2 α no dia 3 após a ovulação foi seguida de luteólise e ovulação, mostrando que, na ovelha, um corpo lúteo de 3 dias de idade não é refratário ao hormônio (Rubianes et al., 2003). Menchaca et al. (2004) com aplicações de duas doses de análogos da PGF2 α dadas com sete dias de intervalo observaram uma taxa de sincronização boa com 80% das ovelhas manifestando estro entre 25 e 48 horas após o tratamento. Além disso, Godfrey et al. (1997) mostraram que o estro pode ser sincronizado com PGF2 α ou com P₄ com sucesso em ovelhas nos trópicos em diferentes épocas do ano.

A P₄ geralmente é aplicada sob a forma de pessários vaginais contendo análogos sintéticos (MAP ou FAP), ou um dispositivo intravaginal impregnado com 0,3 g de P₄ natural. O tratamento longo com P₄ (12 a 14 dias) é amplamente usado em pequenos ruminantes para indução e sincronização do estro. O resultado do tratamento mostra alta percentagem de animais em estro, mas baixa fertilidade quando comparadas ao estro natural (Robinson et al., 1970; Scaramuzzi et al., 2006). Entretanto, Evans et al., (2000) não observaram diferenças na qualidade dos embriões colhidos e nas taxas de prenhez, quando compararam ovelhas induzidas a formar folículos persistentes com as que apresentavam folículos recrutados recentemente. Quando se suprime o tratamento com progestágeno, o estro aparece 2 a 3 dias depois. Ao suprimir o tratamento, a hipófise intensifica a liberação de gonadotrofinas, o que estimula o crescimento e subsequente ovulação. Para a sincronização efetiva, a duração do tratamento deve ser igual ou superior à vida do corpo lúteo (12 a 14 dias) (Evans & Maxwell, 1990). Em protocolos tradicionais, progestágenos são utilizados por longos períodos, estes similares ao tempo de vida de um corpo lúteo cíclico. Estes se mostram eficientes na sincronização do estro, porém com resultados de fertilidade variáveis (Rubianes, 2000).

A eCG é um hormônio fundamental para indução de atividade ovariana em ovelhas. Atua simulando a atividade dos hormônios FSH e LH e consegue provocar um desenvolvimento de folículos mesmo durante os períodos de anestro nesses animais. O

aumento do diâmetro do folículo dominante nos animais que recebem eCG ocorre pelos efeitos desta gonadotrofina no eixo hipotálamo-hipófise-ovário e pelas alterações nos mecanismos regulatórios intra-ovarianos, devido, principalmente, à sua meia-vida prolongada e pela sua atividade semelhante ao LH e ao FSH (Uribe - Velásquez et al., 2002). O protocolo mais frequentemente usado de sincronização de estro associado com IA em tempo fixo é baseado no uso de eCG depois de um pré-tratamento com progesterona ou pessários vaginais com progestágenos (Evans & Maxwell 1990). Evans & Maxwell (1987) preconizaram doses de 600 a 750 UI de eCG, após a retirada dos pessários vaginais impregnados com 50 mg de MAP, aos 13 dias para inseminação de ovelhas fora da estação reprodutiva e doses de 400-500 UI de eCG para fêmeas em estação reprodutiva (Evans & Maxwell, 1990).

Rodrigues et al. (2004) utilizaram uma dose de 200 UI de eCG em ovelhas deslanadas e obtiveram taxa ovulatória de $1,4 \pm 0,6$. Esses autores afirmaram que ovelhas deslanadas de clima tropical necessitam de doses menores para os trabalhos de sincronização de estro. Já Dias et al. (2001) obtiveram 73,3% de ovelhas com ovulação utilizando a mesma dose de 200 UI de eCG. No trabalho de Silva et al. (2010a) quando comparando protocolo utilizando duas doses de PGF2 α , com intervalo de 9 dias e protocolo longo com 250 UI de eCG, todas as ovelhas manifestaram estro e todas tiveram pelo menos um folículo ovulado, com média de aproximadamente 1,5 folículos para cada protocolo, mostrando que os dois protocolos foram eficientes em sincronizar o estro além do protocolo com PGF2 α ser uma alternativa de menor custo.

Transferência de Embriões

A TE tem como principal objetivo a maximização reprodutiva da fêmea, explorando assim seu potencial biológico ao extrapolar suas possibilidades naturais, e contribuindo para a disseminação de animais geneticamente superiores e redução do intervalo entre gerações (Simplicio et al., 2002). Os ovários dos mamíferos contêm centenas de milhares de oócitos, entretanto, o número de descendentes de uma fêmea é bastante reduzido em relação a este potencial de prolificidade (Gonçalves et al., 2001).

Segundo Gibbons & Cueto (1995) a finalidade da aplicação desta técnica nos animais domésticos tem objetivos de ordem genética, comercial, sanitária e de conservação das espécies, entre os objetivos se pode destacar: introduzir e difundir rapidamente novas

raças e genótipos de alto valor produtivo; redução de custos de produção com descarte de animais de baixa eficiência reprodutiva. As características desejáveis e de alta herdabilidade podem ser rapidamente multiplicadas. Um exemplo se apresenta com a característica genética do “gene prolífico Booroola” que na raça Merino dá a seus portadores um valor adicional que poderia ser rapidamente multiplicado pela TE.

Princípios de indução da superovulação em ovelhas e cabras são os mesmos que em vacas. Um hormônio folículo estimulante é administrado ou no fim da fase luteal do ciclo ou entre os dias 1 e 2 antes do fim do tratamento de sincronização (Ishwar & Menom, 1996). A possibilidade de aplicação única e menor custo da gonadotrofina coriônica eqüina foi utilizada por longo tempo. Todavia, os resultados de superovulação não foram satisfatórios quanto a resposta ovulatória, ou mesmo falha em sua ocorrência e viabilidade estrutural dos embriões (Moor et al., 1984). No entanto, o uso de hormônios folículo estimulantes oferecem respostas mais consistentes no tocante a taxas de ovulação e a obtenção de um maior número de embriões viáveis (Baril et al., 1992)

Nas doadoras, um tratamento com progestágenos e luteolítico para sincronização do estro é associado a um tratamento com FSH permitindo induzir a superovulação. A sincronização do estro é obtida por um tratamento progestágeno de duração de 12 dias; a estimulação ovariana para indução da superovulação é obtida pela administração de 200 mg de FSH de origem suína ou ovina. Em razão da baixa duração da atividade biológica do FSH, a dose total é dividida em seis ou oito doses decrescentes injetadas a cada 12 horas durante os três/quatro últimos dias do tratamento com progestágenos. Nas ovelhas tratadas com FSH suíno, a adição de LH no final do tratamento de FSH melhora a produção de embriões (Freitas, 2006).

O protocolo superestimulatório tradicional consiste de uma prolongada exposição ao progestágeno (12-18 dias), com FSH iniciando aproximadamente 48 horas antes da retirada do progestágeno, esses protocolos tradicionais foram desenhados na década de 80 sem conhecimento da dinâmica folicular ovariana em ruminantes (Menchaca et al., 2007).

Os estudos mais recentes têm trabalhado com dominância folicular e superovulação, e suportam a idéia que o tratamento superovulatório iniciado com a ausência de um folículo dominante resultou em maior porcentagem de fêmeas que responderam ao tratamento, melhora no recrutamento folicular, taxa de ovulação e/ou produção de embrião em ovelhas (Rubianes et al., 1995, 1997; González-Bulnes et al., 2002) e em cabras (Menchaca et al., 2002, 2007, González-Bulnes et al., 2003).

A dominância folicular em ovelhas já foi comprovada em diversos trabalhos (Ginther et al., 1996; Webb et al., 2003; González-Bulnes & Veiga-Lopez, 2008; Evans, 2003; Rubianes & Menchaca 2003). Conforme o maior folículo cresce aumenta a produção de estradiol e inibina que inibe o crescimento dos folículos menores levando-os a atresia.

Com o objetivo de se evitar o início da superovulação com a presença de um folículo dominante desenvolveu-se um protocolo denominado Dia 0, que inicia o tratamento durante a primeira onda folicular que ocorre logo após a ovulação. Neste período do ciclo há uma ausência de grandes folículos e um *pool* homogêneo de pequenos folículos crescendo. O tratamento com FSH é iniciado então junto a emergência da primeira onda. Para sincronizar a ovulação e a emergência da primeira onda é utilizado um tratamento curto de sincronização. O tratamento superovulatório é iniciado 72-84 horas após a retirada da fonte de P₄ (Menchaca et al., 2002). Em ovelhas, quando o tratamento com FSH foi iniciado na presença de um folículo dominante, obteve-se menor recrutamento, menor número de ovulações, menor número de embriões transferíveis e desenvolvimento de corpos lúteos subnormais (Rubianes et al., 1997).

Num trabalho de Silva et al. (2010b) quando se comparou o protocolo tradicional com o protocolo Dia 0 não foi observada diferença entre taxa de ovulação e quantidade e qualidade dos embriões produzidos. Provavelmente porque a dominância folicular não está bem esclarecida em ovelhas (Toosi et al., 2010), os protocolos se mostraram semelhantes.

A fecundação frequentemente falha em tratamentos superovulatórios, principalmente em ovelhas com alta taxa de ovulação. Isso pode ser devido à dificuldade do sêmen em atravessar a cérvix, no entanto, esse problema pode ser resolvido por deposição intrauterina do sêmen através da laparoscopia (Ishwar & Menom, 1996). Assim, a fecundação poderá ser feita por monta natural ou IA duas a três inseminações artificiais intervaladas de 12 horas (Fonseca, 2005).

Em uma revisão Ishwar & Menom (1996) mostraram que o uso de GnRH depois da retirada do progestágeno sincronizou o momento da ovulação com tratamento com FSH ou eCG. Como o GnRH induz o pico de LH dentro de 4 horas e a ovulação começa em torno de 24 horas após a aplicação (Menchaca et al., 2001), a IA pode ser utilizada em horário fixo gerando taxas de fertilização similares ao protocolo tradicional (Menchaca et al., 2007).

A colheita de embriões pode ser feita por três métodos, laparotomia (cirúrgica), laparoscopia e pela via transcervical. Há uma divergência entre autores sobre a preferência do método a ser escolhido. Há autores que dizem que os procedimentos cirúrgicos são técnicas

invasivas limitando a possibilidade de repetidas colheitas em uma doadora, em virtude de aderências entre o sistema genital e tecidos circunvizinhos (Gusmão & Moura, 2005). Outros preferem o método cirúrgico ou laparoscópio devido a fatores limitantes na cérvix da ovelha gerando dificuldade de serem realizadas colheitas pelo método transcervical (Silva et al., 2004).

O período no qual os embriões podem ser colhidos é muito restrito, pois passam das tubas uterinas aos cornos uterinos a partir do quarto dia em relação ao estro. A legislação internacional para TE sugere que os embriões sejam transferidos antes da perda da zona pelúcida, que pode acontecer a partir do dia 7. Nas ovelhas, o estágio de blastocisto é atingido a partir do dia 6 (Freitas, 2006).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANUALPEC. Ovinocultura – inventando o futuro, São Paulo: **FNP Consultoria & Comércio**, 376 p., 2008.

ARCO, Características da raça Santa Inês, www.arcoovinos.com.br, acessado em 18/02/2008.

BAIRD, D.T., SCARAMUZZI, R.J., Changes in the secretion of ovarian steroid and pituitary luteinizing hormone in the peri-ovulatory period in the ewe: the effect of progesterone, **Journal of Endocrinology**, v. 70(2): p.237-45, 1976.

BARIL, G.; REMY, B.; VALLET, J. C.; BECKERS, J. F.; SAUMANDE, J. Control of the LH preovulatory surge by a gonadotropin releasing hormone antagonist (Antarelix) in superovulation goats. **COLLOQUE SCIENTIFIQUE, ASSOCIATION SCIENTIFIQUE EUROPÉENNE DE TRANSFERT EMBRYONNAIRE**, Lyon, France. Proceedings, Lyon-France AETE, v.1, p.126, 1992.

BARRETT, D.M.W; BARTLEWSKI, P.M; BATISTA-ARTEAGA, M; SYMINGTON, A.; RAWLINGS, N.C., Ultrasound and endocrine evaluation of the ovarian response to a single dose of 500 UI of eCG following a 12 day treatment with progestogen-releasing intravaginal sponges in the breeding and nonbreeding seasons in ewes, **Theriogenology**, v. 61, p. 311-327, 2004.

BODENSTEINER KJ, CLAY CM, MOELLER CL, SAWYER HR.,Molecular cloning of the ovine Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in ovine and bovine ovaries. **Biology and Reproduction** 60:381-6, 1999.

BODIN L, DI PASQUALE E, FABRE S, BONTUX M, MONGET P, PERSANI L, MULSANT P. A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. **Endocrinology** 148:393-400, 2007

BUENO, M. S.; CUNHA, E. A.; SANTOS, L. E. dos; VERÍSSIMO, C. J.. **Santa Inês: uma boa alternativa para a produção intensiva de carne de cordeiros na região Sudeste**, 2006 Disponível em: http://www.infobibos.com/Artigos/2006_2/SantaInes/index.htm>. Acesso em: 16/6/2010

CASTRO, T.; RUBIANES, E.; MENCHACA, A.; RIVERO, A., Ovarian dynamics, serum estradiol and progesterone concentrations during the interovulatory interval in goats, **THERIOGENOLOGY**, 52, 399-411, 1999.

DAVIS GH, MCEWAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, FARQUHAR PA. Evidence for the presence of a major gene influencing ovulation rate on the X chromosome of sheep. **Biology and Reproduction** 44:620-4, 1991

DAVIS GH, MCEWAN JC, FENNESSY PF, DODDS KG, MCNATTY KP, O WS, Infertility due to bilateral ovarian hypoplasia in sheep homozygous (FecXI FecXI) for the Inverdale prolificacy gene located on the X chromosome. **Biology and Reproduction** 46:636-40, 1992.

DIAS, F.E.F.; JUNIOR, E.S.L.; VILLAROEL, A.B.S.; RONDINA, D.; FREITAS, V.J.F. Sincronização do estro, indução da ovulação e fertilidade de ovelhas deslanadas após tratamento hormonal com gonadotrofina coriônica equina. **Arquivo Brasileiro Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.53, 5, p.618-623, 2001

DONG J, ALBERTINI DF, NISHIMORI K, KUMAR TR, LU N, MATZUK MM. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature** 383:531-5, 1996.

ELVIN JA, CLARK AT, WANG P, WOLFMAN NM, MATZUK MM. Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology** 13:1035-48, 1999.

ELVIN JA, YAN C, MATZUK MM. Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97:10288-93, 2000.

EVANS, A. C. O. Ovarian follicle growth and consequences for fertility in sheep. **Animal Reproduction Science**. 78, 289–306, 2003.

EVANS, A.C.O., DUFFY, P., HYNES,N., BOLAND,M.P., Waves of follicle development during the estrous cycle in sheep, **Theriogenology**, v. 53, p. 699-715, 2000.

EVANS, G.; MAXWELL, W.M.C., **Salamon's artificial insemination of sheep and goats**, Sydney, Butterworths, 1987, 194p.

EVANS, G., MAXWELL, W. M. C. **Inseminación artificial de ovejas y cabras**. Zaragoza : Acribia, 1990. 191p.

FABRE S, PIERRE A, MULSANT P, BODIN, L.; PASQUALE, E.D.; PERSANI, L.; MONGENT, P.; MONNIAUX, D. Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reproductive Biology and Endocrinology** 45:4-20, 2006.

FONSECA, J.F., Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos, **Anais do Congresso Brasileiro de Reprodução Animal**, 16, 2005.

FREITAS, V.J.F., **Biotechnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**, Fortaleza, Multicor, 2006, 84p.

GALLOWAY SM, MCNATTY KP, CAMBRIDGE LM, LAITINEN, M.P., JUENGEL, J.L., JOKIRANTA, T.S., MCLAREN, R.J., LUIRO, K., DODDS, K.G., MONTGOMERY, G.W.,

BEATTIE, A.E., DAVIS, G.H., RITVOS, O.. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Natural Genetics** 25:279-83, 2000.

GIBBONS, A.E.; CUETO, M.I., Transferência de embriões em ovinos y caprinos, Patagônia Norte, **INTA EEA Bariloche**, 1995, 3p.

GILCHRIST RB, RITTER LJ, MYLLYMAA S, KAIVO-OJA, N. DRAGOVIC, R.A., HICKEY, T.E. RITVOS, O. MOTTERSHEAD, D.G. Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **Journal of Cell Science** 119:3811-21, 2006

GINTHER, O. J., WILTBANK, M. C., FRICKE, P. M., GIBBONS, J. R., AND KOT, K. Selection of the dominant follicle in cattle. **Biology and Reproduction** 55, 1187–1194, 1996.

GODFREY, R.W., GRAY, M.L.; COLLINS, J.R. A comparison of two methods of oestrous synchronization of hair sheep in the tropics, **Animal Reproduction Science**, v.47, p.99-106, 1997.

GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F.; **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo, Varela, 2001, 340 p.

GONZÁLEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M. J., SOUZA, C. J. H., GROOME, N. P., GARCÍA-GARCÍA, R. M., LÓPEZ-SEBASTIÁN, A., AND BAIRD, D. T. Measurement of inhibin A and follicular status predict the response of ewes to superovulatory FSH treatments. **Theriogenology** 57, 1263–1272, 2002.

GONZÁLEZ-BULNES, A., CARRIZOSA, J. A., DÍAZ-DELFA, C., GARCÍA-GARCÍA, R. M., URRUTIA, B., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M. J., AND LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. **Small Ruminant Research** 48, 9–14, 2003.

GONZÁLEZ-BULNES, A., AND VEIGA-LOPEZ, A. Evidence of intraovarian follicular dominance effects during controlled ovarian stimulation in a sheep model. **Fertil. Steril.** 89, 1507–1513, 2008.

GUÉRIPEL, X., BRUN, V., GOUGEON, A., Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion, **Biology and Reproduction**, 75, 836-843, 2006.

GUI LM, JOYCE IM. RNA interference evidence that growth differentiation factor-9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biology and Reproduction** 72:195-9, 2005.

GUSMÃO, A. L.; MOURA, J. C. A. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinarie**. V.33, p. 29-32, 2005.

HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN, M.; DAVIS, G.H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.M. 2004 Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF-

9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology and Reproduction** 70:900-9, 2004.

HAYASHI M, MCGEE EA, MIN G, KLEIN, C. ROSE, U.M., VANDUIN, M. HSUEH, A.J. Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology** 140:1236-44, 1999.

HENDERSON,K.M.; MCNATTY, K.P.; O'KEEFFE,L.E.; LUN,S., HEATH,D.A., PRISK,M., Differences in gonadotrophin-stimulates cyclic AMP production by granulose cells from Booroola X Merino ewes wich were homozygous, heterozygous or non-carriers of a fecundity gene influencing their ovulation rate, **Journal Reproduction Fertility**, v. 81, p. 395-402, 1987.

HERRERA, H.L.; FELDMAN, S. D.; ZARCO, Q. L. Evaluacion del efecto luteolítico de la prostaglandina F₂ α em diferentes días del ciclo estral de la borrega. **Veterinaria México**, v.21, p.143-147, 1990.

HUSSEIN TS, FROILAND DA, AMATO F, THOMPSON JG, GILCHRIST R.B. Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J Cell Sci** 118:5257-68, 2005

IBGE, **Pesquisa Pecuária Municipal** 2008, www.ibge.org.br, acessado em 20/04/2010.

ISHWAR, A.K.; MENON, M.A.; Embryo transfer in sheep and goats: a review, **Small Ruminant Research**, 19, 35-43, 1996.

JAINUDEEN, M.R.; WAHID, H.; HAFEZ, E.S.E. Ovinos e caprinos In: **HAFEZ Reprodução Animal**, p. 173-182, 2004.

JUENGEL, J.L., HUDSON, N.L., WHITING, L., MCNATTY, K.P., Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization and pregnancy in ewes, **Biology and Reproduction**, 70, 557-561, 2004a.

JUENGEL J.L., BODENSTEINER K.J., HEATH D.A., HUDSON N.L., MOELLER C.L., SMITH P., GALLOWAY S.M., DAVIS G.H., SAWYER H.R. & MCNATTY K.P. Physiology of *GDF9* and *BMP15* signalling molecules. **Animal Reproduction Science** 82-83, 447-60, 2004b.

LUCY, M.C.; SAVIO, J.D.; BADINGA, L.; DE LA SOTA, R.L.; THATCHER, W.W. Factors that affect ovarian follicular dynamics in cattle, **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 3615-3626, 1992.

MARTINEZ-ROYO A, JURADO J.J, SMULDERS J.P, MARTÍ, J.L., ALABART, J.L., ROCHE, A., FANTOVA, A., BODIN, L., MULSANT, P., SERRANO, M. A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. **Animal Genetics** 39:294-7, 2008.

MCNATTY,K.P., SMITH,P., MOORE,L.G., READER,K., LUN,S., HANRAHAN,J.P., GROOME,N.P., LAITINEN,M., RITVOS,O., JUENGEL, J.L., Oocyte-expressed genes affecting ovulation rate, **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 234, p. 57-66, 2005.

MENCHACA, A., PINCZAK, A., AND RUBIANES, E, Ultrasonographic estimation of the ovulation rate and the length of the ovulation period in superovulated goats, **Theriogenology**, 55, 531, 2001.

MENCHACA, A., PINCZAK, A., AND RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. **Theriogenology** 58, 1713–1721, 2002.

MENCHACA, A.; MILLER, V.; GIL, J.; LACA, M.; RUBIANES, E., Prostaglandin F2 α treatment associated with timed artificial insemination in ewes, **Reproduction Domestic Animal**, v. 39, p. 352-355, 2004.

MENCHACA, A., VILARIÑO, M., CRISPO, M., PINCZAK, A., AND RUBIANES, E. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology** 68, 1111–1117, 2007.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, v.1, 83-89, 1998. In *BIOTECNOLOGIA DA REPRODUÇÃO EM BOVINOS (20 SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA)*

MONTEAGUDO LV, PONZ R, TEJEDOR MT, LAVINA A, SIERRA I, A 17bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. **Animal Reproduction Science** 52, 119-123, 2008

MOOR, R. M.; KRUIP, Th. A. M.; GREEN, D. Intraovarian control of folliculogenesis: limits to superovulation. **Theriogenology**, v. 21, n.1, p. 103-116, 1984.

MOORE RK, OTSUKA F, SHIMASAKI S, Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. **J Biol Chem** 278:304-10, 2003

MORAES, J.C.F.; SOUZA, C.J.H.; GONÇALVES, P.B.D., Controle do estro e da ovulação em bovinos e ovinos, in GONSALVES, P.B.D.; FIGUIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**. São Paulo, Varela, p. 25-56, 2002, 340 p.

MULSANT P, LECERF F, FABRE S, Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98:5104-9, 2001

NILSSON EE, SKINNER MK, Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biology and Reproduction** 67:1018-24, 2002

ORISAKA, M., ORISAKA, S., JIANG, J.Y, CRAIG, J., WANG, Y., KOTSUJI, F., TSANG, B.K., Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early stage, **Molecular Endocrinology**, 20, 2456-2468, 2006.

PAIVA, S.R.; **Caracterização da diversidade genética de ovinos no Brasil com quatro técnicas moleculares**, Tese de Doutorado, Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 118p., 2005

QUESADA, M.; McMANUS, C.; COUTO, F.A.D., Efeitos genéticos e fenotípicos sobre características de produção e reprodução de ovinos deslanados no Distrito Federal, **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, 342-349, 2002.

RAWLINGS, N.C.; COOK, S.J. LH secretion around the time of the preovulatory gonadotropin surge in the ewe. **Animal Reproduction Science**, v. 30, p. 289-299, 1992.

ROBINSON, T. J. et al. Fertility following synchronization of oestrus in the sheep with intravaginal sponges. I. Effects of vaginal douche, supplementary steroids, time of insemination, and numbers and dilution of spermatozoa. **Australian Journal Agriculture Research**. v. 21, p. 767-781, 1970.

RODRIGUES, L.F.S.; ARAUJO, A.A.; NUNES, J.F.; MOURA, A.A.A.; MOREIRA, E.P. Sincronização do estro em ovelhas deslanadas: efeito de diferentes doses de gonadotrofina coriônica eqüina sobre a taxa de ovulação, **Revista Ciências Agrárias**, v.41, p.215-222, 2004.

RUBIANES, E. Nociones básicas de fisiologia reproductiva em cabras y ovejas. In: **Simpósio sobre controle farmacológico do ciclo estral em ruminantes**, 2000. São Paulo - SP Anais. São Paulo - SP: FMVZ-USP. 2000.

RUBIANES, E., IBARRA,D., UNGERFELD, R., CARBAJAL, B., DE CASTRO,T, Superovulatory response in anestrus ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology** 43, 465–472., 1995

RUBIANES, E., UNGERFELD, R.,VIÑOLES, C., RIVERO, A., ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology** 47, 1479–1488, 1997

RUBIANES, E.; MENCHACA, A., The pattern and manipulation of ovarian follicular growth in goats, **Animal Reproduction Science**, v. 78, p. 271-287, 2003.

RUBIANES, E., MENCHACA, A., CARBAJAL, B., Response of the 1-5 day aged ovine corpus luteum to prostaglandin F2 α , **Animal Reproduction Science**, 78, 47-55, 2003.

SCARAMUZZI, R.J., CAMPBELL, B.K., DOWNING, J.A., KENDALL, N.R., KHALID, M., MUÑOZ-GUTIÉREZ, M., SOMCHIT, A. A review of the effects of supplementary nutrition in the ewe on the concentrations of reproductive and metabolic hormones and the mechanisms that regulate folliculogenesis and ovulation rate. **Reprod.Nutr.Dev.** v.46:339-54,2006.

SEBRAE, **Informativo Semanal de Indicador de Preço de Cordeiro**, 09 de abril de 2010, www.sebraedf.gov.br, acessado em 14 de junho de 2010

SHIMIZU, T., Promotion of ovarian follicular development by injecting vascular endothelial growth factor (VEGF) and growth differentiation factor 9 (GDF-9) genes, **Journal of Reproduction and Development**, 52, 23-32, 2006.

SILVA, A.E.D.F.; NUNES, J.F.; SANCHEZ, O., Efeito do manejo nutricional sobre a taxa de ovulação e folículos no decorrer do ano, em ovinos deslanados no Nordeste do Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v 22 (6), p. 635-645, 1987.

SILVA, J. C.; QUINTELA, A.; CHALHOUB, M.; GUSMÃO, A.L. Avaliação da colheita transcervical de embriões ovinos da raça Santa Inês. **Acta Scientiae Veterinarie**. V.32, p.90, 2004.

SILVA, B.D.M; SARTORI, R.; SILVA, T.A.S.N; CARDOZO, D.M.M.; OLIVEIRA, M.A.L.; NEVES, J.P.; Sincronização de estro com prostaglandina f2 α versus progestágeno associado à gonadotrofina coriônica equina (eCG) em ovelhas Santa Inês no Distrito Federal, Brasil, **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 2, p. 417-424, 2010 a

SILVA, B.D.M, SILVA, T.A.S.N., DALCIN, L., LUCCI, C.M., NEVES, J.P., Effect of superovulation initiated at follicular wave emergence in santa inês ewes, **Reproduction, Fertility and Development**, v 22, 366, 2010 b

SIMPLICIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal**, v.1 p. 17-27, 2002.

SOUSA, W.H., LÔBO, R.N.B., MORAIS, O.R., **Ovinos Santa Inês: Estado da Arte e Perspectivas**, www.emepa.org.br, acessado em 11/01/2008.

SOUZA CJ, MACDOUGALL C, CAMPBELL BK, MCNEILLY AS, BAIRD DT , The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRI1B) gene. **Journal of Endocrinology** 169:R1-6, 2001

SOUZA, C.J.H; MELO, E.O.; MORAES, J.C.F., **Genética da prolificidade e seu emprego na produção ovina**, Anais da XVIII CBRA, Congresso Brasileiro de Reprodução Animal, Belo Horizonte, Minas Gerais, p.162 – 165, 2009.

SPICER LJ, AAD PY, ALLEN D, MAZERBOURG S, HSUEH AJ , Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology** 189:329-39, 2006

TOSSI, B.; DAVIES, K.L.; SEEKALLU, S.V.; ZIEGLER, A.C.; BARRETT, D.M.W.; DUGGAVATHI, R.; RAWLINGS, N. Ovarian Follicular Dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe, **Biology and Reproduction**, 2010, published online before print in www.pubmed.com, accessed at 22/05/2010.

URIBE- VELÁSQUEZ, L.F.; OBA, E.; LARA-HERRERA, L.C.; SOUZA, M.I.L; VILLA-VELÁSQUEZ, H.; TRINCA, L.A.; FERNANDES, C.A.C. Respostas endócrinas e ovarianas associadas com o folículo dominante da primeira onda folicular em ovelhas sincronizadas com CIDR ou PGF2 α . **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.31, 2, p. 944-953, 2002.

WEBB, R., NICHOLAS, B., GONG, J. G., CAMPBELL, B. K., GUTIERREZ, C. G., GARVERICK, H. A., ARMSTRONG, D. G. Mechanisms regulating follicular development and selection of the dominant follicle. **Reprod. Suppl.** 61, 71–90, 2003

WILSON T, WU XY, JUENGEL JL. Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology and Reproduction** 64:1225-35, 2001

YOSHINO O, MCMAHON HE, SHARMA S, SHIMASAKI S, A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103:10678-83, 2006

CAPÍTULO 2

UM NOVO POLIMORFISMO NO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO 9 (GDF-9) ESTÁ ASSOCIADO COM AUMENTO NA TAXA DE OVULAÇÃO E PROLIFICIDADE EM OVELHAS HOMOZIGOTAS

Silva BDM; Castro EA; Souza CJH; Paiva SR; Sartori R; Franco MM;
Azevedo HC; Silva TASN; Vieira AMC; Neves JP; Melo EO

RESUMO

UM NOVO POLIMORFISMO NO FATOR DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO 9 (GDF-9) ESTÁ ASSOCIADO COM AUMENTO NA TAXA DE OVULAÇÃO E PROLIFICIDADE EM OVELHAS HOMOZIGOTAS

As ovelhas brasileiras da raça Santa Inês são muito bem adaptadas às condições tropicais do Brasil e representam uma importante fonte de proteína animal. Uma elevada taxa de nascimentos de gêmeos foi relatada em alguns rebanhos Santa Inês. O GDF-9 e o BMP-15 são os primeiros dois genes expressos pelo oócito que são associados com uma taxa aumentada de ovulação em ovelhas. Todas as variações do GDF-9 e do BMP-15 caracterizadas, até agora, apresentam o mesmo fenótipo: as ovelhas heterozigotas têm uma taxa de ovulação aumentada e as mutantes homozigotas são estéreis. Neste estudo foi encontrado um novo alelo do GDF-9, nomeado FecG^E (Embrapa), que leva a uma substituição de uma fenilalanina por uma cisteína em uma posição conservadora do peptídeo maduro. As ovelhas homozigotas para o alelo FecG^E mostraram aumento na taxa de ovulação (82%), e prolificidade (58%). Este novo fenótipo pode contribuir para o melhor entendimento do controle genético do desenvolvimento folicular, os mecanismos envolvidos no controle da ovulação em mamíferos, e no incremento da produção de ovinos.

Palavras chaves: fator de crescimento, *Ovis aries*, prolificidade

ABSTRACT

A NEW POLYMORPHISM IN THE GROWTH AND DIFFERENTIATION FACTOR 9 (GDF-9) GENE IS ASSOCIATED WITH INCREASED OVULATION RATE AND PROLIFICACY IN HOMOZYGOUS SHEEP.

Brazilian Santa Inês sheep are very well-adapted to the tropical conditions of Brazil and are an important source of animal protein. A high rate of twin births was reported in some SI flocks. The Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) and Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP-15) are the first two genes expressed by the oocyte that are associated with an increased ovulation rate in sheep. All GDF-9 and BMP-15 variants characterized, up until now, present the same phenotype: the heterozygote ewes have an increased ovulation rate and the mutated homozygotes are sterile. In this study we have found a new allele of GDF-9, named *FecGE* (Embrapa), which leads to a substitution of a phenylalanine by a cysteine in a conservative position of the mature peptide. Homozygote ewes presenting the *FecGE* allele have shown an increase in their ovulation rate (82%), and prolificacy (58%). This new phenotype can be very useful in better understanding the genetic control of follicular development; the mechanisms involved in the control of ovulation rate in mammals; and for the improvement of sheep production.

Key words: Growth Factor, *Ovis aries*, Prolificacy.

TEXTO PRINCIPAL

Algumas raças de ovinos são naturalmente prolíficas e são importantes para o estudo e entendimento da genética e da fisiologia reprodutivas. Postula-se que o GDF-9 e o BMP-15 podem formar um homo e heterodímero não-covalente *in vivo* e, numa maneira espécie-específica, modular a taxa da ovulação nos mamíferos (Moore et al., 2004). O BMP-15, membro da família TGF β foi o primeiro gene a ser associado com aumento da taxa de ovulação em ovelhas Inverdale (FecX^L polimorfismo) e da ovelha Hanna (FecX^H) (Galloway et al., 2000). Logo após, a variação Booroola (FecB^B) foi encontrada no gene BMPR1B do Merino Booroola (Souza et al., 2001; Wilson et al., 2001; Mulsant et al., 2001). O BMPR1B, junto com o BMPRII, são responsáveis pela sinalização do BMP-15 nos folículos ovarianos (Moore et al., 2003). O último gene principal associado com o fenótipo prolífico foi o GDF-9, em que um polimorfismo (FecG^H) encontrado em ovelhas Cambridge e em ovelhas F700-Belclare é responsável por um aumento na taxa de ovulação em heterozigose e esterilidade em homozigose, em uma maneira muito similar a todas as variações do BMP-15 (Hanrahan et al., 2004; Bodin et al., 2007; Monteagudo et al., 2008; Martinez-Royo et al., 2008).

Além das atividades do GDF-9 e do BMP-15 durante a expansão do cúmulus, maturação oocitária, e ovulação (Elvin et al., 1999; Elvin et al., 2000; Gui e Joyce, 2005; Yoshino et al., 2006), estes dois fatores parácrinos tem um importante papel durante muitas etapas do desenvolvimento folicular. Influenciam o crescimento folicular (Dong et al., 1996; Nilsson e Skinner, 2002), proliferação das células do cúmulus e da granulosa (Hayashi et al., 1999; Gilchrist et al., 2006; Spicer et al., 2006), sinalização da sobrevivência da célula (Hussein et al., 2005; Orisaka et al., 2006), e atuam como moduladores de muitos outros fatores de crescimento e hormônios endócrinos (Juengel et al., 2004). Devido a seu papel na foliculogênese, o conhecimento dos polimorfismos no GDF-9 e no BMP-15 pode ser muito útil no estudo da genética e da fisiologia reprodutiva dos animais. Neste estudo foi mostrado, pela primeira vez, um polimorfismo no gene GDF-9 que aumenta a taxa de ovulação sem esterilidade, em homozigose nas ovelhas.

Neste estudo, vinte e três ovelhas (*Ovis aries*) de uma população da raça Santa Inês com um histórico de nascimentos múltiplos (gêmeos e partos triplos) foram investigadas para SNPs nos genes BMP-15 e GDF-9. As ovelhas foram genotipadas para o SNP Booroola (FecB^B) como descrito anteriormente (Wilson et al., 2001). Subseqüentemente, os exons dos genes GDF-9 e BMP-15 foram seqüenciados e SNPs prospectados. Foram usados os seguintes primers: GDF-9 (*forward* 5' - GGAGAAAAGGGACAGAAGC; *reverse* 5' - ACGACAGGTACTTAGT); BMP-15 (*forward* 5' - GGCTGCTTGTCAGTTTGTAC; *reverse* 5' - GAGCACTTTCAGATTTAA) (veja dados adicionais para detalhes). Sete (GI a GVII) SNPs foram encontrados no GDF-9 (Tabela 2.3, dados adicionais). Somente o polimorfismo GVII é uma mudança não-conservada na posição 345 (fenilalanina para cisteína) do peptídeo maduro e foi detectada em 43% dos animais seqüenciados. Este polimorfismo provoca uma mudança num aminoácido que é 100% conservado na seqüência de quatro representativas espécies de mamíferos (Figura 2.2, dados adicionais), e foi nomeada FecG^E (GenBank FJ429111) de acordo com prévia nomenclatura para elevada fertilidade no alelo GDF-9 (FecG^H) (Hanrahan et al., 2004).

Para encontrar a freqüência do polimorfismo do FecG^E, um total de 334 animais de um rebanho, independente do avaliado anteriormente (dados adicionais), que não tinha sido selecionado para prolificidade teve seu genótipo identificado por PCR-RFLP (dados adicionais). Todos os dados sobre o parto destas ovelhas durante o período de 2002 a 2008 foram coletados, e a associação entre o número de cordeiros nascidos e o genótipo foi testada. A distribuição do genótipo e a freqüência do alelo foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Uma diferença ($P < 0,001$) na freqüência de alelos FecG^E e FecG⁺, assim como na distribuição do genótipo, foi observada entre o rebanho selecionado aleatoriamente e o rebanho selecionado para prolificidade (Tabela 2.1).

Para investigar a associação entre os genótipos FecG^E (E/E, +/E, e +/+) e a taxa de ovulação, 39 ovelhas (15 FecG^{+/+}, 15 FecG^{+/E} e 9 FecG^{E/E}) foram selecionadas dos rebanhos genotipados, e submetidas à sincronização de estro. Os animais foram sincronizados duas vezes, com protocolos com eCG e protocolos com PGF2 α em um modelo *cross-over* (dados adicionais). Onze dias após a última detecção de estro, foi realizada uma laparoscopia como descrito por Killen & Caffery, 1982 para avaliar a taxa de ovulação pela contagem de corpos lúteos. No fim da estação de monta, foi realizado diagnóstico de gestação por ultrassonografia. Todos os animais submetidos a laparoscopia tiveram os genes GDF-9 e BMP-15 seqüenciados a fim de confirmar o genótipo FecG^E e verificar se não havia nenhum outro polimorfismo caracterizado associado com a taxa de ovulação. Os animais foram

tratados de acordo com a Legislação brasileira e foram seguidos os procedimentos da Embrapa sobre bem estar animal.

O número de CL e o número de cordeiros nascidos foram avaliados por um Modelo Linear Generalizado (GLM) onde a distribuição de Poisson foi atribuída à taxa de ovulação, à prenhez, e aos dados do parto. Nesta análise, a contagem de partos foi considerada como resposta variável, medida para cada animal em sete estações de monta diferentes: 2002 a 2008 (variável de tempo). Houve um efeito significativo ($P=0,0136$) dos genótipos sobre a contagem dos fetos. Para estimar a diferença entre cada genótipo foi empregado o teste de Bonferroni.

Os dados de parto das 334 ovelhas genotipadas mostraram uma diferença ($P < 0,0001$) na prolificidade entre os grupos (Tabela 2.2). A taxa de ovulação, foi maior ($P < 0,001$) no grupo homozigoto (E/E) o qual mostrou um aumento de 82% na média do CL ($2,22 \pm 0,12$, Figura 2.1A), assim como a frequência mais elevada (96,3%) de ovelhas com múltipla ovulação (Figura 2.1B), quando comparado ao grupo +/E e +/+. O grupo heterozigoto (+/E) não apresentou nenhuma diferença ($P = 0,612$) na média de CL ($1,34 \pm 0,08$), ou na frequência (31,8%) de ovelhas com ovulações múltiplas (Figura 2.1A e B), quando comparado as ovelhas do tipo selvagem ($1,22 \pm 0,11$ e 14,6%, respectivamente). Foi observado efeito do genótipo no número de gêmeos por ovelha ($P = 0,0136$); as ovelhas E/E tiveram 44% de prenhez gemelar, enquanto nenhuma prenhez gemelar foi observada em ovelhas +/+ (Figura 2.1C). Além disso, as ovelhas E/E não apresentaram nenhum efeito perceptível do $FecG^E$ à exceção do aumento da taxa de ovulação e prenhez gemelar.

Sugere-se que o aumento dos nascimentos múltiplos possa ser uma maneira eficaz de melhora na produção de carne por ovelha, e um aumento de 50% no peso total ganho por ovelha parindo gêmeos foi relatado (Rajab et al., 1992). O aumento de um CL extra e 58% mais cordeiros nascidos observado nas ovelhas E/E comparadas a +/+ foi uma forte evidência do efeito do $FecG^E$ no controle da taxa de ovulação e prolificidade, e representa um novo fenótipo para o GDF-9 em ovelhas. Os dados de nascimento sugerem um efeito aditivo para o alelo $FecG^E$, apesar de nenhuma diferença ter sido observada na taxa de ovulação entre ovelhas +/+ e E/+. Entretanto, as interações do alelo $FecG^E$ são certamente distintas do comportamento de sobredominância observado em $FecG^H$ e de todos os alelos $FecX$ descritos até agora. Os dados de prenhez e nascimentos do grupo E/E confirmam que seus oócitos são viáveis e férteis, o que correlaciona com aumento da prolificidade (número de cordeiros/ovelha) observada entre estes animais. Neste estudo, pela primeira vez, um novo SNP que aumenta a taxa de ovulação e a prolificidade de ovelhas homozigotas foi

documentado para o gene GDF-9. Esta nova variante genética, junto com outras documentadas no GDF-9 e no BMP-15, pode ser muito útil para uma melhor compreensão do controle genético da taxa de ovulação nos mamíferos. Além disso, este SNP pode ser utilizado em programas de acasalamento por seleção assistida por gene (GAS), contribuindo para a melhoria do potencial reprodutivo e da produção. Entretanto, uma investigação adicional é necessária para esclarecer as interações alélicas na variante FecG^H.

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

Material e Métodos

Prospecção de polimorfismos

O exon 2 dos genes GDF-9 e BMP-15 foram sequenciados para SNPs por seqüenciamento de DNA por PCR usando os seguintes primers: GDF-9 (*forward* 5' - GGAGAAAAGGGACAGAAGC; *reverse* 5' - ACGACAGGTACACTTAGT); BMP-15 (*forward* 5' - GGCTGCTTGTCAGTTTGTAC; *reverse* 5' - GAGCACTTTCAGATTAA). As reações de PCR foram feitas em 20 µl com: 0,5 µM de cada primer, 1,5 mM de MgCl₂, 400 µM de dNTPs, 1,5 U Taq polimerase (Invitrogen) e 100 ηg de DNA genômico. O DNA genômico foi extraído de leucócitos pelo de método *salting out* (Biase et al., 2002). O PCR foi realizado com os seguintes ciclos: 93°C/3min; 35 ciclos de 93°C/40s, 56°C/40s, 72°C/40s, e extensão final de 72°C/5min. Os *amplicons* foram purificados do gel de agarose (1%) com GeneClean II (Sistema Bio 101) e foram seqüenciados em seqüenciador ABI 3700. As seqüências produzidas foram alinhadas com seqüências do tipo selvagem obtidas do GenBank (GDF-9 AF078545; BMP-15 AF236079) com software Clustalw (www.ebi.ac.uk/clustalw) para detectar os SNPs.

Genotipagem para a mutação FecG^E

A fim de calcular a frequência do novo alelo $FecG^E$ entre o rebanho selecionado pela prolificidade (23 animais), e o rebanho selecionado aleatoriamente (334 animais); os três genótipos ($FecG^{+/+}$, $FecG^{+/E}$ e $FecG^{E/E}$) foram identificados por PCR-RFLP. Este trabalho foi iniciado com um pequeno grupo de 23 ovelhas Santa Inês, com um histórico familiar de elevada incidência de nascimentos duplos, de um rebanho da Embrapa Tabuleiros Costeiros, uma unidade da Embrapa localizada na região Nordeste. Estes animais foram usados na procura por SNPs, como apresentado na Tabela 2.3. Subsequentemente um novo rebanho de 334 ovelhas Santa Inês, de outra unidade da Embrapa, foi genotipado e usado num experimento de laparoscopia, assim como, no levantamento de dados de partos. Destes 334 animais, foram selecionadas 39 ovelhas para o experimento de laparoscopia. Como o genótipo E/E é o menor grupo (3,6%), foram encontrados somente 9 animais, que compuseram o grupo experimental junto com ovelhas dos outros dois genótipos (15 +/E e 15 +/+; selecionadas aleatoriamente do rebanho de 334 ovelhas, de acordo com seus genótipos). Foram realizadas três réplicas de laparoscopia para cada animal. Entretanto, durante o experimento, dois animais foram perdidos: um do grupo +/E na segunda réplica; e um do grupo +/+ na terceira réplica.

A história de parto destes 334 animais (chamados F1), foi coletada de 7 estações de monta (2002 a 2008). Os dados disponíveis eram de 764 nascimentos (F2) que foram usados para calcular as médias apresentadas na Tabela 2.2, separados de acordo com cada genótipo F1. Os 764 animais da geração F2 não foram genotipados para $FecG^E$. O número de nascimentos considerados não era homogêneo, alguns animais F1 tinham dados de somente uma parição, mas a maioria teve dados de duas partições ou mais. Entretanto, esta falta de homogeneidade foi considerada na modelagem estatística.

O DNA genômico foi extraído de leucócitos do sangue como descrito. A PCR-RFLP para a mutação $FecG^E$ foi realizada amplificando a região madura do peptídeo GDF-9 com os seguintes primers (*forward* 5' - GACCAGGAGAGTGTCAGC; *reverse* 5' - CGACAGGTACACTTAGT) conforme as mesmas condições descritas para a amplificação do exon2. Depois disto, 2 μ L da reação de PCR foram digeridos durante a noite com a enzima de restrição TspRI (Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Os fragmentos de DNA foram diferenciados em de gel de agarose 2,5% e a genotipagem realizada de acordo com o tamanho dos produtos de DNA obtidos da digestão.

Dados da taxa de ovulação

Para investigar a associação entre os genótipos $FecG^E$ e a taxa de ovulação, 39 ovelhas (15 $FecG^{+/+}$, 15 $FecG^{+/E}$ e 9 $FecG^{E/E}$) foram escolhidas do rebanho selecionado aleatoriamente, e submetidas à sincronização de estro. As ovelhas foram sincronizadas duas vezes, usando dois protocolos (eCG e $PGF2\alpha$) num modelo *cross-over*, com um intervalo de dois ciclos estrais entre cada réplica. Em cada réplica, metade das ovelhas recebeu duas aplicações de 530 μ g Cloprostenol (análogo da $PGF2\alpha$, Ciosin, Schering-Plough) i.m., com nove dias de intervalo. A outra metade dos animais recebeu uma esponja intravaginal com 50 mg de MAP (Biorep, Brasil) por 12 dias. No momento da remoção da esponja, 250 UI de eCG (Novormon, Sintax) i.m. foi administrado. A detecção do estro foi realizada duas vezes por dia por observação visual com a ajuda de um rufião. Onze dias após a última detecção de estro, para cada protocolo de sincronização, as ovelhas receberam anestesia local (lidocaína 2% i.m., Eurofarma, Brasil) e foi realizada a laparoscopia conforme descrito por Killen & Caffery, 1982 para avaliar a taxa de ovulação pela contagem dos corpos lúteos. Um ciclo natural, não sincronizado (controle), foi executado como segue: após o último protocolo de sincronização de estro e laparoscopia, as ovelhas foram expostas à presença de um carneiro de fertilidade comprovada por 45 dias. No fim da estação de monta, o diagnóstico de gestação foi realizado por ultrassonografia. Todos os animais submetidos a laparoscopia tiveram o exon 2 dos genes GDF-9 e BMP-15 sequenciados para confirmar o genótipo $FecG^E$ e para verificar se não havia nenhum outro polimorfismo caracterizado associado com a taxa de ovulação. Os animais foram tratados de acordo com a legislação brasileira e seguindo procedimentos da Embrapa para o bem estar animal.

TABELA 2.1: Genótipo e frequência alélica de FecG^E no rebanho Santa Inês.

Rebanho	Genótipo	Frequência (n)	Alelo	Frequência (n)
Rebanho prolífico ^a	+/+	0,174 (4)	FecG ⁺	0,478 (22)
	+/E	0,609 (14)	FecG ^E	0,522 (24)
	E/E	0,217 (5)	-	-
Aleatoriamente selecionado	+/+	0,656 (219)	FecG ⁺	0,808 (540)
	+/E	0,305 (102)	FecG ^E	0,192 (128)
	E/E	0,0389 (13)	-	-

Letras distintas são diferentes para distribuição de genótipo (P<0,001).

TABELA 2.2: Efeito do FecG^E na prolificidade das ovelhas Santa Inês.

Rebanho (F1)	Genótipo	Prolificidade de F1 (média; [95% CI])
Rebanho selecionado	+/+	1,13; [1,11; 1,16] ^a
	+/E	1,44; [1,41; 1,48] ^b
	E/E	1,78; [1,69; 1,87] ^c

Letras diferentes são diferentes (P<0,001).

Rebanho não selecionado; n= 334 ovelhas (219 +/+; 102 +/E e 13 E/E), chamadas F1
Prolificidade = média de 764 nascimentos F2 de 334 ovelhas genotipadas (F1); separadas de acordo com o genótipo.

TABELA 2.3: Polimorfismos de nucleotídeos únicos encontrados no GDF-9 de ovelhas Santa Inês prolíficas (*Ovis aires*).

GDF-9 SNPs	DNAC	PTN	N	Referência
GI	c.471C>T	-	4	Hanrahan et al, 2004
GII	c.477G>A	-	6	Hanrahan et al, 2004
GIII	c.721G>A	p.Glu241Lys	1	Hanrahan et al, 2004
GIV	c.750G>A	-	2	Silva et al. 2010
GV	c.857G>A	p.Arg286Lys	1	Silva et al. 2010
GVI	c.871G>C	p.Gly291Arg	2	Silva et al. 2010
GVII (FecG ^E)	c.1034T>G	p.Phe345Cys	10	Silva et al. 2010

FecGE GenBank accession: FJ42911

FIGURA 1

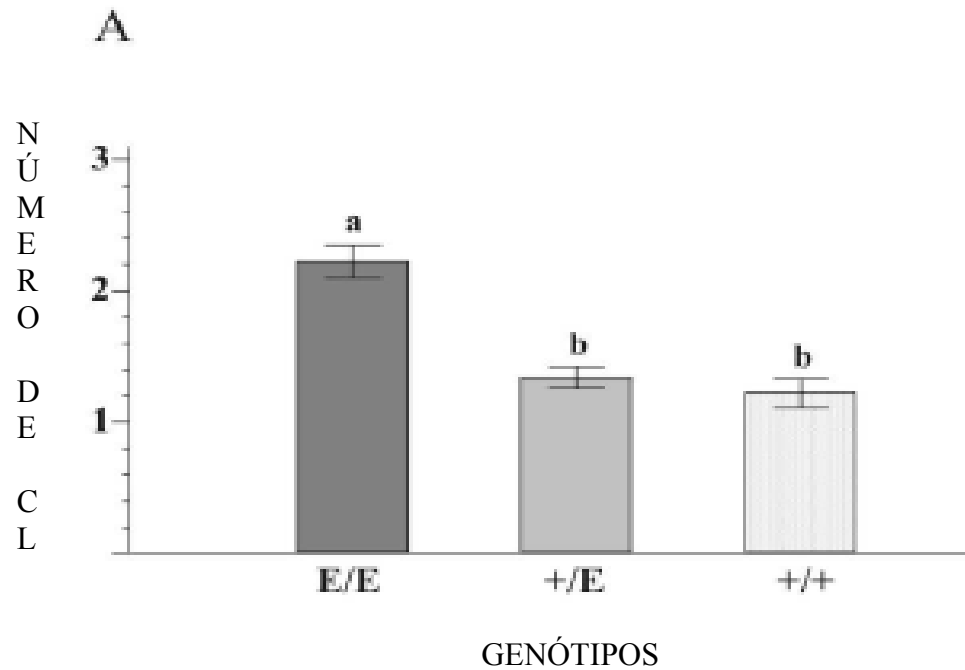


FIGURA 2.1: O efeito do genótipo na ovulação:

A - Média de número de corpos lúteos por ovelha em cada genótipo: E/E ($FecG^E$ em homozigose) $n=9$, +/E ($FecG^E$ em heterozigose) $n=15$, e +/+ (sem alelo $FecG^E$) $n=15$. Os dados de CL são apresentados como média±DP. Grupos com diferentes letras diferem ($P<0.001$).

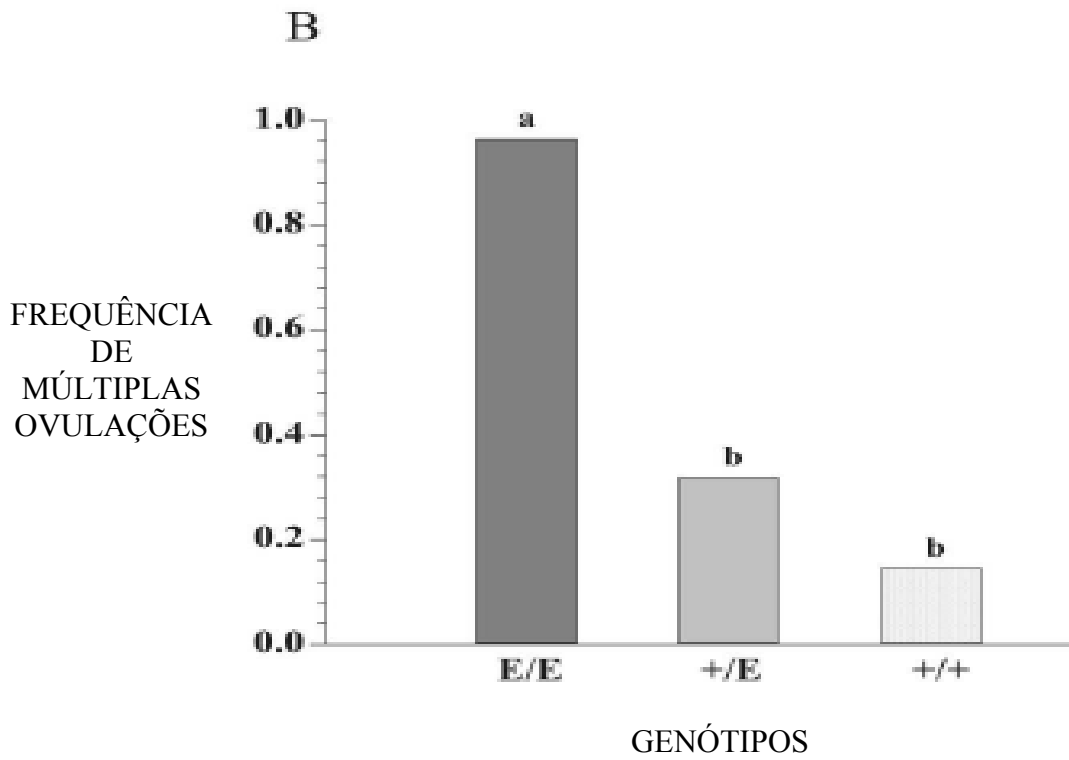


FIGURA 2.1: O efeito do genótipo na ovulação:

B - Frequência de ovulações múltiplas (≥ 2 CL) nas ovelhas de cada genótipo como descrito em (A). Grupos com diferentes letras diferem ($P < 0.001$).

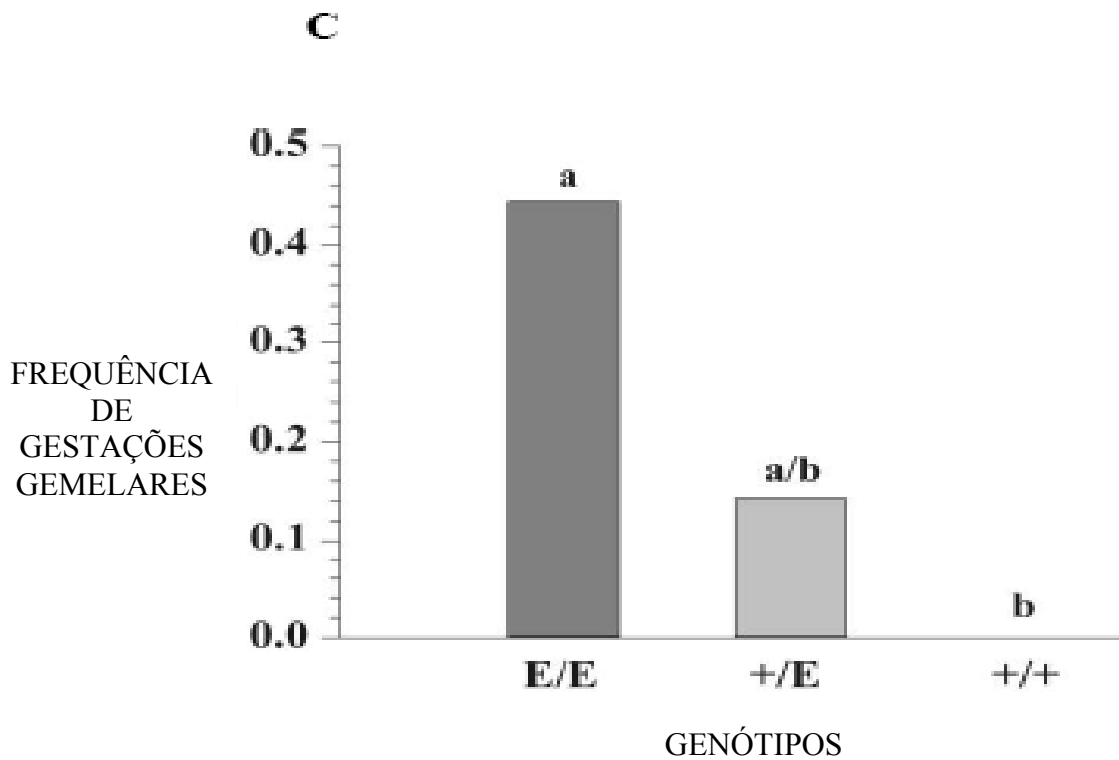


FIGURA 2.1: O efeito do genótipo na ovulação:

C - Frequência de gestação gemelar avaliada por ultrassonografia aos 45 dias de gestação em cada genótipo: E/E ($N=9$), +/E ($N=14$), e +/+ ($N=14$). Grupos com diferentes letras diferem ($P<0.001$).

FIGURA 2.2: Alinhamento das sequências do GDF-9 e as mutações. O alinhamento do GenBank para as sequências de proteínas do GDF-9 de *Ovis aires* (AAC28089), *Bos taurus* (NP777106), *Homo sapiens* (AAC08450), and *Mus musculus* (AAH52667). Os polimorfismos não conservados (GV e GVI), o FecG^E (deste trabalho) e FecG^H (Hanrahan et al., 2004) estão destacados na figura. As seis cisteínas que formam a estrutura Knot estão sublinhados. O local de segmentação, que determina o começo do peptídeo maduro, está marcado em cinza. Aminoácidos são identificados por asteriscos. As substituições conservadas e semi-conservadas são identificadas por um e dois pontos, respectivamente.

Ovine MALPNKFFLWFCCFAWLCPISLDSLPSRGEAQIVARTALESEAETWSLLNHLGGRHRPG 60
 Bovine MALPNKFFLWFCCFAWLCPISLDSQPSRGEAQIVARTALESEAETWSLLKHLGGRHRPG 60
 Human MARPNKFFLWFCCFAWLCPISLGSQASGGEAQIAASAELESGAMPWSLLQHIDERDRAG 60
 Mouse MALPSNFFLGVCCFAWLCPFLSSLSQASTEESQSGASENVESEADPWSLLLPVDGTDRSG 60
 ** *.:*: * .***** **.* * :.* * :.* * .**** :. .*.*

Ovine LLSPLLEVLYDGHGEPRLQDDRALRYMKRLYKAYATKEGTPKSNRRHLYNTVRLFTPC 120
 Bovine LLSPLLNVLVDGHRPEPRLQDDRALSYMKRLYKAYATKEGTPKSNRSHLYNTVRLFTPC 120
 Human LLPALFKVLSVGRGGSPRLQPDSTRALHYMKLYKYATKEGIPKSNRSHLYNTVRLFTPC 120
 Mouse LLPPLFKVLSDRRGETPKLQPDSTRALYYMKLYKYATKEGVKPSRSHLYNTVRLFSPC 120
 ..*.: : .*:****.* **.*:****:***** **.* *****:***

Ovine AQHKQAPGDLAAGTFPSVDLLENLDRVTVEHLFKSVLLYTFNNSISFPPVKICINLVI 180
 Bovine AQHKQAPGDAQAGTLPSVDLLENLDRVTVEHLFKSVLLYTFNNSISFPPVKICINLVI 180
 Human TRHKQAPGDQVTGILPSVELLENLDRITVEHLLKSVLLYNINNSVFSFAVKVCNLM 180
 Mouse AQQEAPSNQVTGPLPMVDLLENLDRVTAMEHLLKSVLLYTLNNSASSSSTVTCMCDLV 180
 ::::***.: .:* * :*****:*.:***:*****.:*** * . .*.*:***:..

Ovine KEPEFSSKTLPRAPYSFTYNSQFEFRKKYKWEIDVTAPLEPLVASHKRNIHMSVNFCTA 240
 Bovine KEPEFSSKTLPRAPYSFTFNSQFEFRKKYKWEIDVTAPLEPLVASHKRNIHMSVNFCTV 240
 Human KEPKSSRTLGRAPYSFTFNSQFEFGKHKHWIQIDVTSLLQPLVASNKRSIHMSINFCTM 240
 Mouse KEAMSSGRAPRAPYSFTL-----KKHRWIEIDVTSLLQPLVTSSERSIHLSVNFCTCT 233
 ** . *.: : ***** **.:*.:****: *.***:* :*.**.:****

(GV) R286K G291R (GVI)

Ovine EDQLQHPSARDSLFNMTLLVAPSLLLYLNDTSAQAFHRWHS LHPKPKPSGDPDQKRLSLA 300
 Bovine KDQLQHPSARDSLFNMTLLAPSLLLYLNDTSAQAFHRWHS LHPKPKPSGDPDQKRLSLA 300
 Human KDQLEHPSAQNGLFNMT-LVSPSLILYLNDTSAQAYHSWYSLHYKRRPSGDPDQERSLSA 299
 Mouse KDQVPE---DGVFMSPLSVPPSLILYLNDTSTQAYHSWQSLQSTWRPLQHPG-QAGVAA 288
 :**.: . :.:*.* .:****:*****:***.* * **: .:* * * . :.:**

F345C (Fec^G)

Ovine YPVGEEAAEGVRSS--RHRRDQESASSELKKPLVPASVNLSEYFKCFLLPQNECELHDFR 358
 Bovine CPMGEEAAEGVRLS--RHRRDQESVSSELKKPLVPASVNLSEYFKCFLLPQNECELHDFR 358
 Human YPVGEEAAEDGRSSHHRHRGQETVSSELKKPLGPASVNLSEYFRQFLLPQNECELHDFR 359
 Mouse RPKVEEAIEVERSP--RRRRGQKAIRSEAKGPLLTASVNLSEYFKCFLLPQNECELHDFR 346
 * : *** * * . *.:**.*.: ** * ** .** *****:***:*****

S395F (Fec^G)

Ovine LSFSQLKWDNWIVAPHKYNPRYCKGDCPRAVGHRYS¹SPVHTMVQNIIEKLDSSVPRPSC 418
 Bovine LSFSQLKWDNWIVAPHKYNPRYCKGDCPRAVGHRYS²SPVHTMVMNIIIEKLDSSVPRPSC 418
 Human LSFSQLKWDNWIVAPHRYNPRYCKGDCPRAVGHRYS³SPVHTMVQNIIEYKLDSSVPRPSC 419
 Mouse LSFSQLKWDNWIVAPHRYNPRYCKGDCPRAVRHRYGS⁴SPVHTMVQNIIEYKLDPSVPRPSC 406
 *****:***** ***** **.*:***.*****

Ovine VPAKYSPLSVLAIEPDGSIAYKEYEDMIATKCTCR 453
 Bovine VPAKYSPLSVLAIEPDGSIAYKEYEDMIATKCTCR 453
 Human VPAKYSPLSVLTIEPDGSIAYKEYEDMIATKCTCR 454
 Mouse VPGKYSPLSVLTIEPDGSIAYKEYEDMIATR⁵CTCR 441
 .****:*****:****

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BIASE F.H., FRANCO M.M., GOULART L.R. & ANTUNES R.C. (2002) Protocol for extraction of genomic DNA from swine solid tissues. **Genetics and Molecular Biology** 25, 313-315.
- BODIN L., DI PASQUALE E., FABRE S., BONTOUX M., MONGET P., PERSANI L. & MULSANT P. (2007) A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune sheep. **Endocrinology** 148, 393-400.
- DONG J., ALBERTINI D.F., NISHIMORI K., KUMAR T.R., LU N. & MATZUK M.M. (1996) Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. **Nature** 383, 531-5.8
- ELVIN J.A., CLARK A.T., WANG P., WOLFMAN N.M. & MATZUK M.M. (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. **Molecular Endocrinology** 13, 1035-48.
- ELVIN J.A., YAN C. & MATZUK M.M. (2000) Growth differentiation factor-9 stimulates progesterone synthesis in granulosa cells via a prostaglandin E2/EP2 receptor pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A** 97, 10288-93.
- GALLOWAY S.M., MCNATTY K.P., CAMBRIDGE L.M., LAITINEN M.P., JUENGEL J.L., JOKIRANTA T.S., MCLAREN R.J., LUIRO K., DODDS K.G., MONTGOMERY G.W., BEATTIE A.E., DAVIS G.H. & RITVOS O. (2000) Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (*BMP15*) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. **Nat Genet** 25, 279- 83.
- GILCHRIST R.B., RITTER L.J., MYLLYMAA S., KAIVO-OJA N., DRAGOVIC R.A., HICKEY T.E., RITVOS O. & MOTTERSHEAD D.G. (2006) Molecular basis of oocyte-paracrine signalling that promotes granulosa cell proliferation. **J Cell Sci** 119, 3811-21.
- GUI L.M. & JOYCE I.M. (2005) RNA interference evidence that growth differentiation factor- 9 mediates oocyte regulation of cumulus expansion in mice. **Biol Reprod** 72, 195-9.
- HANRAHAN J.P., GREGAN S.M., MULSANT P., MULLEN M., DAVIS G.H., POWELL R. & GALLOWAY S.M. (2004) Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors *GDF9* and *BMP15* are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biol Reprod** 70, 900-9.

- HAYASHI M., MCGEE E.A., MIN G., KLEIN C., ROSE U.M., VAN DUIN M. & HSUEH A.J. (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. **Endocrinology** 140, 1236-44.
- HUSSEIN T.S., FROILAND D.A., AMATO F., THOMPSON J.G. & GILCHRIST R.B. (2005) Oocytes prevent cumulus cell apoptosis by maintaining a morphogenic paracrine gradient of bone morphogenetic proteins. **J Cell Sci** 118, 5257-68.
- JUENGEL J.L., BODENSTEINER K.J., HEATH D.A., HUDSON N.L., MOELLER C.L., SMITH P., GALLOWAY S.M., DAVIS G.H., SAWYER H.R. & MCNATTY K.P. (2004) Physiology of *GDF9* and *BMP15* signalling molecules. **Anim Reprod Sci** 82-83, 447-60.
- KILLEN I.D. & CAFFERY G.J. (1982) Uterine insemination of ewes with the aid of a laparoscope. **Aust Vet J** 59, 95.
- MARTINEZ-ROYO A., JURADO J.J., SMULDERS J.P., MARTI J.I., ALABART J.L., ROCHE A., FANTOVA E., BODIN L., MULSANT P., SERRANO M., FOLCH J. & CALVO J.H. (2008) A deletion in the bone morphogenetic protein 15 gene causes sterility and increased prolificacy in Rasa Aragonesa sheep. **Anim Genet** 39, 294-7.
- MONTEAGUDO L.V., PONZ R., TEJEDOR M.T., LAVINA A. & SIERRA I. (2008) A 17bp deletion in the Bone Morphogenetic Protein 15 (*BMP15*) gene is associated to increased prolificacy in the Rasa Aragonesa sheep breed. **Anim Reprod Sci.** 42, 359-362.
- MOORE R.K., OTSUKA F. & SHIMASAKI S. (2003) Molecular basis of bone morphogenetic protein-15 signaling in granulosa cells. **J Biol Chem** 278, 304-10.
- MULSANT P., LECERF F., FABRE S., SCHIBLER L., MONGET P., LANNELUC I., PISSELET C., RIQUET J., MONNIAUX D., CALLEBAUT I., CRIBIU E., THIMONIER J., TEYSSIER J., BODIN L., COGNIE Y., CHITOUR N. & ELSEN J.M. (2001) Mutation in bone morphogenetic protein receptor-IB is associated with increased ovulation rate in Booroola Merino ewes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 98, 5104-9.
- NILSSON E.E. & SKINNER M.K. (2002) Growth and differentiation factor-9 stimulates progression of early primary but not primordial rat ovarian follicle development. **Biol Reprod** 67, 1018-24.
- ORISAKA M., ORISAKA S., JIANG J.Y., CRAIG J., WANG Y., KOTSUJI F. & TSANG B.K. (2006) Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage. **Mol Endocrinol** 20, 2456-68. 10
- RAJAB M.H., CARTWRIGHT T.C., DAHM P.F. & FIGUEIREDO E.A. (1992) Performance of three tropical hair sheep breeds. **J. Anim Sci.** 70, 3351-3359.
- SOUZA C.J., MACDOUGALL C., CAMPBELL B.K., MCNEILLY A.S. & BAIRD D.T. (2001) The Booroola (*FecB*) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (*BMPR1B*) gene. **Journal of Endocrinology** 169, R1-6.

SPICER L.J., AAD P.Y., ALLEN D., MAZERBOURG S. & HSUEH A.J. (2006) Growth differentiation factor-9 has divergent effects on proliferation and steroidogenesis of bovine granulosa cells. **Journal of Endocrinology** 189, 329-39.

WILSON T., WU X.Y., JUENGEL J.L., ROSS I.K., LUMSDEN J.M., LORD E.A., DODDS K.G., WALLING G.A., MCEWAN J.C., O'CONNELL A.R., MCNATTY K.P. & MONTGOMERY G.W. (2001) Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both oocytes and granulosa cells. **Biology of Reproduction** 64, 1225-35.

YOSHINO O., MCMAHON H.E., SHARMA S. & SHIMASAKI S. (2006) A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. **Proc Natl Acad Sci U S A** 103, 10678-83.V

CAPÍTULO 3

**PROTOCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS
COM UM NOVO POLIMORFISMO NO GENE GDF-9 (FecG^E).**

Trabalho a ser enviado para publicação

RESUMO

PROTOSCOLOS DE SUPEROVULAÇÃO EM OVELHAS DA RAÇA SANTA INÊS COM UM NOVO POLIMORFISMO NO GENE GDF-9 (FecG^E).

Neste trabalho foi realizado a superovulação e coleta de embriões de 18 ovelhas (6 +/+, 6 +/E e 6 E/E) para comparação da resposta ovulatória. As fêmeas ovinas foram aleatoriamente distribuídas, dentro dos seus grupos genéticos, entre dois protocolos de superovulação: protocolo tradicional e protocolo Dia 0. Cada tratamento foi repetido duas vezes em um modelo *cross-over* com intervalo de dois meses entre eles. A IA foi realizada com sêmen fresco de um único carneiro, de fertilidade comprovada. Cinco dias após a IA os embriões foram recuperados cirurgicamente, através de laparotomia. Os embriões coletados foram congelados pelo método convencional. A análise estatística foi feita por arranjo fatorial 3x2 com análise de variância, através do programa SAEG 9.1. Dentre os parâmetros avaliados não houve diferença ($P>0,05$) entre o protocolo Dia 0 (CL totais $9,8 \pm 5,3$; estruturas totais $4,5 \pm 4,6$; estruturas viáveis $1,6 \pm 2,0$) e o protocolo tradicional (CL totais $10,0 \pm 6,0$; estruturas totais $3,5 \pm 4,3$; estruturas viáveis $1,7 \pm 2,4$). Para quantidade de corpos lúteos nos ovários (E/E $9,0 \pm 6,3$; +/E $10,1 \pm 5,3$; +/+ $10,5 \pm 5,3$), estruturas totais coletadas (E/E $4,9 \pm 5,0$; +/E $3,1 \pm 3,1$; +/+ $4,1 \pm 5,2$), e viáveis (E/E $1,9 \pm 2,1$; +/E $2,2 \pm 2,6$; +/+ $0,9 \pm 1,7$), não houve diferença ($P>0,05$) entre os genótipos FecG^E. Foi observado um maior número de animais que teve resposta superovulatória quando utilizado o protocolo Dia 0 (10/18) em comparação ao protocolo tradicional (6/18). Quando se compara a quantidade de ovelhas que responderam aos protocolos de superovulação, independente do protocolo, pelo genótipo não houve

diferença: E/E 6/12; +/E 5/12 e +/+ 5/12. Não foi observada alteração nos ovários, no crescimento folicular e nem na produção de embriões viáveis quando se compara entre os genótipos. Os dois protocolos foram eficientes em estimular a superovulação e produção de embriões, mas não houve diferença entre os genótipos avaliados quanto a taxa de ovulação.

Palavras chave: taxa de ovulação, embrião, polimorfismo

ABSTRACT

SUPEROVULATION PROTOCOLS IN EWES OF SANTA INÊS BREED WITH A NEW POLYMORPHISM ON GDF-9 GENE (FecG^E)

Superovulation e embryo recovery was made in 18 ewes (6 +/+, 6 +/E e 6 E/E) to compare ovarian response among genotype. The ewes were randomly distributed in two protocols of superovulation: traditional protocol and Day 0 protocol. Each treatment was repeated twice in a cross-over model intercalated of two months each. Was used fresh semen for AI of one male with proved fertility. Five days after AI the embryos were recovered cirurgically, by laparotomy. The collected embryos were freezing by conventional method and storage in germoplasm bank. The statistical analyses were factorial 3x2 with variance analyses by SAEG 9.1. There was no difference among evaluated parameters ($P>0.05$) between Day 0 protocol (total CL 9.8 ± 5.3 ; total structures 4.5 ± 4.6 ; viable structures 1.6 ± 2.0) and traditional protocol (total CL 10.0 ± 6.0 ; total structures 3.5 ± 4.3 ; viable structures 1.7 ± 2.4), probably because of precocious acquisition of LH receptors changing the follicular dominance process. Corpora lutea in the ovaries (E/E 9.0 ± 6.3 ; +/E 10.1 ± 5.3 ; +/+ 10.5 ± 5.3), total structure recovered (E/E 4.9 ± 5.0 ; +/E 3.1 ± 3.1 ; +/+ 4.1 ± 5.2), and viable embryos (E/E 1.9 ± 2.1 ; +/E 2.2 ± 2.6 ; +/+ 0.9 ± 1.7), there was no difference ($P>0.05$) among groups of genotype animals. Was observed higher number of animals answering the superovulation treatment when used Day 0 protocol (10/18) in comparison with traditional protocol (6/18). The ewes that answered to superovulation protocol, regardless the protocol, by genotype, there were no difference E/E 6/12; +/E 5/12 e +/+ 5/12. Was not observed alteration in ovaries, in follicular growth and neither in viable embryo production when compare among genotypes. Both protocols were efficient in superovulation and embryo production, but there were no difference among evaluated genotypes in ovulation rate, possibly for any alteration in FSH receptor, influenced by the new genotype or by the forward fase of FSH application.

Key words: ovulation rate, embryo, polymorphism.

INTRODUÇÃO

A TE tem como principal objetivo a maximização reprodutiva da fêmea, explorando assim seu potencial biológico ao extrapolar suas possibilidades naturais, e contribuindo para a disseminação de animais geneticamente superiores e redução do intervalo entre gerações (Simplício et al., 2002).

Como há uma grande variação na resposta superovulatória na TE em ovinos, essa variação pode ser devido ao status folicular do ovário no momento do início do tratamento superovulatório. O protocolo superestimulatório tradicional consiste de uma prolongada exposição ao progestágeno (12-18 dias), com FSH iniciando aproximadamente 48 horas antes da retirada do progestágeno (Menchaca et al., 2007).

Em se tratando de dominância folicular e superovulação, muitos trabalhos suportam a idéia que o tratamento superovulatório iniciado com a ausência de um folículo dominante resultou em melhora no recrutamento folicular, taxa de ovulação e/ou produção de embrião em ovelhas (Rubianes et al., 1995, 1997; González-Bulnes et al., 2003) e em cabras (Menchaca et al., 2002, 2007, González-Bulnes et al., 2003).

Com o objetivo de se evitar o início da superovulação com a presença de um folículo dominante desenvolveu-se um protocolo denominado Dia 0, que inicia o tratamento durante a primeira onda folicular que ocorre logo após a ovulação. Neste período do ciclo há uma ausência de grandes folículos e um *pool* homogêneo de pequenos folículos crescendo. Para sincronizar a ovulação e a emergência da primeira onda é utilizado um tratamento curto de sincronização. O tratamento superovulatório é iniciado 72-84 horas após a retirada da fonte de P₄ (Menchaca et al., 2002).

As causas mais comuns de alta taxa de ovulação em heterozigotos para o gene BMP 15 e homozigoto para o gene Booroola é a precoce maturação dos folículos desenvolvidos devido ao aumento a resposta ao FSH e precoce aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa. No trabalho de Melo et al., 2008 pode-se observar que quando utilizados protocolos de sincronização de estro as ovelhas homozigotas mutantes para o

FecG^E apresentaram maior índice de ovulação múltipla, superior as ovelhas heterozigotas e selvagens. Juengel et al. (2004) avaliaram se a imunização de ovelhas contra o GDF-9 e o BMP-15 poderia levar a uma resposta superovulatória dos animais e resultar em perda da qualidade dos oócitos, mas não observaram nenhuma alteração.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta superovulatória e a produção de embriões em ovelhas portando a mutação FecG^E no gene GDF-9 frente a dois protocolos de superovulação com o intuito de minimizar o efeito protocolo nas respostas fisiológicas dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizada a superovulação e coleta de embriões de 18 ovelhas (6 selvagens, 6 heterozigotas e 6 mutantes) para comparação da resposta ovulatória.

As ovelhas, entre 2 e 5 anos de idade, permaneceram por 60 dias antes do início dos protocolos em confinamento recebendo feno de *coast-cross*, 200 g de farelo de milho por animal, água e sal mineral à vontade. Esse período serviu também para adaptação dos animais. As fêmeas foram avaliadas previamente quanto ao estado sanitário, nutricional e reprodutivo.

As fêmeas ovinas foram aleatoriamente distribuídas, dentro dos seus grupos genéticos, entre dois protocolos de superovulação: protocolo tradicional e protocolo Dia 0. Cada tratamento foi repetido duas vezes em um modelo *cross-over* com intervalo de dois meses entre eles. O protocolo tradicional consistiu na inserção de esponja vaginal contendo 60 mg de MAP por 14 dias, o qual foi substituída no dia 7, seguida de 150 µg de cloprostenol (Prolise[®]) i.m.. No dia 12 deu-se início a superovulação com 200 mg de FSH (Folltropin[®]) i.m. dado duas vezes ao dia por 4 dias em doses decrescentes. Uma dose de 200 UI de eCG (Novormon[®]) i.m. foi aplicada no momento da retirada da esponja. A IA foi realizada por laparoscopia 48 e 55 horas após a remoção das esponjas utilizando sêmen fresco de um único carneiro de fertilidade comprovada. O protocolo Dia 0 consistiu numa sincronização prévia por 9 dias com esponja (60 mg MAP), seguido de 160 µg de cloprostenol (Prolise[®]) i.m. e 200 UI de eCG (Novormon[®]) i.m. no Dia 7. Uma dose de 0,05 mg de GnRH (Icirelin; Gestran Plus[®]) i.m. foi dada 16 horas após a remoção das esponjas. Portanto, foi concluído através de estudos anteriores que 48 horas após a remoção da esponja todos os animais já haviam ovulado e assim foi considerado dia 0 e o tratamento com FSH iniciado, numa dose total de 200 mg de FSH (Folltropin[®]), dada duas vezes ao dia, em seis doses decrescentes. Duas doses de cloprostenol (160 µg de cloprostenol, Prolise[®]) i.m. foram dadas junto com a quinta e sexta dose de FSH. Doze horas após a última dose de FSH os animais receberam GnRH (0,05 mg

de lecorelin i.m.). IA, com sêmen fresco, foi realizada por laparoscopia às 16 e 26 horas após o tratamento com GnRH, .

Cinco dias após a IA os embriões foram recuperados cirurgicamente, através de laparotomia, como descrito por Ishwar & Menom (1996). A colheita cirúrgica promove melhor taxa de recuperação dos embriões, segundo Freitas (2006).

Os embriões coletados foram avaliados quanto ao estágio de desenvolvimento e por suas características morfológicas segundo os parâmetros de qualidade propostos pela IETS (1998), que podem ser divididos em mórula, mórula compacta, blastocisto inicial, blastocisto, blastocisto expandido e blastocisto eclodido para estágio de desenvolvimento e grau excelente (I), bom (II), regular (III) e degenerado, morto ou não fecundado (IV) para características morfológicas. Os embriões coletados foram congelados pelo método convencional.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita por arranjo fatorial 3x2 com análise de variância, através do programa SAEG 9.1. Para a discussão, utilizou-se o grau de significância de $P \leq 0,05$.

RESULTADOS

Dentre os parâmetros avaliados não houve diferença entre os protocolos de superovulação (Tabela 3.1, $P>0,05$). Também não houve interação entre protocolo e genótipo.

Tabela 3.1: Quantidade de corpos lúteos no ovário esquerdo (CL OE), no ovário direito (CL OD), quantidade de corpos lúteos totais (CL TOTAL), número de estruturas totais e números de estruturas viáveis quando comparados dois protocolos de superovulação, protocolo Dia 0 e protocolo Tradicional em ovelhas da raça Santa Inês (média \pm DP).

	DO	TRADICIONAL
CL OE	4,8 \pm 3,1	5,3 \pm 3,5
CL OD	5,1 \pm 3,2	4,8 \pm 3,1
CL TOTAL	9,8 \pm 5,3	10,0 \pm 6,0
ESTRUTURAS TOTAIS	4,5 \pm 4,6	3,5 \pm 4,3
ESTRUTURAS VIÁVEIS	1,6 \pm 2,0	1,7 \pm 2,4

Para quantidade de corpos lúteos nos ovários, estruturas totais coletadas e estruturas viáveis não houve diferença ($P>0,05$) entre os grupos de animais dos diferentes genótipos FecG^E (Tabela 3.2).

Tabela 3.2: Quantidade de corpos lúteos no ovário esquerdo (CL OE), no ovário direito (CL OD), quantidade de corpos lúteos totais (CL TOTAL), número de estruturas totais e números de estruturas viáveis quando comparadas ovelhas da raça Santa Inês com diferentes genótipos do gene GDF-9: homozigotas mutante (E/E), heterozigotas (+/E) e selvagem (+/+) (média \pm DP).

	E/E	+/E	+/+
CL OE	3,8 \pm 3,4	5,0 \pm 3,0	6,0 \pm 3,4
CL OD	5,2 \pm 3,8	5,1 \pm 3,0	4,5 \pm 2,8
CL TOTAL	9,0 \pm 6,3	10,1 \pm 5,3	10,5 \pm 5,3
ESTRUTURAS TOTAIS	4,9 \pm 5,0	3,1 \pm 3,1	4,1 \pm 5,2
ESTRUTURAS VIÁVEIS	1,9 \pm 2,1	2,2 \pm 2,6	0,9 \pm 1,7

Foi observado maior número de animais com resposta ao tratamento superovulatório quando utilizado o protocolo Dia 0 (10/18) em comparação ao protocolo Tradicional (6/18). Quando se compara a quantidade de ovelhas que responderam à superovulação, independente do protocolo, pelo genótipo não houve diferença: E/E 6/12; +/E 5/12 e +/+ 5/12.

DISCUSSÃO

Os parâmetros taxa de ovulação, estruturas totais e estruturas viáveis quando comparados entre os protocolos de superovulação utilizados não apresentaram diferença. Provavelmente porque a questão da dominância folicular não é absoluta como na vaca. Enquanto alguns autores relatam a existência da dominância em ovelhas (Rubianes et al., 1995, 1997) outros autores não confirmam a existência desta nesses animais (Gonzales-Bulnes et al., 2000, Toosi et al., 2010). Observou-se que a dominância folicular pode estar presente na primeira onda e na onda ovulatória, evidenciada pelo aumento na concentração de estradiol e pelo maior tamanho dos folículos o que não ocorre nas ondas da fase luteal média (Castro et al., 1999).

Castonguay (1990) trabalhando com ovelhas prolíficas Booroola comparadas a ovelhas não prolíficas não observou dominância folicular em nenhum dos grupos e relatou que o maior folículo não teve efeito negativo no crescimento dos menores folículos. Fato este acontecido no presente trabalho em que as ovelhas podem não ter apresentado dominância folicular por isso não foram encontradas diferenças entre os protocolos. Uma explicação é que a acentuada resposta dos folículos ao LH devido à aquisição precoce de receptores de LH pode mudar o processo de dominância folicular, induzindo a múltipla dominância (Castonguay, 1990).

Neste trabalho foi observado um maior número de ovelhas que responderam ao tratamento superovulatório no protocolo Dia 0 (10/18) quando comparado ao protocolo Tradicional (6/18), Menchaca et al. (2007) também observaram maior porcentagem de fêmeas que responderam ao tratamento quando utilizado o protocolo Dia 0. No presente trabalho os animais considerados como que não apresentaram resposta superovulatória foram porque apresentaram ≤ 2 corpos lúteos nos ovários ou apresentaram regressão precoce do corpo lúteo (corpos lúteos pequenos, $< 5\text{mm}$ e de coloração esbranquiçada). Acredita-se que a causa de regressão precoce do corpo lúteo pode estar associada com a superestimulação de folículos velhos com menor capacidade de ovularem ou de desenvolverem um corpo lúteo normal

(Menchaca et al., 2007). Gusmão & Moura (2005) trabalhando com ovelhas Santa Inês obtiveram 26% dos animais que não responderam a superovulação afirmando que este é um dos grandes entraves dos programas de TE. Notaram também que sob um mesmo manejo e tratamento superovulatório, alguns animais não produziram embriões e outros responderam com uma produção de até 31 estruturas. A ausência de diferença no número médio de corpos lúteos entre os protocolos e a falta de interação entre genótipos e protocolos neste trabalho descarta a possibilidade de efeito de tratamento hormonal na taxa de ovulação.

As visualizações dos ovários durante as inseminações artificiais e contagem de corpos lúteos por laparoscopia mostraram ovários funcionais, de tamanhos fisiológicos e com presença de crescimento folicular em todos os tipos genéticos, diferente da outra mutação no GDF-9 (FecG^H) em que ovelhas homozigotas mutantes possuem ovários de menor tamanho, sem presença de crescimento folicular (Hanrahan et al., 2004) e ovelhas com mutação no gene BMP-15 que possuem o mesmo fenótipo (Fabre et al., 2006).

Um nível adequado de GDF-9 é necessário para a expressão de receptores de FSH durante os primeiros estágios de desenvolvimento folicular (Orisaka et al., 2006), além disso o GDF-9 inibe a aquisição de receptores de LH pelas células da granulosa (Guéripel et al., 2006). Como este polimorfismo FecG^E tem um efeito aditivo, conforme constatado por Silva et al. (2010) o que pode ter ocorrido é que os folículos dos animais mutantes adquiriram mais receptores para FSH e atrasaram a aquisição de receptores de LH, levando a um crescimento acentuado dos folículos o que levou a uma maior produção de estradiol e inibina por estes, ocorrendo um efeito negativo nos menores folículos o que resultou então numa taxa de ovulação semelhante aos animais heterozigotos e selvagens.

Outra explicação é que o GDF-9 atua nos primeiros estágios de desenvolvimento folicular, quando os folículos são independentes de gonadotrofina, mas a continuação do crescimento folicular de pré antral para antral é dependente de gonadotrofina, então quando se faz uma complementaridade com FSH durante um protocolo de superovulação a estimulação dos folículos será igual para todos os genótipos de FecG^E pois já estão sendo estimulados numa fase em que os folículos são dependentes de gonadotrofina.

Ainda são necessários estudos para o melhor esclarecimento de como os polimorfismos atuam no aumento da taxa de ovulação, também há falta de trabalhos que mostrem como é o comportamento folicular diante da superovulação nesses animais para modo de comparação e melhor entendimento dos acontecimentos na fase de desenvolvimento folicular.

Quando se analisa os embriões produzidos, não foram observadas diferenças no número de embriões totais, nem no número de embriões viáveis independente do genótipo, mostrando

que a mutação FecG^E não influencia na qualidade e desenvolvimento embrionário e nem na função luteal. Assim como no capítulo 2, no qual foi observado função luteal normal e habilidade de produzir cordeiros saudáveis. Juengel et al. (2004) também não observaram diferenças na função do corpo lúteo nem no desenvolvimento embrionário em ovelhas imunizadas contra o GDF-9 e o BMP-15, apesar de especularem que a imunização poderia afetar a saúde do oócito ou a habilidade de desenvolvimento embrionário reduzindo a habilidade dos animais em levarem a prenhez a termo. Pôde-se observar também, no presente trabalho, que não houve diferença entre a quantidade de animais que responderam ao tratamento superovulatório, independente do protocolo, entre os grupos de animais dos diferentes genótipos mostrando que não houve influência do genótipo sobre a resposta superovulatória.

CONCLUSÃO

Pode-se concluir a partir dos resultados analisados que este novo polimorfismo FecG^E no gene GDF-9 não é capaz de aumentar a taxa de ovulação quando utilizado protocolo de superovulação. Também não foi observada alteração na qualidade embrionária quando comparadas as ovelhas mutantes, heterozigotas e selvagens.

Os dois protocolos de superovulação, Dia 0 e Tradicional, foram eficientes em estimular a superovulação e produção de embriões, sendo que a resposta de animais a superovulação foi maior quando utilizado o protocolo Dia 0.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CASTONGUAY, F., DUFOUR, J.J., MINVIELLE, F; ESTRADA, R., Follicula dynamics and dominance in Booroola x Finish Landrace and Booroola x Suffolk ewes heterozygous for the F gene, **Journal of Reproduction and Fertility**, 89, 193-203, 1990.

FABRE S, PIERRE A, MULSANT P, BODIN, L.; PASQUALE, E.D.; PERSANI, L.; MONGENT, P.; MONNIAUX, D., Regulation of ovulation rate in mammals: contribution of sheep genetic models. **Reproductive Biology and Endocrinology** 4:20, 2006

FREITAS, V.J.F., **Biotecnologia da reprodução em pequenos ruminantes: produção de embriões por transferência nuclear (clonagem)**, Fortaleza, Multicor, 2006, 84p.

GONZÁLEZ-BULNES, A., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M.J., LOPEZ-SEBASTIAN, A., Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in spanish merino ewes, **Theriogenology**, 54, 1055-1064, 2000.

GONZÁLEZ-BULNES, A., CARRIZOSA, J. A., DÍAZ-DELFA, C., GARCÍA-GARCÍA, R. M., URRUTIA, B., SANTIAGO-MORENO, J., COCERO, M. J., AND LÓPEZ-SEBASTIÁN, A. Effects of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. **Small Ruminant Research** 48, 9–14, 2003

GUÉRIPEL, X., BRUN, V., GOUGEON, A., Oocyte bone morphogenetic protein 15, but not growth differentiation factor 9, is increased during gonadotropin-induced follicular development in the immature mouse and is associated with cumulus oophorus expansion, **Biology and Reproduction**, 75, 836-843, 2006.

GUSMÃO, A. L.; MOURA, J. C. A. Transferência de embriões em caprinos e ovinos. **Acta Scientiae Veterinarie**. V.33, p. 29-32, 2005.

HANRAHAN JP, GREGAN SM, MULSANT P, MULLEN, M.; DAVIS, G.H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S.M. Mutations in the genes for oocyte-derived growth factors GDF-9 and BMP15 are associated with both increased ovulation rate and sterility in Cambridge and Belclare sheep (*Ovis aries*). **Biology of Reproduction** 70:900-9, 2004

JUENGEL, J.L., HUDSON, N.L., WHITING, L., MCNATTY, K.P., Effects of immunization against bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 on ovulation rate, fertilization and pregnancy in ewes, **Biology of Reproduction**, 70, 557-561, 2004.

IETS, STRINGFELLOW, D.A.; SEIDEL, S.M., **Manual da Sociedade internacional de Transferência de Embriões**, 3 ed., 1998.

ISHWAR, A.K.; MENON, M.A.; Embryo transfer in sheep and goats: a review, **Small Ruminant Research**, 19, 35-43, 1996.

MELO, E.O.; SILVA, B.D.M.; CASTRO, E.; SILVA, T.A.S.N.; PAIVA, S.R.; SARTORI, R.; FRANCO, M.M.; SOUZA, C.J.H.; NEVES, J.P. A novel mutation in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene is associated in homozygosis, with increased ovulation rate in Santa Inês sheep. In: **Forty-first Annual Meeting of the Society for the Study of Reproduction**, 2008, Kona-Hawaii, Reproductive Biology: basic Discoveries that affect our lives. Kona: SSR, v.1, p.152-153, 2008.

MENCHACA, A., PINCZAK, A., AND RUBIANES, E. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. **Theriogenology** 58, 1713–1721, 2002

MENCHACA, A., VILARIÑO, M., CRISPO, M., PINCZAK, A., RUBIANES, E. Day 0 protocol: Superstimulatory treatment initiated in the absence of a large follicle improves ovarian response and embryo yield in goats. **Theriogenology** 68, 1111–1117, 2007

ORISAKA, M., ORISAKA, S., JIANG, J.Y, CRAIG, J., WANG, Y., KOTSUJI, F., TSANG, B.K., Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early stage, **Molecular Endocrinology**, 20, 2456-2468, 2006.

RUBIANES, E., IBARRA, D., UNGERFELD, R., CARBAJAL, B., DE CASTRO, T. Superovulatory response in anestrous ewes is affected by the presence of a large follicle. **Theriogenology** 43, 465–472, 1995

RUBIANES, E., UNGERFELD, R., VIÑALES, C., RIVERO, A., ADAMS, G. P. Ovarian response to gonadotropin treatment initiated relative to wave emergence in ultrasonographically monitored ewes. **Theriogenology** 47, 1479–1488, 1997

SILVA, B.D.M.; CASTRO, E.A.; SOUZA, C.J.H.; PAIVA, S.R.; SARTORI, R.; FRANCO, M.M.; AZEVEDO, H.C.; SILVA, T.A.S.N.; VIEIRA, A.M.C.; NEVES, J.P.; MELO, E.O., A new polymorphism in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF9) gene is associated with increased ovulation rate and prolificacy in homozygous sheep (p), **Animal Genetics**, Published Online: May 26 2010, DOI: 10.1111/j.1365-2052.2010.02078.x

SIMPLICIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Congresso Norte/Nordeste de Reprodução Animal**, v.1 p. 17-27, 2002.

TOSSI, B.; DAVIES, K.L.; SEEKALLU, S.V.; ZIEGLER, A.C.; BARRETT, D.M.W.; DUGGAVATHI, R.; RAWLINGS, N. Ovarian Follicular Dominance and the induction of daily follicular waves in the ewe, **Biology of Reproduction**, 2010, published online before print in www.pubmed.com, accessed at 22/05/2010.

CAPÍTULO 4

Considerações Finais

Ovelhas que possuem o novo polimorfismo nos dois alelos do gene GDF-9 possuem uma maior taxa de ovulação e uma maior prolificidade que as heterozigotas e as homozigotas selvagens. Além disso, não apresentam esterilidade quando em homozigose.

Não há diferença entre as ovelhas genotipadas quando se promoveu a superovulação desses animais, não há aumento na taxa de ovulação nem alteração na qualidade embrionária.

É importante caracterizar qual o mecanismo que induz a maior taxa de ovulação e prolificidade desse novo polimorfismo, já que difere dos outros polimorfismos descritos no gene GDF-9 e BMP-15 que levam esterilidade em animais homozigotos mutantes.

Este novo fenótipo pode ser muito útil para melhor entendimento do controle genético do desenvolvimento folicular e dos mecanismos envolvidos no controle da ovulação nos mamíferos.