



Acta Scientiae Veterinariae

ISSN: 1678-0345

ActaSciVet@ufrgs.br

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Brasil

Santos Gottschall, Carlos; Giehl Glanzner, Werner; Rosa de Almeida, Marcos; Tiane Dal Cortivo  
Martins, Carla; de Azevedo Weimer, Tania; Radke Bittencourt, Hélio; Costa Mattos, Rodrigo; Macedo  
Gregory, Ricardo

Resposta reprodutiva de novilhas de corte associada a marcadores moleculares relacionados à  
fertilidade

Acta Scientiae Veterinariae, vol. 41, núm. 1, enero-diciembre, 2013, pp. 1-12

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Porto Alegre, Brasil

Disponível em: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=289031817054>

- Como citar este artigo
- Número completo
- Mais artigos
- Home da revista no Redalyc

redalyc.org

Sistema de Informação Científica

Rede de Revistas Científicas da América Latina, Caribe, Espanha e Portugal

Projeto acadêmico sem fins lucrativos desenvolvido no âmbito da iniciativa Acesso Aberto

## Resposta reprodutiva de novilhas de corte associada a marcadores moleculares relacionados à fertilidade

Reproductive Performance of Beef Cattle Heifers Associated with Molecular Markers Related to the Fertility

Carlos Santos Gottschall<sup>1</sup>, Werner Giehl Glanzner<sup>2</sup>, Marcos Rosa de Almeida<sup>3</sup>, Carla Tiane Dal Cortivo Martins<sup>3</sup>, Tania de Azevedo Weimer<sup>1</sup>, Hélio Radke Bittencourt<sup>4</sup>, Rodrigo Costa Mattos<sup>5</sup> & Ricardo Macedo Gregory<sup>5</sup>

### ABSTRACT

**Background:** The marker assisted selection (MAS) is indicated as an auxiliary strategy to increase the productive performance in cattle. The principle consists in the identification and selection of molecular markers associated with genes involved directly or indirectly with the expression of a desired trait, usually multifactorial and polygenic. The pregnancy rate is a form of expression fertility, with great economic importance in cattle production systems. The pregnancy rate is a multifactorial trait, which is influence by genetics, environment and their interactions. In the current study was search for an association between the reproductive response, expressed by pregnancy rate at insemination and pregnancy rate at the end of the mating season, and molecular markers of genes related to IGF-1 receptor, LH $\beta$ , Leptin, receptors of FSH and LH.

**Materials, Methods & Results:** Data were evaluated from 249 beef heifers of British breeds, Angus, Devon and crosses. The animals at fourteen or twenty seven months were subjected to different protocols for artificial insemination (AI) and fixed-time artificial insemination (TAI), followed by clean up bulls. The protocols AI and TAI, called AI/TAI, were: Group 1 -Ovsynch protocol (27th months). At day zero the animals received an injection of a GnRH at a dose of 10  $\mu$ g buserelin, at seventh day received 500  $\mu$ g of cloprostenol sodium, at ninth day the animals received another dose of 10  $\mu$ g of buserelin. TAI was performed 10 h after the application of buserelin; Group 2 - Protocol Crestar<sup>®</sup> with 1/2 dose of estradiol valerate injectable (27th months). At eighth day the implant was removed, followed by 375  $\mu$ g of cloprostenol sodium. At ninth day, was administered 1 mg of estradiol benzoate. TAI was performed in tenth day, 52 h after implant removal; Group 3 - Control group (27th months), with AI 12 h after estrus during the first seven days. Seventh day, was applied 375  $\mu$ g of cloprostenol sodium on all heifers not inseminated, followed by AI for five days more; Group 4 (14th months) - Same protocol of the Group 2; Group 5 (14th months) - Same protocol of the Group 3. During the group formation, blood samples for extraction of DNA were obtained individually from all experimental animals. Microsatellite markers (short tandem repeats, STR) and/or single nucleotide polymorphisms (SNPs) were investigated by means of polymerase chain reaction (PCR). The STR investigated were the AFZ-1, HEL5, ILST002, IDVGA51, FSHR and LHR. We considered the effects of the treatment groups, age, body condition score (BCS), reproductive tract score (RTS), weight at the beginning of the breeding season, daily weight gain on pregnancy rate to AI/TAI and pregnancy rate to final. Molecular markers investigated did not show association with pregnancy rate. The mean pregnancy rate at insemination was 41.0% and the pregnancy rate final was 91.6%. There were no differences in pregnancy between the age of the animals. The average weight at the beginning of the mating was 313 kg without differentiate between animal that become pregnant or empty during the reproductive season. The RTS influenced the pregnancy rate after insemination in respectively 0%, 32.1% and 49.5% ( $P < 0.05$ ) for RTS 1, 2 and 3.

**Discussion:** Molecular markers AFZ-1, HEL5, ILST002, IDVGA51, FSHR and LHR could not be associated with pregnancy rate at insemination and pregnancy in beef heifers, perhaps because the high degree of reproductive selection that these animals are subjected. The nutritional status of the herd, expressed by weight and body condition score at mating of animals contributed to the achievement of significant pregnancy rates. The reproductive tract score can be considered as a predictor of fertility in herds of beef heifers.

**Keywords:** bovine, reproductive tract score, artificial insemination, weight, pregnancy rate.

**Descritores:** bovinos, escore de trato reprodutivo, inseminação artificial, peso, taxa de prenhez.

## INTRODUÇÃO

Fertilidade é uma característica complexa que representa diversos componentes e estágios exigidos em machos e fêmeas para considerá-los funcionalmente capazes de superar todas as fases críticas do ciclo reprodutivo: formação de gametas, fertilização, implantação embrionária, desenvolvimento fetal e nascimento [16]. De modo geral, as características consideradas indicativas de fertilidade apresentam baixa herdabilidade e são expressas tardiamente na vida do animal [6,10,13,25,29], além de sofrerem controle poligênico e possuírem forte influência ambiental [26,32].

A seleção assistida por marcadores (MAS) tem sido indicada como ferramenta auxiliar no aumento do desempenho reprodutivo e produtivo em bovinos. O princípio consiste na identificação e seleção para marcadores moleculares associados a genes envolvidos diretamente ou indiretamente com a expressão de uma característica desejada, geralmente multifatorial e poligênica [12]. O emprego da MAS pode ser muito útil para selecionar essas características, permitindo a eliminação de genótipos desfavoráveis [44]. A MAS é particularmente útil para a seleção de características de baixa herdabilidade e de difícil mensuração e permite a seleção de animais jovens, antes do desenvolvimento dos caracteres reprodutivos.

No presente trabalho buscou-se uma associação entre alguns marcadores e genes, descritos previamente, com a taxa de prenhez. O estudo teve por objetivos: 1) identificar a frequência alélica para os marcadores moleculares AFZ-1 e HEL5 associados ao gene IGF-IR; ILST002 associado ao gene LHβ; IDVGA51 associado ao gene da Leptina e os genes FSHR e LHR; 2) associar a taxa de prenhez, em novilhas acasaladas aos 14 e 27 meses aos marcadores moleculares e genes escolhidos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

Foram avaliadas 249 novilhas de corte de raças britânicas, Angus, Devon e cruzas. As novilhas, oriundas de propriedade particular, localizada no município de Cristal-RS (Fazenda Corticeiras - 30°58'48" S e 51°56'40" W), foram submetidas a diferentes protocolos de inseminação artificial (IA) e inseminação artificial em tempo fixo (IATF), seguido pelo repasse de touros.

Os protocolos de IA e IATF, sendo denominados de IA/TF a que os animais foram submetidos estão descritos abaixo e resumidos na Tabela 1:

- Grupo 1 - Protocolo OvSynch [34]. No dia zero pela manhã, foi realizada a aplicação intramuscular de um análogo do GnRH, na dose de 10 µg de busrelina (2,5 mL de Sincroforte®<sup>1</sup>). Sete dias após os animais receberam 500 µg de cloprostenol sódico (2 mL de Sincrocio®<sup>2</sup>) intramuscular. No nono dia pela manhã os animais receberam nova aplicação intramuscular de 10 µg de busrelina (2,5 mL de Sincroforte®<sup>1</sup>). A IATF foi realizada à tarde 10 h após a aplicação da busrelina;
- Grupo 2 - Protocolo Crestar®<sup>3</sup> com ½ dose do Valerato de Estradiol (VE) injetável na colocação do implante (equivalente a 2,5 mg de VE e 1,5 mg de Norgestomet). No oitavo dia foi retirado o implante, seguido pela aplicação intramuscular de PGF2a (375 µg de cloprostenol sódico, equivalente a 1,5 mL de Sincrocio®<sup>1</sup>). No 9º dia, 24 h após a retirada do implante, foi aplicado 1 mg de benzoato de estradiol (BE) (1 mL de Sincrodiol®<sup>4</sup>). A IATF foi realizada no 10º dia, 52 h após a retirada do implante;
- Grupo 3 - Grupo controle, com realização da inseminação artificial 12 h após a observação de estro durante os sete primeiros dias. No 7º dia foi aplicada PGF2a, equivalente a 375 µg de cloprostenol sódico (1,5 mL de Sincrocio®<sup>1</sup>) em todas novilhas não inseminadas. O estro foi observado por mais cinco dias, seguida por IA 12 h após a identificação do estro;

Os grupos 1, 2 e 3 foram formados por animais de 27 meses.

- Grupo 4 - Mesmo protocolo dos animais do grupo 2, porém com animais de 14 meses;
- Grupo 5 - Mesmo protocolo dos animais do grupo 3, porém com animais de 14 meses.

A estação de acasalamento teve a duração de 60 dias. Sete dias após a realização da IA/TF foram soltos os touros, com fertilidade comprovada por avaliação andrológica, na proporção de 2,5%. Quarenta dias após a IA/TF foi realizado o diagnóstico de gestação, por palpação retal, por técnico capacitado para avaliar a taxa de prenhez à IA/TF. Setenta dias após o término do repasse foi realizado um segundo diagnóstico de gestação em todos os animais para avaliar a taxa de prenhez final (somado ao repasse dos touros). Também

foram coletadas e analisadas informações envolvendo a idade, grupo racial, pesos ao início e final da estação reprodutiva, ganho médio diário de peso, escore de condição corporal (ECC) na escala de 1 a 5 [24], escore de trato reprodutivo (ETR) adaptado de Andersen et al. [4], em uma escala de 1 a 3 através da avaliação de útero e ovários [9]. O ETR 1 foi atribuído ao animal impúbere, o 2 ao animal peripúbere e o 3 ao animal cíclico.

Por ocasião da inserção do implante auricular, amostras de sangue para a extração do DNA foram obtidas individualmente de todos os animais experimentais, a partir da veia caudal em tubo vacutainer contendo anticoagulante à base de ácido Etileno Diamino Tetra Acético (EDTA)5. As amostras foram processadas no Laboratório de Biotecnologia

da Faculdade de Veterinária da ULBRA, localizada no município de Canoas, RS, sendo extraído o DNA [28].

Foram investigados, através de reação em cadeia da polimerase (PCR), marcadores moleculares microssatélites (short tandem repeats, STR) e/ou polimorfismos de um único nucleotídeo (single nucleotide polymorphisms, SNPs). Os STR investigados foram o AFZ-1 e HEL5 ambos associados ao gene IGF-IR; ILST002 associado ao gene LH $\beta$ ; e o IDVGA51 associado ao gene da Leptina e os SNPs nos genes do FSHR e do LHR (Tabela 2). A escolha dos marcadores e genes ocorreu em função de associação com o desempenho reprodutivo em bovinos descrita anteriormente [1,2,5,15,27,30,42,45].

**Tabela 1.** Formação dos grupos experimentais.

GRUPO	Idade da novilha	Protocolo de sincronização	Número de animais
1	27 meses	OvSynch	62
2	27 meses	Crestar® (1/2 dose V.E)	61
3	27 meses	PGF2a (7 dias após início IA)	62
4	14 meses	Crestar® (1/2 dose V.E)	32
5	14 meses	PGF2a (7 dias após início IA)	32
Total			249

**Tabela 2.** Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo e referências da técnica empregada.

Marcadores	Cromossomo	Gene Alvo	Referências
AFZ1	21	IGF-IR	Jorgensen <i>et al.</i> , 1996
HEL5	21	IGF-IR	Bishop <i>et al.</i> , 1994
ILSTS002	18	LH $\beta$	Kemp <i>et al.</i> , 1992
IDVGA51	4	Leptina	Kappes <i>et al.</i> , 1997
FSHR	11	FSHR	Houde <i>et al.</i> , 1994
LHR	11	LHR	Marson <i>et al.</i> , 2005

Os microssatélites estudados foram investigados através da amplificação do DNA por reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando iniciadores (primers) e temperaturas de anelamento específicas. Os produtos de amplificação dos microssatélites foram analisados em gel de poliacrilamida vertical, não desnaturante [23] e visualizados por coloração com nitrato de prata usando-se um marcador de peso molecular de 25pb (Promega) como escada alélica. Os amplicons dos SNPs LHR e o DNA foi amplificado por PCR e o

produto gerado fragmentado com enzimas de restrição, AluI e HhaI para FSHR foram clivados com as endonucleases HhaI e AluI, ambas da Promega, conforme o protocolo do fabricante e analisados em gel vertical de poliacrilamida não desnaturante.

As frequências alélicas e genotípicas foram estimadas respectivamente por contagem alélica e dos diferentes genótipos [46].

A partir dos resultados obtidos foi realizada a investigação da associação da resposta reprodutiva

aos marcadores moleculares associados a genes com influência sobre a atividade reprodutiva (Tabela 2). Para demonstrar as implicações dos resultados dos marcadores moleculares sobre características de desempenho reprodutivo, empregou-se os resultados obtidos por ocasião do primeiro (prenhez à IA/TF) e segundo diagnóstico de gestação (prenhez final).

Conforme os resultados da frequência alélica, os genótipos foram agrupados em longos e curtos, de acordo com o número de pares de base, seguindo assim metodologias publicadas [11]. Esse agrupamento foi utilizado para testar o genótipo agrupado ao resultado reprodutivo à inseminação e ao final da estação de acasalamento (Tabela 3).

Os dados coletados permitiram o cálculo de informações adicionais que complementam o estudo tais como: percentual de animais prenhes à IA/TF, percentual de animais que conceberam ao final da estação, relações entre idade, peso, ECC, ETR, e resposta reprodutiva de novilhas acasaladas aos 14 e 27 meses.

Os resultados obtidos no experimento foram submetidos à análise de variância, procedimento GLM e qui-quadrado através do software SPSS 13.0, com nível de significância de 5%. Nos modelos foram considerados os efeitos dos tratamentos grupos, idade, ECC, ETR, peso ao início da estação reprodutiva, ganho médio diário de peso, sobre as taxas de prenhez à IA(TF) e prenhez final. Interações possíveis entre as variáveis foram testadas.

**Tabela 3.** Classificação dos alelos conforme o tamanho em pares de base.

Sistema	Tamanho em pares de base	
	Curtos	Longos
AFZ1	≤ 117	≥ 119
HEL5	≤ 159	≥ 161
ILST002	≤ 133	≥ 135
IDVGA51	≤ 175	≥ 177
FSHR	-	-
LHR	-	-

## RESULTADOS

As frequências alélicas para os marcadores investigados estão representados nas Tabelas 4 a 6.

**Tabela 4.** Frequências alélicas identificadas do AFZ-1 e HEL5 nos animais experimentais.

AFZ-1			HEL5		
Alelo	Freq.	%	Alelo	Freq.	%
109	3	0,6	131	2	0,4
111	17	3,4	149	2	0,4
113	116	23,3	151	34	6,8
115	11	2,2	<b>153</b>	204	41,0
117	107	21,5	155	22	4,4
119	30	6,0	157	4	0,8
121	49	9,8	161	16	3,2
123	83	16,7	163	50	10,0
125	80	16,1	165	104	20,9
127	2	0,4	167	50	10,0
			169	10	100,0
<b>Total</b>	<b>498</b>	<b>100,0</b>	<b>498</b>	<b>100,0</b>	

**Tabela 5.** Frequências alélicas identificadas do ILST002 e IDVGA51 nos animais experimentais.

ILST002			IDVGA51		
Alelo	Freq.	%	Alelo	Freq.	%
127	62	12,4	173	34	6,8
129	11	2,2	<b>175</b>	230	46,2
131	36	7,2	177	68	13,7
133	145	29,1	179	65	13,1
135	145	29,1	181	25	5,0
137	32	6,4	183	69	13,9
139	67	13,5	185	7	1,4
<b>Total</b>	<b>498</b>	<b>100,0</b>	<b>498</b>	<b>100,0</b>	

**Tabela 6.** Frequências alélicas identificadas do FSHR e LHR nos animais experimentais.

FSHR			LHR		
Alelo	Freq.	%	Alelo	Freq.	%
C	255	51,2	C	370	74,3
G	243	48,8	T	128	25,7
Total	498	100,0		498	100,0

O número de alelos detectados variou de 2 a 11 nos animais experimentais. Os alelos AFZ1\*113, HEL5\*153, ILSTS002\*133 e 135, IDVGA51\*175, FSHR\*C e LHR\*C, foram os mais frequentes.

Os diferentes marcadores foram classificados conforme os alelos em curtos ou longos

(Tabela 3) e homocigotos ou heterocigotos. As análises realizadas não detectaram qualquer efeito de alelos, ou de homo ou heterocigose sobre a taxa de prenhez das novilhas à IA/TF ou prenhez final (Tabela 7).

**Tabela 7.** Taxa de prenhez à IA/TF e prenhez final em função da classificação dos genótipos curtos-curtos, curtos-longos e longos-longos conforme os pares de bases dos distintos marcadores moleculares e presença ou ausência do alelo 181 no marcador IDVGA51.

Marcador	Prenhez à IA/TF			Prenhez Final		
	Número	%	Valor de P	Número	%	Valor de P
AFZ						
<i>Curto-curto</i>	(29/67)	43,3		(81/90)	90,0	
<i>Curto-Longo</i>	(32/80)	40,0	0,88	(96/104)	92,3	0,80
<i>Longo-longo</i>	(16/25)	39,0		(51/55)	92,7	
HEL						
<i>Curto-curto</i>	(11/25)	44,0		(24/29)	82,8	
<i>Curto-Longo</i>	(37/75)	46,7	0,32	(99/105)	94,3	0,14
<i>Longo-longo</i>	(31/88)	35,2		(105/115)	91,3	
ILST						
<i>Curto-curto</i>	(21/53)	39,6		(63/67)	94,0	
<i>Curto-Longo</i>	(34/88)	38,6	0,64	(111/120)	92,5	0,32
<i>Longo-longo</i>	(22/47)	46,8		(54/62)	87,1	
IDVGA						
<i>Curto-curto</i>	(27/65)	41,5		(72/82)	87,8	
<i>Curto-Longo</i>	(28/70)	40,0	0,98	(94/100)	94,0	0,31
<i>Longo-longo</i>	(22/53)	41,5		(62/67)	92,5	
IDVGA*181						
<i>Ausente</i>	(72/174)	41,4		(207/227)	91,2	
<i>Presente</i>	(5/14)	35,7	0,68	(21/22)	95,5	0,49
FSHR						
<i>CC</i>	(7/18)	38,9		(16/18)	88,9	
<i>CG</i>	(66/162)	40,7	0,86	(201/219)	91,8	0,91
<i>GG</i>	(4/8)	50,0		(11/12)	91,7	
LHR						
<i>CC</i>	(37/93)	39,8		(114/124)	91,9	
<i>CT</i>	(38/92)	41,3	0,65	(111/122)	91,0	0,84
<i>TT</i>	(2/3)	66,7		(3/3)	100,0	
Total	(77/188)	41,0		(228/249)	91,6	

Nos modelos testados em busca de associação dos resultados de prenhez à IA/TF e prenhez final foram detectadas significâncias para ETR sobre a taxa de prenhez à IA/TF e o GMD de novembro a março para a taxa de prenhez final. O ETR (escala simplificada de 1 a 3) influenciou positivamente a taxa

de prenhez à IA/TF ( $P < 0,01$ ), mas não influenciou a taxa de prenhez final (Tabela 8; Tabela 9). Os animais prenhes ao final do período reprodutivo (91,6%) ganharam 0,455 kg/dia entre novembro e março, enquanto os animais vazios ganharam 0,375 kg/dia ( $P < 0,01$ ) [Tabela 8].

**Tabela 8.** Médias de peso, escore de condição corporal, ganho médio diário, escore de trato reprodutivo em novilhas prenhes e vazias à IA/TF e ao final da estação reprodutiva.

Parâmetro	Resposta a IA/TF			Prenhez Final		
	Prenhe	Vazia	Valor de <i>P</i>	Prenhe	Vazia	Valor de <i>P</i>
Número de animais	76	110	-	228	21	-
Resposta reprodutiva %	40,9	59,1	-	91,6	8,4	-
Peso (kg)						
<i>Início do Acasal. (Nov)</i>	314,9	317,5	0,53	312,7	317,1	0,48
<i>Final do Acasal. (Jan)</i>	336,3	335,0	0,81	330,3	326,5	0,58
<i>Diag. de gestação (Mar)</i>	377,4	374,8	0,64	374,2	367,8	0,46
Escore Corporal (1 a 5)						
<i>Início do Acasalamento</i>	3,09	3,11	0,58	3,11	3,05	0,30
Ganho Médio Diário						
<i>Novembro-Janeiro(kg/dia)</i>	0,298	0,319	0,67	0,280	0,142	0,064
<i>Novembro-Março (kg/dia)</i>	0,444	0,446	0,90	0,455	0,375	0,001*
Escore de trato reprodutivo (1 a 3)	2,66	2,44	0,005*	2,46	2,33	0,32

**Tabela 9.** Taxas de prenhez à inseminação e ao final da temporada reprodutiva em função do escore do trato reprodutivo (ETR) em novilhas de corte.

ETR	Taxa de Prenhez à IA/TF		Taxa de Prenhez final	
	n	%	n	%
1	0/3	(0,0%) <sup>a</sup>	7/8	(87,5%) <sup>a</sup>
2	27/84	(32,1%) <sup>b</sup>	109/121	(90,1%) <sup>a</sup>
3	50/51	(49,5%) <sup>c</sup>	112/120	(93,3%) <sup>a</sup>
Média	77/188	(41,0%)	228/249	(91,6%)

<sup>a,b,c</sup>Médias seguidas por letras diferentes na mesma coluna, diferem entre si ( $P < 0,05$ ).

No presente trabalho a taxa de prenhez à IA/TF obtida foi de 41,0%, com valores entre 30,8% e 43,5% ( $P > 0,05$ ) para as novilhas acasaladas aos 14 e 27 meses, respectivamente, enquanto a taxa de prenhez final obtida foi de 91,6%, com valores de 96,9% e 89,7% ( $P > 0,05$ ) para as novilhas acasaladas aos 14 e 27 meses, respectivamente. A ausência de diferença de prenhez entre as idades não será discutida, pois não é o objetivo primário deste estudo que buscou inicialmente uma associação entre marcadores moleculares e desempenho reprodutivo.

#### DISCUSSÃO

Conforme expostos nas Tabelas 4, 5 e 6, os alelos AFZ1\*113, HEL5\*153, ILSTS002\*133 e 135, IDVGA51\*175, FSHR\*C e LHR\*C, foram os mais frequentes. Pesquisas anteriores relataram maior frequência alélica para gado Geral e A. Angus, respectivamente de 21% (AFZ1\*119) e 28% (AFZ1\*115) [40], e maior percentual para o alelo \*123 (40%) em vacas A. Angus para as frequências alélicas do marcador AFZ-1 [1], resultados estes que divergem do presente trabalho.

Para o marcador HEL5, foi observado maior frequência alélica para gado Geral e A. Angus, respectivamente de 15% (HEL\*151) e 21% (HEL\*151) [40], enquanto que em vacas A. Angus a maior frequência alélica do marcador HEL5\*165 foi de 20% [1], resultados também divergentes do presente trabalho, que relata uma frequência de 41% para o HEL\*153.

O marcador ILST002\*135 e \*137 são descritos como os mais frequentes (27%) [40] para gado Geral e o ILST002\*137 o mais frequente com 40% para a raça A. Angus. Aguiar [1] que obteve resultados similares ao presente trabalho, observou a frequência de 30% para os alelos \*133 e \*135 na raça Aberdeen Angus, no marcador molecular ILSTS002.

O alelo \*175 do marcador IDVGA51 é descrito por Almeida *et al.* [2] como o mais frequente em A. Angus, com valor de 40%. Da mesma forma, Aguiar [1] também descreve para a raça Aberdeen Angus o alelo \*175 como o de maior incidência, com 58%. O alelo \*175 foi o mais frequente (64%) para a raça A. Angus e o alelo \*177 o mais frequente para o gado Geral (30%) no trabalho realizado por Silveira [40]. No presente trabalho o IDVGA51\*175 foi o mais frequente com 46,2%.

Para o marcador FSHR na raça Aberdeen Angus, já foi observada homogeneidade para os alelos C

e G (50%) [1]. Estudos realizados em animais da raça Montana e 6 composições raciais distintas observaram a incidência do alelo C entre 43,4% e 52,8% [26]. Para o marcador LHR, em animais da raça Montana, com as seis composições raciais distintas a incidência do alelo C variou entre 63,6% e 75,7% [26].

A variabilidade nos resultados da frequência alélica obtida quando contrastados a literatura disponível era esperada, pois mesmo ao comparar raças semelhantes (britânicas) ou mesmo a mesma raça (A. Angus) é de se esperar uma grande diversidade genética e variabilidade intra e inter-racial. Entretanto, a obtenção dos resultados de frequência alélica e sua descrição são necessárias para buscar a associação pretendida com o desempenho reprodutivo.

Os diferentes marcadores foram classificados conforme os alelos em curtos ou longos (Tabela 3) e homozigotos ou heterozigotos. As análises realizadas não detectaram qualquer efeito de alelos, ou de homo ou heterozigose sobre a taxa de prenhez das novilhas à IA/TF ou prenhez final. Contudo, alguns estudos prévios relatam essas associações de forma significativa. Foi encontrada taxa de prenhez superior em vacas heterozigotas para o microssatélite BMS3004, quando submetidas a um programa hormonal para indução de estro, entretanto, no mesmo rebanho esse fato não foi observado nas fêmeas submetidas ao desmame definitivo precoce [5]. Intervalo de partos mais longo em indivíduos homozigóticos para alelos longos para o marcador HEL5, em comparação a outros ( $P = 0,02$ ) foram descritos anteriormente [30]. Estes mesmos autores também descrevem uma associação em homozigose para o marcador AFZ1, observando uma correlação inversa entre tamanho do alelo e intervalo de parto ( $P = 0,02$ ), sugerindo que a homozigose para alelos longos neste marcador é vantajosa.

A associação entre o alelo 181 do marcador IDVGA51 e o intervalo de partos foi observada em estudo anterior, sendo 79 dias maior em animais portadores deste alelo quando comparado ao restante dos animais ( $P = 0,002$ ) [2]. Entretanto, no presente trabalho a associação entre a taxa de prenhez à IA/TF e taxa de prenhez final em função da classificação dos genótipos curtos-curtos, curtos-longos e longos-longos conforme os pares de bases dos distintos marcadores moleculares e presença ou ausência do alelo 181 no marcador IDVGA51 não mostrou resultados significativos. Embora, no presente estudo, não tenham sido

detectadas associações diretas entre os marcadores selecionados e a taxa de prenhez, os marcadores moleculares selecionados estão ligados a genes envolvidos no sistema hormonal da reprodução e a associação destes marcadores com a eficiência reprodutiva, sendo estes resultados observados em trabalhos anteriores [1,2,5,15,30,42,45,48].

Nas análises testadas para associação da prenhez à IA/TF e prenhez final foram detectadas significâncias entre ETR sobre a taxa de prenhez à IA/TF e GMD de novembro a março sobre a taxa de prenhez final. Devido à baixa herdabilidade dos parâmetros associados à fertilidade é lógico assumir que a maioria dos fatores associados ao desempenho reprodutivo em bovinos são grandemente influenciados pelo manejo [32]. Conforme modelo quadrático utilizado para predição da probabilidade de prenhez em função do peso ao primeiro acasalamento, 73,6% das variações na probabilidade de prenhez foram explicadas pela variável peso ao primeiro acasalamento [8]. Estudos anteriores [31,37] associam taxas de prenhez em novilhas à obtenção de um peso mínimo crítico, geralmente correspondente a 60-66% do peso adulto das vacas do rebanho. Pesquisadores associaram taxas de prenhez aos 14 meses com o peso ao primeiro acasalamento, relatando taxas de 94,7% e 53,3%, ( $P < 0,05$ ) respectivamente para novilhas acima de 305 kg ou entre 276 e 289 kg ao início do acasalamento [43].

O comparativo de médias de peso e ganho médio diário entre animais prenhes e não prenhes à IA/TF e ao final da estação de acasalamento são apresentados na Tabela 8. A análise dos dados de peso não indicou qualquer diferença entre os animais gestantes e não gestantes. Entretanto é importante destacar que os animais atingiram o peso mínimo crítico sugerido por pesquisas anteriores e seguiram ganhando peso durante a estação de acasalamento (janeiro) e após a mesma (março). As médias de peso representam o percentual máximo indicado como ideal de 65% da vaca adulta [31,37]. As vacas adultas do rebanho em questão, quando gordas pesam cerca de 480 kg, e 60 a 65% deste peso equivalem, a 288 a 312 kg. No presente rebanho, por ocasião do primeiro acasalamento apenas 9,6% das novilhas tinham peso abaixo de 281 kg. O conceito do peso mínimo crítico, descrito na literatura científica [36], defende que novilhas de raças britânicas e suas cruzas acasaladas aos 14-15 meses de idade devem atingir peso mínimo ao início do acasalamento

entre 280-300 kg. Resultados demonstraram que novilhas acasaladas aos 24 meses de idade obtiveram um peso ao início do acasalamento e uma taxa de prenhez de 329,9 kg e 87,1% [33], respectivamente, similares aos resultados do presente trabalho. Estes resultados reforçam as afirmações que indicam uma relação linear entre peso e fertilidade de novilhas de corte britânicas até os 300 kg de peso vivo, sendo que acima deste peso às taxas de prenhez são mais influenciadas por outros fatores além do peso [36].

Em bovinos, inúmeros pesquisadores discutiram as evidências da relação entre nutrição e reprodução [35,38,39,47]. Embora numerosas revisões não deixem dúvidas sobre essa associação, os mecanismos exatos através dos quais a nutrição media o processo reprodutivo ainda permanece para ser elucidado [17]. Entretanto, muitas certezas existem. Conforme a literatura a nutrição exerce efeito sobre as concentrações circulantes e as reservas hipofisárias de gonadotrofinas (FSH e LH), e estes são necessários para o desenvolvimento final dos folículos dominantes [41]. O desenvolvimento dos folículos ovarianos também está relacionado a hormônios metabólicos periféricos, como: insulina, hormônio do crescimento (GH), leptina, fator de crescimento semelhante à insulina (IGF-I) e neuropeptídeo-Y (NPY), cujas concentrações variam conforme o estado metabólico do animal.

O escore de condição corporal é outro indicador importante que está associado ao desempenho reprodutivo. Novilhas devem apresentar um ECC mínimo de 3,0 em escala de 1 a 5 pontos [36]. No presente trabalho, possivelmente, como o ECC também estava acima do mínimo crítico não teve diferenças entre os animais prenhes e vazios.

O ganho médio diário (GMD) de peso entre novembro e março não se diferenciou entre animais prenhes e vazios por ocasião da prenhez à IA/TF, entretanto o GMD de peso entre novembro e março se diferenciou significativamente entre animais prenhes e vazios ao final do acasalamento. Os animais prenhes ao final do período reprodutivo (91,6%) ganharam 0,455 kg/dia entre novembro e março, enquanto os animais vazios ganharam 0,375 kg/dia ( $P < 0,01$ ). Os 70 gramas a menos no GMD de peso em um período de 120 dias equivalem a somente 8,4 kg de diferença. Entretanto, o menor GMD durante o período de avaliação nos animais que resultaram vazios ao final é um indicativo que pode ter influenciado o eixo hipotalâmico-hipofisário-

-gonadal e secreção de hormônios gonadotróficos. Os efeitos nutricionais parecem exercer efeito sobre a regulação do eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal e consequentemente as secreções de GnRH, FSH e LH; insulina e IGF-I, que parecem ser as principais vias metabólicas que afetam a função folicular [14,41].

A avaliação do escore do trato reprodutivo (ETR) é descrito como um método de seleção de novilhas para a reprodução correlacionado com a idade a puberdade, resposta à sincronização e taxa de prenhez à sincronização, com 0,32 de herdabilidade estimada [4]. Relatos anteriores demonstraram que o ETR foi positivamente associado à taxa de prenhez em novilhas em estação de acasalamento com uso de inseminação por 50 dias ( $P < 0,01$ ) [18]. Os autores descrevem taxas de prenhez em novilhas, após 50 dias de inseminação de 31%, 40%, 53%, 70% e 80%, respectivamente para os ETRs 1, 2, 3, 4 e 5. Concordando com as afirmações acima, no presente trabalho o ETR (escala simplificada de 1 a 3) influenciou positivamente a taxa de prenhez à IA/TF ( $P < 0,01$ ), porém não influenciou a taxa de prenhez final (Tabela 8; Tabela 9).

A taxa de prenhez ao final da estação respectivamente de 85,7%, 90,1% e 92,3% para os ETR 1, 2 e 3, não apresentou diferença significativa ( $P < 0,05$ ) (Tabela 9). Possivelmente a conjugação de fatores, tais como o elevado peso ao início da estação, a boa taxa de ganho de peso durante a mesma e os tratamentos com hormônios exógenos em grande parte dos animais resultaram em indução da ciclicidade durante a estação de acasalamento.

A eficiência reprodutiva representa um dos fatores mais importantes para a obtenção de resultados econômicos sustentáveis na bovinocultura de corte. Pois, na ausência de reprodução não terá a produção de bezerras/as, futuros reprodutores ou produto. Muitos estudos destacam a importância de promover melhoramento e ganho genético para as características reprodutivas. Entretanto, muitas características reprodutivas apresentam resposta binomial e baixa herdabilidade. Além do mais, a expressão do fenótipo relacionado à fertilidade é fortemente influenciada pelo ambiente.

No presente trabalho, a resposta reprodutiva avaliada pela taxa de prenhez, não pôde ser associada aos marcadores moleculares eleitos. Algumas considerações são necessárias. O rebanho em questão apresenta mais de duas décadas de seleção por fertilidade, com uma política rígida de descarte de animais

sem a produção de terneiros a cada ano. Essa prática resulta em grande efeito sobre a fertilidade, pois apenas perpetuam sua genética os animais que comprovem fertilidade e adaptação às condições de exploração. A variável resposta medida, taxa de prenhez, é influenciada por dezenas de fatores, inclusive relacionados aos machos, não avaliados neste trabalho. Desta forma, novilhas que não emprenharam ao final da estação podem ter fertilidade elevada, mas o fator touro poderá ter influenciado o resultado.

Inúmeros trabalhos conduzidos nas últimas décadas para avaliação de desempenho reprodutivo em vacas e novilhas de corte afirmam que o nível nutricional da dieta apresenta impacto direto sobre o ciclo estral e taxas de prenhez, podendo ser relacionado ao peso e condição corporal. Novilhas devem alcançar a puberdade antes do início da estação de acasalamento, devendo ser alimentadas para atingir o peso mínimo crítico (65% do peso adulto) ao início da estação reprodutiva. Manejo nutricional que permita ganho de peso durante o período de acasalamento irá resultar em melhor desempenho reprodutivo. Esses princípios de manejo nutricional recomendados [32,36] foram atendidos nos animais experimentais sendo representados por um peso ao início da estação (313 kg), escore de condição corporal (3,1) e ganho médio diário de peso do acasalamento ao diagnóstico de gestação (0,449 kg/dia), resultando em taxa de prenhez à IA/TF de 41% e taxa de prenhez após os 60 dias da estação de acasalamento de 91,6%.

## CONCLUSÃO

Os marcadores moleculares AFZ-1, HEL5, ILST002, IDVGA51, FSHR e LHR não puderam ser associados à taxa de prenhez à inseminação e prenhez final em novilhas de corte, talvez ao alto grau de seleção reprodutiva que esses animais são submetidos. O estado nutricional do rebanho, expressos pelo peso e escore de condição corporal dos animais ao acasalamento contribuíram para a obtenção de taxas de prenhez significativas. O escore de trato reprodutivo pode ser considerado como um preditor de fertilidade em rebanhos de novilhas de corte.

## SOURCES AND MANUFACTURERS

<sup>1</sup>Sincroforte® - Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil.

<sup>2</sup>Sincrocio® - Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil.

<sup>3</sup>Crestar® - MSD Saúde Animal, São Paulo, SP, Brazil.

<sup>4</sup>Sincrodiol® - Ourofino, Cravinhos, SP, Brazil.

<sup>5</sup>EDTA - Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA.

**Declaration of interest.** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and writing of the paper.

#### REFERENCES

- 1 **Aguiar P.R.L. 2008.** Estudos de marcadores moleculares (microsatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias. 112f. Porto Alegre, RS. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- 2 **Almeida S.E.M., Almeida E.A., Moraes J.C.F. & Weimer T.A. 2003.** Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. *Journal Animal Breeding and Genetics*. 123(2): 106-113.
- 3 **Almeida S.E.M., Almeida E.A., Terra G., Neves J.P., Gonçalves P.B.D. & Weimer T.A. 2007.** Association between molecular markers linked to the Leptin gene and weight gain in postpartum beef cows. *Ciência Rural*. 37(1): 206-211.
- 4 **Anderson K.J., Lefever D.G., Brinks J.S. & Odde K.G. 1991.** The use of reproductive tract scoring in beef heifers. *Agri-Practice*. 12: 19-26.
- 5 **Bastos G.Dem., Gonçalves P.B.D., Machado M.S.N., Restle J., Neves J.P., Oliveira J.F.C.De, Farias A.M., Siqueira L. & Faturi C. 2003.** Indução Hormonal da Ovulação e Desmame Precoce na Fertilidade Pós-Parto de Vacas de Corte Homozigotas e Heterozigotas para o Microsatélite BMS30041. *Revista Brasileira Zootecnia*. 32(5): 1093-1103.
- 6 **Bellows R.A. & Staigmiller R.B. 1994.** Selection for fertility. In: Fields M.J. & Sands R.S. (Eds.). *Factors affecting calf crop*. Boca Raton: CRC Press, pp.197-212.
- 7 **Bishop M.D., Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., Sunden S.L.F., Hawkins G.A., Toldo S.S., Fries R., Grosz M.D., Yoo J. & Beattie C.W. 1994.** A genetic-linkage map for cattle. *Genetics*. 136(2): 619-639.
- 8 **Bittencourt H.R., Gottschall C.S. & Sant'ana M.F. 2005.** Um modelo alternativo para a predição da probabilidade de prenhez em função do peso ao início do acasalamento. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*. 8(2): 99-104.
- 9 **Brinks J.S. 1994.** Genetics influences on reproductive performance of two-year-old beef females. In: Fields M.J. & Sands R.S. (Eds.). *Factors affecting calf crop*. Boca Raton: CRC Press, pp.45-54.
- 10 **Cammack K.M., Thomas M.G. & Enns R.M. 2009.** Review: Reproductive Traits and Their Heritabilities in Beef Cattle. *The Professional Animal Scientist*. 25(5): 517-528.
- 11 **Comings D.E. 1988.** Polygenic inheritance of micro/minisatellites. *Molecular Psychiatry*. 3(1): 21-31.
- 12 **Davis G.P. & Denise S.K. 1998.** The impact of molecular markers on selection. *Journal of Animal Science*. 76(9): 2331-2339.
- 13 **Deese R.E. & Koger M. 1967.** Herdability of reproduction. In: Cunha T.J., Warnick A.C. & Koger M. (Eds.) *Factors affecting calf crop*. Gainesville: University of Florida Press, pp.232-238.
- 14 **Diskin M.G., Mackey D.R., Roche J.F. & Sreenan J.M. 2003.** Effects of nutrition and metabolic status on circulating hormones and ovarian follicle development in cattle. *Animal Reproduction Science*. 78(3): 345-370.
- 15 **Duarte L.B.H., Moraes J.C.F. & Weimer T.A. 2005.** Diversity of microsatellites linked to the FSH $\beta$  gene, their usefulness for individual identification and association with reproductive performance. *Ciência Rural*. 35: 145-149.
- 16 **Foote R.H. 2003.** Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. *Animal Reproduction Science*. 75(1): 119-139.
- 17 **Hess B.W., Lake S.L., Scholljegerdes E.J., Weston T.R., Nayigihugu V., Molle J.D.C. & Moss G.E. 2005.** Nutritional controls of beef cow reproduction. *Journal of Animal Science*. 83(13): E90-E106.
- 18 **Holm D.E., Thompson P.N. & Irons P.C. 2009.** The value of reproductive tract scoring as a predictor of fertility and production outcomes in beef heifers. *Journal of Animal Science*. 87(6): 1934-1940.
- 19 **Houde A., Lambert A., Saumande J., Silversides D.W. & Lussier J.G. 1994.** Structure of the bovine follicle-stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in bovine tissues. *Molecular Reproduction Development*. 39(2): 127-135.
- 20 **Jorgensen C.B., Konfortov B.A. & Miller J.R. 1996.** A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. *Animal Genetics*. 27(3): 220.
- 21 **Kappes S.M., Keele J.W., Stone R.T., McGraw R.A., Sonstegard T.S., Smith T.P.L., Lopez-Corrales N.L. & Beattie, C.W. 1997.** A second-generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*. 7: 235-249.

- 22 Kemp S.J., Brezinsky L. & Teale A.J. 1992. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. *Animal Genetics*. 23(2): 184.
- 23 Lahiri D.K., Zhang A. & Nurnberger J.I.Jr. 1997. High-Resolution Detection of PCR Products from a Microsatellite Marker Using a Nonradioisotopic Technique. *Biochemical and Molecular Medicine*. 60(1): 70-75.
- 24 Lowman B.G., Scott N. & Somerville S. 1976. Condition scoring beef cattle. *Edinburgh, The East of Scotland College of Agriculture Bulletin*. 6: 8.
- 25 Macneil M.D., Geary T.W., Perry G.A., Roberts A.J. & Alexander L.J. 2006. Genetic partitioning of variation in ovulatory follicle size and probability of pregnancy in beef cattle. *Journal of Animal Science*. 84(7): 1646-1650.
- 26 Marson E.P. 2005. Caracterização da frequência de heterozigose em genes ligados à precocidade sexual em novilhas de corte compostas. 87f. Pirassununga, SP. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo.
- 27 Marson E.P., Ferraz J.B.S., Meirelles F.V., Balieiro J.C.C., Eler J.P., Figueiredo L.G.G. & Mourão G.B. 2005. Genetic characterization of European-Zebu composite bovine using RFLP markers. *Genetics and Molecular Research*. 3(4): 496-505.
- 28 Miller S.A., Dykes D.D. & Polesky, H.F. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*. 16(3): 1215.
- 29 Morris C.A., Baker R.L., Cullen N.G., Hickey S.M. & Wilson. J.A. 1993. Genetic analysis of cow lifetime production up to 12 mating years in crossbred beef cattle. *Animal Production*. 57(1): 29-36.
- 30 Oliveira J.F.C., Neves J.P., Almeida E.A., Steigleder C.S., Moraes J.C.F., Gonçalves P.B.D. & Weimer T.A. 2005. Association between reproductive traits and four microsatellites in Brangus-ibagé cattle. *Genetics and Molecular Biology*. 28(1): 54-59.
- 31 Patterson D.J., Perry R.C., Kiracofe G.H., Bellows R.A., Staigmiller R.B. & Corah L.R. 1992. Management considerations in heifer development and puberty. *Journal of Animal Science*. 70(12): 4018-4035.
- 32 Patterson D.J., Wood S.L. & Randle R.F. 1999. Procedures that support reproductive management of replacement beef heifers. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. Disponível em: <<http://www.asas.org/symposia/9899proc/0902.pdf>>. Acessado em 06/2011.
- 33 Pereira Neto O.A. & Lobato J.F.P. 1998. Efeitos da ordem de utilização de pastagens nativas melhoradas no desenvolvimento e comportamento reprodutivo de novilhas de corte. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*. 27(1): 60-65.
- 34 Pursley J.R., Mee M.O. & Wiltbank M.C. 1995. Synchronization of ovulation in dairy cows using PGF<sub>2α</sub> and GnRH. *Theriogenology*. 44(7): 915-923.
- 35 Randel R.D. 1990. Nutrition and postpartum rebreeding in cattle. *Journal of Animal Science*. 68(3): 853-862.
- 36 Rovira J. 1996. *Manejo nutritivo de los rodeos de cria em pastoreo*. Montevideo: Hemisfério Sur, 288p.
- 37 Sawyer G.J., Barker D.J. & Morris R.J. 1991. Performance of young breeding cattle in commercial herds in the south-west of western Australia. 1. Live weight, body condition, conception and fertility in heifers. *Australian Journal of Experimental Agriculture*. 31(4): 431-441.
- 38 Schillo K.K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science*. 70(4): 1271-1282.
- 39 Short R.E., Bellows R.A., Staigmiller R.B., Berardinelli J.G. & Custer E.E. 1990. Physiological mechanisms controlling anestrus and infertility in postpartum beef cattle. *Journal of Animal Science*. 68(3): 799-816.
- 40 Silveira J.C. 2007. Marcadores moleculares e associação com características reprodutivas em dois rebanhos bovinos do Rio Grande do Sul. 78f. Canoas, RS. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Universidade Luterana do Brasil.
- 41 Souza F.A., Canisso I.F., Borges A.M., Vale Filho V.R., Lima A.L. & Silva E.C. 2009. Restrição alimentar e os mecanismos endócrinos associados ao desenvolvimento folicular ovariano em vacas. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 33(2): 61-65.
- 42 Steigleder C.S., Almeida E.A. & Weimer T.A. 2004. Genetic diversity of Brazilian creole cattle based on fourteen microsatellite loci. *Archivos de Zootecnia*. 53(201): 3-11.
- 43 Vaz R.Z. & Lobato J.F.P. 2010. Efeito da idade de desmame no desempenho reprodutivo de novilhas de corte expostas à reprodução aos 13/15 meses de idade. *Revista Brasileira de Zootecnia*. 39(1): 142-150.

- 44 Weimer T.A. 2003.** *Diagnóstico genético-molecular aplicado à produção animal*. In: Markers E.K. (Ed). Diagnóstico Genético-Molecular. Canoas: Ulbra, pp.203-218.
- 45 Weimer T.A., Steigleder C.S., Machado M.S., Almeida S.E.M., Oliveira J.F.C., Moraes J.C.F. & Henkes L.E. 2007.** Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. *Ciência Rural*. 37(5): 1502-1505.
- 46 Weir B.S. 1996.** *Genetic data analysis: methods for discrete population genetic data*. 2nd edn. Sunderland: Sinauer Associates, 445p.
- 47 Wettemann R.P., Lents C.A., Ciccioli N.H., White F.J. & Rubio I. 2003.** Nutritional- and suckling-mediated ano-ovulation in beef cows. *Journal of Animal Science*. 81(Suppl 2): E48-E59.
- 48 Yang W.C., Li S.J., Tang K.Q., Hua G.H., Zhang C.Y., Yu J.N. & Yang L.G. 2010.** Polymorphisms in the 5' upstream region of the FSH receptor gene, and their association with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Animal Reproduction Science*. 119(3-4): 172-177.