

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**PEDRO HENRIQUE ROSA ALVES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS À  
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA  
ILE DE FRANCE EM SANTA CATARINA**

**FLORIANÓPOLIS — SC  
2022**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
CURSO DE ZOOTECNIA**

**PEDRO HENRIQUE ROSA ALVES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS À  
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA  
ILE DE FRANCE EM SANTA CATARINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado como exigência para obtenção do Diploma de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina.

Orientador: Prof. Dr. André Luis Ferreira Lima

**FLORIANÓPOLIS - SC  
2022**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

CARVALHO, Pedro Henrique Rosa Alves de  
IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS A EFICIÊNCIA  
REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA ILE DE FRANCE EM SANTA  
CATARINA / Pedro Henrique Rosa Alves de CARVALHO ;  
orientador, André Luís Ferreira LIMA, 2022.  
33 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias, Graduação em Zootecnia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Zootecnia. 2. GDF-9. 3. Ovinocultura. 4.  
Prolificidade. 5. RFLP. I. LIMA, André Luís Ferreira. II.  
Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em  
Zootecnia. III. Título.

**PEDRO HENRIQUE ROSA ALVES DE CARVALHO**

**IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS À  
EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA  
ILE DE FRANCE EM SANTA CATARINA**

Esta Monografia de Trabalho de Conclusão de Curso foi julgada aprovada e adequada para obtenção do grau de Zootecnista.

Florianópolis, 21 de novembro de 2022.

**Banca Examinadora:**



Documento assinado digitalmente

**Andre Luis Ferreira Lima**

Data: 16/12/2022 17:31:35-0300

CPF: \*\*\*.135.588-\*\*

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

**Prof. Dr. André Luis Ferreira Lima**  
Orientador

**Universidade Federal de Santa Catarina**



Documento assinado digitalmente

**Sergio Augusto Ferreira de Quadros**

Data: 16/12/2022 18:00:32-0300

CPF: \*\*\*.636.860-\*\*

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

**Prof. Dr. Sergio Augusto Ferreira de Quadros**  
Universidade Federal de Santa Catarina



Documento assinado digitalmente

**Priscila Arrigucci Bernardes**

Data: 16/12/2022 17:47:26-0300

CPF: \*\*\*.913.148-\*\*

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr. Priscila Arrigucci Bernardes**  
Universidade Federal de Santa Catarina

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho aos meus pais que me amam e sempre apoiaram ao decorrer da jornada.

## **AGRADECIMENTOS**

Tenho muito para agradecer a diversas pessoas que me acompanharam ao decorrer desses anos de curso de Zootecnia. Amigos, professores, colegas que sempre estiveram próximos para apoiar, ajudar, dar conselhos e ensinar novas lições sobre conteúdo ou até mesmo sobre a vida.

Em especial aos meus pais, Gilberto e Giane, pois sempre zelaram, me deram apoio para seguir e ultrapassar os obstáculos que encontrei no meio do caminho. Com amor e carinho facilitou. Agradecer ao meu irmão Matheus, meu melhor amigo, que sempre esteve a disposição para me escutar e dar bons conselhos de como agir diante de uma situação.

Aos meus amigos mais próximos também deixo meus mais sinceros agradecimentos, pois foi com o apoio de vocês, as risadas e tempos de curtidão que tornaram toda a trajetória do curso mais divertida e leve.

Aos meus colegas da zootecnia, colegas de sala, de corredor, calouros e veteranos, muito obrigado pela parceria ao longo da trajetória.

Agradeço do fundo do coração ao meu orientador Prof. André Luis Ferreira Lima por depositar seu voto de confiança e também ao Eng Agrônomo José Volni, por disponibilizar sua propriedade e seus animais para a pesquisa.

## RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o intuito de isolar e identificar possíveis polimorfismos genéticos em parte do Éxon II no gene do Fator 9 de Diferenciação Celular (GDF9 - Growth Differentiation Factor 9) de fêmeas Ile de France criadas no Estado de Santa Catarina. Este fator de diferenciação celular está relacionado com maiores incidências de partos múltiplos, influenciando diretamente a eficiência reprodutiva do rebanho. Amostras de sangue foram coletadas de 30 fêmeas, em idade reprodutiva, para extração do DNA genômico. A região de interesse foi isolada e amplificada via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se iniciadores desenhados a partir de sequências específicas disponíveis no GenBank (NCBI). Para busca de sítios polimórficos foi utilizada a técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição) aplicando-se a endonuclease de restrição *TaqI*. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram um padrão monomórfico para o sítio de corte da enzima *TaqI* nos animais avaliados, entretanto, estudos futuros podem ser realizados com o intuito de identificar possíveis polimorfismos na mesma região isolada, utilizando-se a mesma técnica, porém com outras enzimas de restrição. Este trabalho permitiu a realização do isolamento e amplificação de parte do Éxon II do gene GDF9 via PCR, possibilitando inferir que existe monomorfismo genético para a enzima *TaqI* nesta região genética de animais da raça Ile de France.

**Palavras-chave:** GDF-9, *Ovis Aries*, Ovinocultura, Prolificidade, RFLP.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Disponibilidade per capita de carne por ano no Brasil (kg).....	4
Figura 2 - Estacionalidade reprodutiva em ovinos.....	6
Figura 3 - Esquema ilustrativo das diferentes fases do desenvolvimento folicular.....	7

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVO.....	2
3. REVISÃO	
BIBLIOGRÁFICA.....	3
3.1 Ovinocultura.....	3
3.2 Estro e foliculogênese.....	5
3.3 Marcadores moleculares e polimorfismo no GDF-9.....	8
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	9
5. ARTIGO: IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA ILE DE FRANCE EM SANTA CATARINA.....	14

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente existem diversas raças com diferentes aptidões, algumas voltadas para produção de leite, outras para carne ou lã e raças com dupla aptidão (VIANA, 2008). Com a difusão da espécie, pode-se encontrar ovinos em diversos países, mas existem aqueles que lideram a criação e produção, como Nova Zelândia e Austrália. Em contrapartida, a ovinocultura no Brasil vem recuperando forças desde a crise da lã em 1990, quando a produção de tecidos sintéticos se disseminou, prejudicando os criadores de ovelhas com aptidão para lã. Porém, a retomada na criação com um direcionamento para carne tem interessado diversos produtores a ingressar no ramo (VIANA & SILVEIRA, 2009).

A região Sul destaca-se por ter um grande rebanho, com finalidade de produção de carne e lã, no entanto, há possibilidade para aumento no número de animais da região. Assim, um parâmetro importante para o aumento da produção é a prolificidade desses animais, que significa maior número de cordeiros nascidos vivos por ovelhas expostas à reprodução (LÔBO et al., 2011). Além dos efeitos ambientais e de manejo, leva-se em conta também a genética para aumentar a prolificidade, podendo ser melhorada mediante seleção.

Com o advento de marcadores moleculares, genes específicos podem ser encontrados com maior frequência em determinada raça, e esse gene pode estar relacionado a uma característica fenotípica de interesse do criador. Dentre estas características, estão aquelas relacionadas a desempenho produtivos e reprodutivos, como ter maior taxa ovulatória nas fêmeas por ciclo estral e, conseqüentemente, maior número de partos múltiplos. Nas raças ovinas do sul do Brasil, pesquisadores da Embrapa começaram a acompanhar os serviços de registros genealógicos para identificar rebanhos ovinos em que ocorriam partos múltiplos com maior frequência. Identificou-se que essa característica estava relacionada a uma mutação em determinado gene nos ovinos da raça Ile de France, em um município perto da cidade de Vacaria, localizada no estado do Rio Grande do Sul, recebendo então o nome de “mutação Vacaria”(SOUZA;MORAES,2013).

Segundo Souza et al. (2011) dos animais que apresentavam maior prolificidade, eram obtidas amostras de sangue para extração de DNA, no qual eram sequenciados diferentes genes já conhecidos, evidenciando o surgimento de um novo polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) no gene do fator de crescimento e diferenciação 9 (Growth Differentiation Factor 9 – GDF9). O gene deste fator influencia a foliculogênese, que por sua vez é responsável pela maturação do gameta feminino (SHIMASAKI et al., 2004). Quando o GDF9 é inativado, pode

levar à infertilidade pela perda da capacidade de ativação no crescimento dos folículos primordiais. Animais portadores de genótipos homozigotos, possuem a fertilidade comprometida, apresentando ovários de tamanhos reduzidos e infantilizados (DONG et al., 1996; SOUZA et al., 2011). Entretanto, as fêmeas portadoras dessas mutações, mas que apresentam heterozigose possuem acréscimo na fertilidade (SOUZA et al., 2011).

A região estrutural do GDF9 é composta por dois éxons e um íntron, que codificam uma proteína com 135 aminoácidos (SHIMASAKI et al., 2004; INCERTI et al., 1994). Com os avanços na área da biotecnologia, tornou-se possível identificar mutações na cadeia do DNA através de técnicas de sequenciamento genômico. Embora essas mutações sejam identificadas utilizando-se sequenciamento direto de amostras de DNA, a utilização de técnicas menos onerosas para genotipar animais com polimorfismos, já é possível com o auxílio de marcadores moleculares. Dentre essas técnicas, destaca-se a PCR-RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição). Nela, a região de interesse do gene é isolada e amplificada, para posterior digestão específica com endonucleases de restrição (enzimas). Havendo o polimorfismo no sítio de corte da enzima, padrões polimórficos de migração são facilmente detectados em eletroforese de géis de agarose. Tal aplicação de genotipagem pode viabilizar a avaliação de muitos animais de maneira mais econômica.

## **2. OBJETIVOS**

O presente trabalho foi conduzido com o intuito de isolar e identificar possíveis polimorfismos genéticos em parte do Éxon II no gene do Fator 9 de Diferenciação Celular (GDF9 - Growth Differentiation Factor 9) de fêmeas Ile de France criadas no Estado de Santa Catarina e verificar, quando detectados tais polimorfismos, a possível associação dos alelos com a incidência de partos múltiplos.

## **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **3.1 Ovinocultura**

Acredita-se que os ovinos tenham sido uma das primeiras espécies domesticadas proporcionando diversos produtos como carne, fonte de proteína e gordura; leite, com potencial

para produção de laticínios, lã para confecção de roupas e até mesmo o couro e/ou pelego. Os ovinos possuem alta capacidade de adaptação a diversos biomas, com exceção de ambientes quentes e úmidos, podemos encontrar a espécie em praticamente todos os continentes, com diferentes climas, pastagens e relevos (VIANA, 2008).

Os principais países relacionados à ovinocultura no mundo são Nova Zelândia e Austrália. O Brasil tem destaque na produção de carne ovina na América do Sul, mas ainda possui área para aumentar a produção desses animais, mesmo considerando que, a população brasileira possui baixa aceitação ou costume de consumir esse tipo de proteína (VIANA, 2008). Segundo a Empresa Brasileira de Pesquisa e Pecuária — EMBRAPA (2018), cerca de 25 milhões de brasileiros nunca provaram carne ovina, representando aproximadamente 12% da população.

O consumo é frequente para apenas 25% dos brasileiros, ou seja, cerca de 52 milhões de pessoas. Os outros 62% se dividem em duas categorias, 27% que comem poucas vezes no ano e 35% que comeram alguma vez na vida. O que indica a falta de adesão e regularidade no consumo por parte da população, todavia sobre outro aspecto aponta para um setor pecuário com potencial de desenvolvimento. Alguns dos motivos da falta dessa regularidade no consumo são a pouca disponibilidade do produto no mercado, a falta de costume e a dificuldade de encontrar cortes mais apropriados para preparo no dia a dia, como ocorre com outras fontes de proteína animal. O consumo mais regular está na região Sul do Brasil.

Entretanto, o maior grupo daqueles que nunca comeram carne ovina está na região Sudeste, onde está a maior concentração populacional do país e com maior poder de compra (EMBRAPA., 2018). De acordo com a Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (Arco) (2018), o mercado brasileiro de produção ovina consegue atender uma demanda de 400 gramas anuais de carne ovina per capita. A comparação de disponibilidade de carne ovina está demonstrada na Figura 1.

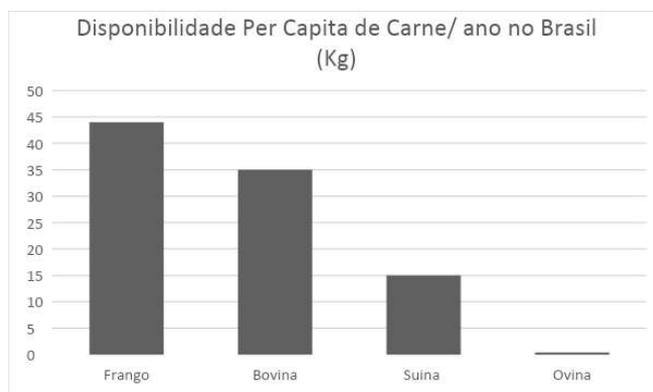


Figura 1 – Disponibilidade per capita de carne por ano no Brasil (kg).  
Fonte: Associação Brasileira de Criadores de Ovinos (2018).

O crescimento demográfico dos países, além da urbanização e mudança nos hábitos alimentares, acarreta um aumento na demanda de carne, possibilitando uma oportunidade de mercado voltado para produção de ovinos (FAO, 2007). Dessa forma, segundo Viana (2008) o Brasil deve se beneficiar dos recursos naturais, de modo a aproveitar e despertar o interesse de países importadores que possuem maior consumo de carne ovina, abrindo espaço para mais um setor no mercado pecuário.

Ao se procurar obter maior produtividade, a nutrição dos animais é um elemento de grande importância, pois adequada alimentação dos indivíduos está relacionada a melhores resultados tanto em ganho de peso quanto no desempenho reprodutivo. Os fatores nutricionais relacionados ao desempenho reprodutivo de uma ovelha são bastante complexos, pois há influência do ambiente, peso do animal, idade e condição corporal (PIRES, 2011). Em suma, o aporte nutricional adequado representa a expressão e funcionamento dos processos reprodutivos do animal. A dieta balanceada deve atender os níveis de energia, proteína, vitaminas e minerais para que a função fisiológica, a síntese de hormônios ocorra de maneira que a maturação oócitária, a taxa ovulatória, o desenvolvimento do feto, bem como o vigor do cordeiro ao nascimento ocorram de forma saudável proporcionando viabilidade econômica ao processo produtivo (ROBINSON et al., 2002; ROBINSON et al., 2006).

O *flushing* é uma técnica de manejo que consiste em fazer um aumento no aporte nutricional para as fêmeas cerca de 30 dias antes de iniciar a temporada reprodutiva, sendo bastante utilizado por produtores e técnicos. O intuito é fornecer mais energia e nutrientes para as fêmeas durante essa fase pré-ovulatória, acarretando um folículo maior, melhor regulação hormonal, por fim melhorando as taxas de fertilidade e prolificidade (BOMFIM et al., 2014).

Todavia, além de manejos nutricionais para melhorar os índices reprodutivos de um rebanho, existem técnicas mais complexas de seleção de animais que abrangem mutações e polimorfismos associados a maior capacidade reprodutiva. Como os genes da família de fatores do crescimento, os TGF $\beta$  (Transforming Growth Factor beta) onde o gene GDF-9 (Growth Differentiation Factor - 9). A família desses genes está associada a expressões nas células da teca, granulosa e oócitos. A regulação e ativação dos folículos primordiais sofre interferência para maturação e desenvolvimento dos oócitos (HAAS et al., 2019), etapas essas que ocorrem ao longo da foliculogênese.

### **3.2 Estro e foliculogênese**

A eficiência de um rebanho ovino está associada com a capacidade reprodutiva dos animais. Para que a reprodução seja satisfatória é importante entender a fisiologia da reprodução dos animais, de modo a melhorar o manejo durante as épocas do ano mais importantes na cultura, como, por exemplo, estação de monta, nascimento e desmame.

Quando a ovelha atinge puberdade é a fase que determina o início da atividade sexual. No caso de fêmeas e machos a maturidade sexual acontece em tempos distintos. Para as fêmeas, a puberdade chega próximo à 7 - 10 meses com peso aproximado de 40 à 45 quilos. Já para machos a maturidade é mais precoce, perto dos 4 - 6 meses e com 22 a 28 quilos (JUNIOR E GIRÃO, 2003). Destaca-se que nesse período inicial de puberdade, os animais ainda possuem limitações reprodutivas, uma vez que anatomicamente a ovelha ainda não está completamente desenvolvida e os machos têm maior produção de células espermáticas inviáveis (CRUZ E FERRAZ, 2012). Segundo Monteiro et al. (2012) ainda existem variáveis que interferem na idade em que os ovinos entrarão em puberdade. Por exemplo, nutrição, estação de nascimento, genética e interações sociais.

Conforme ilustra a Figura 2, a espécie ovina demonstra, principalmente, comportamento reprodutivo poliéstrico estacional. Dessa forma, o ciclo estral ocorre em determinadas épocas do ano de forma cíclica. Isso ocorre devido à exposição ao fotoperíodo negativo, que corresponde ao final de verão e durante o outono. Esse comportamento se deve pela razão de que os fotorreceptores, quando estimulados com uma menor exposição luminosa, transmitem uma informação para o hipotálamo e hipófise que transformarão o sinal luminoso em um sinal hormonal. No que lhe concerne, a melatonina provocará um efeito no hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH), acarretando a liberação do hormônio luteinizante (LH), que irá provocar a ovulação (MACHADO, 2007; COSTA, 2007).

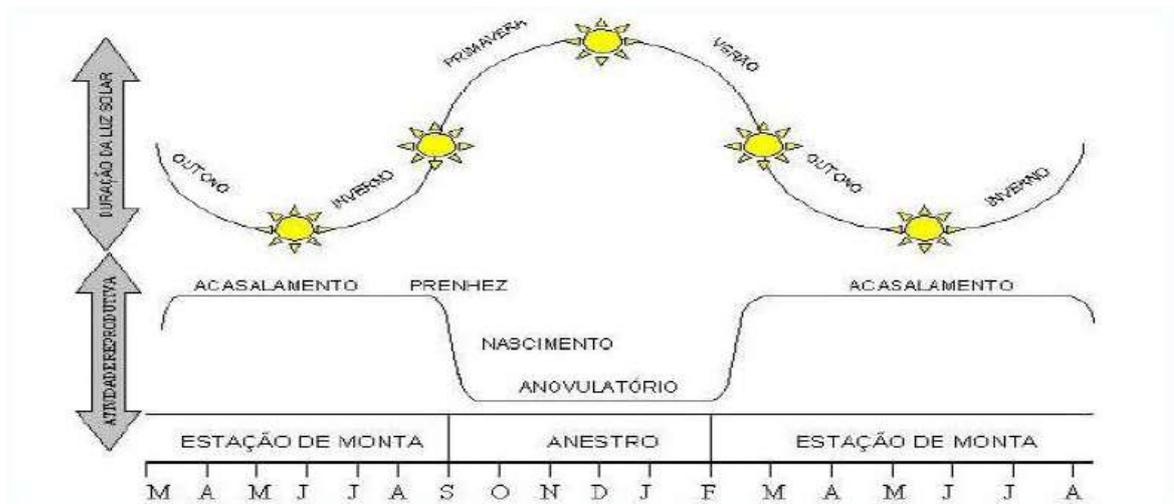


Figura 2: Esquema de estacionalidade reprodutiva em ovinos.

Fonte: Granados et al. (2006).

O ciclo estral tem duração de 17 dias, dividido em fases. Segundo Fonseca (2005), os 13 primeiros dias é a fase luteínica, caracterizada principalmente pela ação da progesterona, dando formação ao corpo lúteo. Essa fase ainda pode ser dividida em metaestro, diestro. E então a partir do 13º e 14ª dia, começa a fase folicular, onde é dividido em proestro e estro e submetido a ação do hormônio estrógeno na corrente sanguínea (GRANADOS et al., 2006).

Durante o estro dos animais ocorre a foliculogênese, que consiste na evolução, no crescimento, formação e maturação folicular. O folículo possui uma função essencial para o desenvolvimento do gameta feminino, pois é ele que dará origem a um ambiente propício para manutenção e viabilidade do oócito.

O crescimento folicular ocorre por transformações sub celulares e moleculares. Composto por estruturas como oócito, células da granulosa e teca, seu desenvolvimento ocorre por sinais hormonais, principalmente por participação do estrógeno. O processo se inicia com o recrutamento de folículos primordiais saudáveis, seguido de proliferação por meiose e diferenciação das células, formando assim as estruturas necessárias mencionadas. Então o folículo primordial avança para primário, depois para secundário, terciário e pré ovulatório. Nessa última etapa, com um pico do hormônio LH acontecerá a luteinização, fazendo com que aconteça a liberação do oócito (gameta) e do corpo-lúteo que será responsável por preparar o útero para receber o embrião através de secreções hormonais (HAFEZ; HAFEZ, 2004). A Figura 3 representa o desenvolvimento e crescimento do folículo primordial até pré ovulatório.

Os bastonetes demonstram a região pituitária, composta por células da teca (externa) e granulosa (interna); o círculo cinza demonstra o oócito.

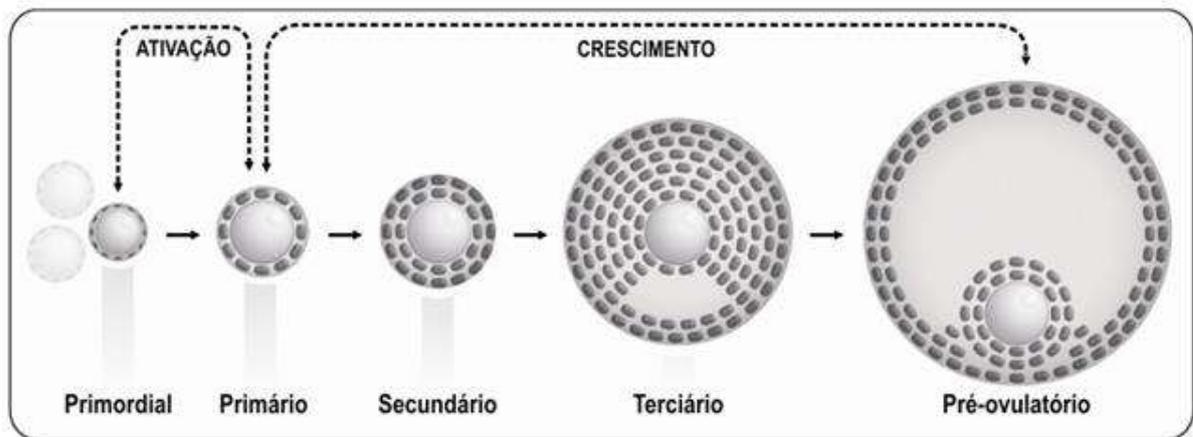


Figura 3: Esquema ilustrativo das diferentes fases do desenvolvimento folicular. Fonte: Lima-Verde et al., (2011).

A importância desse processo se dá pela razão de que o gene GDF-9 tem ação majoritária expressa e secretada pelo oócito de ovelhas, levantando a possibilidade de ser essencial para ativação das células primordiais e seu desenvolvimento, tornando-se determinante no processo de foliculogênese e reprodução (SILVA et al., 2009).

Promover o crescimento de folículos primários, recrutamento das células da teca, manutenção da viabilidade folicular, proliferação de células da granulosa, sinergia com FSH, participação na ovulação e liberação do oócito são efeitos que o GDF-9 depende para a foliculogênese. Entretanto, as expressões do gene em organismos pode diferir devido a mutações ou polimorfismos na região do GDF-9.

### **3.3 Marcadores moleculares e polimorfismo no GDF-9**

A implementação do uso de biotecnologias voltadas para atividades do setor zootécnico iniciaram a partir em 1980, dessa forma aumentou a velocidade dos avanços na genética mundial (CAETANO, 2009). No Brasil o início dos estudos genéticos envolvidos com a prolificidade de ovinos se deu principalmente para modelos experimentais de modo a compreender a fisiologia da reprodução na década de noventa (SOUZA et al., 1994). Todavia, o cenário tem mudado de trajeto, e produtores, assim como técnicos da área, tem buscado

implementar o uso desses genes para alavancar os rebanhos comerciais, o que tem trazido aumentos nos números de cordeiros desmamados (SOUZA et al., 2006).

E com os avanços nos estudos voltado para área da biotecnologia, uma descoberta revolucionária, mudou o cenário, no ano de 1985 a técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) permitiu que a ciência amplifique determinados genes de interesse no DNA, dependendo do *primer* (iniciador) utilizado (PERSING., 1991; ERLICH., 1989).

Atualmente sabe-se que ao longo do genoma existem os SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), sendo pequenas mutações em um nucleotídeo único que ocorrem na cadeia do DNA, mas que influenciar na expressão de uma característica totalmente inovadora (FALEIRO, 2007). Uma técnica muito utilizada para conduzir essa identificação é o PCR (*Polymerase Chain Reaction*) — RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), essa é uma ferramenta extremamente importante para a engenharia genética. Sua principal função é clivar o DNA em sítios correspondentes ao local de corte da enzima utilizada. Os fragmentos de DNA, durante a eletroforese, formam as bandas, que diferem de posição devido ao seu tamanho e ao colocar em luz ultravioleta permite a leitura do resultado.

Através dessas técnicas tornou-se possível buscar mutações SNPs presente num gene específico. Estudos identificaram que na região sul do Brasil existe o polimorfismo no GDF9, em ovinos da raça Ile de France e o alelo mutante foi nomeado de Vacaria (FecGv). O aumento na ovulação e prolificidade dos animais está relacionada com o polimorfismo neste gene do animal, trazendo assim resultados que podem ser benéficos para reprodução (SOUZA et al., 2014).

Destaca-se o fator de heterozigose e homozigose quando se trata de ovelhas polimórficas, pois ovelhas homozigóticas apresentam esterilidade. Ao contrário de ovelhas heterozigóticas (VN), que por sua vez, apresentaram uma taxa de ovulação, aferido por laparoscopia, de 207%. Diferente de ovelhas não portadoras do polimorfismo (NN) que apresentaram uma taxa ovulatória de 134%, demonstrando que a mutação tem ação direta na quantidade de ovulação dos animais (SOUZA; MORAES, 2019).

A principal razão de ovelhas homozigotas apresentarem infertilidade se dá pela razão de que o trato genital permanece infantilizado e os ovários com folículos subdesenvolvidos, explicando então a razão destas ovelhas serem estéreis (BODIN *et al.*, 2007). Barakat *et al.* (2017) também relataram que ovelhas homozigotas portadoras do polimorfismo no gene GDF9 são inférteis e possuem uma falha no ovário elementar.

Uma forma simples de evitar problemas relacionados ao homozigoto é implementação do polimorfismo em apenas um sexo do rebanho. Outra possibilidade para criadores de ovinos

é a venda de reprodutores que positivaram para mutação. Carneiros que apresentam homozigose podem agregar valor, devido à capacidade de proliferar o gene mutante, pois no caso de machos a homozigose não demonstra infertilidade (SOUZA; MORAES, 2019).

A implementação de animais portadores dessa genética pode gradualmente aumentar a produção de cordeiros e conseqüentemente de carne. Mas é prudente apontar que animais com maiores valores genéticos, fêmeas mais prolíficas, mais produtivas exigem cuidados nutricionais e sanitários maiores. Portanto, a melhoria genética voltada para maior número de cordeiros por fêmea deve ser algo bem estruturado e pensado. Ovelhas com gestação gemelares, dependem de um aporte nutricional maior, principalmente no terço final da gestação (AZEVEDO et al., 2015).

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, Hymerson Costa *et al.* Estudos da Genética FecGE na Prolificidade de Ovinos. Aracaju, Se: Issn, 2015.
- FAO. Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Alimentação. Estatísticas FAO, 2007.
- Barakat, I. A. H., Salem, L. M., Daoud, N. M., Khalil, W. K. B., & Mahrous, K. F. (2017). Genetic polymorphism of candidate genes for fecundity traits in Egyptian sheep breeds. *Biomedical Research (India)*, 28(2), 851–857.
- 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(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- BOMFIM, Marco Aurélio Delmondes *et al.* PAPEL DA NUTRIÇÃO SOBRE A REPRODUÇÃO OVINA. *Acta Veterinaria Brasílica*, Mossoró, v. 8, supl. 2, p. 372-379, 2014.
- CAETANO, A. R.. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec.* 2009, vol.38, p.64-71.
- COSTA, Ricardo Lopez Dias da. Aspectos Reprodutivos das Ovelhas. *Revista Pesquisa e Tecnologia*. v.4, n.1, 2007.
- CRUZ, Jurandir Ferreira da; FERRAZ, Rita de Cássia Nunes. Manejo reprodutivo de caprinos e ovinos. Online. Disponível em: <http://www.neppa.uneb.br>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.

EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e Ovinos. Produção Mundial. Disponível em:  
<https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial>. Acesso em: (colocar a data de acesso no formato do exemplo a seguir: 11.jul.2020).

ERLICH, H. A. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, Vol, 9, No. 6, 1989.

FALEIRO, F.G. Marcadores genéticos-moleculares aplicados a programas de conservação e uso de recursos genéticos vegetais. Planaltina: Embrapa, 2007.

FONSECA, J. F. Estratégias para o controle do ciclo estral e superovulação em ovinos e caprinos. In: Congresso Brasileiro de Reprodução Animal. 16. Goiânia: 2005. Anais: Palestras. 9p.

GRANADOS, L. B. C.; DIAS, A. J. B.; SALES, M. P. Aspectos gerais da reprodução de caprinos e ovinos. In: Capacitação dos técnicos e produtores do Norte e Noroeste Fluminense em Reprodução de Caprinos e Ovinos. 1.ed. Campos dos Goyatacazes: 2006. 54p.

HAAS, Cristina Sangoi; ROVANI, Monique Tomazele; GONÇALVES, Paulo Bayard Dias; GASPERIN, Bernardo Garziera. Participação de membros da superfamília TGF beta na foliculogênese, luteinização e luteólise. *Rev Bras Reprod Anim*, Capão do Leão, v. 43, n. 1, p. 18-24, jan./ mar. 2019.

HAFEZ, E.s.e.; HAFEZ, B.. Foliculogênese, Maturação Ovocitária e Ovulação. In: HAFEZ, E.s.e. Hafez e B.. *Reprodução Animal*. 7. ed. Tamboré: Manole, 2004. Cap. 5. p. 69-96.

INCERTI, Barbara et al. Structure of the mouse growth/differentiation factor 9 gene. 1994. 125 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicine, Baylor College Of Medicine, Houston, 1994.

JÚNIOR, Antônio de Souza; GIRÃO, Raimundo Nonato. Manejo das crias de caprinos e ovinos. ed. Sebrae. Teresina: Plug Propaganda. 2003. 36 p. Aprisco, 1.

LOBÔ, Raimundo Nonato Braga; FACÓ, Olivardo; LOBO, Ana Maria Bezerra Oliveira; MORAIS, Octávio Rossi de; SILVA, Kleibe de Moraes; ALBUQUERQUE, Fernando Henrique M. A. R.. Programa de Melhoramento Genético de Caprinos e Ovinos de Corte (GENECOC). Sobral: Embrapa, 2011. 61 p. Disponível em:  
<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/93476/1/DOC-101.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2022.

MACHADO, Rui. Ovinocultura: Controle da verminose, mineralização, reprodução e cruzamentos na Embrapa Pecuária Sudeste. 1. ed. São Carlos: 2007. p.28-38.

MONTEIRO, Claudia Dias; BICUDO, Sony Dimas; TOMA, Hugo Shisei. Puberdade em

fêmeas ovinas. 2010. Online. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br>. Acesso em: 10 de dezembro de 2022.

MONTEIRO, Claudia Dias; BICUDO, Sony Dimas; TOMA, Hugo Shisei. Puberdade em fêmeas ovinas. 2010. Online. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br>. Acesso em: 30 de outubro de 2012.

PERSING, DAVID H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. *Journal of Clinical Microbiology*, July 1991, p. 1281-1285 vol. 29, no. 7

Pires, A. V. 2011. Aspectos nutricionais relacionados à reprodução, p. 537-559. In: Berchielli T.T., Pires A.V. & Oliveira S.G. (ed.) *Nutrição de ruminantes*. Editora FUNEP, Jaboticabal.

ROBINSON, J. J., Rooke J.A & McEvoy T.G. 2002. Nutrition for conception and pregnancy, p. 189-211. In: Freer M. & H. Dove. (ed.) *Sheep nutrition*. Vol. 1. ed. CSIRO, Canberra.

ROBINSON, J. J., Ashworth C.J., Rooke J.A., Mitchell L.M. & McEvoy T.G. 2006. Nutrition and fertility in ruminant livestock. *Animal Feed Science and Technology*. 126:259-276.

Shimasaki S, Moore RK, Otsuka F, Erickson GF. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction. *Endocr Rev*, v.25, p.72-101, 2004.

SILVA, J.R.V. *et al.* A superfamília dos fatores de crescimento transformante- $\beta$  e o controle da foliculogênese em mamíferos. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v. 33, n. 3, p. 149-160, jun. 2009.

Souza CJH, Moraes JCF, Chagas LM. Effect of the Booroola gene on time of ovulation and ovulatory dynamics. *Anim Reprod Sci*, v.37, p.7-13, 1994.

Souza CJH, Jaume CM, Moraes JCF. Introdução da mutação Booroola em rebanhos comerciais e avaliação ponderal dos cordeiros (resultados preliminares). In: *Jornadas Uruguayas de Buiatria*, 34, 2006, Paysandu. Paysandu: Jornadas Uruguayas de Buiatria, 2006. p.182-183.

SOUZA, Carlos José Hoff de; MORAES, José Carlos Ferrugem. A Mutação “Vacaria” e Seu Uso na Produção de Carne Ovina. 85. ed. Bagé/RS: ISSN, 2013.

SOUZA, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014). Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. *Animal Genetics*, 45(5), 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>

SOUZA, Carlos José Hoff de; MORAES, José Carlos Ferrugem. *Biologia reprodutiva de ovelhas não-portadoras, heterozigotas e homozigotas do alelo Vacaria do gene GDF-9 determinante de prolificade em um rebanho mestiço Ile de France*. Gramado: CBRA, 2019.

VIANA, João Garibaldi Almeida. *Panorama Geral da Ovinocultura no Mundo e no Brasil*. 2008.

<https://www.bibliotecaagptea.org.br/zootecnia/ovinocultura/artigos/PANORAMA%20DA%20OVINOCULTURA.pdf>. Acesso em: 30 maio 2022

VIANA, J.G.A.; SILVEIRA, V.C.P. Análise econômica da ovinocultura: estudo de caso na Metade Sul do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2009.

A formatação do artigo científico a seguir é específica de cada periódico, sendo de responsabilidade do aluno e orientador atender suas exigências. O artigo científico será submetido ao periódico “Brazilian Journal of Development”. As normas podem ser acessadas pelo endereço eletrônico: <https://ojs.brazilianjournals.com.br/ojs/index.php/BRJD/index>. Acesso em: 14/12/2022.

## IDENTIFICAÇÃO DE ALELOS ASSOCIADOS A EFICIÊNCIA REPRODUTIVA EM FÊMEAS DA RAÇA ILE DE FRANCE EM SANTA CATARINA.<sup>1</sup>

### ALELLIC IDENTIFICATON RELATED TO REPRODUCTIVE EFFICIENCY TRAITS ON ILE DE FRANCE BREED FEMALES IN SANTA CATARINA.

Carvalho, Pedro Henrique Rosa Alves\*  
Lima, André Luís Ferreira\*\*

#### RESUMO

O presente estudo foi conduzido com o intuito de isolar e identificar possíveis polimorfismos genéticos em parte do Exon II no gene do Fator 9 de Diferenciação Celular (GDF9 - Growth Differentiation Factor 9) de fêmeas Ile de France criadas no Estado de Santa Catarina. Este fator de diferenciação celular está relacionado com maiores incidências de partos múltiplos, influenciando diretamente a eficiência reprodutiva do rebanho. Amostras de sangue foram coletadas de 30 fêmeas, em idade reprodutiva, para extração do DNA genômico. A região de interesse foi isolada e amplificada via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) utilizando-se iniciadores desenhados a partir de sequências específicas disponíveis no GenBank (NCBI). Para busca de sítios polimórficos foi utilizada a técnica de RFLP (Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição) aplicando-se a endonuclease de restrição *Taq.α1*. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram um padrão monomórfico para o sítio de corte da enzima *Taq.α1* nos animais avaliados, entretanto, estudos futuros podem ser realizados com o intuito de identificar possíveis polimorfismos na mesma região isolada, utilizando-se a mesma técnica de identificação de polimorfismos, porém com outras enzimas de restrição. Este trabalho permitiu a realização do isolamento e amplificação de parte do Exon II do gene GDF9 via PCR, possibilitando inferir que existe monomorfismo genético para a enzima *Taq.α1* nesta região genética de animais da raça Ile de France.

**Palavras-chave:** RFLP, *Ovis Aries*, Prolifidade, Ovinocultura.

#### ABSTRACT

This study was carried on intent to isolate and identify genetic polymorphisms on part of Exon II from Growth Differentiation Factor 9 (GDF9) gene in Ile de France sheep raised on Santa Catarina State. This growth differentiation factor is related to higher rates of multiple parturitions, which can directly influence on the herd reproductive efficiency. Blood samples were collected from 30 females, at reproductive age, to genomic DNA extractions. Target region was isolated and amplified by Polymerase Chain Reactions (PCR) using primers designed from specific sequences available on GenBank (NCBI). For polymorphic identification, were used RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) reactions with *Taq.α1* restriction endonuclease. The results obtained on this study showed a monomorphic

1-A utilização dos animais nesta pesquisa foi autorizada pela CEUA-UFSC.

2-Acadêmico do Curso de Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis - Brasil

3- Docente do Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Santa Catarina – Florianópolis – Brasil

40 pattern to the enzyme's cut site. However, further investigations should be made with RFLP at  
41 the same region of GDF9 gene using other restriction enzymes. This work allows the isolation  
42 and amplification from part of Exon II of GDF9 gene, characterizing the existence of genetic  
43 monomorphism to *Taq.α1* enzyme at this region on Ile de France sheep.

44 **Keywords:** RFLP, *Ovis Aries*, Prolificity, Sheep.

## 46 INTRODUÇÃO

47  
48 Com aproximadamente 18,4 milhões de animais, a ovinocultura brasileira apresenta o  
49 18º maior rebanho de ovinos do mundo, segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística  
50 (IBGE) de 2016. Deste efetivo, 60,5% estão na região Nordeste, 26,5% no Sul e em menores  
51 percentagens nas demais regiões. Porém, considerando-se a quantidade de ovinos por estado, o  
52 Rio Grande do Sul e a Bahia têm praticamente o mesmo efetivo, com 3,5 milhões cada. Outro  
53 dado também oriundo do IBGE (2017) descreve que no Brasil há, em média, 527 mil  
54 estabelecimentos agropecuários com ovinos. Comparando a região Sul, o estado do Rio Grande  
55 do Sul segue em primeiro, com 47 mil estabelecimentos, seguido do Paraná com 17 mil e após  
56 vem Santa Catarina, com 12 mil envolvendo a ovinocultura, contendo em média 300 mil  
57 animais.

58 A região Sul destaca-se por ter um enorme rebanho, com finalidade de produção de  
59 carne e lã. Um parâmetro importante para o aumento da escala de produção é a prolificidade  
60 desses animais, ou seja, buscar o maior número de cordeiros nascidos vivos por ovelhas  
61 expostas à reprodução (LÔBO et al., 2011). Além dos efeitos ambientais e de manejo, leva-se  
62 em conta também a genética desses animais para aumentar a prolificidade, podendo ser  
63 melhorada mediante seleção assistida por marcadores moleculares, ou seja, genes específicos  
64 que são encontrados com maior frequência em determinada raça, no qual podem estar  
65 relacionados a uma maior taxa ovulatória nas fêmeas por ciclo estral, conseqüentemente, maior  
66 número de partos múltiplos. Nas raças ovinas do sul do Brasil, pesquisadores da Embrapa  
67 começaram a acompanhar os serviços de registros genealógicos para identificar rebanhos  
68 ovinos que ocorriam partos múltiplos com maior frequência. Tal característica foi detectada em  
69 ovinos da raça Ile de France, em um município perto da cidade de Vacaria, localizada no Rio  
70 Grande do Sul, recebendo então o nome de “mutação Vacaria” (SOUZA E MORAES, 2013).

71 Segundo Souza et al. (2011) os animais que apresentavam uma maior prolificidade,  
72 eram extraídas amostras de sangue para extração de DNA, no qual eram sequenciados diferentes  
73 genes já conhecidos, evidenciando o surgimento de um novo polimorfismo de nucleotídeo  
74 único (SNP) no gene do fator de crescimento e diferenciação 9 (Growth Differentiation Factor  
75 9 – GDF9). O gene deste fator é expresso nos tecidos ovarianos de ovelhas e demais mamíferos,  
76 e tem efeito nas células da teca e da granulosa, atuando assim, de forma contributiva para a  
77 foliculogênese e ovulação (SHIMASAKI et al., 2004). Quando o GDF9 é inativado, pode levar  
78 à infertilidade pela perda da capacidade de ativação no crescimento dos folículos primordiais.  
79 Animais portadores de genótipos homocigotos VV possuem a fertilidade comprometida,  
80 apresentando ovários de tamanhos reduzido e sem folículos evidentes. (DONG et al., 1996;  
81 SOUZA et al., 2011). Entretanto as fêmeas portadoras das mutações NNVN e NNNN possuem  
82 acréscimo na fertilidade em uma taxa média de 210% e 130%, respectivamente (SOUZA et al.,  
83 2011). A região estrutural do GDF9 é composta por dois éxons e um íntron, que codificam um  
84 proteína com 135 aminoácidos (SHIMASAKI et al., 2004; INCERTI et al., 1994).

85 Embora essas mutações sejam identificadas utilizando-se sequenciamento direto de  
86 amostras de DNA, a utilização de técnicas menos onerosas para genotipar animais em  
87 polimorfismos com efeitos já conhecidos faz-se essencial como um fator viabilizador da  
88 inclusão destes genes de efeito maior em programas de melhoramento animal com seleção  
89 assistida por marcadores moleculares. Dentre essas técnicas, destaca-se a PCR-RFLP (Reação

em Cadeia da Polimerase – Polimorfismo de Tamanho de Fragmento de Restrição). Nela, a região de interesse do gene é isolada e amplificada para posterior digestão específica com endonucleases de restrição. Havendo o polimorfismo no sítio de corte da enzima, padrões polimórficos de migração são facilmente detectados em eletroforese de géis de agarose. Tal aplicação de genotipagem pode viabilizar a avaliação de um grande número de animais de maneira mais econômica. Em virtude destes fatos, o presente trabalho foi conduzido com o intuito de isolar e identificar possíveis polimorfismos genéticos em parte do Exon II no gene do Fator 9 de Diferenciação Celular (GDF9 - Growth Differentiation Factor 9) de fêmeas Ile de France criadas no Estado de Santa Catarina e verificar, quando detectados tais polimorfismos, a possível associação dos alelos com a incidência de partos múltiplos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta de amostras e extração do DNA genômico**

Para extração do DNA genômico dos animais, foram utilizadas amostras do sangue de 30 fêmeas adultas em idade reprodutiva, da raça Ile de France, criadas no estado de Santa Catarina. As amostras foram coletadas por venopunção jugular utilizando-se agulhas descartáveis e tubos do tipo vacutainer com EDTA potássico, em um volume de 4 mL/tubo/animal. Para o procedimento, os animais foram contidos em pé com a cabeça erguida, tosquiados na região jugular para facilitar localização da veia e, de maneira minimamente invasiva e buscando-se evitar qualquer tipo de stress, o sangue foi coletado. Após a coleta, os tubos devidamente identificados foram acondicionados em freezer a - 20°C até o momento da extração do DNA genômico.

Todas as etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Ensino e Pesquisa em Genética Animal (LEPGA) da Universidade Federal de Santa Catarina, localizado no Departamento de Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, Florianópolis/SC. As extrações de DNA genômico da fase leucocitária foram realizadas conforme metodologia proposta por O DNA genômico foi extraído da fase leucocitária, conforme metodologia descrita por ZADWORNY & KUHNLEIN (1990). As amostras descongeladas contendo 1,5 mL de sangue/cada foram transferidas para tubos de 2 mL e centrifugadas por 15 minutos. Logo em seguida, o sobrenadante foi descartado. Posteriormente, o volume dos tubos foi ajustado para 2 mL com uma solução A (250 µL Tris HCl pH 7.6 1 M; 250 µL MgCl<sub>2</sub> 0.5M; 50 µL NaCl 5 M Em seguida, serão adicionados 500 µL de solução de Proteinase K (5 µL de Tris HCl pH 8.0 1 M; 10 µL de NaCl 5 M; 10 µL de EDTA pH 8.0 0.5 M; 12.5 µL de SDS a 20% e completar o volume com 460,5 µL de água ultrapura e adicionar 2 µL de solução de proteinase K na concentração 20 mg/mL no momento do uso) ao sedimento de leucócitos armazenados na etapa anterior e misturados no vórtex até que se desprenda do fundo do tubo. Em seguida, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e os tubos invertidos diversas e o sobrenadante foi descartado. A seguir foi realizada a lavagem com 500 µL de etanol a 70% gelado e centrifugado por 5 minutos e a secagem em temperatura ambiente. O pellet será ressuscitado em 250 µL de solução TE e 0,25 mL de solução de RNase (10 mg/µL) e incubado por 12 horas a 4°C. Após a extração, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi diluída com 5 µL de tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e submetidos à eletroforese em gel de agarose (1,5%), em tampão TBE 1X com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização do DNA genômico foi feita em luz ultravioleta (UV), e o gel foto documentado.

## 140 **Análises de PCR e genotipagem**

141

142 As seqüências dos oligonucleotídeos iniciadores específicos para isolar a região  
143 codificadora do gene GDF9, foram fwd 5'- GACCAGGAGAGTGCCAG -3' e rev 5'-  
144 ACTAAGTGTACCTGTTCG- 3', desenhadas a partir de informações disponíveis no GenBank.  
145 As amostras de DNA genômico tiveram as regiões de interesse isoladas e amplificadas por  
146 PCR, em reações contendo 100 ng de DNA, 0,5 µM de cada iniciador, 1X PCR buffer [10 mM  
147 Tris-HCl (pH 9,0), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> e 50 mM KCl], 100 µM de dNTPs e 0,5 U de Taq polimerase  
148 num volume final de 25 µl.

149 Após a amplificação, uma alíquota de 5 µl de cada amostra foi diluída com 5 µL de  
150 tampão de corrida (0,05% de azul de bromofenol) e submetidos à eletroforese em gel de agarose  
151 (1,5%), em tampão TBE 1X (Tris-HCl 89 mM; EDTA 2,5 mM e Ácido Bórico 89 mM e pH  
152 8,3) com corante Sybr a 70V, por aproximadamente 50 minutos. A visualização dos  
153 "amplicons" foi feita em luz ultravioleta (UV), e o gel foto documentado em aparelho visando  
154 avaliar a eficiência da PCR em função do tamanho do fragmento amplificado. As amostras  
155 foram mantidas a 4°C até análises de RFLP. Nesta etapa, os produtos obtidos nas reações de  
156 PCR foram digeridos em banho-maria, com tempo e temperatura descrito no protocolo  
157 fornecido pelo fabricante da enzima, utilizando-se 10 µL da reação de PCR, 1/10 de tampão  
158 para a enzima de restrição e 5 unidades da enzima de restrição TaqI (New England  
159 Biosciences) que possui como sítio de corte a sequência palindrômica 5'-TGCA-3', em um  
160 volume final de 20 µL. Após a digestão, os fragmentos foram submetidos à eletroforese em gel  
161 de agarose (2,5%), em tampão TBE 1X a 100V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. A  
162 visualização das bandas foi feita em luz ultravioleta (UV) e o gel foto documentado.

163

164

## 165 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

166

167 Os procedimentos de extração de DNA genômico foram realizados com êxito nas 30  
168 amostras, obtendo-se DNA com integridade e sem sinais de degradação, conforme ilustra a  
169 Figura 1. Com estes resultados, foi possível utilizar o material obtido para a etapa de Reação  
170 em cadeia da polimerase.

171



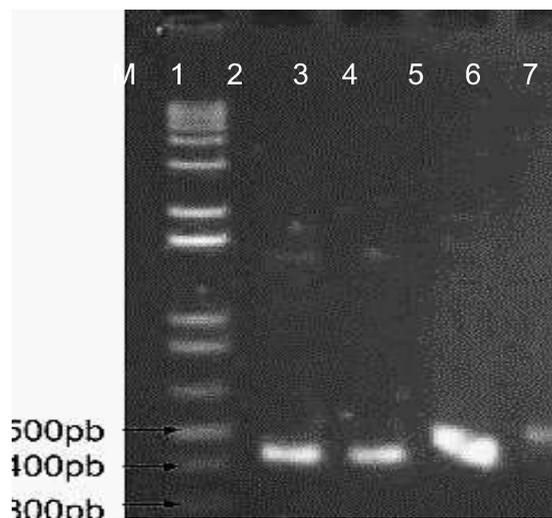
172

173

174 Figura 1. Imagem representativa do resultado das extrações de DNA genômico das amostras de Sangue. Gel  
175 de agarose a 0,5% de concentração.

176 Para otimização das reações de PCR foi feita uma análise prévia com gradiente de  
177 temperaturas de anelamento dos iniciadores onde obteve-se a temperatura ideal correspondente  
178 a 54,2° C. Após este teste de otimização, as reações de PCR foram realizadas nas 30 amostras

179 seguindo 35 ciclos com as temperaturas e tempos de 95°C/1", 54°C/1" e 72°C/1" para  
180 desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente. A Figura 2 mostra, de forma  
181 representativa, os resultados obtidos nas reações de PCR, que permitiram a amplificação do  
182 fragmento aproximadamente 400pb, correspondente à parte do Exon II do gene GDF9 na  
183 espécie ovina em todas as amostras. Resultados semelhantes foram obtidos por Araby et. al.  
184 (2019), onde estes autores isolaram e amplificaram uma região de 713pb do mesmo Exon, em  
185 ovelhas da raça Rahmani, no Egito.  
186



187  
188 Figura 2. Imagem representativa (Gel de agarose a 1,5%) dos resultados obtidos na etapa de PCR, para  
189 isolamento e amplificação da região de interesse. M= 1Kb Plus DNA ladder.

190  
191 Após o isolamento e clonagem da região de interesse via PCR, a aplicação da técnica de  
192 RFLP com a enzima Taq  $\alpha$ 1 mostrou-se eficiente no processo de clivagem dos fragmentos  
193 realizada em todas as amostras testadas. Entretanto, foi obtido um padrão monomórfico de  
194 migração das bandas, com dois fragmentos de aproximadamente 200pb em todos os animais,  
195 conforme demonstrado na Figura 3.  
196



197  
198 Figura 3: Figura 2. Imagem representativa (Gel de agarose a 2,5%) do padrão monomórfico de  
199 migração de bandas, na etapa de RFLP com a enzima Taq  $\alpha$ 1. M= 1Kb Plus DNA ladder.

200  
201 Trabalhando com a mesma região do gene GDF9 em ovinos da Raça Shal, no Irã,  
202 Ghaffari et al.(2009) obtiverem resultado semelhante de padrão monomórfico utilizando RFLP  
203 com a endonuclease DdeI. Estes autores se referiram ao padrão monomórfico obtido como AA  
204 – Selvagem.

205 O monomorfismo genético para o sítio de corte da enzima Taq  $\alpha$ 1 obtido para a região  
206 de interesse do GFD9 neste trabalho, pode ser atribuído a alta incidência de regiões bastante  
207 conservadas em genes associados às características reprodutivas em mamíferos. Entretanto,  
208 estudos futuros podem ser realizados para a mesma região de interesse, mas com outras  
209 endonucleases, para se buscar polimorfismo que sejam associados à eficiência reprodutiva das  
210 ovelhas e que mostrem-se como uma ferramenta menos onerosa e mais acessível para os  
211 produtores inseridos em programas de melhoramento da raça Ile de France.

212  
213  
214

## 215 CONCLUSÕES

216  
217  
218  
219  
220  
221  
222

Os resultado obtido no presente estudo permitem inferir que foi possível isolar e  
amplificar a região de interesse, correspondente ao Exon II do gene GDF9 em fêmeas Ile de  
France e que as mesmas apresentaram um padrão monomórfico para o sítio de corte da  
endonuclease Taq  $\alpha$ 1, com a utilização da técnica de RFLP para genotipagem dos animais.

## 223 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

224  
225

- 226 1. Abdoli, R., Zamani, P., Mirhoseini, S. Z., Ghavi Hossein-Zadeh, N., & Nadri, S. (2016). A  
227 review on prolificacy genes in sheep. *Reproduction in Domestic Animals*, 51(5), 631–637.  
228 <https://doi.org/10.1111/rda.12733>
- 229 2. Ahmad, H. I., Liu, G., Jiang, X., Edallem, S. G., Wassie, T., Tesema, B., Yun, Y., Pan, L.,  
230 Liu, C., Chong, Y., Yu, Z. J., & Jilong, H. (2017). Maximum-likelihood approaches reveal  
231 signatures of positive selection in BMP15 and GDF9 genes modulating ovarian function in  
232 mammalian female fertility. *Ecology and Evolution*, July, 8895–8902.  
233 <https://doi.org/10.1002/ece3.3336>
- 234 3. Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis – Valuable Tool for  
235 Genotyping and Genetic Fingerprinting. Denmark: Institute Of Biological Psychiatry,  
236 Mental Health Centre Sct. Hans, S/D.
- 237 4. Barakat, I. A. H., Salem, L. M., Daoud, N. M., Khalil, W. K. B., & Mahrous, K. F. (2017).  
238 Genetic polymorphism of candidate genes for fecundity traits in Egyptian sheep breeds.  
239 *Biomedical Research (India)*, 28(2), 851–857
- 240 5. Bodensteiner KJ, Clay CM, Moeller CL, Sawyer HR. Molecular cloning of the ovine  
241 Growth/Differentiation factor-9 gene and expression of growth/differentiation factor-9 in  
242 ovine and bovine ovaries. *Biol Reprod*, v.60, p.381-386, 1999
- 243 6. Bodin, L., Di Pasquale, E., Fabre, S., Bontoux, M., Monget, P., Persani, L., & Mulsant, P.  
244 (2007). A novel mutation in the bone morphogenetic protein 15 gene causing defective  
245 protein secretion is associated with both increased ovulation rate and sterility in Lacaune  
246 sheep. *Endocrinology*, 148(1), 393–400. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0764>
- 247 7. CAETANO, A. R.. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no  
248 melhoramento animal e perspectivas para o futuro. *R. Bras. Zootec.* 2009, vol.38, p.64-71.
- 249 8. Castro EA, Lopez IMR, Lim A, Franco MM, Paiva SR, Souza CJH, Rumpf R, Melo EO.  
250 Characterization of a new SNP in the Growth and Differentiation Factor 9 (GDF-9) gene,  
251 specific for the Brazilian Santa Ines Sheep. In: *World Congress on Genetics Applied to*  
252 *Livestock Production*, 8, 2006, Belo Horizonte, MG, Brazil. *Proceedings ... Belo*  
253 *Horizonte: WCGAP, 2006. CD-ROM*

- 254 9. Ceko, M. J., Hummitzsch, K., Hatzirodos, N., Bonner, W. M., Aitken, J. B., Russell, D. L.,  
255 Lane, M., Rodgers, R. J., & Harris, H. H. (2015). X-Ray fluorescence imaging and other  
256 analyses identify selenium and GPX1 as important in female reproductive function.  
257 *Metallomics*, 7(1), 71–82. <https://doi.org/10.1039/c4mt00228h>
- 258 10. COELHO, R. A. de S. Qualidade e negócio da pele caprino-ovina. In: ENCONTRO DO  
259 AGRONEGÓCIO DA CAPRINO-OVINOCULTURA: I PÓLO JUAZEIRO-  
260 PETROLINA, 1999, Petrolina, PE. Anais... Petrolina, PE: Embrapa Semi-Árido: Embrapa  
261 Caprinos, 1999. p. 108-129
- 262 11. El-Seedy, A. S., Hashem, N. M., El-Azrak, K. M., Nour El-Din, A. N. M., Ramadan, T.  
263 A., Taha, T. A., & Salem, M. H. (2017). Genetic screening of FecB, FecXG and FecXI  
264 mutations and their linkage with litter size in Barki and Rahmani sheep breeds.  
265 *Reproduction in Domestic Animals*, 52(6), 1133–1137. <https://doi.org/10.1111/rda.13002>
- 266 12. EMBRAPA CAPRINOS E OVINOS. Centro de Inteligência e Mercado de Caprinos e  
267 Ovinos. Produção Mundial. Disponível em: [https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-](https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial)  
268 [mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial](https://www.embrapa.br/cim-inteligencia-e-mercado-de-caprinos-e-ovinos/producao-mundial). Acesso em: (colocar a data de acesso no  
269 formato do exemplo a seguir: 11.jul.2020)
- 270 13. ERLICH, H. A. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Immunology*, Vol, 9, No.  
271 6, 1989
- 272 14. FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. Introduction to quantitative genetics. 4.ed. Longman  
273 Press,London, UK, 1996.
- 274 15. FONSECA, Jeferson Ferreira da. Otimização da Eficiência Reprodutiva em Caprinos e  
275 Ovinos. 2006. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744074011.pdf>.  
276 Acesso em: 30 maio 2022
- 277 16. Galloway SM, McNatty KP, Cambridge LM, Laitinen MP, Juengel JL, Jokiranta TS,  
278 McLaren RJ, Luiro K, Dodds KG, Montgomery GW, Beattie AE, Davis GH, Ritvos O.  
279 Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate  
280 and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nat Genet*, v.25, p.279-283, 2000
- 281 17. Galloway, S. M., McNatty, K. P., Cambridge, L. M., Laitinen, M. P. E., Juengel, J. L.,  
282 Jokiranta, T. S., McLaren, R. J., Luiro, K., Dodds, K. G., Montgomery, G. W., Beattie, A.  
283 E., Davis, G. H., & Ritvos, O. (2000). Mutations in an oocyte-derived growth factor gene  
284 (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature*  
285 *Genetics*, 25(3), 279–283. <https://doi.org/10.1038/77033>
- 286 18. GARCIA, C. A. Ovinocultura e Caprinocultura. Marília: Universidade de Marília, 2004. 22  
287 f. Apostila
- 288 19. Hanrahan, J. P., Gregan, S. M., Mulsant, P., Mullen, M., Davis, G. H., Powell, R., &  
289 Galloway, S. M. (2004). Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9  
290 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge  
291 and Belclare Sheep (*Ovis aries*). *Biology of Reproduction*, 70(4), 900–909.  
292 <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.023093>
- 293 20. IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Agropecuário  
294 1974/1984/1994/2004/2014/2019. Rio de Janeiro, 2019
- 295 21. Lassoued, N., Benkhilil, Z., Woloszyn, F., Rejeb, A., Aouina, M., Rekik, M., Fabre, S., &  
296 Bedhiaf-Romdhani, S. (2017). FecX Bar a Novel BMP15 mutation responsible for  
297 prolificacy and female sterility in Tunisian Barbarine Sheep. *BMC Genetics*, 18(1), 1–10.  
298 <https://doi.org/10.1186/s12863-017-0510-x>
- 299 22. Massague J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, v.67, p.753-791, 1998
- 300 23. Nicol, L., Bishop, S. C., Pong-Wong, R., Bendixen, C., Holm, L. E., Rhind, S. M., &  
301 McNeilly, A. S. (2009). Homozygosity for a single base-pair mutation in the oocyte-specific  
302 GDF9 gene results in sterility in Thoka sheep. *Reproduction*, 138(6), 921–933.  
303 <https://doi.org/10.1530/REP-09-0193>

- 304 24. PERSING, DAVID H. Polymerase Chain Reaction: Trenches to Benches. Journal of  
305 Clinical Microbiology, July 1991, p. 1281-1285 vol. 29, no. 7
- 306 25. RASMUSSEN, H. B. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-
- 307 26. RAYMOND, M. & ROUSSET, F. GENEPOP version 3.1d: Population genetics software  
308 for exact test and ecumenism. J. Heredity. 86:248-249. 1995a.
- 309 27. SIMPLÍCIO, A. A. A caprino-ovinocultura na visão do agronegócio. Revista Conselho  
310 Federal de Medicina Veterinária. Brasília/DF, n. 24, ano VII, p. 15-18, set/out/dez 2001
- 311 28. Souza CJH, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT Effect of bone morphogenetic protein 2  
312 (BMP2) on oestradiol and inhibin A production by sheep granulosa cells, and localization  
313 of BMP receptors in the ovary by immunohistochemistry. Reproduction, v.123, p.363-369,  
314 2002
- 315 29. Souza CJH, Campbell BK, Mcneilly AS, Baird DT. Bone morphogenetic proteins and  
316 folliculogenesis: lessons from the Booroola mutation. Reproduction Suppl, n.61, p.361-370,  
317 2003
- 318 30. Souza CJH, Jaume CM, Moraes JCF. Introdução da mutação Booroola em rebanhos  
319 comerciais e avaliação ponderal dos cordeiros (resultados preliminares). In: Jornadas  
320 Uruguayas de Buiatria, 34, 2006, Paysandu. Paysandu: Jornadas Uruguayas de Buiatria,  
321 2006. p.182-183
- 322 31. Souza CJH, Moraes JCF, Chagas LM. Effect of the Booroola gene on time of ovulation  
323 and ovulatory dynamics. Anim Reprod Sci, v.37, p.7-13, 1994
- 324 32. SOUZA *et al.* POLIMORFISMO NO GENE GDF9 DETERMINANTE DE MAIOR  
325 TAXA DE OVULAÇÃO E PROLIFICIDADE EM OVINOS. 2011. Disponível em:  
326 <https://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/910136/1/M56p.pdf>. Acesso em: 30  
327 maio 2022
- 328 33. Souza, C. J. H., McNeilly, A. S., Benavides, M. V., Melo, E. O., & Moraes, J. C. F. (2014).  
329 Mutation in the protease cleavage site of GDF9 increases ovulation rate and litter size in  
330 heterozygous ewes and causes infertility in homozygous ewes. Animal Genetics, 45(5),  
331 732–739. <https://doi.org/10.1111/age.12190>
- 332 34. Wilson, T., Wu, X. Y., Juengel, J. L., Ross, I. K., Lumsden, J. M., Lord, E. A., Dodds, K.  
333 G., Walling, G. A., McEwan, J. C., O'Connell, A. R., McNatty, K. P., & Montgomery, G.  
334 W. (2001). Highly prolific Booroola sheep have a mutation in the intracellular kinase  
335 domain of bone morphogenetic protein IB receptor (ALK-6) that is expressed in both  
336 oocytes and granulosa cells. Biology of Reproduction, 64(4), 1225–1235.  
337 <https://doi.org/10.1095/biolreprod64.4.1225>