

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS DE
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE DOADORAS DA
RAÇA GIR LEITEIRO**

**Mariana Alencar Pereira
Zootecnista**

2019

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA-UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS DE
PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE DOADORAS DA
RAÇA GIR LEITEIRO**

Mariana Alencar Pereira

Orientadora: Prof. Dra. Lucia Galvão de Albuquerque

Coorientadores: Dra. Lenira El Faro Zadra

Dr. Marcos Vinícius G. Barbosa da Silva

Dr. Henrique Torres Ventura

Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de
Jaboticabal, como parte das exigências para
a obtenção do título de Doutor em Zootecnia.

2019

P436a

Pereira, Mariana Alencar

Análise genética de características de produção in vitro de embriões de doadoras da raça Gir Leiteiro / Mariana Alencar Pereira. -- Jaboticabal, 2019
36 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientadora: Lucia Galvão de Albuquerque

Coorientadora: Lenira El Faro Zadra

1.Fertilização in vitro. 2. Herdabilidade. 3. Inferência bayesiana. 4. Modelos lineares generalizados mistos. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE DOADORAS DA RAÇA GIR LEITEIRO

AUTORA: MARIANA ALENCAR PEREIRA

ORIENTADORA: LUCIA GALVÃO DE ALBUQUERQUE

COORIENTADOR: HENRIQUE TORRES VENTURA

COORIENTADOR: LENIRA EL FARO ZADRA

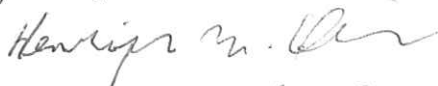
COORIENTADOR: MARCOS VINÍCIUS GUALBERTO BARBOSA DA SILVA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em ZOOTECNIA, pela Comissão Examinadora:

Pesquisadora Dra. LENIRA EL FARO ZADRA
Instituto de Zootecnia / Sertãozinho/SP



Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / FCAV / Unesp - Jaboticabal



Prof. Dr. HUMBERTO TONHATI
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Profa. Dra. RENATA VERONEZE
Departamento de Zootecnia-UFV / Viçosa/MG

P/  (Videoconferência)

Pós-Doutoranda PRISCILA ARRIGUCCI BERNARDES
Centro Avançado de Pesquisa de Bovino de Corte-IZ / Sertãozinho/SP



Jaboticabal, 08 de novembro de 2019

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Mariana Alencar Pereira, nascida na cidade de Goiânia/GO-Brasil, no dia 17 de maio de 1986. Filha de Milza Adelia Alencar Lima Pereira e Oluzmar Rodrigues Pereira. Em dezembro de 2008, concluiu a graduação em Zootecnia pela Pontifícia da Universidade Católica de Goiás (PUC-GO), Brasil. Desde então trabalhou na Associação Brasileira dos Criadores de Zebu como auxiliar técnico, técnico de campo, pesquisadora de melhoramento genético e atualmente como Gerente de Melhoramento Genético do PMGZ Leite. Em 2015, obteve o título de Mestre no Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), realizando estudos na área de “melhoramento genético de zebuínos leiteiros”, sob orientação da Profa. Dra. Carina Ubirajara de Faria. Em março de 2016, iniciou o doutorado em Zootecnia, área de concentração em Genética e Melhoramento dos Animais Domésticos na Faculdade de Ciencias Agrárias e Veterinárias, UNESP, Campus de Jaboticabal, sob orientação da Profa. Lucia Galvão Albuquerque.

“Meus filhos. Por um minuto apenas, pensemos no infinito amor que Deus tem por seus filhos. Por um minuto apenas, pensemos na paciência inesgotável de Deus para conosco. Por um minuto apenas, recordemos os irmãos que padecem sofrimentos maiores do que os nossos, resignados e confiantes na proteção infalível do Pai. Por um minuto apenas, pensemos que Deus pode modificar a nossa vida agora mesmo, se a nossa fé permanecer inabalável. E, de minuto em minuto, façamos do nosso dia um dia de luz, e a luz de Deus jamais nos deixará nas trevas.”

Bezerra de Menezes

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter concedido todas as bênçãos e os recursos necessários para eu chegar até aqui.

Aos meus pais Oluzmar Rodrigues e Milza Adelia Alencar por terem me apoiado, pelo amor e compreensão.

Ao meu companheiro e esposo Higo Oliveira Sousa Soares pelo amor e compreensão, estando ao meu lado em todos os momentos.

A Associação Brasileira dos Criadores de Zebu pela liberação do tempo de serviço, o qual resultou meu crescimento profissional.

Aos laboratórios de produção de embriões pela confiança em ceder os dados utilizados nesse estudo.

A minha orientadora Professora Dra. Lucia Galvão de Albuquerque pela oportunidade e compreensão com a minha rotina entre estudos e trabalho.

A coorientadora Dra. Lenira El Faro Zadra que desde o meu mestrado nunca me abandonou, sempre me ajudou com seus conhecimentos e compreensão, do fundo do coração, obrigada por não ter desistido de mim.

Ao coorientador Dr. Marcos Vinicius Gualberto Barbosa Silva pelo auxílio.

Aos amigos de pós-graduação e da vida André Mauric, Bianca Olivieri e Flavio Lucio Mota.

Aos amigos de jornada Fabyano Fonseca e Silva, Edson Vinicius Costa, Renata Veroneze, Ivan Carvalho e aos novos e antigos amigos que de alguma maneira contribuíram e ainda contribuem e muito para minha vida.

À Coordenadoria do Programa de Pós Graduação em Zootecnia e a todos os professores do PPG em Zootecnia e do PPG em Genética e Melhoramento Animal.

Aos membros da banca de qualificação e defesa, Prof. Dr. Humberto Tonhati, Prof. Dr. Henrique Nunes de Oliveira, Prof. Dr. Fabyano Fonseca e Silva, Dr. Gerardo Alves Fernandes Junior e Profa. Dra. Renata Veroneze, que desde o início auxiliaram com valiosas orientações e sugestões.

E a todos aqueles que de alguma maneira me auxiliaram e torceram por mim.

SUMÁRIO

RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	iii
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Raça Gir.....	2
2.2 Número de oócitos.....	3
2.3 Produção <i>in vitro</i> de embriões.....	5
2.4 Análise genética das características número de embriões e oócitos.....	7
2.5 Modelagem das variáveis discretas resultantes da PIVE.....	9
2.6 Estudo de associação genômica ampla (GWAS)	9
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	11
3.1 Dados fenotípicos	11
3.2 Dados genotípicos	12
3.3 Estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos	13
3.4 Estudo de associação genômica ampla (GWAS).....	15
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
4.1 Componentes de variância e parâmetros genéticos	17
4.2 Estudo de associação genômica ampla (GWAS).....	21
5. CONCLUSÃO.....	27
6. REFERÊNCIAS.....	27

ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS DE PRODUÇÃO *IN VITRO* DE EMBRIÕES DE DOADORAS GIR LEITEIRO

RESUMO- O presente estudo teve como objetivo: 1) estimar parâmetros genéticos para características de produção *in vitro* de embriões de doadoras da raça Gir Leiteiro considerando as distribuições Gaussiana e Poisson; 2) investigar a existência de regiões cromossômicas que possam estar associadas com essas características. Os dados utilizados totalizaram 12.491 informações de aspirações foliculares provenientes de 5.496 doadoras da raça Gir Leiteiro. As características número de oócitos viáveis (NOV) e número de embriões viáveis (NEV) foram analisadas por meio de modelo animal unicaracterísticas considerando os efeitos sistemáticos de grupo de contemporâneos (data da aspiração folicular e rebanho), idade da doadora (covariável linear e quadrática) e intervalo entre as aspirações (OPU) (covariável linear). Os efeitos de animal e de ambiente permanente, além do residual, foram assumidos como aleatórios. Os componentes de variância foram estimados via modelos lineares generalizados mistos sob o enfoque bayesiano. A herdabilidade estimada para NOV foi de 0,12 para os modelos Gaussiano e Poisson, respectivamente e para NEV, as estimativas de herdabilidade foram de 0,02 e 0,03, respectivamente. Os valores de repetibilidade variaram em função do modelo estudado, de 0,17 a 0,22 para NOV e de 0,08 a 0,37 para NEV, empregando-se os modelos Gaussiano e Poisson, respectivamente. O modelo Poisson ajustou-se melhor para as características estudadas, uma vez que apresentou menores valores para o critério de informação da deviance (DIC). Os valores genéticos preditos para as características obtidos pelos diferentes modelos foram altamente correlacionados, 0,79 para NOV e 0,87 para NEV. Considerando os 10% melhores animais de acordo com o valor genético, observou-se um maior re-ranqueamento para a característica NOV em relação à NEV, indicando que a escolha do modelo adequado é importante para o processo de seleção dos animais. A partir dos valores genéticos preditos via modelo Poisson foram calculados, de forma iterativa, os efeitos dos marcadores ponderados. Os resultados da análise de GWAS via GBLUP foram apresentados com base no percentual de variância explicada por janelas de tamanho de 100 SNPs adjacentes. Apenas SNPs com variância genética aditiva acima de 1% foram considerados. A variância explicada pelas janelas de maior efeito foi de 21,22% e estas estavam localizadas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 17, e 27 para a característica NOV. Para a característica NEV, a variância explicada pelas janelas de maior efeito foi de 13,39% e estas estavam localizadas nos cromossomos 2, 6, 9, 14, 18 e 25. Nessas regiões foram identificados genes relacionados direta ou indiretamente com as características estudadas.

Palavras-chave: fertilização *in vitro*, herdabilidade, inferência bayesiana, modelos lineares generalizados mistos, polimorfismos de um único nucleotídeo, Zebu

GENETIC ANALYSES OF IN VITRO PRODUCTION TRAITS FROM DAIRY GYR DONORS

ABSTRACT- The present study aimed to: 1) estimate genetic parameters for in vitro production traits of Dairy Gyr donors considering Gaussian and Poisson distribution; 2) investigate the existence of chromosomal regions that may be associated with these traits. The data totaled 12,491 records of ovum pick-up from 5,496 Dairy Gyr donors. The traits viable oocyte number (VON) and viable embryos number (VEN) were analyzed by unitrait animal model considering systematic effects of contemporary group (ovum pick-up date and herd), age of donor (covariable linear and quadratic) and pick-up interval (OPU) (covariable linear). Additive genetic, permanent environmental and residual effects were assumed as random. The variance components were estimated by generalized linear mixed models under Bayesian approach. The heritability estimated for VON was 0.12 for both models. For VEN estimated heritability was 0.02 and 0.03 for Gaussian and Poisson models, respectively. The repeatability ranged according to the model studied, 0.17 to 0.22 for VON and 0.08 to 0.37 for VEN, employing Gaussian and Poisson models, respectively. Poisson model showed the best fit to the studied traits, according the deviance information criterion (DIC). The predicted breeding values of traits using the different models were high correlated, 0.79 to VON and 0.87 to VEN. Considering the 10% best breeding values the re-ranking of animals for VON was higher when compared to VEN, suggesting that choosing an appropriated model is important for selection process of animals. The results of GWAS analysis through GBLUP were based on the percentage of variance explained by windows of 100 adjacent SNPs. Only SNPs with additive genetic variance above 1% were considered. The variance explained by the window with larger effects was 21.22%, observed on chromosomes 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 17 and 27 for NOV. For the NEV trait, the variance explained by the windows with larger effects was 13.39%, on chromosomes 2, 6, 9, 14, 18 and 25. In these regions genes directly or indirectly related to the studied traits were identified.

Key words: bayesian inference, general linear mixed models, heritability, *in vitro* fertilization, single nucleotide polymorphism, zebu

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o país que apresenta maior representação mundial na produção *in vitro* de embriões (PIVE) de bovinos sendo responsável por cerca de 70% dos embriões produzidos (IETS, 2015). Estima-se que 92,4% dos embriões produzidos são de raças zebuínas (Viana et al. (2012). Doadoras zebuínas podem ser mais eficientes do que doadoras taurinas tanto na produção de oócitos quanto na taxa de prenhez pós transferência de embrião. Essa diferença na eficiência pode ser observado em estudo de Watanabe et al. (2017), os quais reportaram valores de 23,8 para o número de oócitos da raça zebuína Gir Leiteiro e de 19,3 para a raça taurina Holandesa. Esse comportamento também ocorreu para a taxa de prenhez após a transferência de embrião, cujo valor foi de 29,9% e de 25,9%, respectivamente, e os autores concluíram que esse resultado foi devido à superioridade da raça Gir na produção de oócitos via aspiração folicular (Watanabe et al., 2017).

A produção de embriões depende do estado reprodutivo e fisiológico das doadoras, sendo este determinado por fatores como idade, raça, nutrição, gestação e genética (Stroebech et al., 2015). A respeito do componente genético, faz-se necessário considerar que as características de PIVE, geralmente, não apresentam distribuição normal, com isso a análise genética das mesmas exige prévia transformação de dados (Tonhati et al., 1999) ou mesmo a utilização de distribuições que mais se ajustam aos dados como a de Poisson (Asada & Terawaki, 2002; Kong et al., 2007; Perez et al., 2017) e a Poisson inflacionada de zeros (ZIP) (Perez et al., 2017).

Jaton et al. (2016) relataram que as características reprodutivas de vacas e novilhas estão correlacionadas favoravelmente com a resposta superovulatória. Segundo Parker Gaddis et al. (2017), é possível que alguns genes que controlam essas características, sejam também relacionados com as funções reprodutivas de fêmeas submetidas a inseminação natural ou artificial. Quanto à variabilidade genética, estudos com doadoras de raças leiteiras apresentaram estimativas de

herdabilidade de baixa a moderada para número de oócitos e embriões (Tonhati et al., 1999; Merton et al., 2009; Merton et al., 2016; Perez et al., 2017).

Concomitantemente à aplicação das biotecnologias reprodutivas, o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento do genoma possibilitou a confecção de painéis de marcadores SNP (Single Nucleotide Polymorphisms). Tais painéis vêm sendo amplamente utilizados em estudos de associação e seleção genômica nas diversas espécies animais e vegetais. Segundo Thomasen et al. (2016), o uso combinado de biotecnologias reprodutivas e métodos de seleção genômica podem aumentar o ganho genético em programas de melhoramento.

A PIVE em combinação com programas de seleção e ferramentas genômicas, tem possibilitado que fêmeas elites produzam mais crias em um curto intervalo de tempo, reduzindo o intervalo de geração e consequentemente incrementando o ganho genético anual a partir das vacas (Loi et al., 2016; Thomasen et al., 2016). Adicionalmente, a seleção de doadoras geneticamente superiores contribui para a eficiência econômica e a aplicabilidade dessa biotecnologia.

Diante do exposto, objetivou-se comparar modelos assumindo diferentes distribuições (Poisson e normal) para avaliação genética das características número de oócitos e de embriões em doadoras da raça Gir Leiteiro. Adicionalmente, realizou-se os estudos de associação genômica (GWAS) visando identificar regiões cromossômicas de maior relevância para as características.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Raça Gir

A raça Gir, de origem indiana da península de Kathiavar, foi introduzida no Brasil no ano de 1906. Em seu país de origem, essa raça é utilizada apenas para a produção de leite devido a questões culturais, porém no Brasil, inicialmente tornou-se uma raça de duplo propósito. A partir de 1976, a Associação Brasileira dos

Criadores de Zebu (ABCZ) iniciou o controle leiteiro oficial e posteriormente, a partir dos esforços de criadores e empresas como ABCZ, Embrapa e Abcgil, criou-se o teste de progênie para leite.

Com o passar dos anos, houve um crescimento populacional de animais dessa raça, a qual no ano de 2018 apresentou mais de 600.000 animais com registro provisório (ABCZ, 2018). A raça Gir com esse crescimento exponencial impulsionado por suas potencialidades como a rusticidade, adaptabilidade e produtividade tornou-se um importante recurso genético para a produção de leite em países tropicais.

Segundo Fernandes et al. (2019) após o uso de touros oriundos do teste de progênie para leite, houve progresso genético para diversas características na raça Gir, o que não era anteriormente constatado, mas ainda algumas características não responderam satisfatoriamente o processo de seleção. De acordo com Ventura et al. (2018), fêmeas nascidas de 1976 a 2014 apresentaram incremento de 47 kg de leite/ano na produção de leite até 305 dias.

A raça zebuína Gir, segundo Watanabe et al. (2017) apresentou maior quantidade de oócitos e de embriões produzidos, quando comparada com a raça Holandesa. Valores de 23,8 para número de oócitos e de 29,9% para taxa de prenhes após a transferência de embriões foram observados na raça Gir, quanto que a raça taurina apresentou 19,3 e 25,9%, respectivamente. Essa superioridade na produção de oócitos e de embriões dos animais zebuínos viabiliza os programas PIVE. Segundo Viana et al. (2012) desde o início da catalogação dos dados, mais de 90% dos embriões produzidos no Brasil eram de origem zebuína.

2.2. Número de oócitos

Durante a embriogênese é estabelecida uma reserva de oócitos em bovinos e estes vêm a se desenvolver em folículos primários ou primordiais no córtex, que é a parte externa do ovário. Existe uma ampla variação em termos de quantidade e qualidade de folículos entre os indivíduos, o que, segundo Kanitz et al. (2002),

poderia ser uma das explicações para a variabilidade da resposta superovulatória de fêmeas bovinas. Os folículos tornam-se ativos e passam pelo desenvolvimento progressivo em intervalos regulares, começando no final estágio fetal da fêmea e continuam durante a idade adulta da mesma (Britt, 2008). Durante a formação do folículo primordial, o oócito ainda na primeira prófase meiótica, é considerado infértil e esta condição é alterada apenas com a ativação folicular durante a puberdade (Aerts & Bols, 2010).

Segundo Orisaka et al. (2009), o crescimento folicular é dividido em três fases, em que na primeira os folículos primordiais tornam-se primários e secundários, independente da presença da gonodotrofina. Já na segunda fase, ou denominada também de fase antral, esses folículos começam a responder à gonodotrofina devido ao desenvolvimento da cavidade antral e podem ser vistos na superfície do ovário. Na última fase, os folículos são dependentes da gonodotrofina e começam a responder ao hormônio folículo estimulante (FSH), o qual é responsável pelo recrutamento dos folículos e é nesse momento, que muitos folículos se tornam atresícos e nunca chegarão a ovular.

O desenvolvimento folicular durante o ciclo estral ocorre em um padrão de ondas e os folículos são classificados em diferentes graus em função de sua morfologia, mas somente um é selecionado como dominante e a ovulação deste coincide com a quebra do corpo lúteo (CL).

O conceito de onda folicular só foi possível por meio do desenvolvimento do ultrassom por volta do ano de 1980 (Adams et al., 2008). Os folículos crescem ao mesmo tempo, como uma onda e usualmente uma fêmea apresenta duas a três ondas dentro de um ciclo estral. Geralmente, o primeiro cio de uma novilha ocorre por volta dos oito meses de idade, mas as ondas foliculares ocorrem mesmo antes da puberdade, ou durante a gestação (Kanitz, 2003).

As ondas foliculares consistem na proliferação e crescimento dos folículos, sendo dependentes de estímulos hormonais. Os estágios iniciais do crescimento folicular ocorrem independentemente dos hormônios gonadotróficos (Juengel et al (2018). Inicialmente, os folículos antrais tornam-se responsivos e dependentes de FSH e LH (hormônio luteinizante), os quais são responsáveis pelo recrutamento e seleção do folículo dominante. Segundo Mapletoft et al. (2009), a cada onda o

folículo dominante adquire mais receptores de LH, ao contrário dos subordinados, os quais permanecem sensíveis ao FSH até sofrerem atresia. O folículo dominante encerra sua função metabólica e regride, quando ocorre a supressão de LH em função da secreção de progesterona pelo corpo lúteo e caso não ocorra fecundação, uma nova onda folicular se inicia.

O número de oócitos ovulados ao longo da vida de uma matriz é mínimo em comparação com o número de oócitos que ela possui ao nascer (Aerts & Bols, 2010; Lonergan & Fair, 2016), devido à duração da vida reprodutiva, estabelecida entre puberdade e senescência, que é em torno de 13 anos (Iwata, 2016). Fatores genéticos, metabólicos, nutricionais e ambientais influenciam a quantidade e qualidade de oócitos em bovinos. Houve diferenças favoráveis às doadoras *Bos indicus* devido ao tamanho e capacidade ovulatória do folículo dominante (Gimenes et al., 2008), dado que uma melhor população de folículo antral propicia um maior número de oócitos (Batista et al., 2014). Já os fatores nutricionais e metabólicos afetaram os padrões das ondas foliculares, as secreções dos hormônios reprodutivos e a qualidade de oócitos de fêmeas pertencentes às raças Gir e Holandesa (Sales et al., 2015; Baruselli et al., 2016).

2.3. Produção *in vitro* de embriões

A demanda dos produtores de bovinos leiteiros para potencializar a multiplicação e aumentar o ganho genético de fêmeas superiores, impulsionou a aplicação comercial da PIVE. A superovulação e a transferência de embriões foram aplicadas comercialmente a partir dos anos 70 (Hasler, 2014).

O Brasil tem produzindo em média 15 oócitos e seis embriões por sessão (Bó & Mapletoft, 2013). Esta biotecnologia consiste em: coleta e maturação *in vitro* dos oócitos, capacitação e seleção dos espermatozoides, fertilização e cultura *in vitro* dos embriões. Posteriormente, esses embriões podem ser congelados ou transferidos a fresco.

A aspiração folicular é feita por ultrassonografia transvaginal, que é um

procedimento não invasivo e, segundo Van Wagendonk-de Leeuw et al. (2006), permite a coleta de folículos menores com ou sem estimulação hormonal. Uma das limitações desta técnica é a baixa produção de oócitos por ovário e a necessidade de um instrumento sofisticado para realizá-la (Machado et al., 2006).

Segundo Ball & Peters (2004), após a aspiração, os oócitos passam por um período de 24 horas de capacitação para depois serem expostos aos espermatozoides para fecundação *in vitro*. No processo de capacitação, ocorre uma série de transformações em nível de núcleo e citoplasma dos oócitos, para que estes possam ser fecundados e se desenvolver até o estágio de blastócito. Desse modo, para a maturação nuclear do oócito é necessário retomar a meiose, que compreende da prófase até a metáfase. Os principais fatores que afetam competência dos oócitos maturados são: estresse oxidativo, toxinas e as condições de cultivo *in vitro*, que podem promover profundos efeitos (Carrel et al., 2005).

Posterior à maturação dos oócitos, é necessária a preparação do sêmen para a fertilização *in vitro*. A chamada capacitação dos espermatozoides ocorre com a remoção de proteínas ligadas ao epidídimo e o plasma seminal, tornando-se essencial para uma série de eventos ligados a fertilização *in vitro* (Rodriguez-Martinez & Barth, 2007). Existem diversas técnicas de seleção dos espermatozoides que visam melhorar a qualidade espermática com aumento da taxa de motilidade progressiva e qualidade morfológica (Samardzija et al., 2015), aumentando assim a eficiência da produção *in vitro* de embriões.

A fertilização *in vitro* é uma combinação, dentro de condições laboratoriais controladas, do oócito maduro com o espermatozoide para formar o zigoto. Este processo deve permitir o metabolismo dos oócitos e células do *cumulus*, além de manter a função espermática eficiente para que ocorra a fecundação (Gonçalves et al., 2007). Uma vez fertilizados, os embriões são cultivados *in vitro* por sete dias antes de sofrerem o processo de congelamento e ou transferência imediata (Scheffers & Weigel, 2012).

Antes do congelamento ou transferência dos embriões frescos deve ser feito uma avaliação visual da qualidade do embrião, fato este que implica na tomada de decisão pelo congelamento ou transferência imediata (Farin et al., 2007). Uma das principais vantagens da PIVE é que pode ser praticada em qualquer idade ou

estágio reprodutivo (Moore & Thatcher, 2006), devido à ocorrência das ondas foliculares. Adicionalmente é possível aspirar oócitos até duas vezes por semana, aumentando a produtividade por doadora (Scheifers & Weigel, 2012).

A produção de embriões apresenta alguns problemas como a variabilidade na quantidade produzida (Lonergan & Boland, 2011; Tríbulo et al., 2011), o fato de aproximadamente 20% das doadoras não produzirem embriões seguindo um protocolo de superovulação (Hasler, 2003) e por fim os custos, que em partes são altos para a maioria dos produtores, quer seja pela aspiração, uso de protocolo hormonais ou até mesmo o sêmen que pode ser de alto valor agregado.

2.4. Análise genética das características número de embriões e oócitos

O número de oócitos e o número de embriões são características relacionadas com a fertilidade e que apresentam variabilidade genética. A herdabilidade para número de embriões varia de 0,03 a 0,16 e para número de oócitos de 0,19 a 0,27 (Tabela 1). Os valores de repetibilidade para essas características variam de 0,13 a 0,40. Segundo Mapletoft (2006), é provável que filhas de vacas que apresentam bom desempenho para essas características, também apresentem semelhante desempenho. Mesmo com amplos fatores que afetam essas características pode-se considerar a influência de componentes genéticos e de repetibilidade. A seleção para essas características é importante para melhorar a eficiência de um programa de produção de embriões (Merton et al., 2009).

Tabela 1. Número de informações, média, herdabilidade (h^2), repetibilidade (r) e modelo empregado em diferentes estudos para as características de número total de oócitos (NO) e de embriões viáveis (EV) em raças leiteiras a partir de diversos estudos.

Referência	In vivo/in vitro	N	Raça	Característica	Média	h^2	r	Modelo
Tonhati et al., 1999	In vivo	1.562	Holandesa	EV	5,9	0,03	0,13	Gaussiano sem transformação dos dados
Asada & Terawaki, 2002	In vivo	306	Holandesa	EV	4,42	0,09	0,34	Gaussiano sem transformação dos dados
Eriksson et al., 2007	In vivo	761	Suíça	EV	3,55	0,12	0,40	Gaussiano sem transformação dos dados
König et al., 2007	In vivo	4.196	Holandesa	EV	4,84	0,10	-	Poisson
Merton et al., 2009	In vitro	18.702	Holandesa	NO	7,8	0,25	-	Gaussiano com dados transformados $\log_{10}$
				EV	1,1	0,10	-	
Jaton et al., 2016	In vivo	137.445	Holandesa	EV	7,6	0,14	0,23	Gaussiano com dados transformados $\log_{10}$ e anscombe
Perez et al., 2016	In vitro	5.173	Guzerá	NO	11,0	0,19	0,32	Gaussiano com dados transformados $\log_{10}$
				EV	4,0	0,14	0,20	
Perez et al., 2017	In vitro	5.173	Guzerá	NO	11,0	0,25	0,62	Poisson
				EV	4,0	0,20	0,50	
Parker Gaddis et al., 2017	In vitro	13.159	Holandesa	NO	7,6	0,27	0,40	Gaussiano com dados transformados $\log_{10}$
				EV	5,11	0,15	0,30	

2.5. Modelagem das variáveis discretas resultantes da PIVE

O modelo linear misto (Linear Mixed model - LMM) é muito utilizado em melhoramento animal e pressupõe a normalidade dos resíduos. Portanto, quando a variável resposta é discreta, como no caso dos dados de contagens, geralmente a mesma é transformada usando escala logarítmica ($\log_{10} [X+1]$). Tal transformação já foi amplamente empregada para modelar características resultantes da PIVE como número de oócitos e embrião (Merton et al., 2009; Jatón et al., 2016; Perez et al., 2016).

Os modelos lineares generalizados mistos são uma extensão do LMM, porém permitem a utilização de distribuições não normais via conceito de “função de ligação”. Esta função define a relação entre o valor esperado da variável resposta e o preditor linear. Entretanto, são escassos os estudos utilizando distribuições não normais para características advindas da PIVE (Koning et al., 2007; Perez et al., 2017).

Independente da estratégia adotada para modelagem das variáveis discretas pressupõe-se que também estas sejam afetadas por diversos genes (modelo infinitesimal), ou seja, existe uma variável contínua e normalmente distribuída representada por uma categórica.

2.6. Estudo de associação genômica ampla (GWAS)

No genoma o tipo mais abundante de mutações são os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), cuja frequência pode ser afetada por pressão de seleção e fatores exógenos (Moutain et al., 1992). Os SNPs são em sua maioria dialélicos, sendo que para serem considerados marcadores moleculares é necessário que o alelo de menor frequência (MAF) esteja presente em pelo menos 1% da população avaliada (Brookes, 1999). Existe estabilidade dessas variações genômicas que

sugerem que marcadores significativos para uma raça ou população não sejam para as demais, pois 85% dos SNPs são comuns dentro de uma mesma espécie e 15% específicos para cada população (Hawken et al., 2012).

Segundo Wang et al. (2005) uma das vantagens do GWAS seria inicialmente a não exigência de conhecimento profundo referente aos processos fisiológicos e bioquímicos envolvidos na expressão dos fenótipos estudados. Estudos de GWAS baseiam-se na identificação de SNPs em desequilíbrio de ligação (LD) com *loci* de características quantitativas (QTL) de efeitos maiores (Hayes & Goddard, 2010). Para quantificar a associação entre os SNPs e a característica estudada, têm sido propostos diferentes métodos (VanRaden, 2008), já que como desafio tem-se a estimação de um grande número de efeitos a partir de um número limitado de observações, tamanho amostral, a colinearidade advinda do LD entre os marcadores e a interpretação dos resultados (Resende et al., 2008).

Nos estudos de GWAS têm sido aplicadas diferentes metodologias estatísticas como inferência Bayesiana (ex. BayesA, BayesB) ou métodos clássicos (ex. GBLUP, RRBLUP) assumindo variâncias específicas para cada marcador, que assim possam explicar diferentes proporções da variância genética da característica estudada. Segundo Wang et al. (2014), abordagens GBLUP, as quais consideram uma distribuição normal para os efeitos dos SNPs, tiveram melhor desempenho devido a natureza poligênica das características estudadas. Entretanto, experiências com conjunto de dados reais indicaram que metodologias Bayesianas impactaram na redução da acurácia por ignorarem SNPs com menor efeito (Cole et al., 2009).

Ainda são escassos na literatura estudos de GWAS para características oriundas da PIVE (Parker Gaddis et al., 2017; Jatón et al., 2018).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Dados fenotípicos

Os dados fenotípicos empregados nas análises foram fornecidos por diferentes laboratórios que realizaram a OPU e a PIVE e continham informações do rebanho em que a doadora foi aspirada, data da aspiração folicular, número de oócitos viáveis (NOV) e número de embriões viáveis (NEV). O arquivo de genealogia fornecido pela ABCZ continha as informações de registro dos animais e data de nascimento das doadoras devidamente cadastradas.

Dados resultantes da PIVE de 5.496 doadoras da raça Gir Leiteiro foram coletados de 2004 a 2016, por seis diferentes empresas comerciais de produção de embriões, com número médio de 4,6 aspirações foliculares por animal (OPU), totalizando 12.491 informações analisadas. Inicialmente o banco de dados continha 26.535 informações de aspirações de vacas Gir Leiteiro e produções de embriões provenientes de diferentes acasalamentos com touros pertencentes às raças Holandesa ou Gir Leiteiro. Alguns acasalamentos combinaram mais de um touro, caracterizando um *pool* de touros. Estes acasalamentos foram codificados para a inclusão do efeito de touro (ou *pool* de touros) usado no acasalamento aninhado dentro de raça.

As características analisadas foram: número de oócitos viáveis (NOV), obtidos a partir da OPU e número de embriões viáveis (NEV), obtidos após a maturação e fecundação dos oócitos viáveis.

Para as análises foram mantidas informações de doadoras com o intervalo mínimo de sete dias entre as OPUs. A idade mínima das doadoras foi de um ano, e à máxima, de 16 anos. Considerou-se como grupo de contemporâneas as doadoras provenientes do mesmo rebanho, cujas aspirações ocorreram na mesma data e no mesmo laboratório responsável pelo procedimento. Foram realizadas análises de consistências dentro de grupos de contemporâneas considerando-se a média do

grupo $\pm$ 3,5 desvios-padrão para cada fenótipo estudado e, no mínimo, cinco doadoras por grupo.

O arquivo de pedigree contemplou até cinco gerações anteriores, e totalizou 12.354 animais, dentre os quais 6.858 eram ancestrais sem dados fenotípicos.

A estatística descritiva referente às características NOV e NEV de doadoras Gir Leiteiro foi descrita na Tabela 2.

Tabela 2. Mediana, média, desvio-padrão (DP), coeficiente de variação (CV), valores de mínimo e de máximo e número de observações com valores iguais 0 na base de dados para as características estudadas de doadoras Gir Leiteiro.

Característica	N	Mediana	Média	Moda	DP	CV (%)	Mínimo	Máximo	Nº de zeros
NOV	12.076	12	15,32	5,00	12,14	79,21	1	70	0
NEV	12.426	2	3,65	0	4,66	127,45	0	32	4.513

NOV= número de oócitos viáveis; NEV= número de embriões viáveis;

O número de doadoras com observações para as características estudadas de forma generalizada, informações do arquivo de genealogia e número de grupos de contemporâneas estão descritos na Tabela 3.

Tabela 3. Estrutura dos dados para as características estudadas de doadoras Gir Leiteiro

Informações	NOV	NEV	Ambas
Número de informações válidas	12.076	12.426	12.011
Número de fêmeas com observações	5.250	5.459	5.213
Número de fêmeas com pais conhecidos	5.230	5.439	11.968
Número de fêmeas com mães conhecidas	5.209	5.416	11.938
Número de grupo de contemporâneas	1.122	1.057	1.084

NOV= número de oócitos viáveis; NEV= número de embriões viáveis;

3.2.Dados genotípicos

O arquivo de genótipo de forma ampla, contemplou um total de 563 touros e 19 matrizes nascidos entre 1964 a 2013, os quais foram genotipados com o BovineHD BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), totalizando 777.962

marcadores. Outras 1.955 matrizes foram genotipadas com o BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA), que continha 54.609 SNP e mais 662 matrizes genotipadas com o GGP-LD Indicus BeadChip (GeneSeek® Genomic Profiler Indicus 30 K), que continha 27.533 marcadores. Foi realizado o processo de imputação via FIMPUTE 2.2 software (Sargolzaei et al., 2014), de forma que painéis de menor densidade foram imputados para o nível HD, com acurácia de imputação de 0,99, em média. Marcadores e amostras foram também editados para *call rate* (<90%)

O controle de qualidade das informações genóticas foi realizado considerando os seguintes critérios para exclusão de SNPs: $MAF \leq 0,02$; HWE $p\text{-value} \leq 10^{-5}$. Apenas SNPs de cromossomos autossômicos foram incluídos nas análises. Após o controle de qualidade, restaram informações de 3.109 animais e 510.569 SNPs. Dos animais genotipados, 369 apresentaram informações fenotípicas para ambas as características.

3.3. Estimativas de componentes de variância e parâmetros genéticos

A análise genética das características NOV e NEV foram realizadas considerando as distribuições Gaussiana e de Poisson. Na distribuição Gaussiana, assumiu-se o seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{W}\mathbf{pe} + \mathbf{e}, \quad (1)$$

em que: $\mathbf{y}$ é o vetor de observações (NOV e NEV); $\boldsymbol{\beta}$ é o vetor de efeitos sistemáticos de meio (Grupo de contemporâneas, touro utilizado na PIVE aninhado dentro de raça, considerando-se três códigos: 1 para raça Gir, 2 para a raça Holandesa e 3 para pool de touros (apenas para a característica NEV); idade na OPU - efeitos linear e quadrático; intervalo entre OPUs em dias); $\mathbf{a}$ é o vetor de efeito aleatório genético aditivo; $\mathbf{pe}$ é o vetor de efeito aleatório de ambiente permanente; $\mathbf{e}$ é o vetor do efeito residual; $\mathbf{X}$, $\mathbf{Z}$ e $\mathbf{W}$ são matrizes de incidência dos efeitos sistemáticos e aleatórios, respectivamente.

Adicionalmente, assumiu-se que: $\mathbf{y}|\boldsymbol{\beta}, \mathbf{a}, \mathbf{pe}, \sigma_a^2, \sigma_{pe}^2, \sigma_e^2 \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Za} + \mathbf{Zpe}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$, sendo $\mathbf{I}$ uma matriz identidade; $\boldsymbol{\beta}|\sigma_\beta^2 \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_\beta^2)$, com σ_β^2 igual a 1×10^9 , que corresponde a uma priori não-informativa; $\mathbf{a}|\sigma_a^2 \sim N(0, \mathbf{A}\sigma_a^2)$, onde $\mathbf{A}$ é a matriz de parentesco baseada em pedigree; $\mathbf{pe}|\sigma_{pe}^2 \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_{pe}^2)$; $\sigma_\varepsilon^2|v_\varepsilon, S_\varepsilon^2 \sim \chi^{-2}(v_\varepsilon, S_\varepsilon^2)$, $\sigma_a^2|v_a, S_a^2 \sim \chi^{-2}(v_a, S_a^2)$, $\sigma_{pe}^2|v_{pe}, S_{pe}^2 \sim \chi^{-2}(v_{pe}, S_{pe}^2)$, sendo (v_a, S_a^2) , (v_{pe}, S_{pe}^2) e $(v_\varepsilon, S_\varepsilon^2)$ hiper-parâmetros especificados analogamente e χ^{-2} a distribuição qui-quadrado escalonada invertida

Sob o enfoque da distribuição Poisson, utilizou-se o modelo generalizado misto proposto por Hadfield & Nakagawa (2010a), o qual está fundamentado em uma variável latente ($\mathbf{l}$) como segue:

$$\mathbf{l} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Za} + \mathbf{Zpe} + \mathbf{e}, \quad (2)$$

em que: $\mathbf{l}$ é o vetor da variável latente (geralmente denominada como *liability*) de acordo com o parâmetro canônico da distribuição não-normal (Poisson); e $\boldsymbol{\beta}, \mathbf{a}, \mathbf{pe}, \mathbf{e}, \mathbf{X}$ e $\mathbf{Z}$ são os mesmos como definido em (1). Sob esta abordagem, $\mathbf{l}|\boldsymbol{\beta}, \mathbf{a}, \mathbf{pe}, \sigma_a^2, \sigma_{pe}^2, \sigma_e^2 \sim N(\mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Za} + \mathbf{Zpe}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$. Segundo Hadfield (2010b), a distribuição de probabilidade de $\mathbf{y}$ dado a variável latente $\mathbf{l}$ para o modelo Poisson é descrita por: $P(\mathbf{y}|\mathbf{l}) = \prod_{i=1}^N f_P(y_i | \exp(l_i))$.

As distribuições a posteriori para os parâmetros dos modelos Gaussiano e Poisson foram obtidas por meio da simulação Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC). Tal processo foi implementado no pacote MCMCglmm (Hadfield & Nakagawa, 2010a) do software R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2016). Para o modelo Gaussiano, 100.000 amostras foram geradas, assumindo um período de *burn-in* de 10.000 e intervalo de amostragem de 10 iterações. Para o modelo Poisson, devido a sua complexidade, foram geradas 300.000 amostras, sendo 100.000 e 10 iterações assumidas para o *burn-in* e o intervalo amostral, respectivamente. A convergência das cadeias foi avaliada pelos critérios de Geweke (GEWEKE, 1992), Raftery e Lewis (RAFTERY & LEWIS, 1992) e Heidelberger e Welch (HEIDELBERGER & WELCH, 1983), os quais estão disponíveis no pacote BOA (SMITH, 2007) do software R.

A partir dos valores gerados ($i=1,2,\dots,N$ iterações) via amostragem MCMC para os componentes de variância, obteve-se as distribuições marginais a posteriori para herdabilidade e repetibilidade como segue:

$$h^2(i) = \frac{\sigma_a^2(i)}{\sigma_a^2(i) + \sigma_{pe}^2(i) + \sigma_e^2(i)} \quad \text{e} \quad r(i) = \frac{\sigma_a^2(i) + \sigma_{pe}^2(i)}{\sigma_a^2(i) + \sigma_{pe}^2(i) + \sigma_e^2(i)},$$

em que: σ_a^2 , σ_{pe}^2 e σ_e^2 são as estimativas das variâncias genético aditiva, ambiente permanente e residual, respectivamente, e i representa cada iteração MCMC.

Posteriormente, os modelos foram comparados com base no DIC (*Deviance Information Criterion*) descrito por Spiegelhalter et al. (2002):

$$\text{DIC} = D(\bar{\theta}) + 2p_D,$$

sendo: $D(\bar{\theta})$ o valor estimado do desvio obtido por substituição dos parâmetros pelas respectivas estimativas (médias a posteriori) na função de verossimilhança; e p_D o número de parâmetros efetivo do modelo. Modelos com menores DIC indicam melhor ajuste dos dados e menor grau de complexidade. A correlação de Spearman entre valores genéticos preditos para as duas características em cada modelo foi calculada para avaliar possíveis alterações na classificação dos animais de acordo com o modelo empregado.

3.4. Estudo de associação genômica ampla (GWAS)

A metodologia GBLUP foi utilizada no estudo de GWAS, considerando como variável dependente, os valores genéticos preditos pelo modelo (Gaussiano ou Poisson) mais indicado através do DIC. Para a característica NOV a análise considerou 1.072 animais e para NEV 1.027, ambas baseadas no seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{W}\mathbf{g} + \mathbf{e} \quad (3)$$

onde $\mathbf{y}$ é o vetor de valores genéticos preditos para as características estudadas; $\boldsymbol{\mu}$ é a média geral; $\mathbf{W}$ é uma matriz ($n \times p$) que consiste nos genótipos de p marcadores SNP para cada um dos n animais, $\mathbf{g}$ é um vetor com valores genéticos

dos animais; $\mathbf{e}$ é o vetor dos efeitos residuais. Assume-se que $\mathbf{g} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_a^2)$, onde $\mathbf{G}$ é a matriz de parentesco genômica e σ_a^2 é a variância genética aditiva e $\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2)$, onde $\mathbf{I}$ é uma matriz identidade e σ_e^2 é a variância dos efeitos residuais;

A matriz de parentesco genômica $\mathbf{G}$ foi calculada conforme apresentado por VanRaden (2008):

$$\mathbf{G} = \mathbf{ZDZ}'\boldsymbol{\lambda}$$

em que: $\mathbf{Z}$ é a matriz de genótipos ajustada para a frequência alélica, $\mathbf{D}$ é uma matriz de ponderadores para os SNPs (Inicialmente, $\mathbf{D} = \mathbf{I}$), e $\boldsymbol{\lambda}$ é um fator de ponderação:

$$\boldsymbol{\lambda} = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_a^2} = \frac{1}{\sum_{i=1}^M 2p_i(1-p_i)}$$

Os efeitos dos SNPs foram derivados de forma iterativa a partir dos valores genéticos dos animais. Foram consideradas duas iterações para o cálculo dos efeitos dos SNPs, conforme cenário “S2” do algoritmo proposto por Wang et al. (2012).

O percentual da variância genética explicada por janelas de 100 SNPs adjacentes foi calculada de acordo com Wang et al. (2014):

$$\frac{Var(a_i)}{\sigma_a^2} \times 100 \% = \frac{Var(\sum_{j=1}^{100} Z_j \hat{u}_j)}{\sigma_a^2} \times 100 \%$$

onde, a_i é o valor genético de cada região com 100 SNPs adjacentes, σ_a^2 é a variância genética total, Z_j é o vetor com o genótipo do SNP para todos os animais e $\hat{u}_j$ é o efeito estimado para cada SNP dentro de cada janela.

Gráficos do tipo Manhattan, contendo a variância explicada pelas janelas formadas por 100 SNPs adjacentes, foram utilizados na identificação de regiões cromossômicas de maior efeito sobre as características. O banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) foi utilizado na identificação dos genes presentes nas janelas de maior efeito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Componentes de variância e parâmetros genéticos

Nas análises de convergência, todas as variâncias estudadas passaram nos testes de convergência para Heidelberg & Welch e Raftery & Lewis. Adicionalmente, para o teste de Gewke o p-valor foi não significativo a 0,05, indicando que o número de iterações foi suficiente.

As estimativas dos componentes de variância são apresentadas na Tabela 4. Para a distribuição Gaussiana, o componente de variância é mostrado na escala observada, enquanto que para Poisson seus componentes de variância são expressos na escala de preditor linear [$\log(\lambda)$].

Tabela 4. Média, mediana, moda, desvio-padrão (DP) e intervalos de maior densidade a *posteriori* (95% IC) da variância genética aditiva (σ_a^2), de ambiente permanente (σ_{pe}^2) e residual (σ_e^2) das características e modelos estudados.

Parâmetro	Distribuição	Média	Mediana	Moda	DP	95% IC
Número de oócitos viáveis						
σ_a^2	Gaussiano	14,21	14,06	9,18	3,46	8,11-21,36
σ_{pe}^2	Gaussiano	12,4	12,33	17,31	2,82	6,69-17,77
σ_e^2	Gaussiano	92,1	92,1	93,13	1,66	88,91-95,33
σ_a^2	Poisson	0,05	0,05	0,04	0,01	0,03-0,08
σ_{pe}^2	Poisson	0,05	0,05	0,06	0,01	0,02-0,07
σ_e^2	Poisson	0,33	0,33	0,33	0,01	0,31-0,34
Número de embriões viáveis						
σ_a^2	Gaussiano	0,31	0,28	0,31	0,17	0,04-0,66
σ_{pe}^2	Gaussiano	0,8	0,81	0,91	0,23	0,35-1,25
σ_e^2	Gaussiano	12,22	12,22	12,20	0,22	11,81-12,68
σ_a^2	Poisson	0,02	0,02	0,03	0,01	0-0,04
σ_{pe}^2	Poisson	0,04	0,04	0,03	0,02	0-0,07
σ_e^2	Poisson	0,6	0,6	0,58	0,02	0,56-0,64

*Valores obtidos para distribuição Poisson estão na escala de preditor linear [$\log(\lambda)$].

Os modelos empregados para as análises das características estudadas não diferiram em relação ao particionamento das variâncias como pode ser constatado pelas estimativas de herdabilidade (Tabela 5), diferentemente do resultado obtido

por Perez et al. (2017), em que houve diferentes proporções das variâncias genética, residual e de ambiente permanente em função do modelo.

É escasso o número de estudos na literatura que reportam as estimativas de variância para o componente de ambiente permanente para as características resultantes da PIVE. No presente estudo, o intervalo entre as aspirações foliculares variou de 7 a 2.561 dias, o que pode ter afetado o particionamento das variâncias e inflacionado as variâncias residuais, como foi observado (Tabela 4).

Os intervalos de maior densidade a *posteriori* tiveram menor variação para ambas características estudadas com a distribuição de Poisson, ao contrário da distribuição Gaussiana (Tabela 4), corroborando com os resultados encontrados pelos autores Perez et al. (2017). Menores variações nos intervalos de maior densidade a posteriori denotam maior concentração de distribuição do parâmetro.

As estimativas de média, mediana, moda, desvio-padrão (DP) e intervalos de maior densidade a posteriori (95%IC) para herdabilidade e repetibilidade das características e distribuições estudadas são apresentadas na Tabela 5. A herdabilidade estimada para NOV foi de 0,12 para os dois modelos, enquanto que para NEV as estimativas de herdabilidade foram de 0,02 e 0,03 para o modelo Gaussiano e Poisson, respectivamente. Maior variabilidade genética foi encontrada para a característica NOV do que para NEV. Os menores valores de DIC (Tabela 5) indicaram que o modelo de Poisson proporcionou o melhor ajuste, para ambas as características.

Tabela 5. Média com erro-padrão (entre parêntese), mediana, moda, desvio-padrão (DP) e intervalos de maior densidade *a posteriori* (95% IC) das estimativas de herdabilidade (h^2) e repetibilidade (r) com os respectivos valores de DIC para as características e modelos estudados.

Características e Modelos Estatísticos:							
Parâmetro	Distribuição	Média	Mediana	Moda	DP	95% IC	DIC
Número de oócitos viáveis							
h^2	Gaussiano	0,12 (0,00)	0,12	0,08	0,03	0,07-0,17	91.501,31
r	Gaussiano	0,22 (0,00)	0,22	0,22	0,02	0,19-0,25	
h^2	Poisson	0,12 (0,00)	0,12	0,09	0,03	0,07-0,18	73.446,42
r	Poisson	0,24 (0,00)	0,24	0,24	0,22	0,20-0,27	
Número de embriões viáveis							
h^2	Gaussiano	0,02 (0,00)	0,02	0,02	0,01	0-0,05	68.639,82
r	Gaussiano	0,08 (0,00)	0,08	0,09	0,01	0,06-0,11	
h^2	Poisson	0,03 (0,00)	0,02	0,05	0,02	0-0,07	43.187,32
r	Poisson	0,09 (0,00)	0,09	0,10	0,02	0,05-0,13	

Para os parâmetros descritos na Tabela 5, a amplitude dos intervalos de maior densidade *a posteriori* foi mais concentrada com uma variação de 0,05 a 0,11 para os diferentes modelos e características estudadas, favoravelmente esse tipo de comportamento indica uma menor dispersão dos parâmetros. No estudo de Perez et al. (2017) a repetibilidade, independente do modelo empregado, apresentou uma menor variação na amplitude (0,06 a 0,09 de IC-95%) para ambas características (NOV e NEV), enquanto que para a estimativa de herdabilidade houve uma maior variação (0,11 a 0,22 de IC-95%).

Em geral, essas estimativas de herdabilidade para NEV e NOV foram inferiores às reportadas na literatura (Merton et al., 2009; Perez et al., 2016; Perez et al., 2017), que pode ser explicada pelas diferentes estruturas dos bancos de dados, principalmente por se tratar de informações provenientes de diferentes laboratórios de reprodução animal, além dos processos de seleção, dentre outros fatores.

Estimativas de herdabilidade para NEV na produção *in vivo* de embriões foram relatadas em estudos com doadoras da raça Holandesa, e estas foram de pequena magnitude, 0,03 (Tonhati et al., 1999), 0,09 (Asada & Terawaki, 2002), 0,10 (König et al., 2007) e de 0,13 (Jaton et al., 2016). No presente estudo, independente da abordagem metodológica empregada, a estimativa de herdabilidade para NEV foi, praticamente nula, indicando que uma pequena parte da variância genética foi

explicada pelos modelos e uma grande parte de fatores não considerados nos modelos inflacionou, principalmente, a variância residual.

A característica NEV em comparação com a característica NOV apresenta adicionalmente o fator da qualidade do sêmen capacitado para o processo in vitro. Silva et al. (2015) constataram a influência da qualidade do sêmen para a expressão da característica NEV de doadoras da raça Gir. No presente estudo, 23% dos touros utilizados eram da raça Holandesa, 13% da raça Gir e 64% de pool de touros entre essas duas raças. Essa fonte de variação para a característica NEV no presente estudo foi parcialmente corrigida no modelo considerando a identificação do touro aninhado dentro de raça.

Considerando a não transformação para NOV e NEV e dois diferentes modelos, Gaussiano e Poisson, os autores Perez et al. (2017), obtiveram estimativas de herdabilidade de 0,16 e 0,25 e de 0,10 e 0,20, respectivamente. Esses autores concluíram que o melhor modelo para análise dessas características foi o de Poisson, corroborando com o resultado encontrado no presente estudo.

As estimativas de repetibilidade de NEV foram inferiores a NOV, resultado semelhante ao constatado pelos autores Perez et al. (2017), cujas estimativas variaram de 0,54 a 0,63 para NOV e de 0,35 a 0,50 e para NEV, considerando as distribuições Gaussiana e Poisson, respectivamente. As estimativas de repetibilidade foram, em geral, inferiores às estimativas relatadas na literatura (Jaton et al. 2016; Perez et al. 2016; Perez et al. 2017; Packer Gaddis et al., 2017).

A correlação de Spearman entre os valores genéticos preditos para NOV, para os dois modelos foi de 0,79, enquanto que para NEV a correlação foi um pouco superior, de 0,87. Ao considerar apenas os 10% maiores valores genéticos preditos, a proporção de indivíduos selecionados em comum pelos dois modelos, foi de 30% para NEV e de 70% para NOV. Estes valores denotam mudanças importantes na classificação dos animais, em função do modelo empregado, para ambas as características, contudo a maior mudança foi para NEV em função da menor quantidade de indivíduos em comuns, ressaltando assim a particularidade dessa característica frente ao modelo e distribuição estudados.

Os coeficientes de correlação de Spearman entre os valores genéticos preditos para os diferentes modelos foram moderadas e houve dependência do

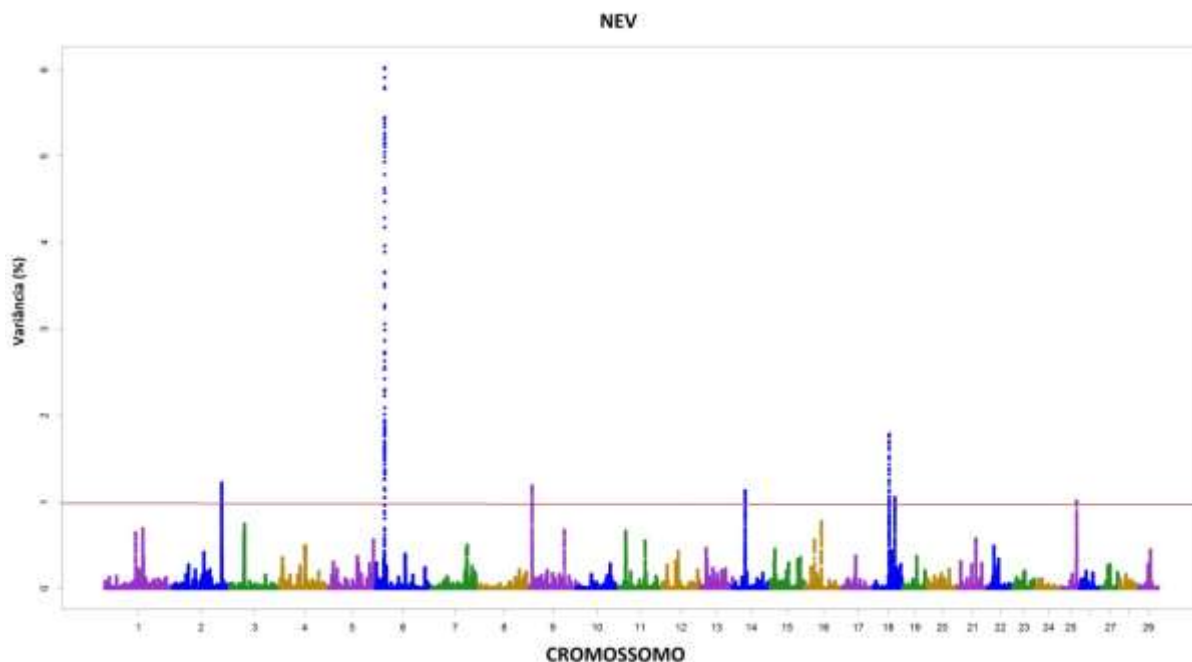


Figura 2. Gráfico do tipo Manhattan com a proporção da variância (%) explicadas pelas janelas compostas por 100 SNPs adjacentes para a característica número de embriões viáveis transformada (NEV).

Os resultados da análise de GWAS mostraram janelas que se destacaram quanto à variância explicada para as características estudadas (Figuras 1 e 2). As janelas de maior efeito para NOV e NEV somadas explicaram 21,22% e 13,39% da variância genética aditiva, respectivamente. Estas janelas estão localizadas nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 8, 13, 14, 17 e 27 para NOV e 2, 6, 9, 14, 18 e 25 para NEV, totalizando 65 e 32 genes identificados, respectivamente (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Cromossomo (Chr), posição, identificação dos genes e proporção da variância explicada pelas janelas de maior efeito para a característica número de oócitos viáveis (NOV).

Chr	Posição (pb)	Genes	Variância (%)
1	37780337 - 38176853	ARL13B;PROS1;STX19;NSUN3	1,35
2	36992390- 37498570	TANC1;BAZ2B;WDSUB1	1,82
2	49984231- 50470083	-	1,22
2	120000000- 120000000	-	1,06
3	43815022- 44147021	PLPPR4	1,55
4	51673106- 52248017	MET;ST7;CAPZA2;CAV1 e CAV2	2,38
5	40351712- 40654636	MUC19;CNTN1	2,30
8	46119159- 46384252	PTAR1	2,49
13	25798085- 26258112	ARHGAP21;PRTFDC1;ENKUR;THNSL1;GPR158	1,45
14	1433215- 1967325	ZNF 7,16 e 34; RPL8; COMMD5; MROH1;ARHGAP39;MIR2308;LRRC 14 e 24;MFSD3;GPT;PPP1R16A;FOXH1;KIFC2;CYHR1;TONSL;VPS28;SLC39A4;CPSF1;ADCK5;SLC52A2;FBXL6;TMEM249;SCRT1;DGAT1;HSF1;BOP1;SCX;MROH8;MIR183 9;HGH1;MAF1;CYC1;SHARPIN;GPAA1;EXOSC4;OPLAH;SMPD5	1,04
17	72055006- 72402076	SMTN;SELM;INPP5J;PLA2G3;RNF185;LIMK2;PIK3IP1;PATZ1;DRG1;EIF4ENIF1;SFI1	2,64
27	6948856- 7363812	VEGFC	1,92

Tabela 7. Cromossomo (Chr), posição, identificação dos genes e proporção da variância explicada pelas janelas de maior efeito para a característica número de embriões viáveis (NEV).

Chr	Posição (pb)	Genes	Variância (%)
2	120000000 – 120000000	-	1,22
6	20097696- 20356424	TBCK;AIMP1;GIMD1	6,02
9	7046940- 7379768	-	1,18
14	28427843- 29031539	ASPH;CLVS1	1,13
18	30741380- 31428757	TRNAC-ACA	1,78
18	44464191- 45030628	LSM14A;KIAA0355;GP1;PDCD2L	1,05
25	34443034- 35277806	HIP1;CCL 24 e 26; RHBDD2;POR;TMEM1201;STYXL1;M DH2;SRRM3;HSPB1;YWHAG;SSC4D; ZP3DTX2;UPK3B;UPK3BL;POLR2J;L RWD1;ALKBH4;ORAI2;PRKRIP1;SH2 B2;CUX1	1,01

Para a característica NOV, foi identificado o gene PATZ1, localizado no cromossomo 17, que possui relação com o desenvolvimento ovariano, segundo Adona et al. (20019). Os genes CAV1 e CAV2 (caveolin), ambos localizados no cromossomo 4, foram identificados para a característica NOV. De acordo com Rispoli et al. (2013), estes genes controlam o hormônio folículo estimulante (FSH), o qual tem como uma de suas principais funções, estimular o desenvolvimento folicular. A presença da proteína caveolina pode controlar os níveis do FSH e, consequentemente, impactar no desenvolvimento folicular. Diouf et al. (2006), sugeriram que a caveolina nas células da granulosa do folículo ovariano provavelmente contribui para o controle no aumento da membrana receptora que ocorre no momento da ovulação e luteinização.

Para a característica NOV foram identificados também os genes PLA2G3 e PIK3IP1, que possuem relação positiva com as características ligadas a circunferência escrotal, segundo Soares et al. (2017). Segundo Van Melis et al. (2010), existe correlação genética positiva (0.30) entre circunferência escrotal e precocidade de prenhez de novilhas, característica que pode ser indicativa de uma boa capacidade folicular.

Segundo Neupane et al. (2017), o gene PLA2G3 influencia o metabolismo de lipídios e a sinalização do Fc epsilon RI, os quais são membros da família de genes

da enzima fosfolipase A2 (PLA2) relacionada com a síntese de prostaglandina. A prostaglandina desempenha papel fundamental nas ondas foliculares, pois é responsável pela regressão do corpo lúteo, que tem como consequência a retomada das ondas foliculares. Soares et al. (2017) também reportaram associação entre o PLA2G3 e características de circunferência escrotal (maturidade).

Localizados no cromossomo 14, os genes ZNF's, chamados de "domínios de ligação do DNA", são responsáveis pela síntese de proteínas elementos responsivos aos esteroides no DNA, logo então, ativam a síntese de proteína podendo afetar no grau de fertilidade dos animais. De acordo Hand et al. (2017), um terço das proteínas ZNF contém um terminal conhecido como domínio de caixa associado a Kruppel, o qual é responsável pela maturação do oócito e o desenvolvimento embrionário em fase precoce. Esses genes podem regular a foliculogênese e impactar na fertilidade dos animais, conforme constatado por Moore et al. (2016).

Ao analisar a taxa de prenhez e de concepção de novilhas, ambas relacionadas à NOV, Cochran et al. (2013) identificaram o gene CPSF1. Um SNP no DGAT1 localizado próximo ao CPSF1 foi associado com características como o não retorno ao primeiro serviço, considerando 28 e 56 dias, idade a puberdade, número de inseminações por concepção e taxa de concepção, todas estritamente relacionadas à NOV (Collis et al., 2012).

De acordo com Demeter et al. (2009) e Hill et al. (2016), em estudos realizados com bovinos da raça Holandesa, o gene DGAT foi significativamente associado com diferentes características reprodutivas tais como quantidade de serviços por concepção e período de serviço, as quais são diretamente relacionadas a característica NOV no presente estudo. O gene DGAT1 parece ser um forte gene candidato para produção de leite assim como para características reprodutivas (Collis et al., 2012; Rychtářová et al., 2014).

Na PIVE, segundo Orozco-Lucero & Sirard (2014), a competência ou potencial de desenvolvimento refere-se à habilidade de oócitos ou embriões nas fases iniciais chegarem ao estágio de blastócitos. Para identificar essa capacidade, alguns marcadores moleculares têm sido empregados como o RPL8, o qual está associado na competência dos oócitos em atingir o estágio II de maturação, o qual está relacionado com a quantidade de oócitos viáveis. No presente estudo, o gene

RPL8 foi identificado para a característica NOV, corroborando com os autores citados anteriormente. Leroy et al. (2012) relataram que esse gene foi significativo ao aumento de oócitos competentes aspirados de folículos em crescimento.

Para a característica NEV, foi identificado o gene CCL6, que está localizado no cromossomo 25. Segundo Smith et al. (2019), este gene foi considerado de alta regulação na produção de embriões, vistas ao desenvolvimento, qualidade e competência. O CCL6 é expresso no polo TE do embrião bovino e sua síntese poderia configurar um gradiente de quimiocina, o qual facilita diretamente o movimento das células para o blastocoele (forma expandida do blastócito) (Negrón-Pérez et al., 2017b).

Localizado no cromossomo 25, o gene CCL24 foi identificado para a característica NEV, sendo que o mesmo atua na expressão no pico do blastócito em torno dos sete dias do desenvolvimento embrionário de bovinos (Negrón-Pérez et al., 2017a). Em outro estudo com embriões de bovinos, constatou-se que o gene CCL24 auxilia no arranjo espacial da massa celular interna do embrião (Negrón-Pérez et al., 2017b), impactando em sua capacitação.

Em um estudo sobre a expressão de genes envolvidos no controle da fertilidade no endométrio uterino bovino, relatou-se a funcionalidade do gene YWHAG no metabolismo de lipídio e no desenvolvimento de tecidos durante o desenvolvimento embrionário (Waters et al., 2012). A capacidade de desenvolvimento celular do embrião, após a fecundação, impacta diretamente na característica estudada NEV. Outro estudo detectou abundância da proteína YWHAG em estágios iniciais do desenvolvimento embrionário, aumentado significativamente no fluido luminal uterino de novilhas prenhes em torno dos 19 dias (Forde et al., 2015).

Para ambas as características estudadas, NOV e NEV foram identificadas regiões do genoma que se destacaram quanto ao percentual da variância genética, porém sem nenhuma região genômica comum entre elas, ou seja, sem possível efeito pleiotrópico. No entanto, denotou-se que nessas regiões foram relacionados genes candidatos importantes para os determinantes genéticos que afetam a expressão de ambas as características.

5. CONCLUSÕES

O modelo Poisson proporcionou melhor ajuste de número de oócitos viáveis e número de embriões viáveis em doadoras da raça Gir, sendo, portanto, o modelo recomendado para a análise genética de ambas as características. As características da produção *in vitro* de embriões possuem baixas estimativas de herdabilidade o que implica em ganho genético pouco expressivo.

As regiões de maior efeito identificadas nesse estudo contemplaram genes que, de forma direta ou indireta, têm relação com as características estudadas, contribuindo para o entendimento do controle genético das mesmas e, consequentemente, para o processo de seleção dos animais.

6. REFERÊNCIAS

ABCZ- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU. **Estatística. (2018).** Disponível em: < <http://www.abcz.org.br/Home/Conteudo/22889-Estatisticas>>. Acesso em: 22 dez. 2018.

Adams GP, Jaiswal R, Singh J, Malhi P (2008) Progress in understanding ovarian follicular dynamics in cattle. Proc. IETS Pre- Post-Conf. Symp. Anim. Models Reprod. Dev. Pract. Bov. Embryo Transf. **IETS 2008 Pre- Post-Conf. Symp.** 69: 72–80.

Adona PR, Leal CLV, Biase FH, De Bem TH, Mesquita LG, Meirelles FV, Ferraz AL, Furlan LR, Monzani PS, Guemra S (2016) In vitro maturation alters gene expression in bovine oocytes. **Zygote**, 24:624:633.

Aerts JM & Bols PE (2010) Ovarian follicular dynamics: a review with emphasis on the bovine species. Part I: Folliculogenesis and pre-antral follicle development. **Reprod. Domest. Anim.** 45: 171-9179.

Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ (2010) Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. **Journal of Dairy Science**, 93:743-752.

Asada Y & Terawaki Y (2002). Heritability and repeatability of superovulatory responses in Holstein population in Hokkaido, Japan. **Asian Australasian Journal Animal Science**, 15: 944-948.

Ayres DR, Pereira RJ, Boligon AA, Silva FF, Schenkel FS, Roso VM, Albuquerque LG (2013). Linear and Poisson models for genetic evaluation of tick resistance in cross-bred Hereford × Nelore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 130: 417-424.

Ball PJH & Peters AR (2004) **Reproduction in cattle**, 3rd ed. ed. Blackwell Pub, Oxford, UK ; Ames, Iowa.

Baruselli PS, Colli MHA, Rezende RG (2016) Situação atual, desafios e perspectivas da reprodução programada em bovinos de corte e de leite. In: 7° Simposio Internacional de Reprodução Animal Aplicada. Londrina.

Batista EOS, Macedo GG, Sala RV, Ortolan MDDV, Sa Filho MF, Del Valle TA, Jesus EF, Lopes, RNVR, Renno FR, Baruselli PS (2014) Plasma Antimüllerian Hormone as a Predictor of Ovarian Antral Follicular Population in *Bos indicus* (Nelore) and *Bos taurus* (Holstein) Heifers. **Reproduction in Domestic Animals** 49: 448-452.

Bényei B, Gáspárdy A, Komlósi I, Pécsi A (2004) Repeatability and heritability of ovulation number and embryos in dam-daughters pairs in superovulated Holstein–Friesian cows. **Reprod. Domest. Anim.** 39: 99–102.

Blondin, P (2015). Status of embryo production in the world. **Animal Reproduction** 12:356-358.

Bó GA & Mapletoft RJ (2013) Evaluation and classification of bovine embryos. **Anim. Reprod. Sci** 10:344–348.

Boison SA, Santos DJA, Utsunomiya AHT, Carneiro R, Neves HHR, O'Brien AMP, Garcia JF, Sölkner J, da Silva MVG (2015) Strategies for single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping to enhance genotype imputation in Gyr (*Bos*

Indicus) dairy cattle: comparison of commercially available SNP chips. **J Dairy Sci.**, 98:4969–89.

Britt JH (2008). Oocyte development in cattle: physiological and genetics aspects. **Revista Brasileira de Zootecnia** 37:110-115.

Brookes AJ (1999) The essence of SNPs. **Gene**. 2:177-1786.

Carrell DT, Liu L, Huang I, Peterson M (2005) Comparison of maturation, meiotic competence, and chromosome aneuploidy of oocytes derived from two protocols for in vitro culture of mouse secondary follicles. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics** 22:347-354.

Cochran SD, Cole JB, Null DJ, Hansen PJ (2013) Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. **BMC Genetics**,14:49.

Cole JB, VanRaden PM, O'Connell JR, Van Tassell CP, Sonstegard TS, Schnabel R D, Taylor JF, Wiggans GR. (2009). Distribution and location of genetic effects for dairy traits. **J. Dairy Sci.** 92, 2931–2946.

Collis E, Fortes MRS, Zhang Y, Tier B, Schutt K, Barendse W, Hawken R (2012) Genetic variants affecting meat and milk production traits appear to have effects on reproduction traits in cattle. **Animal Genetics**, 43:442-446.

Cory AT, Price CA, Lefebvre R, Palin MF (2012) Identification of single nucleotide polymorphisms in the bovine follicle-stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. **Anim. Genet.** 44:197–201.

Dekkers JC (2004) Commercial application of marker-and-gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **Journal of Anim. Science** 82 E-Suppl:E313-328.

Demeter RM, Schopen GCB, Oude Lansink AGJM, Meuwissen MPM, Van Arendonk JAM (2009) Effects of milk fat composition, DGAT1, and SCD1 on fertility traits in Dutch Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, 92:5720-5719.

Diouf MN, Lefebvre R, Silversides DW, Sirois J, Lussier JG (2006) Induction of Alpha-Caveolin-1 (α CAV1) Expression in Bovine Granulosa Cells in Response to an

Ovulatory Dose of Human Chorionic Gonadotropin. **Molecular Reproduction and Development**, 73:1353-1360.

Eriksson S, Häggström M, Stålhammar H (2007) Genetic parameters for superovulatory response in Swedish Red Cattle and Swedish Holstein heifers. In: 58th Annu. Meet. Eur. Assoc. Anim. Prod., Dublin, Ireland. **Wageningen Academic Publishers**, Wageningen, the Netherlands, p. 1–6.

Farin PW, Moore K, Drost M (2007) Assisted reproductive technologies in cattle. In: Current Therapy in Large Animal. **Theriogenology** 63:496-508.

Forde N, Bazer FW, Spencer TE, Lonergan P (2015) ‘Conceptualizin’ the endometrium: identification of conceptus-derived proteins during early pregnancy in cattle. **Biology of Reproduction**, 92:1-13.

Geweke J (1992). Evaluating the accuracy of sampling-based approaches to the calculation of posterior moments. **Bayesian statistics**, 4: 625-631.

GiMENES LU, Sá Filho MF, Carvalho, NAT, Torres-Junior JRS, Souza AH, Madureira EH, Trinca LA, Sartorelli ES, Barros CM, Carvalho JBP, Mapletoft RJ, Baruselli PS (2008) Follicle deviation and ovulatory capacity in Bos indicus heifers. **Theriogenology** 69: 852-858.

Gonçalves PBD, Barreta MB, Sandri LR, Ferreira R, Antoniazzi AQ (2007) Produção in vitro de embriões bovinos: o estado da arte. **Rev Bras Reprod Anim** 31: 212-217.

Hadfield JD (2010b). MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. **Journal of Statistical Software**, 33(2): 1-22.

Hadfield JD & Nakagawa S. (2010a). General quantitative genetic methods for comparative biology: phylogenies, taxonomies and multi-trait models for continuous and categorical characters. **Journal of Evolutionary Biology**, 23(3): 494-508.

Hand JM, Zhang K, Wang L, Koganti PP, Mastrantoni K, Rajput SK, Ashry M, Smith GW, Yao J (2017) Discovery of a novel oocyte-specific Krüppel-associated box domain-containing zinc finger protein required for early embryogenesis in cattle. **Mechanisms of Development**, 144-103-112.

Hasler JF (2003) The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. Potential Implic. **Appl. Reprod. Technol.** 79:245–264.

Hasler JF (2014) Forty years of embryo transfer in cattle: A review focusing on the journal Theriogenology, the growth of the industry in North America, and personal reminiscences. **Theriogenology** 81:152–169.

Hayes BJ, Bowman PJ, Chamberlain AJ, Goddard, ME (2009) Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of Dairy Science**, 92:433-443.

Hayes B & Goddard M (2010) Genome-wide association and genomic selection in animal breeding. **Genome** 53, 876–883.

Hawken RJ, Zhang YD, Fortes MRS, Collis E, Barris WC, Corbet NJ, Williams, Fordyce G, Holroyd RG, Walkley JRW, Barendse W, Johnston DJ, Prayaga KC, Tier B, Reverter A, Lehnert SA (2015) Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **J. Anim. Sci.** 90:1398–1410.

Heidelberger P & Welch PD (1983) Simulation run length control in the presence of an initial transient. **Operations Research** 31:1109-1144.

Hill R, Canal A, Bondioli K, Morell R, Garcia MD (2016) Molecular markers located on the DGAT1, CAST, and LEPR genes and their associations with milk production and fertility traits in Holstein cattle. **Genetic and Molecular Research**, 15(1): gmr.15017794.

IETS, The International Embryo Transfer Society.(2015) Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals. Disponível em: www.iets.com. Acesso em: 08 dezembro 2018.

Jaton C, Koeck A, Sargolzaei M, Malchiodi F, Price CA, Schenkel FS, Miglior F (2016) Genetic analysis of superovulatory response of Holstein cows in Canada. **Journal of Dairy Science** 99: 3612-3623.

Juebgel JL, Smith PR, Quirke LD, French MC, Edwards SJ (2018) The local regulation of folliculogenesis by members of the transforming growth factor superfamily and its relevance for advanced breeding programmes. **Anim. Reprod.** 15: 180-190.

Kanitz W, Becker F, Schneider F, Kanitz E, Leiding C, Nohner HP, Pöhland R, (2002) Superovulation in cattle: practical aspects of gonadotropin treatment and insemination. **Reprod. Nutr. Dev.** 42:587–599.

Konig, S, Bosselmann, F, Von Borstel, U, U, Simianert, H (2007). Genetic analysis of traits affecting the success of embryo transfer in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, 90: 3945-54.

Loi, P, Toschi, P, Zacchini, F, Ptak, G, Scapolo, PA, Capra, E, Stella, A, Marsan, P A, Williams, J L (2016). Synergies between assisted reproduction technologies and functional genomics. **Genet. Sel. Evol.** 48:53.

Leroy JLMR, Rizos DD, Sturmey R, Bossaert P, Gutierrez-Adan A, Van Hoeck V, Valckx S, Bols PEJ (2012) Intrafollicular conditions as a major link between maternal metabolism and oocyte quality: a focus on dairy cow fertility. **Reproduction, Fertility and Development**, 24:1-12.

Lonergan P & Fair T (2016) Maturation of oocytes in vitro. **Annu. Rev. Anim. Biosci.** 4:255-268.

Machado SA, Reichenbach HD, Weppert M, Wolf, E, et al. (2006). The variability of ovum pick-up response and in vitro embryo production from monozygotic twin cows. **Theriogenology** 65: 573-583.

Mapletoft RJ, Bó GA, Baruselli PS (2009). Control of ovarian function for assisted reproductive technologies in cattle. **Anim. Reprod.** 6:114-124.

Merton JS, Ask B, Onkundi DC, Mullart E, Colenbrander B, Nielen M (2009). Genetic parameters for oocyte number and embryo production within a bovine ovum pick-up–in vitro production embryo-production program. **Theriogenology**, 72: 885–893.

Meuwissen, THE, Hayes, BJ, Goddard, ME (2001) Prediction of Total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, 157:1819-1829.

Moore SG, Pryce JE, Hayes BJ, Chamberlain AJ, Kemper KE, Berry DP, McCabe M, Cormican P, Lonergan P, Fair T, Butler ST (2016) Differentially expressed genes in endometrium and corpus luteum of Holstein cows selected for high and low fertility are enriched for sequence variants associated with fertility. **Biology of Reproduction**, 94:1-11.

Misztal I (2012) BLUPF90-a flexible mixed model program in Fortran 90. User Manual. Animal and Dairy Science. Athens, GA, USA: University of Georgia; [S.l.: s.n.], 2012. Disponível em: <http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90.pdf> Acessado em: nov. 2018.

Negrón-Pérez VM, Vargas-Franco D, Hansen PJ (2017a) Single-cell gene expression of the bovine blastocyst. **Reproduction**, 154:627-644.

Negrón-Pérez VM, Zhang Y, Hansen PJ (2017b) Role of chemokine (C-C motif) ligand 24 in spatial arrangement of the inner cell mass of the bovine embryo. **Biology of Reproduction**, 96:948-959.

Neupane M, Geary TW, Kiser JN, Burns GW, Hansen PJ, Spencer TE, Neibergs HL (2017) Loci and pathways associated with uterine capacity for pregnancy and fertility in beef cattle. **Plos One**, 2:1-19.

Orisaka M, Tajima K, Tsang BK, Kotsuji F, (2009). Oocyte-granulosa-theca cell interactions during preantral follicular development. **J. Ovarian Res.** 2: 9.

Orozco-Lucero, E & Sirad MA (2014) Molecular markes of fertility in cattle oocytes and embryos:progress and challenges. **Animal Reproduction**, 11:183-194.

Parker Gaddis KL, Dikmen S, Null DJ, Cole JB, Hansen PJ, (2017). Evaluation of genetic componentes in traits related to superovulation, in vitro fertilization, and embryo transfer in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, 100:2877-2891.

Perez BC, Peixoto MGCD, Bruneli FT, Ramos PVB, Balieiro JCC (2016). Genetic analysis of oocyte and embryo production traits in Guzerá breed donors and their associations with age at first calving. **Genetics and Molecular Research**, 15(2): gmr.15027583.

Perez, BC, Silva, FF, Ventura, RV, Bruneli, Balieiro, JCC, Peixoto, MGCD (2017). Count Bayesian models for genetic analysis of *in vitro* embryo production traits in Guzerá cattle. **Animal**, 1-9.

R Development Core Team 2016. R: A language and environment for statistical computing. **R Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. Acessado em: 2 de Abril de 2016; Disponível em: <http://www.R-project.org>.

Raftery AE & Lewis LM (1992). Comment: one long run with diagnostics: implementation strategies for Markov Chain Monte Carlo. **Statistical Science**, 7: 493-497.

Resende, MDV et al. (2008) Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesquisa Florestal Brasileira**, 56:63-77.

Rispoli LA, Payton RR, Gondro C, Saxton AM, Nagle KA, Jenkins BW, Schrick FN, Edwards L (2013). Heat stress effects on the cumulus cells surrounding the bovine oocyte during maturation: altered matrix metalloproteinase 9 and progesterone production. **Reproduction**, 146:193-207.

Rodriguez-Martinez H & Barth AD (2007) In vitro evaluation of sperm quality related to in vivo function and fertility. In: Reproduction in domestic animals, Nottingham, UK: Nottingham University Press, 6:39.

Rychtářová J, Sztankóová Z, Kyselová J, Zink V, Štípková M, Vacek M, Štolc L (2014) Effect of DGAT1, BTN1A1, OLR1, and STAT1 genes on milk production and reproduction traits in the Czech Fleckvieh breed. **Czech J. Anim. Sci.**, 59: 45–53.

Sales JNS, Iguma LT, Batista RITP, Quintão CCR, Gama MAS, Freitas C, Pereira MM, Camargo LSA, Viana JHM, Souza JC, Baruselli OS (2015) Effects of a high-energy diet on oocyte quality and in vitro embryo production in *Bos indicus* and *Bos taurus* cows. **J Dairy Sci**, 98:1-14.

Samardzija M, Getz I, Lojkic M, Valpotic H, Djuricic (2015) Optimization of sperm for in vitro production of bovine embryos. **SOJ Vet Sci**. 2:1-7.

Sargolzaei M, Chesnais JP, Schenkel FS (2014) A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC Genomics**, 15:478.

Schepers JM, Weigel KA (2012) Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. **Anim. Front.** 2:4–9.

Silva, APTB, Mello, RRC, Ferreira, JE, Mello, MRB (2015). Efeito do acasalamento entre a doadora e o touro (holandês versus gir) na produção in vitro de embriões bovinos. **B. Indústr. Anim**, 72:51-78.

Smith BJ. (2007). boa: An R Package for MCMC Output Convergence Assessment and Posterior Inference. **Journal of Statistical Software**, 21 (11):1-37.

Smith SL, Everts RE, Sung L-Y, Du F, Page RL, Henderson B, Rodriguez-Zas SL, Nedambale TL, Renard J-P, Lewin HA, Yang X, Tian XC (2009) Gene Expression Profiling of Single Bovine Embryos Uncovers Significant Effects of In Vitro Maturation, Fertilization and Culture. **Molecular Reproduction & Development** , 76:38–47.

Soares ACC, Guimarães SEF, Kelly MJ, Fortes MRS, Silva FF, Verardo LL, Mota RR, Moore S (2017) Multiple-trait genomewide mapping and gene network analysis for scrotal circumference growth curves in Brahman cattle. **Journal of Animal Science**, 95:3331–3345.

Spiegelhalter DJ, Best NG, Carlin BP, Van Der Linde A, (2002). Bayesian measures of model complexity and fit (with discussion). **Journal of the Royal Statistical Society**, 64:583-639.

Tonhati H, Lobo RB, Oliveira HN, (1999). Repeatability heritability of response to superovulation in Holstein cows. **Theriogenology**, 51:1151-1156.

Thomasen JR, Willam A, Egger-Danner C, Sørensen AC (2016) Reproductive technologies combine well with genomic selection in dairy breeding programs **Journal of Dairy Science**, 99:1331–1340.

Tríbulo A, Rogan D, Tribulo H, Tribulo R, Alasino RV, Beltramo D, Bianco I, Mapletoft RJ, Bó GA (2011) Superstimulation of ovarian follicular development in beef cattle with a single intramuscular injection of Folltropin-V. **Anim. Reprod. Sci.** 129: 7–13.

Van Melis MH, Eler JP, Rosa GJM, Ferraz JBS, Figueiredo LGG, Mattos EC, Oliveira HN (2010) Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy, and stayability in Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, 88:3809-3813.

Vanraden, PM (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, 91:4414-4423.

Van Wagtendonk-de Leeuw AM (2006) Ovum pick up and in vitro production in the bovine after use in several generations: A 2005 status. **Theriogenology**, 65: 914–925.

Ventura HT, Costa ED, Pereira MA, Silva FF, Josahkian LA, Silva EJL, Santos APS, (2018) **Sumário de touros: avaliação nacional de touros das raças zebuínas leiteiras Gir, Gir Mocha e Sindi. Uberaba: ABCZ.** 52p.

Viana, JHM, Siqueira, LGB, Palhao, MP, Camargo, LSA (2012). Features and perspectives of the Brazilian in vitro embryo industry. **Animal Reproduction**, 9(1): 12-18.

Wang, WYS et al. (2005) Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics**, 6: 109-118.

Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, Vitezica Z, Okimoto R, Wing, T, Hawken R, Muir WM, (2014) Genome wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6 week body weight in broiler chickens. **Frontiers in Genetics**, 5:134.

Watanabe YF, Souza AH, Mingoti RD, Ferreira RM, Batista, EOS, Dayan A, Watanabe O, Meirelles FV, Nogueira MFG, Ferras JBS, Baruselli OS, (2017). Number of oocytes retrieved per donor during OPU and its relationship with in vitro embryo production and field fertility following embryo transfer. **Animal Reproduction**, 14(3): 635-644.

Waters SM, Coyne GS, Kenny DA, MacHugh DE, Morris DG (2012) Dietary n-3 polyunsaturated fatty acid supplementation alters the expression of genes involved in the control of fertility in the bovine uterine endometrium. **Physiol Genomics**, 44:878-888.