



**CENTRO UNIVERSITÁRIO DE BRASÍLIA – Uniceub
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA EDUCAÇÃO E SAÚDE – FACES
PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA**

LETÍCIA BALDOTTO DE CARVALHO BONFIM

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE CONTROLE POPULACIONAL DE
CAPIVARAS POR IMUNIZAÇÃO ATIVA CONTRA PEPTÍDEOS OVOCITÁRIOS**

**CLONAGEM DOS GENE DO GDF9 E BMP15 DE CAPIVARAS, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO DAS
PROTEÍNAS RECOMBINANTES E IMUNIZAÇÃO DAS FÊMEAS**

**BRASÍLIA
2020**



LETÍCIA BALDOTTO DE CARVALHO BONFIM

**DESENVOLVIMENTO DE UM PROTÓTIPO DE CONTROLE POPULACIONAL DE CAPIVARAS
POR IMUNIZAÇÃO ATIVA CONTRA PEPTÍDEOS OVOCITÁRIOS**

**CLONAGEM DOS GENE DO GDF9 E BMP15 DE CAPIVARAS, EXPRESSÃO, PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS
RECOMBINANTES E IMUNIZAÇÃO DAS FÊMEAS**

Relatório final de pesquisa de
iniciação científica apresentado à
assessoria de pós-graduação e
pesquisa da faculdade de ciências
da educação e saúde – FACES.

Orientação: Prof.^o Dr.
Andrei Antonioni Guedes Fidelis

BRASÍLIA
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo a Deus, meu porto seguro e Aquele que nunca deixa de acreditar em mim.

À meus pais, que muito me ouviram e acompanharam cada etapa que permitiu esse trabalho estar completo hoje, sempre me incentivando.

À Ana Carolina, Brunna e Jéssica, minhas companheiras de trabalho em campo que dividiram comigo manhãs e tardes de muito esforço, mas também de muitas boas lembranças.

À Ana Paula, ao George, ao Luiz e aos mestres Zé e Paulo, aqueles que me ensinaram tudo sobre como eram realizados os procedimentos no Zoológico e que são referências de como fazer alguém se sentir bem recebido e acolhido.

Aos professores Andrei e Eduardo, mestres natos e que muito me instruíram, mas acima de tudo foram grandes exemplos de que tipo de profissional quero ser um dia.

À Camila, minha orientadora na Embrapa, que me ensinou com paciência, dedicação e organização admiráveis, dos quais nunca esquecerei.

À Augusta.

“Um dia eu encontrarei as palavras certas
e elas serão simples” – Jack Kerouac.

RESUMO

Devido às aparições cada vez mais frequentes de animais selvagens em regiões rurais e urbanas, gerando um alerta na população, na saúde pública e no ramo econômico, o presente trabalho teve como objetivo a clonagem, sequenciamento, expressão e purificação dos genes do GDF9 e BMP15 de bovinos com o intuito de desenvolver uma medida efetiva de controle populacional das capivaras do DF. Esses fatores atuam na função ovariana de muitos mamíferos, incluso a capivara, e por meio da incorporação dessas proteínas recombinantes bovinas à bactérias da espécie *Escherichia coli* está em andamento o desenvolvimento de uma vacina capaz de executar uma reação cruzada no sistema imunológico das capivaras. Essa reação desencadeia a produção de antígenos contra a BMP15 e o GDF9 do próprio organismo, proporcionando um bloqueio na maturação dos ovócitos da capivara e assim resultando em uma forma de contracepção ou esterelização imunológica. Para elaboração da vacina, primeiramente foi realizada a superexpressão das proteínas desejadas em bactérias *E. coli* no laboratório. Em seguida, algumas modificações no genoma das bactérias foram feitas para incluir as sequências proteicas de GDF9 e BMP15 e para torná-las mais resistentes a alguns antibióticos, dessa forma, promovendo a melhor expressão das proteínas. Com a sequência protéica já incorporada ao DNA destas, houve então um processo de transformação das bactérias por intermédio de etapas até a completa produção das proteínas. As primeiras etapas se voltavam para a inoculação de bactérias dentro de um meio e para a indução da produção de proteínas. Depois disso, realizava-se a disjunção das proteínas desejadas das demais estruturas presentes nas bactérias por meio da sonicação, e posterior a ela vinha a centrifugação, na qual se dava continuidade ao processo de separação da proteína na solução do restante das estruturas bacterianas, que ficam em forma de pellet. Em seguida, era efetuada a purificação, etapa que utiliza cromatografia de afinidade e que dá origem à proteína pura. Então, era desempenhado um processo de quantificação, onde a proteína já expressa, purificada e pronta para ser injetada era avaliada na forma de géis que apresentavam a quantidade de proteínas obtidas e confirmavam se elas eram verdadeiramente as proteínas de interesse. Por fim, era avaliada a regulação da concentração do produto final obtido, pois como se faz necessária uma superestimulação no organismo animal, a concentração de proteínas também precisava ser alta. Uma vez que as etapas de produção das proteínas são finalizadas, é adicionado um adjuvante para que a vacina seja aplicada, porém o trabalho não pode avançar até o estágio de imunização das fêmeas por conta da paralisação decorrente da pandemia e de problemas na conclusão do terceiro plano de ação. Pode-se concluir que o manejo de animais silvestres apresenta grandes desafios e com o avanço populacional desordenado faz-se ainda mais necessário buscar soluções para o controle das taxas de fertilidade das capivaras por meio de uma alternativa não invasiva, com um custo benefício vantajoso e de execução viável.

Palavras Chave: GDF9, BMP15, controle, capivara.

SUMÁRIO

Página

1. INTRODUÇÃO	7
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA / FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	9
4. METODOLOGIA.....	16
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	18
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1. INTRODUÇÃO

Um dos grandes desafios do século é encontrar meios de preservar espécies de animais de vida livre em um cenário extremamente antropocêntrico, no qual o estilo de vida dos seres humanos se choca com a luta pela sobrevivência desses animais. Há anos o dinamismo humano causa grandes alterações no mundo adaptando-o às suas necessidades e, dentro dessa realidade, animais encontram grandes desafios para se adaptarem e coexistirem com os seres humanos (INSKIP E ZIMMERMANN, 2009). O confronto existente entre o homem e a fauna surge a partir do ponto que os objetivos humanos afetam diretamente a vida selvagem e toda sua complexidade ou no momento que a vida selvagem passa a intervir nos objetivos humanos e em seu estilo de vida. Quão maiores os efeitos causados ao bem estar, à cultura e aos bens pessoais das pessoas, menor a aceitação delas ao convívio com animais silvestres (MADDEN, 2004).

Conforme há a invasão dos locais de origem da capivara, mais confrontos surgem com o homem e mais imprescindível se mostra ser o controle do crescimento da espécie (FERRAZ ET AL., 2009; FELIX ET AL., 2014; MARCHINI E CRAWSHAW JR., 2015). Nas regiões Sul e Sudeste existem muitas discussões sobre o assunto devido ao alto número de capivaras, as quais se dividem em argumentos voltados a conservação da espécie e a desfavor da caça e em argumentos sustentados pelo excessivo medo de se contrair a febre maculosa. Realizando uma reflexão mais profunda sobre a doença, já é comprovado que as pessoas a correlacionam diretamente à presença de capivaras até mesmo em regiões onde a febre maculosa não é endêmica, o que gera na grande maioria das vezes um julgamento precipitado sobre o animal. (LABRUNA, 2013).

Por serem animais que vivem em grandes grupos, podendo chegar até a vinte integrantes, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) possuem uma hierarquia dentro de seus bandos, que normalmente compreendem os machos dominantes, os machos jovens, filhotes e as fêmeas reprodutoras. Elas são consideradas os maiores roedores existentes e são comuns em grande parte dos estados do Brasil, sendo facilmente encontradas em regiões onde há a presença do homem (MOREIRA ET AL, 2013). Um dos fatores responsáveis por essa aproximação está no fato de serem uma espécie herbívora que se alimenta de uma diversidade de alimentos (vegetais) comuns ao consumo do homem como arroz, milho, soja, cana-de-açúcar, feijão, entre outros (FERRAZ ET AL., 2005).

Como não possuem muitos predadores, não apresentam grande risco de extinção e frequentam áreas onde a presença humana prevalece, as capivaras têm sido vistas como espécies invasoras conforme crescem em número de indivíduos. O superpovoamento desses animais provoca uma inquietação na população devido aos riscos que oferecem ao desenvolvimento do ramo agrícola, no qual a espécie prejudica produtores rurais, e à saúde pública, na qual a espécie pode trazer consequências à saúde da população (MOREIRA E PINHEIRO, 2013). Esse é um problema que se deve às capivaras serem carreadoras de doenças que podem ser transmitidas ao homem, chamadas zoonoses, sendo as mais conhecidas a leptospirose, a brucelose e a febre maculose (LABRUNA, 2013).

Segundo Miglino et al. (2014) as capivaras possuem preferência pelo período de chuva, mas podem se reproduzir em qualquer época do ano, gerando aproximadamente quatro filhotes por gestação. Dessa forma, é importante buscar métodos que unam a preservação da espécie com o devido controle da população de forma eficiente e econômica. A imunocastração em fêmeas, experimento discutido nesse trabalho, possui a vantagem de ser simples, não agredir o animal e dispensar a intervenção cirúrgica, muito

mais complexa de ser realizada em animais de vida livre devido a fatores como transporte, custo e aos riscos que esse procedimento implica.

2. OBJETIVOS:

Geral:

Produzir um protótipo de contra concepção/esterilização por imunização ativa contra fatores de crescimento específicos do ovócito em capivaras.

Específicos:

- i - Clonar e sequenciar os genes do GDF9 e BMP15 de capivara;
- ii - Expressar e purificar as proteínas GDF9 e BMP15 bovinas recombinantes em bactéria;

3. REVISÃO DA BIBLIOGRAFIA / FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA:

Através da secreção de GnRH pelo hipotálamo, os hormônios FSH e LH são produzidos e liberados pela hipófise para atuarem sobre o processo de crescimento de folículos ovarianos e suas concentrações no organismo são determinadas por meio de um mecanismo de *feedback* negativo pelos hormônios esteróides e pela inibina produzida nos ovários (EPPIG, 2001). A diversidade celular presente no ovário também acrescenta muito na produção de folículos, uma vez que as células vizinhas são capazes de induzir fatores de crescimento a estes. O próprio ovócito possui uma grande atuação na uniformização das células somáticas próximas ao folículo ovariano segundo estudos recentes feitos na área (BRAW-TAL, 2002; EPPIG, 2001).

O fator de crescimento e diferenciação 9 (GDF9) e a proteína morfogenética de osso 15 (BMP15) são dois dentre muitos fatores protéicos produzidos pelo ovócito que possuem funções elementares ao desenvolvimento dos folículos do ovário, sendo o GDF9 crucial para a produção dos folículos em roedores e ovinos e a BMP15 fundamental para que o crescimento destes avance para além do estágio de folículo primário em ovinos. A inexistência desses fatores gera, respectivamente, um comprometimento do desenvolvimento folicular de todos os estágios posteriores ao do folículo primário nos animais citados e uma diminuição dos índices de ovulação apenas em camundongos, mas sem que haja a infertilidade destes (DONG ET AL., 1996; HANRAHAN ET AL., 2004; GALLOWAY ET AL., 2000; YAN ET AL., 2001).

Por meio de experimentos realizados em roedores pode-se constatar que o GDF9 atua em folículos antrais estimulando a formação de hormônios esteróides que induzem o desenvolvimento de características masculinas pelas células da teca, promovendo a maturação e diferenciação de folículos pré-antrais e coordenando a divisão celular de células da granulosa em oposição à atuação do FSH (SOLOVYEVA ET AL., 2000; HSUEH ET AL., 2000; VITT ET AL., 2000). Já nos experimentos com a BMP15, foi observado que ela atua na multiplicação de células da granulosa sem interferência da atuação do FSH (OTSUKA ET AL., 2000). A BMP15 é responsável por diminuir a expressão dos receptores de FSH o que desencadeia uma ação seletiva. Ela passa a não interferir na fabricação de estradiol, mas ocasiona a redução na síntese de progesterona durante a produção de esteroides pelas células da granulosa promovida pelo FSH (OTSUKA ET AL., 2001).

Como ainda não foram realizadas outras pesquisas acerca dessas proteínas em capivaras, não se tem muito conhecimento a respeito das principais fases de atuação dos fatores de crescimento, sobre quais células específicas os produzem, quais suas funções biológicas e seus parâmetros de expressão gênica. Nas capivaras, o estudo das funções e do desenvolvimento do GDF9 e da BMP15, desde a produção até a plena maturação, poderá ter como serventia a criação de um padrão experimental de contraceptivo e/ou esterilizante imunológico para outros animais, sobretudo, selvagens.

O Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Cenargen já realizou o trabalho de clonar e produzir ambas proteínas recombinantes com os genes de bovinos. Estas foram geradas em bactérias e futuramente ainda serão avaliadas se encontram-se são capazes de atuarem como antígenos em capivaras fêmeas, promovendo uma imunização ativa. Uma vez que essa etapa for concluída, incógnitas como a função biológica da GDF9 e BMP15 no processo de crescimento dos folículos ovarianos serão respondidas.

A tese que sustenta essa linha de raciocínio é a hipótese de que as proteínas GDF9 e

BMP15 de ambos animais (bovino e capivara) sejam diferentes ao ponto de desencadear uma reação imunológica no animal que receber a vacina e semelhantes ao ponto dos anticorpos produzidos originarem uma reação cruzada e se voltarem contra o GDF9 e o BMP15 do próprio ovócito das capivaras.

Ainda se espera a etapa final do projeto para se avaliar se as proteínas de origem bovina desencadearão uma diminuição drástica na fertilidade/natalidade da capivara sem que hajam grandes efeitos colaterais. As vantagens dessa pesquisa são a elaboração de um protótipo de imunógeno que sirva para a contracepção/esterilização da espécie e como um exemplar experimental para controle populacional de outras demais espécies de animais silvestres, excluindo alternativas como o abate e a cirurgia.

4. METODOLOGIA

O projeto, que foi desenvolvido a partir da parceria entre a Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Cenargen) e a Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Zoo-BSB), teve seu início com a avaliação das capivaras do Zoo-BSB, que vivem soltas e livres para transitarem para onde desejarem. Foram delimitados três grupos de capivaras em vida livre no Zoo-BSB, um próximo do recinto dos hipopótamos (GH), outro junto ao lago das tartarugas (GT) e outro junto ao lago dos primatas (GP). Os animais dos três grupos formados já estavam acostumados à aproximação humana em geral, sendo que os locais de onde mais foram extraídas amostras pelos alunos foram no lago das tartarugas e no lago dos primatas. A pesquisa, que ficou conhecido pela equipe pelo cognome CAPIVAROV, foi dividida em quatro planos de ação, sendo que apenas o terceiro deles será contemplado nesse trabalho: Clonagem dos gene do GDF9 e BMP15 de capivaras, expressão, purificação das proteínas recombinantes e imunização das fêmeas.

De acordo com metodologia anteriormente utilizada, antes da chegada dos alunos do PIC à sede da Embrapa Cenargen, já haviam sido desenhados oligonucleotídeos iniciadores para o GDF9 para a BMP15 fundamentado na semelhança entre as espécies, quanto a origem e estrutura, que também possuem esses genes (humana, bovina, murina, ovina e suína). Fazendo uso do DNA genômico de capivaras, estes oligonucleotídeos foram utilizados na PCR e seus resultados finais foram clonados e sequenciados. Os fragmentos correlatados ao peptídeo maduro dos genes GDF9 e BMP15, fazendo uso de iniciadores homólogos, foram amplificados por PCR a começar pelo DNA ovariano bovino (SOUZA ET AL., 2001).

As etapas da expressão das proteínas GDF9 e BMP15 foram realizadas pelos alunos e durante todos os procedimentos as amostras de GDF9 e BMP15 eram sempre identificadas para não serem confundidas e misturadas.

A primeira fase é o pré-inóculo, onde com dois palitos estéreis, se coletavam pequenas amostras de uma colônia de bactérias *E. Coli* e colocavam-os dentro de tubos de 15 ml – identificados para o GDF9 e para a BMP15 – com meio LB estéril. Eram usados 1,5 ml de meio LB para cada 100 ml de volume final da indução. O conteúdo dos dois tubos era incubado durante a noite em um shaker a 37°C e 250 rotações por minuto (rpm).

A segunda fase é o inóculo, na qual se transferia o pré-inóculo para erlenmeyers e se adicionava 100 ml de meio LB a cada frasco. Estes eram levados para o shaker a 37° C a 250 rpm. Conforme o tempo passava, se retirava uma alíquota de 1 ml dos frasco para realizar o registro da desidade óptica (OD) em um espectrofotômetro de cubetas a 600nm em intervalos cada vez mais curtos de tempo, até que o valor estivesse entre 0,4 e 0,6. Chegando a esse valor, os frascos com o inóculo eram retirados imediatamente do shaker.

A terceira fase é a indução, onde eram acrescentados 20 µl de IPTG e as amostras eram incubadas no shaker a 28°C e a 250 rpm de 4 a 6 horas.

A quarta fase é a centrifugação, onde o meio da indução era passado dos erlenmeyers para tubos de 50 ml e levados para a centrífuga já resfriada durante seis minutos a 8 °C na máxima rotação. Após isso, os sobrenadantes eram descartados e os pellets de cada tubo eram ressuspensos com 1 ml de tampão fosfato-salino (PBS); fazia-se então a transferência para tubos de 15 ml onde eram adicionados mais 5 ml de PBS antes de uma nova centrifugação. Por fim, os pellets eram ressuspensos com 5 ml de tampão de ligação (BB) ou tampão de sonicação (TS-1) e os tubos eram colocados em um recipiente com bastante gelo para a próxima etapa.

A quinta fase é a sonicação, no qual era utilizado o sonicador, também chamado de processador ultrassônico, que é um instrumento importante para a quebra dos compostos celulares por ondas sonoras de alta frequência. Após a sonicação, mais uma centrifugação era realizada.

A sexta e última fase é a purificação, a qual se iniciava passando 10 ml de água destilada e 5 ml de BB em ambas as colunas Ni⁺ (HisTrap -GE HealthcareLife Sciences) com o objetivo de limpá-las de resquícios das atividades anteriores. Em seguida, quatro eppendorfs eram separados para o GDF9 e mais quatro para o BMP15, denominados: PRÉ-COL, ELUATO, ELU 1 e ELU 2. Enquanto isso, as amostras eram colocadas na centrífuga já resfriada à 6 °C por 20 minutos. Terminada a centrifugação, eram utilizados filtros para seringa para filtrar as amostras para dentro de tubos de 15 ml e os pellets resultantes da centrifugação eram congelados. Em seguida, os produtos filtrados eram passados nas colunas HisTrap com o objetivo de nelas reter as proteínas de interesse e o primeiro ml obtido desse processo era destinado aos eppendorfs de PRÉ-COL. Posteriormente a isso, passavam-se 10 ml de BB nas colunas HisTrap, desprezando-se o primeiro ml e reservando-se o segundo ml nos eppendorfs de ELUATO. Logo após, eram passados 5 ml de tampão de eluição (EB) nas colunas HisTrap, se desprezava o primeiro ml e se reservava o segundo ml no eppendorf ELU 1 e o terceiro ml no eppendorf ELU 2.

Os pellet congelados de GDF9 e BMP15 eram retirados do freezer e ressuspensos com 5 ml de PBS cada. Em cada eppendorf eram adicionados 3 µl de corante e 12 µl das amostras de GDF9 e BMP15. Os eppendorfs eram fervidos, centrifugados e colocados para resfriar em gelo. Por fim, as amostras dos eppendorfs eram aplicadas no geis de poliacrilamida (SDS-PAGE) e ajustava-se a máquina para 0.03A por 1 hora.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As proteínas purificadas pela coluna de Ni⁺ (HisTrap -GE HealthcareLife Sciences), tinham como objetivo ser quantificadas e analisadas na forma dos géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) quanto a sua integridade e pureza (JUENGEL ET AL., 2002). Dessa forma, seriam utilizadas na imunização das capivaras as frações que atingissem uma pureza estimada superior a 80%. Porém conforme os experimentos foram sendo conduzidos, muitas amostras das proteínas na etapa de purificação estavam se concentrando no pellet de forma insolúvel, obstáculo esse que a equipe laboratorial não conseguiu contornar até a presente data de entrega desse trabalho.

Devido à paralisação do Zoológico de Brasília, iniciada em Março de 2020, devido às medidas de distanciamento social para contenção do avanço do novo coronavírus, os alunos também ficaram impossibilitados de realizarem novas coletas de material. Só agora, no mês de Outubro por conta do Decreto nº 41.260, de 29 de Setembro de 2020, que as visitas estão sendo retomadas.

Portanto, os resultados da pesquisa ainda estão como inconclusivos e o projeto CAPIVAROV ainda está em atividade no laboratório da Embrapa e será assumido pelos próximos voluntários do PIC – Embrapa Cenargen com previsão de ser finalizado na metade do ano de 2021.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Como trata-se de um animal com gostos muito variados e com grande capacidade de adaptação, a capivara se adequa a diferentes tipos de alimentos e ambientes. Associado a isso, alguns fatores corroboraram para que houvesse um aumento no número de indivíduos, como a expansão agrícola, a diminuição de seus predadores naturais e a proibição da caça. O crescimento desregulado desses animais provou que se faziam necessárias medidas de controle populacional diferentes das mais tradicionais, a cirúrgica, que apresentava muitas complicações e riscos, e o abate, que não é bem recebido público. Por possuir um teor mais humanizado, a imunocastração tem o potencial de ser uma técnica bem aceita pelas pessoas e que se mostra útil em resolver o problema por intervir na taxa de fertilidade dos animais e conseqüentemente baixar a taxa de natalidade da população de capivaras.

Baseado na literatura utilizada e no passo a passo feito no laboratório, existem indícios de que as proteínas GDF9 e BMP15 estavam sendo devidamente extraídas e separadas das demais estruturas bacterianas, o que representa que a linha de pesquisa está seguindo o curso certo e vem sendo bem aplicada no laboratório. Uma vez solucionado o problema da insolubilidade, com mais pesquisas sobre o assunto e tempo hábil, os resultados poderão ser contemplados em breve.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BRAW-TAL, R. The initiation of follicle growth: the oocyte or the somatic cells? *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.187, p.11-18, 2002
- DONG, J.; ALBERTINI, D. F.; NISHIMORI, K.; KUMAR, T. R.; LU, N.; MATZUK, M. M. Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, v.383, p.531-5, 1996.
- EPPIG, J. J. Oocyte control of ovarian follicular development and function in mammals. *Reproduction*, v.122, p.829-38, 2001.
- Fagerstone, K A., L A. Miller, G Killian, C A. Yoder Review of issues concerning the use of reproductive inhibitors, with particular emphasis on resolving human-wildlife conflicts in North America. *Integrative Zoology*. 1: 15-30, 2010.
- Felix, GA. Almeida Paz, ICL, Piovezan, U, Garcia, RG, Lima, KAO, Nääs, IA, Salgado, DD, Pilecco, M and Belloni, M Feeding behavior and crop damage caused by capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in an agricultural landscape. *Braz. J. Biol.*, 2014, vol. 74, no. 4, p. 779-786, 2014
- FERRAZ, K. P. M. B. et al. *Biologia e Manejo da Capivara: do controle de danos ao máximo rendimento sustentável.*-Piracicaba, SP-Brail. Scientia Agrícola, 2005.
- GALLOWAY, S. M.; MCNATTY, K. P.; CAMBRIDGE, L. M.; LAITINEN, M. P.; JUENGEL, J. L.; JOKIRANTA, T. S.; MCLAREN, R. J.; LUIRO, K.; DODDS, K. G.; MONTGOMERY, G. W.; BEATTIE, A. E.; DAVIS, G. H.; RITVOS, O. Mutations in an oocyte-derived growth factor gene (BMP15) cause increased ovulation rate and infertility in a dosage-sensitive manner. *Nature Genetics*, v.25, p.279-83., 2000.
- HANRAHAN, J. P.; GREGAN, S. M.; MULSANT, P.; MULLEN, M.; DAVIS, G. H.; POWELL, R.; GALLOWAY, S. M. Mutations in the Genes for Oocyte-Derived Growth Factors GDF9 and BMP15 Are Associated with Both Increased Ovulation Rate and Sterility in Cambridge and Belclare Sheep (Ovisaries). *BiolReprod*, v.70, p.900-909, 2004.
- HSUEH, A. J.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSU, S. Y. Hormonal regulation of early follicle development in the rat ovary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, v.163, p.95-100, 2000.
- Inskip, C., Zimmermann, A Human-felid conflict: a review of patterns and priorities worldwide. *Oryx*, Volume 43, 01, 18 34, 2009,
- JUENGEL, J. L.; HUDSON, N. L.; HEATH, D. A.; SMITH, P.; READER, K. L.; LAWRENCE, S. B.; O'CONNELL, A. R.; LAITINEN, M. P.; CRANFIELD, M.; GROOME, N. P.; RITVOS, O.; MCNATTY, K. P. Growth differentiation factor 9 and bone morphogenetic protein 15 are essential for ovarian follicular development in sheep. *Biology of Reproduction*, v.67, p.1777-89, 2002.
- Labruna, M. B. 2013. Brazilian spotted fever: the role of capybaras. Pp. 371 – 383 in *Capybara: biology, use and conservation of a valuable neotropical resource* (J.R. Moreira, K.M.P.M.B. Ferraz, E.A. Herrera and D.W. Macdonald, eds.). Springer, New York, USA.
- MADDEN F. Creating Coexistence between Humans and Wildlife: Global Perspectives on Local Efforts to Address Human–Wildlife Conflict, *Human Dimensions of Wildlife: An International Journal*, 9:4, 247-257, 2004
- Miglino, M. A., T. C. dos Santos, C. Kanashiro, and R. H. S. Ferraz. 2013. Morphology and reproductive physiology of female capybaras. Pp. 131 – 143 in *Capybara: biology, use and*

- conservation of a valuable neotropical resource (J.R. Moreira, K.M.P.M.B. Ferraz, E.A. Herrera and D.W. Macdonald, eds.). Springer, New York, USA.
- Moreira, J. R., M. R. Alvarez, T. Tarifa, V. Pacheco, A. Taber, D. G. Tirira, E. A. Herrera, K. M. P. M. B. Ferraz, J. Aldana-Domínguez, and D. W. Macdonald. 2013. Taxonomy, natural history and distribution of the capybara. Pp. 3 – 37 in *Capybara: biology, use and conservation of a valuable neotropical resource* (J.R. Moreira, K.M.P.M.B. Ferraz, E.A. Herrera and D.W. Macdonald, eds.). Springer, New York, USA.
- Moreira, J. R.; M. S. Pinheiro. 2013. Capybara production in Brazil: captive breeding or sustainable management? Pp. 333 – 344 in *Capybara: biology, use and conservation of a valuable neotropical resource* (J.R. Moreira, K.M.P.M.B. Ferraz, E.A. Herrera and D.W. Macdonald, eds.). Springer, New York, USA.
- OTSUKA, F.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *Journal of Biological Chemistry*, v.276, p.11387-92., 2001.
- OTSUKA, F.; YAO, Z.; LEE, T.; YAMAMOTO, S.; ERICKSON, G. F.; SHIMASAKI, S. Bone morphogenetic protein-15: Identification of target cells and biological functions. *Journal of Biological Chemistry*, v.275, p.39523-39528, 2000.
- SOLOVYEVA, E. V.; HAYASHI, M.; MARGI, K.; BARKATS, C.; KLEIN, C.; AMSTERDAM, A.; HSUEH, A. J.; TSAFRIRI, A. Growth differentiation factor-9 stimulates rat theca-interstitial cell androgen biosynthesis. *Biology of Reproduction*, v.63, p.1214-8., 2000.
- SOUZA, C. J.; MACDOUGALL, C.; CAMPBELL, B. K.; MCNEILLY, A. S.; BAIRD, D. T. The Booroola (FecB) phenotype is associated with a mutation in the bone morphogenetic receptor type 1 B (BMPRII) gene. *Journal of Endocrinology*, v.169, p.R1-6, 2001.
- STOCKARD, C., PAPANICOLAOU, G.N. The vaginal closure membrane, copulation and vaginal plug in the guinea-pig with further consideration of the oestrus rhythm. *Biol. Bull. Mar Biol. Lab., Woods, Hole*, 37: 222-245, 1919.
- VITT, U. A.; MCGEE, E. A.; HAYASHI, M.; HSUEH, A. J. In vivo treatment with GDF-9 stimulates primordial and primary follicle progression and theca cell marker CYP17 in ovaries of immature rats. *Endocrinology*, v.141, p.3814-20, 2000.
- YAN, C.; WANG, P.; DEMAYO, J.; DEMAYO, F. J.; ELVIN, J. A.; CARINO, C.; PRASAD, S. V.; SKINNER, S. S.; DUNBAR, B. S.; DUBE, J. L.; CELESTE, A. J.; MATZUK, M. M. Synergistic roles of bone morphogenetic protein 15 and growth differentiation factor 9 in ovarian function. *Molecular Endocrinology*, v.15, p.854-66, 2001.