



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
UNIDADE ACADÊMICA CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA**



NAMÍBIA OLIVEIRA BALBINO DE SOUZA

**Estudos genômicos para a prolificidade em cabras: uma revisão
sistemática**

RIO LARGO – ALAGOAS

2018

NAMÍBIA OLIVEIRA BALBINO DE SOUZA

Estudos genômicos para a prolificidade em cabras: uma revisão sistemática

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Zootecnia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga

RIO LARGO – ALAGOAS

2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências Agrárias
Bibliotecária Responsável: Myrtes Vieira do Nascimento

S729e	<p>Souza, Namíbia Oliveira Balbino de Estudos genômicos para a prolificidade em cabras: uma revisão sistemática / Namíbia Oliveira Balbino de Souza – 2018. 41 f.; il.</p> <p>Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias. Rio Largo, 2018. Orientação: Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga</p> <p>Inclui bibliografia</p> <p>1. Caprinocultura. 2. Genética – Caprinos. 3. Revisão sistemática – Produção de caprinos. I. Título</p> <p style="text-align: right;">CDU: 636.3</p>
-------	--

TERMO DE APROVAÇÃO

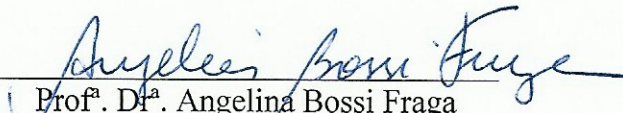
NAMÍBIA OLIVEIRA BALBINO DE SOUZA

ESTUDOS GENÔMICOS PARA A PROLIFICIDADE EM CABRAS: UMA REVISÃO SISTEMÁTICA.

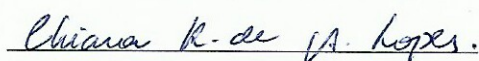
Esta dissertação foi submetida a julgamento como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Zootecnia, outorgado pela Universidade Federal de Alagoas.

A citação de qualquer trecho desta dissertação é permitida, desde que seja feita de conformidade com as normas da ética científica.

Aprovado em 09/10/2018

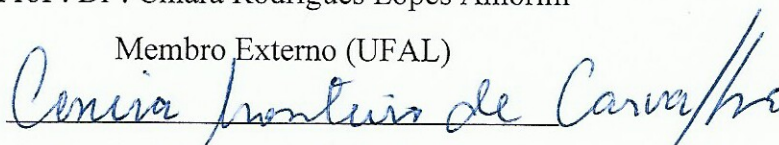

Prof.^a. Dr.^a. Angelina Bossi Fraga

Orientadora (CECA/UFAL)



Prof.^a. Dr.^a. Chiara Rodrigues Lopes Amorim

Membro Externo (UFAL)



Prof.^a. Dr.^a. Cenira Monteiro de Carvalho

Membro Externo (UFAL)

Rio Largo – AL

2018

À minha amada família.

AGRADECIMENTO

Agradeço, primeiramente, à Deus, Andreas e aos Espíritos Protetores.

À minha querida orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a. Angelina Bossi Fraga, por todos os ensinamentos, paciência e amizade.

À minha amada mãe Maria Elena, que não mede esforços para proporcionar a mim e aos meus irmãos o melhor.

Ao meu pai Ivã Balbino (in memoriam) por ter me deixado a maior herança, a educação.

Aos meus grandes irmãos Nahra e Anwar, por estarem sempre ao meu lado.

A Valmir pelo apoio e amor a mim dedicados.

Aos meus irmãos menores, por toda a paz que transmitem.

Aos grandes amigos que o Mestrado me deu: Rosália, Raísa, Breno, Lays, Luciano, Renaldo e Fernando.

Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Alagoas, Centro de Ciências Agrárias.

A todos os funcionários que fazem parte do CECA.

Não basta ter a aparência da pureza, mas deve-se tê-la no coração.”

–O Evangelho Segundo o Espiritismo.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Fluxograma dos artigos selecionados para a revisão sistemática. Baseado na metodologia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses)..... 17
- Figura 2. Um Gene-Act network das interações entre os genes diferencialmente expressados. Vermelho indica regulação para cima e verde representa regulação para baixo..... 26
- Figure 3. Circos plot de distribuição de SNP de cromossomos em cabras. Distribuição de SNP em (A) a baixa fecundidade (BF) do grupo misturado e (B) a alta fecundidade (AF) do grupo misturado. O círculo mais externo retrata os ideogramas de cada cromossom 30
- Figura 4. (A) Transformação-Z do genoma amplo do diferencial de heterozigosidade (D-ZHp, ZHp-HF- ZHp-LF) manhattan plot entre os grupos BF e AF. Os nomes vermelhos são alguns dos genes contidos no grupo D-ZHp mínimo na janela de 150 KB. Nomes de homozigose média de vermelho ou azul nos grupos BF e AF. (B) Transformação-Z do genoma amplo da Estatística F (Z-Fst) manhattan plot entre os grupos de BF e AF. Nomes vermelhos são alguns dos genes contidos no Z-Fst máximo na janela de 150KB. 33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Critérios, número de artigos, data e horário das buscas, utilizados para a revisão sistemática nas três bases de dados Scopus, Pubmed e Biomed Central.....	15
Tabela 2 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de repetição de acordo com as bases de dados consultadas.....	18
Tabela 3 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de exclusão conteúdo de título divergente do tema em estudo de acordo com as bases de dados consultadas	18
Tabela 4 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de exclusão conteúdo de abstract divergente do tema em estudo de acordo com as bases de dados consultadas	21

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 MATERIAL E MÉTODOS	15
2.1 Critérios de inclusão dos artigos	15
2.2 Estratégia de busca	15
2.3 Seleção dos artigos.....	16
3 RESULTADOS	17
3.1 Seleção dos estudos.....	17
4 DISCUSSÃO	18
4.1 Das exclusões.....	18
4.2 Artigos excluídos por texto completo	22
4.2.1 Advances in Molecular Breeding Research of Goat Fecundity	22
4.2.2 Identification and Comparative Analysis of the Ovarian microRNAs of Prolific and Non-prolific Goats During the Follicular Phase Using High-Throughput Sequencing.....	23
4.2.3 Genome-wide Transcriptome Analysis in the Ovaries of Two Goats Identifies Differentially Expressed Genes Related to Fecundity.....	23
4.3 Análises dos artigos selecionados	27
4.3.1 Whole-Genome Scanning for the Litter Size Trait Associated Genes and SNPs Under Selection in Dairy Goat (<i>Capra hircus</i>).....	27
4.3.1.1 Introdução.....	27
4.3.1.2 Material e métodos	28
4.3.1.3 Resultados.....	28

4.3.1.4 Discussão	34
4.3.2 Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene	35
4.3.2.1 Introdução.....	35
4.3.2.2 Material e métodos	36
4.3.2.3 Resultados.....	36
4.3.2.4 Discussão	37
4.3.2.5 Conclusão.....	38
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	38
REFERÊNCIAS.....	39

RESUMO

As características reprodutivas são de assaz importância para o sistema de produção de caprinos. Dentre essas características, a aplicação da prolificidade pode aumentar o aumento o número de partos múltiplos por ano, a pressão de seleção, redução do intervalo de geração e ganho genético anual. A herdabilidade para essa característica em cabras varia de 0,08 a 0,18. Os estudos de GWAS visam detectar variantes em *loci* genômicos que estão associados às características complexas. Entretanto, poucos estudos genômicos têm sido realizados em caprinos. O objetivo da pesquisa foi realizar uma revisão sistemática visando elucidar os avanços dos estudos genômicos no âmbito da prolificidade em cabras. Foram escolhidas três bases de dados para essa revisão: SCOPUS (2007-2018), PubMed (2008-2018) e BIOMED CENTRAL (2008-2018). Após os trabalhos de revisão, foram identificados 70 artigos de acordo com os seguintes critérios de busca: genomic ou GWAS, reproduction, animal, prolificacy e goat. Dentre eles excluíram-se 4 artigos repetidos, 41 cujos títulos possuíam conteúdo fora da área de estudo proposta, 20 abstracts relatando contexto divergente dessa pesquisa e 3 artigos de texto completo fora do âmbito estudado. Apenas dois artigos atenderam todos os critérios de elegibilidade, e foram elencados como objetos desse estudo. O artigo intitulado “*Whole-Genome Scanning for the Litter Size Trait Associated Genes and SNPs Under Selection in Dairy Goat (Capra hircus)*” utilizando-se dois grupos de cabras da raça Laoshan (alta fertilidade e baixa fertilidade), relataram a existência de genes candidatos relacionados à reprodução. Os genes CCNB2, AR, ADCY1, DNMT3B, SMAD2, AMHR2, ERBB2, FGFR1, MAP3K12 e THEM4 foram especificados para o grupo de cabras de alta fertilidade. Enquanto que KDM6A, TENM1, SWI5 e CYM, foram registrados no grupo de baixa fertilidade. Os genes SYCP2, SOX5 e POU3F4 foram localizados nos dois grupos. O segundo artigo aceito pelos critérios descritos “*Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene*” objetivou uma investigação do polimorfismo do gene BMP15 utilizando as técnicas PCR-RFLP e SNP em quatro raças de cabras no Egito e sua associação com a prolificidade. Os resultados mostraram a existência de sete SNPs, sendo quatro SNPs para alta prolificidade (760 G>C, 757 A>C, 762 G>A, e 769 G>C) e três SNPs para a baixa prolificidade. Os nucleotídeos codificantes de alta prolificidade apareceram em três raças (Alpina, Zaraibe e Baladi). O nucleotídeo de número 760 G>C mostrou presença em todas as cabras de alta prolificidade em todas as raças. Esses SNPs podem ser usados na MAS para melhorar essa característica nos rebanhos.

Palavras-chave: genoma amplo, Seleção Assistida por Marcadores, Prolificidade, Polimorfismo de Nucleotídeo Único

ABSTRACT

The reproductive traits are of importance for the goat production system. Among these characteristics, a prolific application to increase the number of multiple births per year, a selection pressure, reduction of production interval and annual genetic gain. The heritability for this characteristic in goats varies from 0.08 to 0.18. GWAS studies aim to detect variants in genomic *loci* that are associated with complex features. However, few genomic studies have been performed on goats. The objective of this research was to perform a systematic review to elucidate the advances of genomic studies in the field of goat proliferation. Three databases were selected for this review: SCOPUS (2007-2018), PubMed (2008-2018) and BIOMED CENTRAL (2008-2018). After the review work, 70 articles were identified according to the following search criteria: genomic or GWAS, reproduction, animal, prolificacy and goat. Among them, 4 repeated articles were excluded, 41 whose titles had content outside the proposed study area, 20 abstracts reporting divergent context of this research and 3 full-text articles outside the scope studied. Only two articles met all eligibility criteria, and were listed as objects of this study. The article entitled "*Whole-Genome Scanning for the Litter Size Trait Associated Genes and SNPs Under Selection in Dairy Goat (Capra hircus)*" using two groups of Laoshan goats (high fertility and low fertility), reported the existence of candidate genes related to reproduction. The genes CCNB2, AR, ADCY1, DNMT3B, SMAD2, AMHR2, ERBB2, FGFR1, MAP3K12 and THEM4 were specified for the group of high fertility goats. While KDM6A, TENM1, SWI5 and CYM, were recorded in the low fertility group. The SYCP2, SOX5 and POU3F4 genes were located in both groups. The second article accepted by the criteria described "*Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene*" aimed to investigate the polymorphism of the BMP15 gene using PCR-RFLP and SNP techniques in four goat breeds in Egypt and its association with prolificacy. The results showed the existence of seven SNPs, four SNPs for high prolificacy (760 G> C, 757 A> C, 762 G> A, and 769 G> C) and three SNPs for low prolificacy. High prolificacy coding nucleotides appeared in three breeds (Alpina, Zaraibe and Baladi). The nucleotide number 760 G> C showed presence in all goats of high prolificacy in all breeds. These SNPs can be used in MAS to improve this trait in herds.

Keywords: genome wide, Marker Assisted Selection, Prolificacy, Single Nucleotide Polymorphisms

1 INTRODUÇÃO

A criação de caprinos é uma atividade de assaz importância, especialmente aos pequenos produtores, devido a facilidade de produção, lucratividade, assim como a sua boa adaptação aos diversos tipos de ambientes. Em todos os países em desenvolvimento, as cabras são vistas como animais multifuncionais, do ponto de vista socioeconômico e ecológico (DEVENDRA, 2013). Entretanto, os índices produtivos nos rebanhos caprinos são baixos, especialmente nas regiões áridas e semiáridas, resultantes do baixo nível de tecnificação, baixo desempenho reprodutivo (aborto e anestro prolongado), nutrição e suplementação mineral inadequadas, e manejo sanitário pouco eficiente (PEREIRA, 2012; DEVENDRA, 2013; MALHEIROS FILHO et al., 2014).

Em geral, os índices reprodutivos nos caprinos também são baixos e, bem como em outras espécies, a reprodução é um processo sensível às variações do ambiente (SANTOS et al., 2013). Dentre essas características, a prolificidade é de grande interesse para a eficiência do sistema de criação, uma vez que contribui para o ganho genético anual, aumentando a pressão de seleção, redução do intervalo de geração e aumento do número de partos múltiplos por ano (SARMENTO et al., 2010). Embora animais oriundos de partos simples tendam a ser mais pesados em relação aos animais nascidos de partos múltiplos, esses últimos tendem a apresentar ganho compensatório após o desmame em relação aos animais de partos simples (PEREIRA, 2012). Com isso, é possível aumentar os índices produtivos dos rebanhos caprinos incluindo a prolificidade nos programas de seleção. Entretanto, a herdabilidade da maioria das características reprodutivas é baixa, pois têm grande influência do manejo e demais condições ambientais. A herdabilidade para a prolificidade em cabras varia de 0,08 a 0,18 (HAMED et al., 2009; GUNIA et al., 2010; SANTOS et al., 2013). Isso indica que a utilização dos métodos tradicionais de melhoramento genético não contribui com ganhos genéticos promissores. Nesses casos, as técnicas moleculares são recomendadas pois permitem a detecção de genes de efeito maior para determinadas características, podendo aumentar a acurácia dos processos de seleção, principalmente para características com baixa herdabilidade.

As atuais técnicas moleculares têm permitido, por meio de marcadores genéticos, a detecção de regiões cromossômicas associadas às respostas fenotípicas dos animais, homens e plantas. Atualmente, os SNPs têm sido muito promissores na seleção genômica, em razão da capacidade de processamento de milhões de pares de base em apenas um único ensaio, levando a minimização dos custos por base, otimização de tempo, menor ocorrência de erro, além de serem mais abundantes no genoma, trazendo uma maior acurácia na avaliação genética (GUIMARÃES et al., 2013). A utilização desses marcadores, requer a elaboração de modelos inovadores de análises, o que tem mobilizado equipes multidisciplinares concentradas em um único objetivo.

O GWAS visa detectar variantes em *loci* genômicos que estão associados às características complexas (VISSCHER et al., 2012). Atualmente, diversos estudos com abordagens GWAS têm sido evidenciados em algumas espécies de animais domésticos, como bovinos de leite (ISMAIL et al., 2017), bovinos de corte (SANTIAGO et al., 2017), suínos (VAN SON et al., 2017) e ovinos (BERTON et al., 2017). Todavia, embora os métodos de seleção mais refinados sejam realidade em algumas espécies animais, é necessário o estímulo na espécie caprina.

O lançamento do BeadChip goatSNP50, um microarranjo de alto processamento, desenvolvido por Tosser-Klopp et al. (2014) e pelo Consórcio Internacional do Genoma Caprino (IGGC), tornou possível os estudos de GWAS e a descoberta de novos genes com grandes efeitos em caprinos. Essa nova ferramenta tem impulsionado as pesquisas genômicas com caprinos e representa uma valiosa oportunidade para os estudos de diversidade genética e endogamia na produção animal.

Apesar da publicação de alguns estudos com abordagens genômicas envolvendo caprinos, questiona se essas técnicas foram implementadas visando o conhecimento, em nível de DNA, de regiões genômicas envolvidas em processos metabólicos que culminam com a ocorrência de partos múltiplos em cabras. A hipótese é que GWAS pode ser implementado nos programas de seleção para prolificidade em cabras. O objetivo da pesquisa foi realizar uma revisão sistemática visando elucidar os avanços dos estudos genômicos no âmbito da prolificidade em cabras.

2 MATERIAL E MÉTODOS

A revisão sistemática é uma análise de uma questão claramente formulada que utiliza métodos sistemáticos e explícitos para poder identificar, selecionar e avaliar de maneira crítica as pesquisas relevantes (MOHER et al., 2010).

2.1 Critérios de inclusão dos artigos

Optou-se por incluir nessa revisão apenas artigos que abordassem os estudos genômicos da prolificidade em cabras.

2.2 Estratégia de busca

Algumas bases de dados selecionadas previamente não apresentaram resultados de pesquisa relacionados aos descritores preditos: AGRIS, SCIELO, MEDLINE e WEB OF SCIENCE.

Para selecionar os artigos relacionados ao título da pesquisa, foram escolhidas três bases de dados: SCOPUS (<https://www.scopus.com/>) (2007-2018), PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/>) (2008-2018) e BIOMED CENTRAL (<https://www.biomedcentral.com/>) (2008-2018). O filtro de pesquisa foi estruturado uniformemente para as três bases, por meio de operadores booleanos (AND e OR), assim como os códigos de campo All Fields (ALL) e Abstract (ABS), como mostra a Tabela 1. Para a formulação da estratégia, os seguintes descritores foram utilizados: genomic, GWAS, reproduction, prolificacy e goat. Não houve restrição com relação ao idioma e ano.

Tabela 1. Critérios, número de artigos, data e horário das buscas, utilizados para a revisão sistemática nas três bases de dados Scopus, Pubmed e Biomed Central

CRITÉRIOS	Nº DE ARTIGOS	HORÁRIO	DATA
SCOPUS			
ALL (genomic) OR ALL (gwas) AND ALL (animal) AND ALL (reproduction) AND ALL (prolificacy) AND ABS (goat)	40	11:38	23/09/2018

Continuação da Tabela 1

PUBMED			
#1, "Search (genomic) OR GWAS", 1088783, 09:22:18 #2, "Search ((genomic) OR GWAS) AND animal", 533302, 09:22:54 #3, "Search (((genomic) OR GWAS) AND animal) AND reproduction", 59820, 09:24:18	13	09:26	23/09/2018
#4, "Search (((((genomic) OR GWAS) AND animal) AND reproduction) AND prolificacy)", 214, 09:25:52 #5, "Search ((((((genomic) OR GWAS) AND animal) AND reproduction) AND prolificacy) AND goat[Abstract]", 13, 09:26:57			
BIOMED CENTRAL			
genomic OR GWAS AND animal AND reproduction AND prolificacy AND goat	17	12: 14	23/09/18

ALL - todo o texto, OR - ou, AND - e, ABS – abstract.

Fonte: Souza, 2018

2.3 Seleção dos artigos

Dois revisores avaliaram independentemente os títulos e os resumos encontrados pela pesquisa bibliográfica. Após a identificação dos artigos, foram removidas as duplicatas através da comparação entre títulos, autores e ano de publicação. Os critérios utilizados para a exclusão nessa etapa foram os seguintes:

- a) outras espécies: ovinos; suínos; coelhos e camundongos;
- b) metodologia empregadas divergentes das abordagens que envolvem os marcadores SNPs e os estudos de associação;
- c) livros;
- d) características reprodutivas diferentes da “prolificacy” ou “litter size”;

Após a seleção, deu-se início a triagem, de forma que os artigos com resumos iminentemente elegíveis para a inclusão na revisão, foram selecionados para completa leitura. Em seguida, os revisores verificaram se estes atendiam os critérios de elegibilidade.

Posteriormente, os revisores leram e avaliaram detalhadamente cada artigo a fim de identificar todos os estudos convenientes à inclusão na revisão sistemática.

3 RESULTADOS

3.1 Seleção dos estudos

A coleta dos artigos nas respectivas bases de dados seguiu o fluxograma da metodologia realizada por MOHER et al. 2010, representada na figura 1. Após a realização das pesquisas, foram identificadas 70 referências.

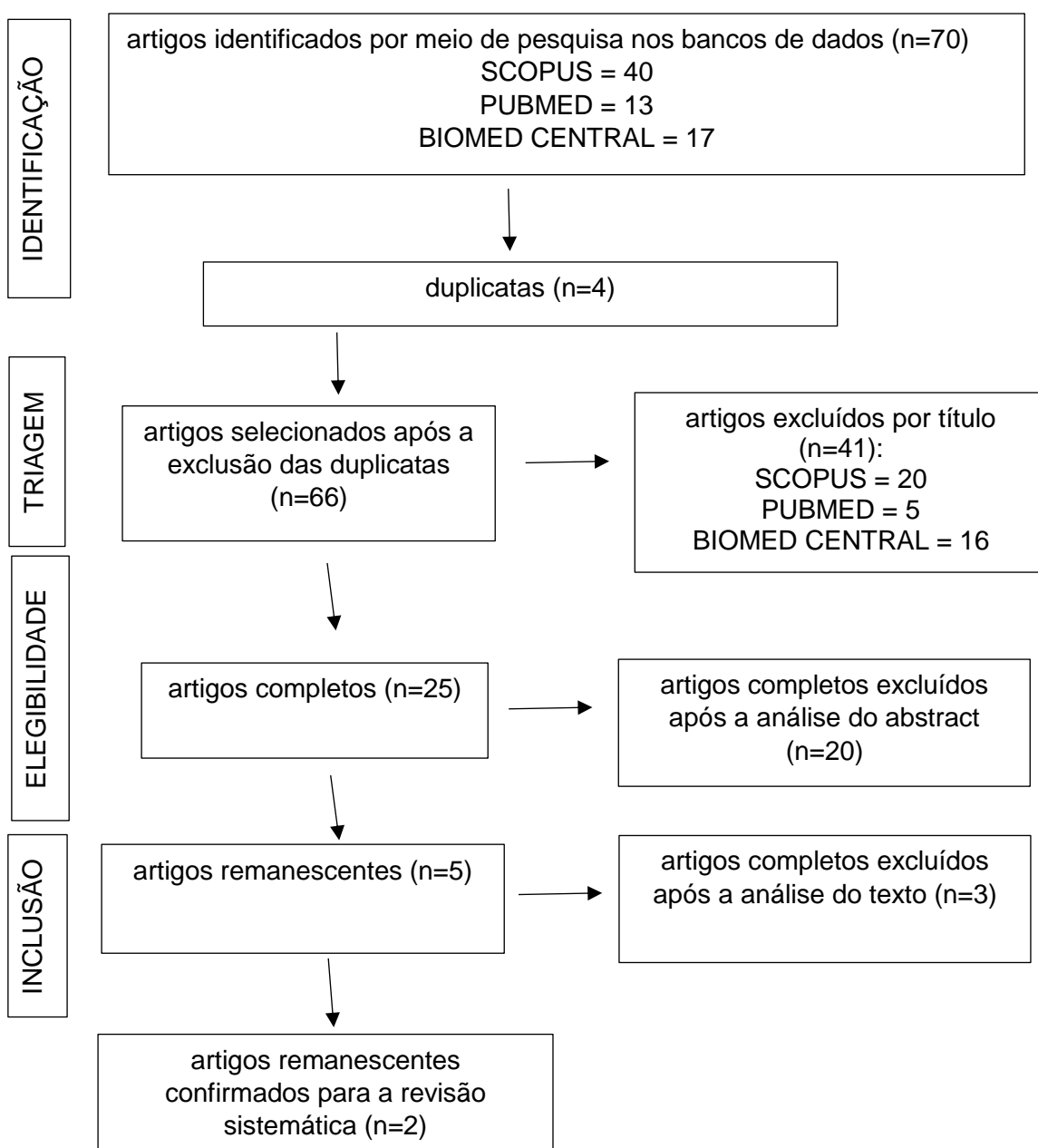


Figura 1. Fluxograma dos artigos selecionados para a revisão sistemática. Baseado na metodologia PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses).

Fonte: Souza, 2018

4 DISCUSSÃO

4.1 Das exclusões

Inicialmente, foram excluídos quatro artigos relacionados na Tabela 2 porque apareceram em duas das bases de dados. Na Tabela 3 estão apresentados os artigos cujas informações no título foram suficientes para exclusão.

Tabela 2 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de repetição de acordo com as bases de dados consultadas

ARTIGO	SCOPUS	PUBMED	BIOMED
Production of transgenic pigs with an introduced missense mutation of the bone morphogenetic protein receptor type IB gene related to prolificacy	X	X	
The association of two single nucleotide polymorphisms (SNPs) in growth hormone (GH) gene with litter size and superovulation response in goat-breeds	X	X	
Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats		X	X
Optimized diffusion of buck semen for saving genetic variability in selected dairy goat populations		X	X

Fonte: Souza, 2018

Tabela 3 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de exclusão conteúdo de título divergente do tema em estudo de acordo com as bases de dados consultadas

ARTIGO	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO – CONTEÚDO DE TÍTULO	BASE
Association of novel SNPs in gonadotropin genes with sperm quality traits of Boer goats and Boer crosses	Característica: Qualidade espermática	SCOPUS
Molecular characterization and expression of the GDF9 gene in New Zealand white rabbits	Espécie: coelhos	SCOPUS
Linear and nonlinear genetic relationships between type traits and productive life in US dairy goats	Características de tipo e vida produtiva	SCOPUS
Heritability and genome-wide association mapping for supernumerary teats in French Alpine and Saanen dairy goats	Característica: tetas supranumerárias	SCOPUS
Production of transgenic pigs with an introduced missense mutation of the bone morphogenetic protein receptor type IB gene related to prolificacy	Espécie suína	SCOPUS
Melatonin receptor 1A gene RsaI and inhibin alpha subunit gene HaeII polymorphisms in Honamli and Hair goat breeds reared in Western Mediterranean region of Turkey	Característica: polimorfismo do gene HaeII	SCOPUS

Continuação da Tabela 3

Exploring differentially expressed genes in the ovaries of uniparous and multiparous goats using the RNA-Seq (Quantification) method	Característica diferente de prolificidade ou litter size	SCOPUS
Associations between polymorphisms of the GF11B gene and growth traits of indigenous Chinese goats	Característica de crescimento	SCOPUS
Screening for S32G mutation of BMP15 gene in 18 goat breeds	Característica: rastreamento de mutação	SCOPUS
Review of modern strategies to enhance livestock genetic performance: From molecular markers to next-generation sequencing technologies in goats	Característica diferente de prolificidade ou litter size	SCOPUS
Designing, optimization and validation of tetra-primer ARMS PCR protocol for genotyping mutations in caprine Fec genes	Característica: otimização e caracterização de validação	SCOPUS
Effect of breed and some environmental factors on body weights till weaning and litter size in five goat breeds in Mexico	Característica: efeito da raça e fatores ambientais	SCOPUS
Analysis on DNA sequence of goat RFRP gene and its possible association with average daily sunshine duration	Característica: duração do dia	SCOPUS
ARMS-PCR as an alternative, cost effective method for detection of fecb genotype in sheep	Espécie ovina	SCOPUS
Limiting factors and strategies for improving reproductive outputs of small ruminants reared in semi-arid environments	Característica diferente de prolificidade ou litter size	SCOPUS
Nutritional and metabolic modulation of the male effect on the resumption of ovulatory activity in goats	Característica: efeito macho na atividade ovulatória de cabras	SCOPUS
Expression sequence tag and QTL/MAS of goat/sheep in China	Utilização de QTL/MAS	SCOPUS
Goat Medicine (Book)	Livro	SCOPUS
Risk factors associated with dairy goats stayability	Característica: stayability	SCOPUS
Current state of development of genome analysis in livestock	Característica diferente de prolificidade ou litter size	SCOPUS
Production of Transgenic Pigs with an Introduced Missense Mutation of the Bone Morphogenetic Protein Receptor Type IB Gene Related to Prolificacy	Espécie suína	PUBMED
Kompetitive Allele Specific PCR (KASP™) genotyping of 48 polymorphisms at different caprine loci in French Alpine and Saanen goat breeds and their association with milk composition	Característica: composição do leite	PUBMED
In vitro culture and characterization of spermatogonial stem cells on Sertoli cell feeder layer in goat (Capra hircus)	Característica: caracterização de células de haste espermatogonial	PUBMED
Comparative profiling of differentially expressed microRNAs between the follicular and luteal phases ovaries of goats	Característica: perfil comparativo de mRNAs	PUBMED

Continuação da Tabela 3

Identification and characterization of microRNAs in the ovaries of multiple and uniparous goats (<i>Capra hircus</i>) during follicular phase	Utilização de mRNAs	PUBMED
Intratesticular injection followed by electroporation allows gene transfer in caprine spermatogenic cells	Característica: células espermatogênicas	PUBMED
Optimized diffusion of buck semen for saving genetic variability in selected dairy goat populations	Característica: difusão do sêmen	PUBMED
Genome-wide analysis of DNA Methylation profiles on sheep ovaries associated with prolificacy using whole-genome Bisulfite sequencing	Espécie ovina	PUBMED
Integrated ovarian mRNA and miRNA transcriptome profiling characterizes the genetic basis of prolificacy traits in sheep (<i>Ovis aries</i>)	Espécie ovina	BIOMED
Including α s1 casein gene information in genomic evaluations of French dairy goats	Gene α s1 caseína	BIOMED
Optimized diffusion of buck semen for saving genetic variability in selected dairy goat populations	Característica: difusão do sêmen	BIOMED
Geographical patterning of sixteen goat breeds from Italy, Albania and Greece assessed by Single Nucleotide Polymorphisms	Padronização geográfica	BIOMED
A missense mutation in growth differentiation factor 9 (GDF9) is strongly associated with litter size in sheep	Espécie ovina	BIOMED
Genome-wide analysis reveals signatures of selection for important traits in domestic sheep from different ecoregions	Espécie ovina	BIOMED
Genetic evaluation with major genes and polygenic inheritance when some animals are not genotyped using gene content multiple-trait BLUP	Padronização geográfica	BIOMED
Copy number variations in high and low fertility breeding boars	Variação no número de cópias	BIOMED
Expression profiling of a high-fertility mouse line by microarray analysis and qPCR	Espécie de camundongos	BIOMED
Divergent activity of the gonadotropin-releasing hormone receptor gene promoter among genetic lines of pigs is partially conferred by nuclear factor (NF)-kB, specificity protein (SP)1-like and GATA-4 binding sites	Espécie suína	BIOMED
Fat deposition deficiency is critical for the high mortality of pre-weanling newborn piglets	Espécie suína	BIOMED
Ovine reference materials and assays for prion genetic testing	Espécie ovina	BIOMED
Transcriptome analysis of porcine PBMCs after in vitro stimulation by LPS or PMA/ionomycin using an expression array targeting the pig immune response	Espécie suína	BIOMED
Population structure and genetic diversity of 25 Russian sheep breeds based on whole-genome genotyping	Espécie ovina	BIOMED
Genome-wide analysis reveals population structure and selection in Chinese indigenous sheep breeds	Espécie ovina	BIOMED

Fonte: Souza, 2018

Vinte e cinco artigos completos foram potencialmente elegíveis para inclusão na revisão, porém vinte foram excluídos pois não atenderam os critérios de elegibilidade (Tabela 4). Dessa forma, cinco artigos completos foram incluídos na revisão sistemática.

Tabela 4 - Exclusão dos artigos resultantes da revisão sistemática (Genomic; GWAS; Animal; Reproduction; Prolificacy) usando o critério de exclusão conteúdo de abstract divergente do tema em estudo de acordo com as bases de dados consultadas

ARTIGO	CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	BASE
Insertion/deletion within the KDM6A gene is significantly associated with litter size in goat	Característica: revisão dos genes candidatos	SCOPUS
Analysis of the SNP loci around transcription start sites related to goat fecundity trait base on whole genome resequencing	Não abordou o estudo de GWAS	SCOPUS
Polymorphisms of caprine GnRHR gene and their association with litter size in West African Dwarf goats	Característica: Identificações de mutações dentro do gene e investigar sua associação com a fertilidade	SCOPUS
Association of exon 2 of BMP15 gene with the litter size in the Raini Cashmere goat	Indisponível para download	SCOPUS
Current status of molecular genetics research of goat fecundity	Não abordou o estudo de GWAS	SCOPUS
Identification of novel SNPs in INHBB gene of Indian goat	Indisponível para download	SCOPUS
Novel PCR-RFLP for detecting single nucleotide polymorphism in exon1 of GPR54 gene and its association with age at first kidding in goats	Indisponível para download	SCOPUS
Polymorphism and nucleotide sequencing of BMPR1B gene in prolific Assam hill goat	Característica: Detector a incidência de mutação na região exônica do gene BMPR1B	SCOPUS
Association analysis of polymorphisms in caprine KiSS1 gene with reproductive traits	Não abordou o estudo de GWAS	SCOPUS
Polymorphism study of growth differentiation factor 9B (GDF9B) gene and its association with reproductive traits in sheep	Espécie ovina	SCOPUS
Polymorphism in exon 2 of INHBB gene and its relationship with litter size in Jining grey goats	Indisponível para download	SCOPUS
Novel single nucleotide polymorphisms of GnRHR gene and their association with litter size in goats	Indisponível para download	SCOPUS
Polymorphism of GDF9 gene and its association with litter size in goats	Não abordou o estudo de GWAS	SCOPUS
Polymorphism of PRLR and LH β genes by SSCP marker and their association with litter size in Boer goats	Característica: análise do efeito polimórfico de genótipos e combinações genotípicas dos genes PRLR e LH β	SCOPUS
Study of BMP-15 gene polymorphism in Iranian goats	Indisponível para download	SCOPUS
Association between PCR-SSCP of bone morphogenetic protein 15 gene and prolificacy in Jining Grey goats	Indisponível para download	SCOPUS
Genome-wide analysis of miRNAs in the ovaries of Jining Grey and Laiwu Black goats to explore the regulation of fecundity	Não abordou o estudo de GWAS	PUBMED
The association of two single nucleotide polymorphisms SNPs in growth hormone (GH) gene with litter size and superovulation response in goat-breeds	Não abordou o estudo de GWAS	PUBMED

Continuação da Tabela 4

Novel polymorphism of AA-NAT gene in Indian goat breeds differing in reproductive traits	Característica: status parcial do gene AA-NAT	PUBMED
Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats	Não abordou o estudo de GWAS	BIOMED

Fonte: Souza, 2018

Após essa etapa, restaram **cinco artigos**, dos quais **três foram excluídos** por texto completo, totalizando apenas dois artigos para serem elencados como objeto de estudo da pesquisa, sobre os quais foram realizadas análises completas.

4.2 Artigos excluídos por texto completo

4.2.1 Advances in Molecular Breeding Research of Goat Fecundity

JIAN-YING WANG, ZOU-RAN LAN, XIU-MEI ZHANG

Journal of Animal and Veterinary Advances, v. 11, n. 4, p. 449-453, 2012.

Esse estudo é um artigo de revisão e relata importantes avanços na genética molecular na característica prolificidade em cabras. Os autores fazem um breve histórico dos avanços da genética desde a descoberta da dupla hélice do DNA até o desenvolvimento dos marcadores de primeira, segunda e terceira geração (SNPs) e dos mapas genéticos de alta precisão indicando os benefícios desses avanços para o estudo.

Nesse artigo são apresentados resultados de várias pesquisas com genes candidatos indicando exercerem um importante papel na capacidade reprodutivas das cabras. Entretanto, não foram mencionadas as abordagens de GWAS ou a seleção genômica. Provavelmente, porque esse estudo foi publicado em 2012 e, o desenvolvimento do microarranjo de alto processamento das plataformas de genotipagem dos caprinos, BeadChip GoatSNP50, foi somente publicada por TOSSER-KLOPP et al. no ano de 2014.

O primeiro estudo abordando o tema em questão, foi Whole-genome Scanning for the Litter Size Trait Associated Genes and SNPs Under Selection in Dairy Goat, de Lai e colaboradores, publicado em 2016.

4.2.2 Identification and Comparative Analysis of the Ovarian microRNAs of Prolific and Non-prolific Goats During the Follicular Phase Using High-Throughput Sequencing

XIANG-DONG ZI, JIAN-YUAN LU, LI MA

Scientific Reports, 7, 2017

Nesse artigo, os autores fizeram uma comparação de microRNAs ovarianos oriundos de dois grupos de cabras. Um grupo formado por cabras prolíficas (Jintang black), e o outro, por cabras Tibeitanas não prolíficas, durante a fase folicular usando uma tecnologia de sequenciamento de RNA. Após as análises e leituras do RNA, os resultados mostraram um total de 389 e 142 miRNAs conhecidos, para as raças Tibeitanas e Jintang black, respectivamente.

Os resultados revelaram que miR-21, miR-99^a, miRNA-143, let-7f, miR-493 e miR-200b podem afetar o desenvolvimento folicular, indicando o papel dos miRNAs na taxa de ovulação das cabras.

4.2.3 Genome-wide Transcriptome Analysis in the Ovaries of Two Goats Identifies Differentially Expressed Genes Related to Fecundity

XIANGYANG MIAO, QINGMIAO LUO, XIAOYU QIN

Gene, 582, 69-76, 2016

Embora esse artigo tenha sido excluído da presente revisão sistemática proposta, foi apresentado aqui uma breve explanação sobre o tema abordado, em virtude do potencial inovador e da contribuição de seus resultados nas considerações finais dessa revisão.

Abstract

Foram implementados sequenciamentos de genomas amplos de RNA mensageiros em duas raças de cabras usando uma tecnologia de sequenciamento de RNA e anotações funcionais para identificar as vias metabólicas de interesse. As análises de expressão digital mostraram que 338 genes regulavam as cabras Jining Grey e 404 regulavam as cabras Laiwu Black. Uma análise de PCR real time verificou a confiabilidade dos dados sequenciados de RNA. Esse estudo sugere que múltiplos genes responsáveis por várias

funções biológicas e vias metabólicas se expressam de maneiras diferentes em cada uma das duas raças de cabras. Tais genes podem estar envolvidos na regulação de fecundidade e prolificidade das cabras.

Introdução

As análises de transcriptoma são um efetivo modo de analisar processos biológicos a nível molecular. A nova tecnologia de sequenciamento do RNA, usa o sequenciamento profundo de última geração e é considerada como uma excelente ferramenta para as análises de RNA.

Embora seja conhecido que a fertilidade em ovelhas depende de múltiplos genes, incluindo o gene Bone Morphogenetic Protein 15 (BMP15) e o receptor do gene BMP15 na raça Boorola (BMPR1B), pouco se sabe sobre os determinantes genéticos da fecundidade e prolificidade das cabras.

A Jining Grey é uma raça local da China com média de prolificidade de 2,94. Por outro lado, a cabra Laiwu Black tem prolificidade bem mais baixa que a Jining Grey. Alguns resultados de pesquisa indicam que o gene BMPR1B seja um “major” gene para prolificidade em cabras Black Bengal. Ele também está associado com as diferenças reprodutivas entre Lezhi Black e cabras Tíbetanas. Essas informações e outros detalhes sugerem que as análises genômicas amplas de RNA mensageiro das raças Jining Grey e Laiwu Black com diferentes potenciais para prolificidade, devem ser examinadas para descobrir o potencial dos mecanismos moleculares da fecundidade em cabras.

Material e métodos

O experimento foi aprovado pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais do Instituto de Ciências Animais da Academia Chinesa de Ciências Agrícolas. Foram selecionadas cinco fêmeas Laiwu Black e cinco fêmeas Jining Grey da mesma idade, apresentando um bom estro. Após 4-5 h da detecção do estro, as cabras foram abatidas e os ovários foram removidos, imediatamente congelados em nitrogênio líquido, e armazenados a -70° C para a extração do RNA. O RNA das cinco cabras de cada grupo foi misturado para gerar duas bibliotecas, que foram diluídas para 4nM, e uma alíquota de 120 mL foi usada para gerar agrupamentos numa célula de fluxo emparelhada utilizando o cBOT (Illumina) e sequenciada no Illumina Genome Analyzer Iix (GAllx) usando o SBS

36-cycle Sequencing Kit v5. As leituras limpas foram mapeadas para sequências de genes de referência de cabra e para sequências de genoma de referência de cabra estabelecidas usando o alinhador SOAP / SOAP2.

No fluxo de trabalho das análises de bioinformática, o índice do genoma de referência foi construído por meio do Bowtie v2.0.6, e as leituras limpas foram alinhadas ao genoma de referência usando o TopHat v2.0.9 The Cufflinks v2.1.1 Reference Annotation Based Transcript (RABT). As leituras originais do sequenciamento de mRNA foram filtradas e apenas as tags de mapeamento exclusivas foram usadas na análise de expressão gênica. O software utilizado para identificar os genes expressados diferencialmente foi o IDEG6.

O GO é um sistema padronizado de classificação funcional dos genes, que tem por objetivo descrever de forma abrangente as propriedades dos genes e seus produtos. Foram utilizados três vocabulários: componente celular, função molecular e processo biológico. A associação dos genes com diferentes vias, foi calculada por meio da base de dados da Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG).

As expressões de vários mRNAs foram confirmadas por PCR. O cDNA foi sintetizado a partir do RNA por transcrição reversa, utilizando o kit de reagentes PrimerScript RT (TaKara, Japan) no GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA).

Resultados

Mais de 25 milhões de leituras foram obtidas para cada raça. Os dados mostraram que 13.454.559 e 13.588.179 foram unicamente mapeados para as cabras Jining Grey e Laiwu Black, respectivamente. Durante a transcrição do gene, uma variedade de mRNAs pode gerar do mesmo modelo de DNA pelo processo de splicing alternativo, e esse splicing pode ser traduzido em diferentes proteínas. São geralmente reconhecidos sete tipos de splicing alternativo: exon skipping, retenção de intron, exon mutuamente exclusivo, primeiro exon alternativo, último exon alternativo, local de emenda alternativo 5' e local de emenda alternativo 3'.

Foram encontrados 742 genes expressados diferentemente entre Jining Grey e Laiwu Black. Entre as diferenças gênicas expressas 338 foram reguladas para cima na raça Jining Grey 404 foram reguladas para cima em Laiwu Black.

Os resultados de GO e KEGG sugerem que um gene pode estar envolvido em diversos caminhos ou interagindo com vários outros genes (Figura 2).

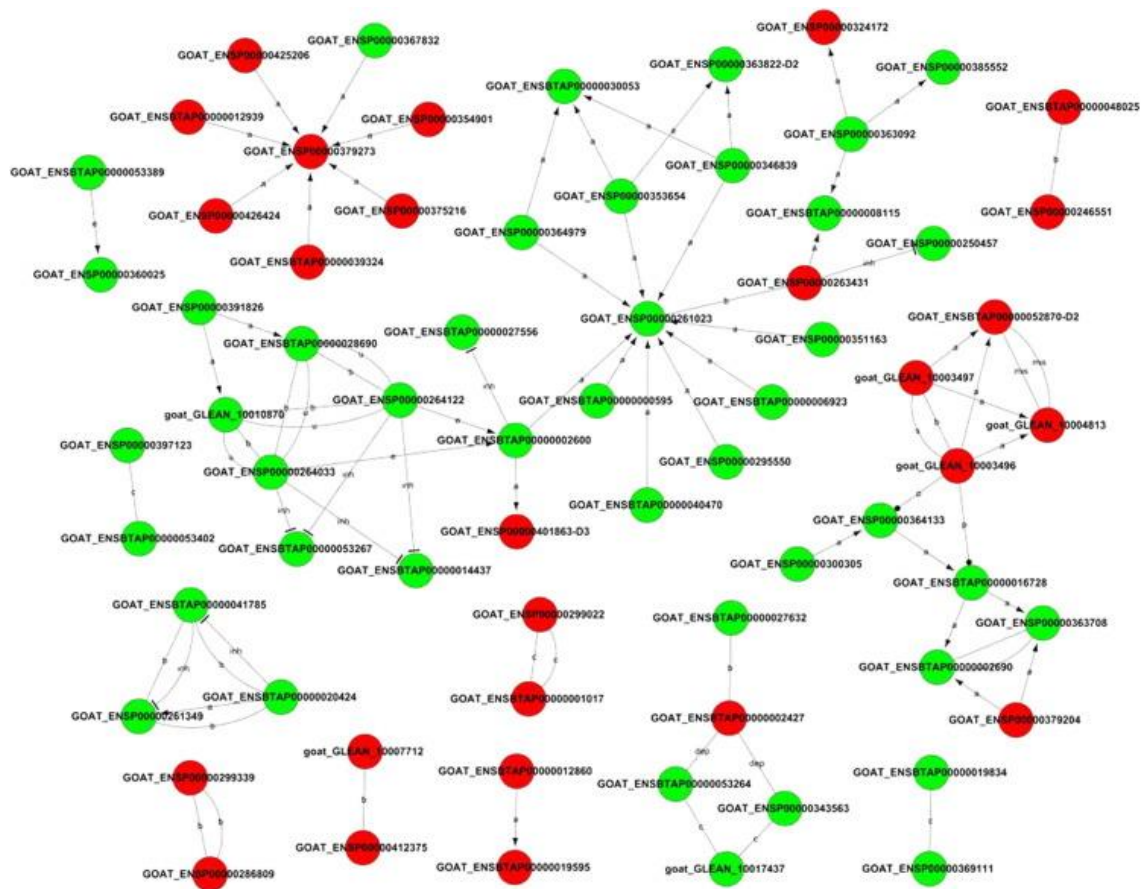


Figura 1. Um Gene-Act network das interações entre os genes diferencialmente expressados. Vermelho indica regulação para cima e verde representa regulação para baixo. Fonte: Miao et al, 2016

Os resultados do RNA-seq indicaram que a expressão de IGF1R, BMPR1B, TGFBR1, SMAD3, SRD5A2 e BMPR2 foram regulados para cima em Jining Grey.

Discussão

Os resultados do RNA-seq encontraram BMPR1B como um dos genes diferencialmente regulados entre as duas raças, indicando também que esse gene pode ser importante na fecundidade de cabras. Esse estudo pode fornecer informações para estabelecer uma ligação entre a variação de fecundidade e metabolismo, bem como outros processos biológicos em cabras. O KEGG identificou vários caminhos de sinalização nos genes expressados

diferencialmente, tal como o TGF- β e o mitógeno. Esses caminhos podem desempenhar um papel na fecundidade de cabras, e os genes identificados devem ser explorados com o objetivo de avaliar essas relações. Com a utilização do RNA-seq, foi possível caracterizar os genes expressados diferencialmente entre as cabras Jining Grey e Laiwu Black, identificando várias funções biológicas e caminhos de sinalização que fornecem informações sobre quais genes podem estar envolvidos na regulação da fecundidade e prolificidade de cabras.

Contudo, após a explanação do artigo acima, a sua exclusão foi realizada porque embora o objetivo do estudo tenha sido a prolificidade de cabras em nível molecular, os autores empregaram a técnica de análises de sequenciamento do RNA expresso nos ovários das cabras. Sendo, portanto, bastante distinto dos objetivos propostos nessa revisão.

4.3 Análises dos artigos selecionados

4.3.1 Whole-Genome Scanning for the Litter Size Trait Associated Genes and SNPs Under Selection in Dairy Goat (*Capra hircus*)

FANG-NONG LAI, HONG-LI ZHAI, MING CHENG, JUN-YU MA, SHUN-FENG CHENG, WEI GE, GUO-LIANG ZHANG, JUN-JIE WANG, RUI-QIAN ZHANG, XUE WANG, LING-JIANG MIN, JIU-ZHOU SONG, WEI SHEN

Scientific Reports, 2016

4.3.1.1 Introdução

As cabras leiteiras da raça Laoshan foram divididas em duas populações, uma caracterizada de baixa fecundidade (BF) e a outra de alta fecundidade (AF), as quais identificadas com 12.458.711 e 12.423.128 SNPs, respectivamente. O número de *loci* e de genes candidatos foram escaneados independentemente. Os genes relacionados com a reprodução de alta fecundidade foram: CCNB2, AR, ADCY1, DNMT3B, SMAD2, AMHR2, ERBB2, FGFR1, MAP3K12 e THEM4, enquanto que KDM6A, TENM1, SWI5 e CYM foram especificamente relacionados como o grupo de baixa fecundidade.

Muitos marcadores genéticos têm sido associados com a prolificidade. Em um estudo anterior, foi demonstrado que a mutação no SNP G1534A em exon 2 da proteína BMP4 em cabras indianas Black Bengal e Jakhrana, é relacionada às variações observadas na prolificidade. Semelhantemente, dois SNPs (g.151435C>T, g. 173057T>C) no exon 2 e 3' região não traduzida (3' UTR) do PRLR também apresentaram essa relação. O objetivo do estudo foi focar em cabras leiteiras Laoshan, utilizando técnicas modernas de sequenciamento para o rastreamento dos SNPs de alta fecundidade. Essa raça tem como características o estro sazonal, produção de 800kg de leite em 270 dias, e prolificidade média de 1,7 crias por parto.

4.3.1.2 Material e métodos

Declaração de Ética

Os processos desenvolvidos no estudo foram observados pela administração de Ciência Animal e aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Agrícola do Qingdao, (acordo nº. 2013-16).

Sequenciamento de pools do genoma amplo de animais

O DNA genômico foi extraído do tecido da orelha de cada cabra usando o QIAamp DNA Kit (QIAGEN, 51304, Hilden, Germany). O grupo com baixo rendimento foi constituído por 20 indivíduos, com o valor de prolificidade de um. O grupo com alto rendimento foi constituído por 14 indivíduos, onde 13 tinham prolificidade de 3, e um com prolificidade 4. O DNA de cada membro do grupo foi misturado em quantidades equimolares (2 μ / amostra) de forma a estabelecer bibliotecas de sequenciamento de dois pares.

4.3.1.3 Resultados

Sequenciamento e mapeamento

O DNA genômico foi purificado individualmente nas 34 cabras Laoshan, com fecundidade significativamente diferentes ($P < 0,01$). Foram selecionadas cabras com BF ($n=20$, $LS=1,00 \pm 0,00$) e AF ($n=14$, $LS=3,07 \pm 0,27$), cujos DNA foram misturados equivalentemente.

Chamada e anotação do SNP

Os SNPs foram contados e as médias de heterozigosidade foram calculadas em janelas de leitura de 150KB. O número total de SNPs por cada janela foi semelhante entre os grupos BF e AF (Figura 3). Porém, comparando com o grupo BF, a heterozigosidade média do SNP mostrou uma acentuada redução no grupo AF nas regiões 67,05-67,50 e 82,35-83,10 MG do cromossomo X, 10,65-10,80 na região do cromossomo 18, 82,35-82,50 MG do cromossomo 12, e 65,70-66,15 MB na região do cromossomo 8.

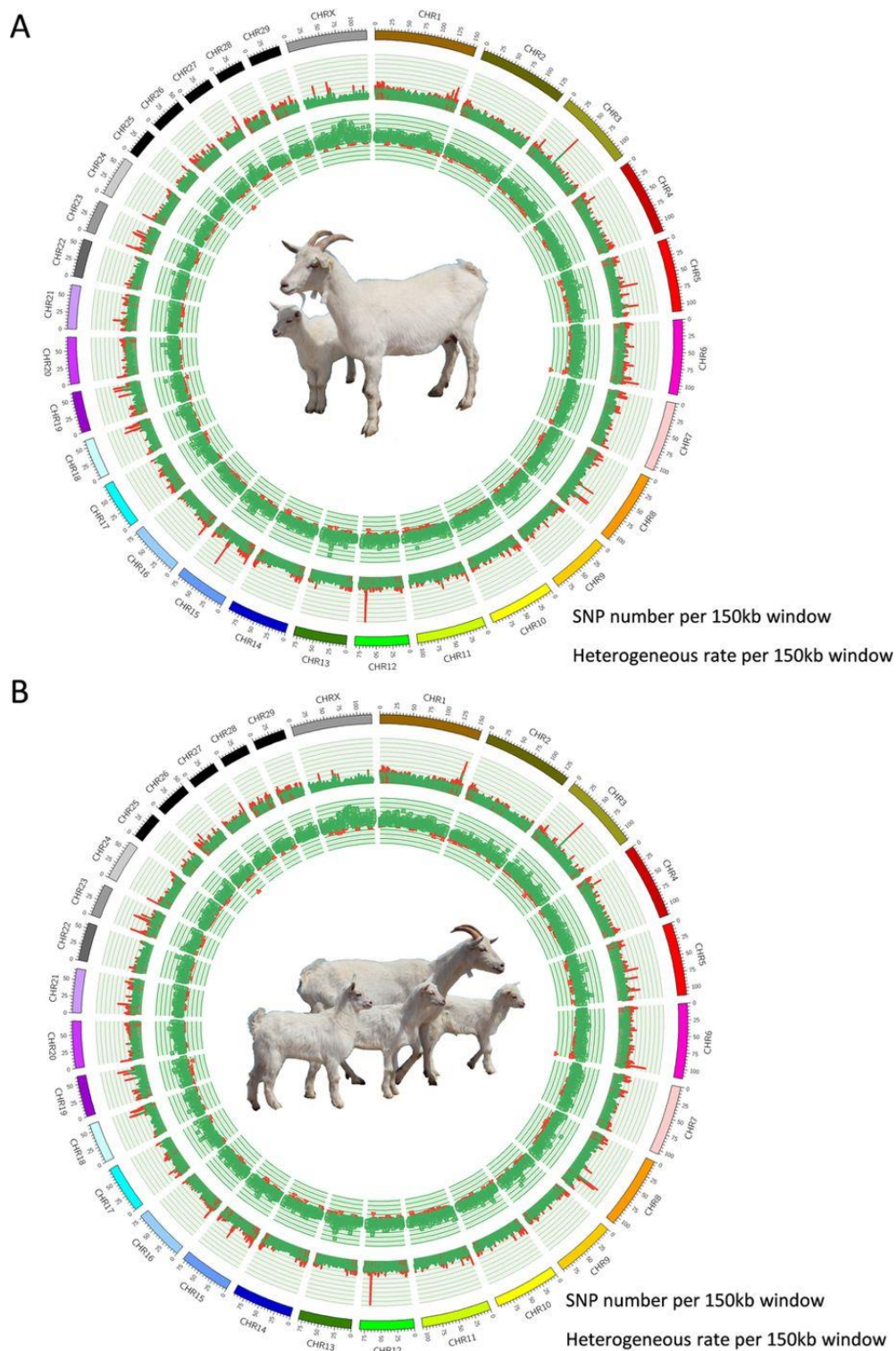


Figure 3. Circos plot de distribuição de SNP de cromossomos em cabras. Distribuição de SNP em (A) a baixa fecundidade (BF) do grupo misturado e (B) a alta fecundidade (AF) do grupo misturado. O círculo mais externo retrata os ideogramas de cada cromossomo
Fonte: Lai et al, 2016

Análise de varredura seletiva em todo o genoma

A heterozigosidade (Hp) foi estimada dos dados de polimorfismo genético e usadas na população genética de análise. 33.643 janelas do cromossomo foram acessadas e calculados os escores de transformação-Z para Hp (ZH_p), variando de -11,72 a 4,36, e -12,53-4,24 em BF e AF, respectivamente. A diferença foi apenas para a prolificidade, uma vez que os grupos BF e AF pertencem a mesma raça caprina. A maioria dos escores de heterozigosidade mostrou uma pequena variação entre os grupos BF e AF. Após as análises de varredura selecionadas, foram determinados os SNPs homozigotos dentro da janela no grupo AF e heterozigotos no grupo BF. A região mais representativa foi:

46,58-46,65MB no cromossomo 7 (D-ZH_p = -8,05, BF-ZH_p = 2,50, AF-ZH_p = -5,55), pelo qual contém o gene SIL1 (SIL1 nucleotide exchange factor).

Outras regiões que foram fortemente selecionadas:

77,40-77,47MB (D-ZH_p = -7,84) no cromossomo 11;

47,70-47,85MB (D-ZH_p = -5,67) no cromossomo 15;

46,35-46,50MB (D-ZH_p = -5,12) e 68,55-68,70MB no cromossomo X.

Essas regiões continham:

RHOB (ras homolog family member B);

PUM 2 (pumilio RNA – binding family member 2);

RRM1 (ribonucleotide reductase M1);

STIM1 (stromal interaction molecule 1);

CTNNA1 (catenin alpha 1);

RRTM2 (leucine rich repeat transmembrane neuronal 2);

ZDHHC15 (zinc finger, DHHC-type containing 15), respectivamente (Figura 4 A).

O *F_{st}* é uma estatística métrica que tem o objetivo de avaliar o grau de diferenciação genética entre as populações selecionadas naturalmente ou artificialmente. As regiões 54,15-54,90MB no cromossomo 8 contém TLE4 (transducing-like enhance of Split 4), e a região mais diferenciada entre os grupos BF e AF (*F_{st}* = 0,284, e *ZF_{st}* = 4,0965). Em seguida, as regiões da seleção artificial mostraram diferenciação entre os grupos BF e AF, tal como:

15,23-15,30MB (ZFst = 3,769) no cromossomo 10;
 26,70-26,85MB (ZFst = 3,769) no cromossomo 25;
 26,78-26,85MB (ZFst = 3, 6286) no cromossomo 25;
 58,50-58,65MB (ZFst = 3,6286) no cromossomo X.

Essas regiões continham:

COR2B (coroin, actin binding protein, 2B);
 TRNAR-UCG (transfer RNA arginine, anticódon UCG);
 ITGAL (integrin alpha L);
 ZNF768 (zinc finger protein 768);
 ZNF689 (zinc finger protein 689);
 e DACH2 (dachshund family transcription fator 2) (Figura 4 B).

Os escores de ZHp e ZFst foram combinados, e foram selecionados 5% do escore ZHp mínimo e 5% máximo do score ZFst.

Um conjunto de janelas de “overlapping” (sobreposição) compartilhadas entre AF e BF foram selecionadas. Os genes em regiões compartilhadas como DACH2, SWI5, e MRPS24 contendo SNPs são muito diferentes entre os grupos BF e AF e também por conter mais SNPs homozigotos. A triagem selecionou 73 janelas genômicas únicas e fixas, contendo 137 genes candidatos no grupo AF, onde foram selecionados vários genes relacionados com a reprodução:

Genes relacionados com a meiose do oócito CCNB2 (cyclin B2);
 AR (androgen receptor);
 ADCY1 (adenylate cyclase 1);
 DNMT3B (DNA cytosine - 5 – methyltransferase 3 beta);
 SMAD2 (SMAD family member 2);
 e AMHR2 (aiti-Mullerian hormone receptor, type II).

Todos são envolvidos na via de sinalização do TGF-beta ERBB4 (erb – b2 receptor tyrosine kinase 4) e ADRA1B (adrenoceptor alpha 1B) a qual estão envolvidos na via de sinalização do cálcio, FGFR1 (fibroblast growth fator receptor 1) e MAP3K12 (mitogen-activated protein kinase kinase kinase 12).

No grupo BF, 68 janelas genômicas fixas contendo 113 genes candidatos:
 PROK1 (prokineticin1);
 CHD7 (Chromodomain helicase DNA binding protein 7);

KDM6A (lysine K-specific demethylase 6^a)

TENM1 (teneurin transmembrane protein 1);

e SWI5 (SWI5 homologous recombination repair protein).

Com relação à janela compartilhada, foram encontrados genes como SYCP2 (synaptonemal complex protein 2), SOX5 (SRY sex determining region Y – box 5), e POU3F4 (POU class 3 homeobox 4).

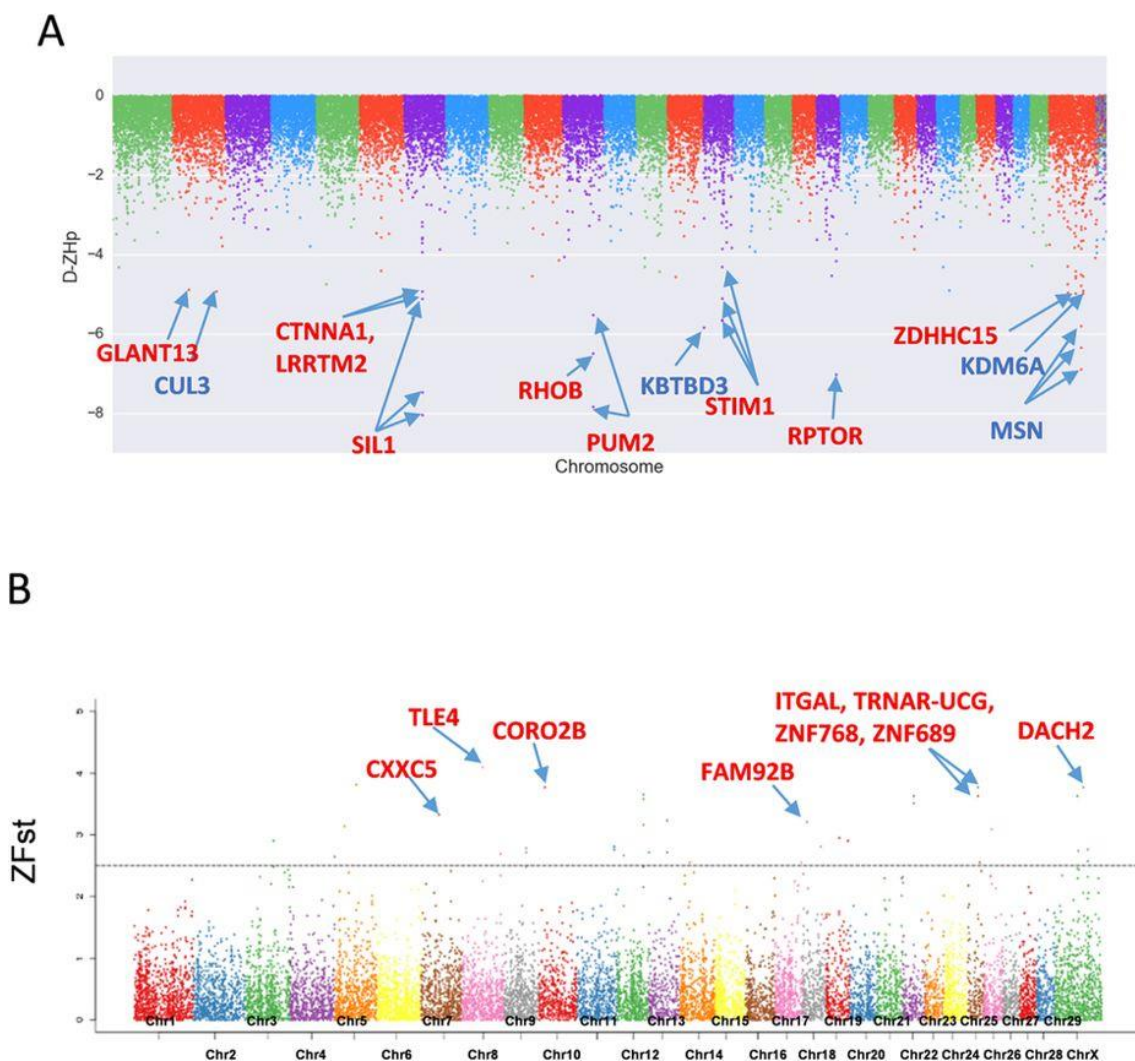


Figura 4. **(A)** Transformação-Z do genoma amplo do diferencial de heterozigosidade (D-ZHp, ZHp-HF- ZHp-LF) manhattan plot entre os grupos BF e AF. Os nomes vermelhos são alguns dos genes contidos no grupo D-ZHp mínimo na janela de 150 KB. Nomes de homozigose média de vermelho ou azul nos grupos BF e AF. **(B)** Transformação-Z do genoma amplo da Estatística F (Z-Fst) manhattan plot entre os grupos de BF e AF. Nomes vermelhos são alguns dos genes contidos no Z-Fst máximo na janela de 150KB.

Fonte: Lai et al, 2016

Substituição nonsynonymous e nonsense em cabras de alta e baixa fecundidade

Foram encontrados 931 nonsynonymous, 6 stop gain e 2 stop loss nonsense, e 1277 SNPs synonymous homólogos específicos para o grupo AF. Semelhantemente, 893 nonsynonymous, 5 stop gain e 3 stop loss nonsense, e 1081 SNPs synonymous homólogos específicos para o grupo BF. Esses resultados demonstram que as substituições nonsynonymous nonsense podem não desempenhar uma função predominante em uma seleção positiva para características de fecundidade. Foram determinados o número e a distribuição de SNPs alterando a proteína de tradução nos grupos BF e AF e descobriram que o número variava em cromossomos 7, 15, 21 e X. Posteriormente, foram selecionados aleatoriamente 10 amostras de cada grupo BF e AF, e verificaram 5 SNPs utilizando o sequenciamento de alto rendimento (**C1540T** em SETDB2, **T1034C**, **G1035A** e **T1063C** em CDH26), enquanto o SNP exônico no gene CYM não foi consistente com o sequenciamento de alto rendimento.

4.3.1.4 Discussão

O estudo disponibiliza um diferencial na varredura em todo o genoma, baseado nas características de fecundidade em cabras leiteiras. Após a triagem, várias substituições foram selecionadas na população de fecundidade alta. Esse foi o primeiro estudo de análise de varredura na escala genômica ampla em cabras leiteiras, na qual foram selecionadas naturalmente uma população de cabras leiteiras Laoshan com alta fecundidade, com o intuito de que algumas substituições genéticas podem ser enriquecidas naturalmente ou derivadas de genes associados à fecundidade alta. Usando uma seleção de janela fixa, foram selecionados os genes candidatos associados ao grupo de fecundidade alta. Os SNPs homólogos foram contados e resultaram em uma tradução alterada, encontrados especificamente no grupo AF, identificado apenas o SETDB2. Foi demonstrado que a substituição do SNP exônico c.C1540T foi selecionado sob seleção artificial bem como a tradução alterada de SETDB2 no grupo AF. Foi descoberto que comparados com os 928 SNPs nonsynonymous, 8 SNPs nonsense provavelmente não desempenham funções primárias nas características de fecundidade. Os SNPs nonsynonymous estão localizados nos

genes candidatos compartilhados, como c. A65G em CD3D no grupo BF e c. A1063G, c. G1035A, c. T1034C em CDH26 e c. G560A em EML1 no grupo AF. Tais SNPs nonsynonymous foram selecionados tendo como forte diferenciação genética entre os grupos, e podem desempenhar funções importantes na característica de fecundidade.

A prolificidade, a qual envolve múltiplos genes e *loci*, é uma característica quantitativa complexa, e a identificação de todos os genes e *loci* candidatos associados à prolificidade é um grande obstáculo para a genética moderna. A triagem de alto rendimento para a combinação de polimorfismos múltiplos genotípicos é de assaz importância, porém, é necessária uma verificação adicional das variações, devido a limitação de custo e modelo experimental.

Para conclusão, foram rastreados os SNPs encontrando diferentes performances na fecundidade na escala genômica em cabras leiteiras. Foram identificados genes candidatos tais como CCNB2, SYCP2, KDM6A e outros que podem fazer parte da formação dessas características. E os SNPs nonsynonymous homólogos em SETDB2, CYM, CDH26, EML1 e CD3D podem desempenhar funções importantes na característica de fecundidade em cabras Laoshan.

4.3.2 Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene

HANIM SHABAAN MOHAMMED HEIKAL, WALAA SLOUMA HAMOUDA ABD EL NABY

Advances in Animal and Veterinary Sciences, 5, 10, 410-415, 2017

4.3.2.1 Introdução

O objetivo desse estudo foi investigar o polimorfismo do gene BMP15 pela técnica de PCR-RFLP e SNP e sua associação com a prolificidade em quatro raças de cabras (Zaraibe, Baladi, Damascus e Alpina) no Egito. Resultados promissores de pesquisas relacionando o gene BMP15 com a prolificidade em ovelhas motivaram os autores a conduzir esse trabalho. O gene BMP15 é um fator de crescimento derivado do ovário, o qual é essencial para o desenvolvimento folicular (HANRAHAN et al., 2004). Carneiros com duas cópias

de gene BMP15 inativo (homozigoto para essa mutação) são inférteis e apresentam falhas no ovário primário. Enquanto que, carneiros com um único gene BMP15 inativo (heterozigoto para essa mutação) são férteis e os efeitos dessas mutações na taxa de ovulação são aditivas (DAVIS et al., 1991, 1993; HANRAHAN et al., 2004).

4.3.2.2 Material e métodos

Foram utilizadas quatro raças de cabras na Estação de Pesquisa em Produção animal em Sakha no Egito: 14 Baladi, 15 Zaraibi, 11 Damascus e 10 Alpinas. Foram extraídas amostras de DNA e realizadas amplificações do gene BMP15 pela reação de PCR (Polimerase Chain Reaction). Em seguida, os produtos da PCR foram conduzidos para as análises de digestão PCR-RFLP (Polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism).

Os produtos do PCR foram purificados e enviados para o sequenciamento (3PCR/goat) na Companhia Invitrogen, na Alemanha. Os resultados do sequenciamento foram analisados usando programa para detectar os SNPs.

4.3.2.3 Resultados

Foram obtidos PCR e escaneadas as mutações de BMP15 em 50 fêmeas com no mínimo um registro de prolificidade. Os produtos de PCR renderam um fragmento de 141 bp. A técnica de RFLP indicou a presença de uma banda monomórfica sem corte entre todos os animais estudados.

Foi realizada as análises de sequenciamento do BMP15 (141 pb) em 11 fêmeas representado as quatro raças de cabra (7 de alta prolificidade e 4 de baixa prolificidade). Os resultados do sequenciamento de todas as fêmeas mostraram sete SNPs entre as raças de cabras estudadas, com alta e baixa fertilidade.

Os resultados revelaram que haviam 3 SNPs nas cabras Zaraibi de número 6, 14 e 10, as quais tinham a prolificidade de 4, 4 e 3 respectivamente. Os autores relataram que dois desses SNPs podem ser usados na MAS para o melhoramento da prolificidade na raça Zaraibi.

A cabra número 17 da raça Baladi, com prolificidade de 3 crias, apresentou 5 SNPs, os quais promovem substituições de quatro aminoácidos correspondentes.

Também, na raça Alpina, a cabra de número 7 (com prolificidade 2) tinha os mesmos SNPs da cabra 17 da raça Baladi, com exceção de apenas um. De forma que, esses quatro SNPs podem ser usados na MAS nas raças Baladi e Alpina para melhorar a prolificidade.

A cabra 15 da raça Damascus com prolificidade 2, apresentou apenas um SNP, o qual promove mudança no seu aminoácido correspondente.

Em geral, os resultados mostraram que existem vários SNPs que podem ser usados na MAS para melhorar a prolificidade nas cabras. O SNP no nucleotídeo 760 foi comum para todas as raças.

Também foram identificados SNPs associados com a baixa prolificidade em cabras. A cabra 16 da raça Baladi apresentou dois SNPs, assim como a cabra 4 da raça Alpina, e a cabra 8 da raça Damascus.

4.3.2.4 Discussão

Foram identificados 7 SNPs de interesse nas cabras estudadas, sendo três SNPs para baixa prolificidade, três para alta prolificidade e um específico para as raças locais do Egito. Esses SNPs podem ser usados na MAS para melhorar essa característica nos rebanhos. O nucleotídeo de número 760 G>C mostrou presença em todas as cabras de alta prolificidade em todas as raças. Os nucleotídeos de número 757 A>C, 762 G>A, e 769 G>C em cabras de alta prolificidade apareceram em três raças (Alpina, Zaraibe e Baladi).

Na raça Baladi, enquanto o nucleotídeo 769 na cabra 16 (baixa prolificidade) faz a mudança G>A, esse mesmo nucleotídeo (769), na cabra 17 (alta prolificidade), promove a mudança G>C.

Na raça Alpina, nas cabras 7 e 4, o nucleotídeo 762 mudou G>A em cabras de alta prolificidade e alterando C>T em cabras de baixa prolificidade. A cabra 8 da raça Damascus apresentou no nucleotídeo 751 e 769 mudanças de G>T e G>C em baixa prolificidade, enquanto o nucleotídeo 760 na cabra 15 mudou G>C em alta prolificidade.

Então, os SNPs detectados em BMP15 podem ser usados na MAS para a baixa prolificidade. As substituições de aminoácidos podem causar mudanças na estrutura da proteína, bem como afetar as vias metabólicas durante a diferenciação do folículo e ovulação.

4.3.2.5 Conclusão

Os autores concluíram que há um SNP principal presente em todas as raças de alta prolificidade das quatro raças de cabra em estudo.

Três SNPs apareceram apenas nas cabras (alta prolificidade) das raças Zaraibe, Alpina e Baladi, pelos quais promovem mudanças em aminoácidos correspondentes.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O aumento da prolificidade das cabras contribui para a maior rentabilidade da criação e para a obtenção de maior ganho genético das características em seleção, uma vez que aumenta a taxa de reposição. Apesar das características reprodutivas possuírem baixa herdabilidade, a genética molecular e a MAS surgem como alternativas promissoras para alavancar o melhoramento genético, permitindo a localização e inserção de regiões cromossômicas em programas de seleção, as quais sejam relacionadas às características de interesse.

A seleção genômica pode aumentar o ganho genético para a característica de prolificidade. Entretanto, deve haver o alinhamento no desenvolvimento das técnicas de genotipagem bem como nos métodos de avaliação genética com a inclusão das informações genômicas para atingir o alvo da pesquisa, seleção genômica para prolificidade em caprinos.

Essa revisão revelou a existência de estudos que indicam a presença de genes candidatos para a prolificidade em cabras e a possibilidade de sua utilização na seleção assistida por marcadores genéticos. Além disso, esse estudo foi importante para instigar novos estudos sobre a expressão de RNA e microRNA. Pesquisas com essas abordagens têm revelado que um mesmo gene pode apresentar expressão diferente em organismos distintos. Portanto, evidências têm mostrado que o melhoramento genético aplicado a prolificidade de cabras tem grandes chances de se tornar uma realidade.

REFERÊNCIAS

AN, X. et al. Association analysis between variants in KISS1 gene and litter size in goats. **BMC Genetics**, v. 14, n. 63, p. 1471-2156, 2013.

BERTON, M. P. et al. Genomic regions and pathways associated with gastrointestinal parasites resistance in Santa Inês breed adapted to tropical climate. **Journal of Animal Science Biotechnology**, v. 8, n. 73, 2017.

DEVENDRA, C. Investments on Pro-poor Development Projects on Goats: Ensuring Success for Improved Livelihoods. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 26, n. 1, P. 1-18, 2013.

GUIMARÃES, S. E. F. et al. Biotecnologia aplicada ao melhoramento de suínos. X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal. Uberaba, MG. 2013.

GUNIA, M. *et al.* Genetic parameters of litter size in Creole goats and their implication for a breeding programme including adaptation traits. **Advances in Animal Biosciences**, v.1, p. 402-403, 2010.

HAMED, A. *et al.* Estimation of genetic parameters and some non-genetic factors for litter size at birth and weaning and milk yield traits in Zaraibi goats. **Egyptian Journal of Sheep & Goat Sciences**, v. 4, p. 55-64, 2009.

HEIKAL, H. S. M.; NABY, W. S. H. A. E. Genetic Improvement of Litter Size in Four Goat Breeds in Egypt Using Polymorphism in Bone Morphogenetic Protein 15 Gene. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 5, p. 410-415, 2017.

ISMAIL, M. K. A. et al. Genome wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. **Genetics Selection Evolution**. 49, 82, 2017.

LAI, F. N. et al. Whole-genome scanning for the litter size trait associated genes and SNPs under selection in dairy goat (*Capra hircus*). **Scientific Reports**, v. 6, p. 1-12, 2016.

MALHEIROS FILHO, J. R. et al. Produção, qualidade do leite e índices fisiológicos de cabras Alpinas no semiárido no período chuvoso. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 18, n. 7, p. 762–768, 2014.

MIAO, X. et al. Genome-wide analysis of miRNAs in the ovaries of Jining Grey and Laiwu Black goats to explore the regulation of fecundity. **Scientific Reports**, p. 1-9, 2016.

MIAO, X.; LUO, Q.; QIN, X. Genome-wide transcriptome analysis in the ovaries of two goats identifies differentially expressed genes related to fecundity. **Gene**, p. 69-76, 2016.

MOHER, D. et al. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: The PRISMA statement. **International Journal of Surgery**, v. 8, p. 336-341, 2010.

PARDESHI, V. C. et al. Assessing the role of *FecB* mutation in productivity of Indian sheep. **Current Science**, p. 887-890.

PEREIRA, J. C. C. Melhoramento genético aplicado à produção animal, 6ed., Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2012.

SANTIAGO, G. G. et al. Genome-wide association study for production and meat quality traits in Canchim beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 95, p. 3381-3390, 2017.

SANTOS, N. P. S. et al. Aspectos ambientais e genéticos da prolificidade em caprinos utilizando modelos bayesianos de limiar e linear. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 3, p. 885-893, 2013.

SARMENTO, J. L. R. et al. Prolificidade de caprinos mestiços leiteiros no semiárido nordestino. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 7, p. 1471-1476, 2010.

TOSSER-KLOPP, G. et al. Design and characterization of a 52k SNP chip for goats. **PLOS one**, v. 9, p. 1-8, 2014.

VAN SON, M. et al. Genome-wide association study confirm major QTL for backfat fatty acid composition on SSC14 in Duroc pigs. **BMC Genomics**, v. 18, n. 369, p. 1-13, 2017.

VISSCHER, P. M. et al. Five Years of GWAS Discovery. **The American Journal of Human Genetics**, v. 90, p. 7–24, 2012.

WANG, J. Y.; LAN, Z. R.; ZHANG, X. M. Advances in Molecular Breeding Research of Goat Fecundity. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 11, n. 4, p. 449-453, 2012.

WANG, K. et al. A novel indel within goat casein alpha S1 gene is significantly associated with litter size. **Gene**, p. 161-169, 2018.

ZI, X. D.; LU, J. Y.; MA, L. Identification and comparative analysis of the ovarian microRNAs of prolific and non-prolific goats during the follicular phase using high-throughput sequencing. **Scientific Reports**, v.7, p. 1-10, 2017.