

MARCADORES MOLECULARES ASSOCIADOS À REPRODUÇÃO ANIMAL

MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED TO ANIMAL REPRODUCTION

Luiz Francisco Machado Pfeifer; Augusto Schneider; Nelson José Laurino Dionello; Márcio Nunes Corrêa

- REVISÃO BIBLIOGRÁFICA -

RESUMO

A maioria das características de importância econômica na reprodução animal é multifatorial, o que significa que são controladas por vários genes e afetadas por fatores ambientais. Em razão disso, apresentam baixas estimativas de herdabilidade (h^2) e são menos sensíveis à seleção direta. Desta forma, o melhoramento genético pode ser incrementado combinando-se a seleção direta para uma determinada característica com a seleção assistida por marcadores genéticos para esta mesma característica. A seleção assistida por marcadores moleculares tem por objetivo, selecionar animais de genótipo superior, através da relação existente entre os marcadores moleculares com os genes de efeito favorável em características de interesse econômico. Neste âmbito, várias estratégias para a identificação de marcadores moleculares vêm sendo empregadas. O objetivo principal desta revisão é apresentar resultados da utilização de alguns marcadores moleculares que podem ser usados na seleção de genótipos superiores em populações pecuárias.

Palavras-chave: Marcadores genéticos, reprodução, melhoramento animal, seleção assistida

ABSTRACT

Most traits of economical importance are multifactorial, which means that they are controlled by many genes and affected by environmental factors. In such view, they show low estimate of heritability (h^2) and are less sensitive to direct selection. Therefore animal breeding could be improved by the association of direct selection of a certain trait with the selection assisted by genetic markers. Marker assisted selection has the purpose of selecting animals with a superior genotype, via association of these markers with genes of favorable effect on economical interest traits. Thereby, many strategies to the generation of molecular markers have been used. The main aim of this review is to show results of the utilization of some molecular markers that may be used in the selection of superior genotypes in livestock populations.

Key words: Genetic markers, reproduction, animal improvement, aided selection

INTRODUÇÃO

A capacidade de produção de um animal (fenótipo) é o reflexo da interação de seu material genético (genótipo) com o ambiente. Esse conceito resulta de um elaborado processo celular de transformação da informação contida no DNA em proteínas, da interação entre as proteínas presentes no ambiente celular e de sua interação com o meio externo. Desta forma, em ambiente controlado, qualquer característica produtiva é reflexo da informação contida no DNA (REGITANO & COUTINHO, 2001).

A maioria das características de importância econômica, como no caso de características reprodutivas, são multifatoriais, o que significa que são controladas por vários genes e altamente afetadas por fatores ambientais. Em razão disso, apresentam baixas estimativas de herdabilidade (h^2) e são menos sensíveis à seleção direta

(OLIVEIRA & HENKES, 2001). A baixa h^2 , associada aos longos períodos de tempo requeridos para a mensuração das características reprodutivas em fêmeas, limita o uso das técnicas de seleção tradicionais em função do elevado custo. Desta forma, o melhoramento animal pode ser incrementado combinando-se a seleção direta de uma determinada característica com a seleção assistida por marcadores genéticos.

Marcadores genéticos são características de herança mendeliana simples, que possibilitam a inferência do genótipo a partir do fenótipo do indivíduo, permitindo que a segregação do gene marcador seja acompanhada. A análise da segregação requer a existência de pelo menos duas formas alélicas, ou seja, a existência de polimorfismo no loco marcador (REGITANO & COUTINHO, 2001).

A seleção assistida por marcadores moleculares tem por objetivo selecionar animais de genótipo superior. Neste âmbito, várias estratégias para a geração de marcadores moleculares vêm sendo empregadas, entre elas: isoenzimas, polimorfismos de tamanho gerado pelo uso de enzimas de restrição (RFLP), DNA *fingerprinting* com sondas multilocais, polimorfismos de DNA amplificados ao acaso (RAPD) e microssatélites. A amplificação de regiões microssatélites tem sido a estratégia preferida para a identificação de marcadores moleculares, sendo que a publicação do primeiro mapa genético saturado de bovinos com 306 locos marcadores, entre os quais 290 são microssatélites, colaborou para a difusão desta estratégia nesta espécie (BISHOP *et al.*, 1994).

Os genomas de eucariotos abrigam grande quantidade de DNA repetitivo, as seqüências microssatélites (*simple sequence repeats* - SSR), caracterizados por repetições em seqüência de um mono, di, tri ou tetranucleotídeo (*short tandem repeat* - STR), localizadas dentro de regiões de seqüência únicas (REGITANO & COUTINHO, 2001). Outra característica do genoma mamífero que pode ser utilizada como marcador molecular na seleção animal é a presença de SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphism*, que são mutações pontuais no DNA, de apenas um par de base, que ocorrem raramente em populações, sendo que as mesmas podem ocorrer em diferentes partes do genoma, como em regiões intergênicas ou em regiões não transcritas, sendo que quando estas mutações pontuais ocorrem em regiões codificantes, podem causar a alteração do aminoácido e conseqüentemente da proteína formada.

Recentes avanços nas técnicas de biologia molecular demonstraram ser uma ferramenta muito útil para o melhoramento genético dos animais de produção. Da mesma forma que o Projeto Genoma Humano, o mapeamento genético de espécies domésticas possui fundamental importância pela possibilidade de utilizar marcadores moleculares para selecionar animais com desejável mérito genético (BREDBACKA, 2001).

(Recebido para Publicação em 30/06/2005, Aprovado em 30/05/2008)

Vários trabalhos estão sendo publicados evidenciando a influência dos fatores genéticos sobre eventos reprodutivos envolvidos no processo de ovulação e retorno à ciclicidade pós-parto em bovinos, bem como a relação destes fatores genéticos com a secreção de proteínas diretamente envolvidas neste processo (ROTHSCHILD *et al.*, 1991; OLIVEIRA, 2000; GARCIA *et al.*, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2003; BASTOS *et al.*, 2003; GE *et al.*, 2003; SCHMITZ, 2003;).

O objetivo principal desta revisão é demonstrar a influência da presença de alguns marcadores moleculares envolvidos em processos reprodutivos na produção animal.

USO DE MARCADORES GENÉTICOS NA PRODUÇÃO ANIMAL

BREDBACKA (2001) registrou a importância de técnicas como o PCR (*polymerase chain reaction*) e da hibridização *in situ* fluorescente (FISH) para o diagnóstico de doenças genéticas pré-implantação (PGD), assim como no melhoramento assistido por marcadores moleculares, para utilização em laboratórios de produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, a partir da biópsia celular dos embriões. Ainda que os baixos índices de produção de embriões atingidos na PIV (MERTON *et al.*, 2003) atuem como uma barreira para implantação deste tipo de seleção na bovinocultura, tais técnicas de biologia molecular podem servir para detectar pontos críticos no processo de PIV, que representam um bloqueio para o melhoramento genético baseado no PGD.

Alguns trabalhos estão buscando relacionar a eficiência reprodutiva, em vacas com estresse nutricional submetidas à indução de estro, com alguns marcadores

moleculares (OLIVEIRA, 2000; ALMEIDA *et al.*, 2003; BASTOS *et al.*, 2003), pois o mecanismo biológico que resulta na grande heterogeneidade no tempo de retorno à ciclicidade pós-parto ainda não é totalmente compreendido. Acredita-se que este fato pode estar ligado a alguma característica genotípica. O balanço energético negativo reduz a frequência de pulsos de LH, a taxa de crescimento folicular e o diâmetro do folículo dominante, bem como as concentrações de fator de crescimento semelhante a insulina tipo I (IGF-I), glicose, insulina e, possivelmente, leptina, afetando a esteroidogênese, a ovulação e a possibilidade de concepção (ROCHE, 1996). Esses achados são evidências de que podem haver associações significativas entre indivíduos que apresentam variabilidade genética para um QTL (locus de traços quantitativos) e desempenho reprodutivo de vacas submetidas a um protocolo de indução de estro e ovulação no período pós-parto (BASTOS *et al.*, 2003). BASTOS *et al.* (2003) realizaram um experimento com sincronização da ovulação em vacas pós-parto, as quais foram genotipadas para o marcador molecular *BMS 3004*, sendo que aquelas que apresentavam o marcador em heterozigose apresentaram maior taxa de prenhez ao final da estação reprodutiva do que as que possuíam o marcador em homozigose (Tabela 1). Os autores atribuíram os resultados a possibilidade do microssatélite *BMS3004* atuar na regulação gênica do hormônio luteinizante (LH), de tal modo que animais heterozigotos possam produzir maior quantidade da cadeia β do LH, acarretando em níveis mais elevados de LH na circulação. Essa é uma hipótese plausível, já que a frequência e a amplitude de liberação do LH pela hipófise estão relacionadas com o intervalo de anestro pós-parto em bovinos (JORRITSMA *et al.*, 2005).

Tabela 1 – Taxa de prenhez no primeiro e segundo diagnóstico de gestação (cumulativo), em grupos de vacas submetidos a indução hormonal e desmame precoce, de acordo com os genótipos para o microssatélite *BMS3004*.

Genótipo	Grupo					
	Indução hormonal				Desmame precoce	
	n	1° diagnóstico	2° diagnóstico	n	1° diagnóstico	2° diagnóstico
Heterozigoto	36	41,7 ^{Aa}	69,4 ^{Aa}	37	73,0 ^{Ba}	75,7 ^{Aa}
Homozigoto	38	36,8 ^{Aa}	42,1 ^{AD}	42	66,7 ^{Ba}	73,8 ^{Ba}

^{A,B} Valores seguidos por letras maiúsculas diferentes na mesma linha e mesmo parâmetro (1° DG e 2° DG) significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre grupos.

^{a,b,c} Valores seguidos por letras minúsculas na mesma coluna significam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os módulos.

Já OLIVEIRA (2000), trabalhando com um rebanho de vacas da raça Ibagé, encontrou efeito significativo entre os genótipos favoráveis para os microssatélites *AFZ1* e *HEL5* e menor intervalo entre partos (IEP) (média de 435 dias) em relação aquelas com genótipos desfavoráveis (média de 585 dias). Esses microssatélites estão localizados no cromossomo 21, onde também é encontrado o gene do receptor do IGF-I.

O hormônio de crescimento (GH) é provavelmente o principal regulador do crescimento pós-natal e do metabolismo em mamíferos, afetando diretamente a taxa de crescimento, composição corporal, saúde e produção de leite, além de atuar modulando a expressão de alguns genes, incluindo o do IGF-I (HO *et al.*, 1993; LINCOLN *et al.*, 1995), que está diretamente relacionado à secreção de gonadotrofinas pelo eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano (SCHMITZ, 2003) e com o aumento dos níveis dos fatores de crescimento folicular em bovinos (MIHM *et al.*, 2002). Os

genes do GH e do receptor do GH (GHR) são importantes candidatos para a identificação de marcadores genéticos para crescimento, carcaça e características leiteiras em animais de produção (GE *et al.*, 2003). Estes mesmos autores constataram que um SNP na região promotora do GHR está associado ao aumento das concentrações de IGF-I em neonatos de 42 dias da raça Angus em relação à média dos níveis de IGF-I dos demais componentes do rebanho que não apresentam este polimorfismo. Portanto, este polimorfismo pode ser um potencial marcador genético para estimar a concentração de IGF-I em rebanhos da raça Angus.

A leptina, produto do gene *obese* (*ob*), é uma proteína com 16-kDa produzida pelas células do tecido adiposo que atua na regulação do consumo de alimento em várias espécies (ALMEIDA *et al.*, 2003). Alguns estudos sugerem que esta proteína pode também afetar o eixo hipotalâmico-hipofisário-ovariano através de receptores

específicos no hipotálamo (CUNNINGHAM *et al.*, 1999; SPICER, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2002), modulando a liberação de LH pela hipófise (HOLNESS *et al.*, 1999; KEISLER *et al.*, 1999; ASHWORTH *et al.*, 2000). O gene da leptina pode ser um bom marcador molecular relacionado a desempenho reprodutivo, bem como para a seleção de animais com melhores características de carcaça (HOSSNER, 1998). GARCIA *et al.* (2002), trabalhando com novilhas pré-puberes, evidenciaram a associação de níveis adequados de leptina com o estabelecimento da puberdade, verificando também uma correlação positiva ($r = 0,85$, $p < 0,02$) entre condição corporal (CC) e níveis de leptina. Neste estudo foi registrado um aumento linear dos níveis de leptina com a aproximação da puberdade, porém os níveis de RNAm para leptina foram mais elevados entre 6 e 3 semanas antes da puberdade, normalizando-se quanto mais perto da puberdade. De acordo com THOMAS *et al.* (2002), a leptina também está relacionada ao peso de touros, circunferência escrotal e a concentração sérica de testosterona, sugerindo maiores investigações na interação crescimento-reprodução em bovinos.

Como resultado da interação entre condição corporal e performance reprodutiva, pode-se considerar o gene da leptina como um candidato para avaliar a eficiência reprodutiva em animais de produção (THOMAS *et al.*, 2002). ALMEIDA *et al.* (2003) avaliaram em seu trabalho 9 polimorfismos do gene LEP, sendo 4 RFLPs e 5 STRs (Tabela 2), em fêmeas de raça sintética (3/8 Nelore e 5/8 Aberdeen Angus) para avaliar a possível associação entre estes marcadores e a performance reprodutiva. Foi registrado um menor IEP ($p = 0,016$) para o marcador de interesse *LEPSau3AI* presente em homozigose, porém em heterozigose este aumentou o IEP em 81 dias. Já a presença do alelo *IDVGA51-181* aumentou ($p = 0,002$) o IEP em 79 dias. Desta forma a seleção contra estes genótipos pode melhorar os índices reprodutivos através da redução do intervalo entre partos. Também foi observado que os animais que possuíam o alelo *LEPSau3AI+* tinham 4 vezes mais chance de apresentar maior peso ao 1º parto (PPP) em comparação a média da população. No entanto, os parâmetros reprodutivos empregados (IEP e PPP) são

mensurações indiretas do funcionamento do sistema reprodutivo, pois estão diretamente relacionados a condição corporal e ao nível alimentar. A leptina está tanto relacionada com o metabolismo energético (HOUSEKNECHT & PORTOCARRERO, 1998) como com a regulação do eixo hipotálamo-hipófise (CHEHAB *et al.*, 1997; SPICER & FRANCISCO, 1997), sendo que desta forma é difícil determinar o quanto a presença dos alelos *IDVGA51-181* e *LEPSau3AI+* age diretamente no sistema reprodutivo. No entanto, estes resultados demonstram a associação de marcadores genéticos com um melhor desempenho reprodutivo, podendo ser usados na seleção assistida por marcadores para seleção de animais com melhor desempenho.

Há também exemplos da importância dos marcadores moleculares na produção de suínos. O melhoramento em suínos para o tamanho da leitegada, um dos principais índices reprodutivos utilizado para avaliação do sucesso de produção, era realizado através do cruzamento de matrizes com machos de linhagens superiores, o que demonstrou ser extremamente variável (BOLET *et al.*, 1989). Com o desenvolvimento de mapas genômicos surgiu a oportunidade para identificação individual dos genes que controlam o processo reprodutivo (SHORT *et al.*, 1997). ROTHSCCHILD *et al.* (1991) identificaram um polimorfismo para o *locus* do receptor de estrogênio em suínos (ESR), sendo que estudos demonstraram um aumento de 1,25 leitões por leitegada na presença do alelo favorável do ESR (SHORT *et al.*, 1995; ROTHSCCHILD, 1996; ROTHSCCHILD *et al.*, 1996;). O estrogênio é um hormônio esteróide secretado pelas células da granulosa (BAO & GARVERICK, 1998), sendo que na presença do alelo favorável para o ESR há um efeito positivo no número de leitões nascidos e nascidos vivos. Apesar de que a herdabilidade para o aumento do número de leitões por leitegada seja de 0,10 (HANFORD *et al.*, 2003), a seleção animal assistida por marcadores moleculares utilizando o ESR possibilitou um aumento do número de leitões nascidos em fêmeas Large White, possuindo um efeito econômico considerável sobre a produção de suínos (Tabela 2).

Tabela 2 – Média dos quadrados mínimos e efeitos da substituição de alelos para o número de nascidos totais (TNB) e número de nascidos vivos (NBA) na primeira e subseqüentes partições.

Genótipos ESR	Primeira partição		Outras partições	
	TNB	NBA	TNB	NBA
AA	10,14 ^a	9,42 ^a	11,36 ^a	10,03 ^a
AB	10,59 ^b	9,87 ^b	11,86 ^b	10,51 ^b
BB	10,97 ^c	10,22 ^c	12,04 ^b	10,71 ^b
Efeito				
Aditivo	0,42**	0,39**	0,31**	0,31**
Dominância	0,04	0,05	0,16*	0,14*

^{a, b, c} Médias dentro de uma mesma coluna sem uma letra com um diferem entre si ($p < 0,01$)

* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

A taxa de ovulação está diretamente relacionada ao tamanho da leitegada, porém há dificuldade de realizar uma seleção direta para esta característica em rebanhos suínos comerciais. CAMPBELL *et al.* (2003) realizaram um estudo para avaliar possíveis marcadores genéticos envolvidos no processo de ovulação situados na porção terminal do cromossomo 8 de suínos, onde estão situados marcadores associados à 14 genes nos primeiros 27 cM (centi-Morgans) deste cromossomo. Os resultados encontrados neste estudo

demonstraram a presença de QTLs do cromossomo 8 que afetam a taxa de ovulação possibilitando seu uso em programas de seleção assistida por marcadores.

Em ovinos, um campo a ser explorado com marcador para o melhoramento animal e a linhagem Booroola do Merino Australiano, assim como o nome, possuem o gene Booroola ($Fec B = Fecundity Booroola$), sendo este o principal gene que afeta a taxa de ovulação e, conseqüentemente, o número de cordeiros nascidos.

Segundo PIPER *et al.* (1984) as fêmeas que não possuem nenhuma cópia deste gene produzem normalmente apenas um cordeiro/parto, sendo que as heterozigotas, dois e as homozigotas, três. A alta taxa de ovulação é atribuída à presença da co-dominância do alelo Fec B (LANNELUC *et al.*, 1994), correspondente à mutação não-conservativa no domínio da sinalização intracelular do gene para o receptor do BMPR-IB (*bone morphogenetic protein tipo IB*), um fator de crescimento envolvido na foliculogênese (MULSANT *et al.*, 2002).

Outros trabalhos (MESSER *et al.*, 1997; PELLETIER *et al.*, 2000) que também visam detectar marcadores genéticos para aumentar a eficiência reprodutiva em ovelhas utilizaram o gene do receptor da melatonina 1 A (*MTNR1A*) como marcador molecular, pois este está relacionado a sazonalidade estral das ovelhas. A flutuação da duração do anestro estacional em ovelhas está associada com os níveis de melatonina circulante, que funciona como chave para o desencadeamento da ciclicidade (MALPAUX *et al.*, 1996). Descoberto por PELLETIER *et al.* (2000) o

polimorfismo de RFLP no gene *MTNR1A* possibilitou avaliar sua influência no desempenho reprodutivo. Foi registrado o efeito de 6 genótipos encontrados de diferentes RFLPs (*MM*, *Mm*, *mm* e *RR*, *Rr* e *rr*) e verificou-se que as fêmeas adultas que apresentavam pelo menos uma cópia do alelo M possuem uma tendência a serem mais férteis do que àquelas que não apresentam este alelo em seu genótipo ($p = 0,09$).

CONCLUSÃO

A partir dos resultados dos experimentos apresentados nesta revisão foi possível evidenciar a associação de determinados marcadores genéticos com melhor desempenho reprodutivo, registrando a importância da seleção assistida por marcadores moleculares no melhoramento em animais de produção. Ainda que, mais estudos avaliando a variabilidade genética para QTL e principalmente a correlação genética destes marcadores com características produtivas em condições comerciais sejam necessários.

cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, p. 2158–2167, 2002.

GE, W.; DAVIS, M.E.; HINES, H.C.; et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the growth hormone and growth hormone receptor genes with blood serum insulin-like growth factor I concentration and growth traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, p. 641–648, 2003.

HANFORD, K.J.; VAN VLECK, L.D.; SNOWDER, G.D. Estimates of genetic parameters and genetic change for reproduction, weight, and wool characteristics of Targhee sheep. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, p. 630–640, 2003.

HO, K.K.Y.; HOFFMAN, D.M.; THEILL, L.E.; et al. Aging and growth hormone transcriptional control of GH. **Hormone Research**, Basel, v. 40, p. 80–86, 1993.

HOLNESS, M.J.; MUNNS, M.J.; SUGDEN, M.C. Current concepts concerning the role of leptin in reproductive function. **Molecular Cellular Endocrinology**, Orlando, v. 157, p. 11–20, 1999.

HOSSNER, K.L. Cellular, molecular and physiological aspects of leptin: Potential application in animal production. **Canadian Journal of Animal Science**, Quebec, v. 78, n.4, p. 463–472, 1998.

HOUSEKNECHT, K.L.; PORTOCARRERO, C.P. Leptin and its receptors: regulators of whole-body energy homeostasis. **Domestic Animal Endocrinology**, Orlando, v. 15, p. 457–475, 1998.

JORRITSMA, R.; LANGENDIJK, P.; KRUIP, TAM; et al. Associations between energy metabolism, LH pulsatility and first ovulation in early lactating cows. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 40, p. 68–72, 2005.

KEISLER, D.H.; DANIEL, J.A.; MORRISON, C.D. The role of leptin in nutritional status and reproductive function. **Journal of Reproduction and Fertility**, Harrogate, v. 54, p. 425–435, 1999.

LANNELUC, I.; DRINKWATER, R.D.; ELSEN J.M.; et al. Genetic-markers for the booroola fecundity (fec) gene in sheep. **Mammalian Genome**, Harwell, v. 5, n.1, p. 26–33, 1994.

LINCOLN, D.T.; SINOWATZ, F.; EL-HIFNAWI, E.; et al. Evidence of a direct role for growth hormone (GH) in mammary gland proliferation and lactation. **Anatomia, Histologia, Embriologia**, Berlin, v. 24, p. 107–115, 1995.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S.E.M.; ALMEIDA, E.A.; MORAES, J.C.F.; et al. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 120, p. 106–113, 2003.

ASHWORTH, C. J.; HOGGARD, N.; THOMAS, L.; et al. Placental leptin. **Reviews of Reproduction**, Harrogate, v. 5, p.18–24, 2000.

BAO, B.; GARVERICK, H.A. Expression of esteroidogenic enzyme and gonadotropin receptor genes in bovine follicles during ovarian follicular waves: a review. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 76, p. 1903–1921, 1998.

BASTOS, G.M.; GONÇALVES, P.B.D.; MACHADO, M.S.N., et al. Indução hormonal da ovulação e desmame precoce na fertilidade pós-parto de vacas de corte homozigotas e heterozigotas para o microsatélite BMS3004. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 32, n. 5, p. 1093–1103, 2003.

BISHOP, M.D.; KAPPES, S.M.; KEELE, J.W.; et al. A genetic linkage map for cattle. **Genetics**, Pittsburgh, v. 136, p. 619, 1994.

BOLET G.; OLLIVIER L.; DANDO, P. The identification of single genes with large effects. Selection sur la prolificat chez le porc. I. Resultats d'une experience de selection sur onze generations. **Genetics Selection Evolution**, Cedex, v. 21, p. 93–106, 1989.

BREDBACKA, P. Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. **Theriogenology**, Orlando, v. 55, p. 23–34, 2001.

CAMPBELL, E.M.G.; NONNEMAN, D.; ROHRER, G.A. Fine mapping a quantitative trait locus affecting ovulation rate in swine on chromosome 8. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 81, p. 1706–1714, 2003.

CHEHAB, F.F.; MOUNZIH, K.; LU, R.; et al. Early onset of reproductive function in normal female mice treated with leptin. **Science**, Washington, v. 275, p. 88–90, 1997.

CUNNINGHAM, M.J.; CLIFTON, D.K.; STEINER, R.A. Leptin's actions on the reproductive axis: perspectives and mechanisms. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 60, p. 216–222, 1999.

GARCIA, M.R.; AMSTALDEN, M.; WILLIAMS, S.W.; et al. Serum leptin and its adipose gene expression during pubertal development, the estrous cycle, and different seasons in

- MALPAUX, B.; VIGUIE, C.; SKINNER, D.C.; et al. Seasonal breeding in sheep: Mechanism of action of melatonin. **Animal Reproduction Science**, Orlando, v. 42, p. 109–117, 1996.
- MERTON, J.S.; DE ROSS, A.P.W.; MULLAART, E.; et al. Factors affecting oocyte quality and quantity in commercial applications of embryo technologies in the cattle breeding industry. **Theriogenology**, Orlando, v. 59, p. 651-674, 2003.
- MESSER, L.A.; WANG, L.; TUGGLE, C.K.; et al. Mapping of the melatonin receptor 1a (MTNR1A) gene in pigs, sheep, and cattle. **Mammalian Genome**, Harwell, v. 8, p. 368–370, 1997.
- MIHM, M.; CROWE, M.A.; KNIGHT, P.G.; et al. Follicle Wave Growth in Cattle. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 37, p. 191–200, 2002.
- MULSANT P.; LECERF F.; FABRE S.; et al. Prolificacy genes in sheep: the French genetic programmes. **Reproduction**, Harrogate, v. 61, p. 353-359, 2002. Suppl.
- OLIVEIRA, J.F.C. **Caracterização de perfis fisiológicos e marcadores moleculares em fêmeas Brangus-lbagé com distintos graus de fertilidade**. Santa Maria, 2000. 63f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) - Universidade Federal de Santa Maria.
- OLIVEIRA, J.F.C.; HENKES, L.E. Marcadores moleculares em reprodução animal. In: GONÇALVES, P.B.D.; FIGUEIREDO, J.R.; FREITAS, V.J.F. (Eds.) **Biotécnicas aplicadas à reprodução animal**. São Paulo: Livraria Varela, 2001. cap.12. p. 261-281.
- PELLETIER, J.; BODIN, L.; HANOCQ, E.; et al. Association between expression of reproductive seasonality and alleles of the gene for Mel1a receptor in the ewe. **Biology of Reproduction**, Madison, v. 62, p. 1096–1101, 2000.
- PIPER, L.R.; BINDON, B.M.; DAVIS, G.W. The single gene inheritance of the prolificity of the Booroola Merinno. In: LAND, R.B.; ROBINSON, D.W. (Eds.) **The genetics of reproduction in sheep**. London: Butterworths, 1984. p.115-125.
- REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L. L. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Editora da EMBRAPA, 2001. cap.1. p-11-25.
- ROCHE, P.J.; BUTKUS, A.; WINTOUR, E.M.; et al. Structure and expression of Leydig insulin-like peptide mRNA in the sheep. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Claro, v. 121,n.2, p. 171-177, 1996.
- ROTHSCHILD, M.F. Genetics and reproduction in the pig. **Animal Reproduction Science**, Orlando, v. 42, p. 143, 1996.
- ROTHSCHILD, M.F.; JACOBSON, C.D.; VASKE, D.; et al. The estrogen receptor locus is associated with a major gene influencing litter size in pigs. **Proceedings of National Academic Sciences**, Washington, v. 93, p. 201-205, 1996.
- ROTHSCHILD, M.F.; LARSON, R.G.; JACOBSON, C.D.; et al. Pvu II polymorphisms at the porcine estrogen receptor locus (ESR). **Animal Genetics**, Logan, v. 22, p. 448, 1991.
- SCHMITZ, M. Differential effect of insulin-like growth factor I on *in vitro* gonadotropin subunits expression in Atlantic salmon. **Fish Physiology and Biochemistry**, Dordrecht ,v. 28, p. 105–106, 2003.
- SHORT, T.H.; ECKARDT, G.R.; SASAKI, S.; et al. Marker assisted selection for litter size in pigs. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 73 ,p. 109 , 1995. suppl. 1
- SHORT, T.H.; ROTHSCCHILD, M.F.; SOUTHWOOD, O.I.; et al. Effect of the estrogen receptor locus on reproduction and production traits in four commercial pig lines. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 75, p. 3138–3142, 1997.
- SPICER, L. J. Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction. **Domestic Animal Endocrinology**, Orlando, v. 21, p. 251–270, 2001.
- SPICER, L.J.; FRANCISCO, C.C. The adipose obese gene product, leptin: evidence of a direct inhibitory role in ovarian function. **Endocrinology**, Chevy Chase, v. 138, p. 3374–3379, 1997.
- THOMAS, M.G.; ENNS, R.M.; HALLFORD, D.M.; et al. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. **Journal of Animal Science**, Savoy, v. 80, p. 757–767, 2002.
- WILLIAMS, G.L.; AMSTALDEN, M.; GARCIA, M.R.; et al. Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle. **Domestic Animal Endocrinology**, Orlando, v. 23, p. 339–349, 2002.