

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE AGRONOMIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE TOUROS BRAFORD POR MEIO DE
MARCADORES MOLECULARES STRs e SNPs E DA TERMOGRAFIA
INFRAVERMELHO**

SILVIO RENATO OLIVEIRA MENEGASSI

Médico Veterinário/UFSM

Mestre em Zootecnia/UFRGS

Tese apresentada como um dos requisitos à obtenção do Grau de Doutor em
Zootecnia

Área de concentração Produção Animal

Porto Alegre (RS), Brasil
Fevereiro, 2014

CIP - Catalogação na Publicação

Menegassi, Silvio

AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE TOUROS BRAFORD POR MEIO
DE MARCADORES MOLECULARES STRs e SNPs E DA
TERMOGRAFIA INFRAVERMELHO / Silvio Menegassi. --
2014.

92 f.

Orientador: Júlio Otávio Barcellos.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Agronomia, Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Fertilidade. 2. Marcador Molecular. 3.
Termografia Infravermelho. 4. Touro. I. Barcellos,
Júlio Otávio, orient. II. Título.

SILVIO RENATO OLIVEIRA MENEGASSI
Médico Veterinário e
Mestre em Zootecnia

TESE

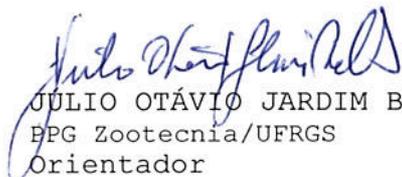
Submetida como parte dos requisitos
para obtenção do Grau de

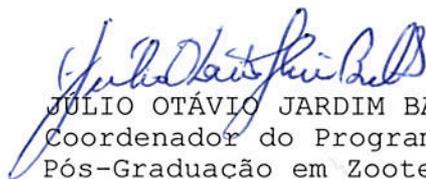
DOUTOR EM ZOOTECNIA

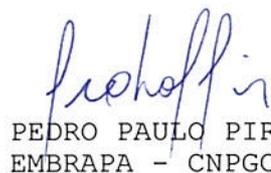
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia
Faculdade de Agronomia
Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Porto Alegre (RS), Brasil

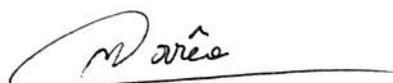
Aprovado em: 25.02.2014
Pela Banca Examinadora

Homologado em: 06.05.2014
Por


JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
EPG Zootecnia/UFRGS
Orientador


JÚLIO OTÁVIO JARDIM BARCELLOS
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Zootecnia


PEDRO PAULO PIRES
EMBRAPA - CNPGC


MÁRCIO NUNES CORREA
UFPel


MARC ROGER JEAN MARIE HENRY
UFMG


GABRIEL RIBAS PEREIRA
UFRGS


PEDRO ALBERTO SELBACH
Diretor da Faculdade de Agronomia

Ao meu pai,
pelo exemplo de que um homem tem que deixar rastro;

A minha mãe,
pelo exemplo de determinação e comando;

Aos meus filhos,

“O tempo não cura totalmente uma ferida, mas diminui muito seus efeitos.”

por terem entendido que as pessoas são muito frágeis. Pela amizade, atenção e por cuidarem de mim, quando foi preciso;

Às mulheres da minha vida,

Dorvalina, Elayne, Suzana, Lara e Evelise,

por terem feito com que todos os momentos fossem vividos com intensidade e que valessem à pena.

A todos vocês, dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) pela oportunidade de cursar doutorado nessa instituição de excelência;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão de bolsa de estudos;

Ao meu amigo e orientador professor Júlio Barcellos pelos ensinamentos, paciência, amizade, dedicação, apoio e confiança em mim depositada. Tenho orgulho de ter sido teu orientado e de ser teu amigo;

À Universidade Luterana do Brasil (ULBRA) pela realização das pesquisas dos marcadores moleculares STRs e SNPs, conduzidas e realizadas pela graduanda de Biomedicina Katiana Santos Stelmach Pereira e coordenadas pelo Dr. Paulo Ricardo Loss Aguiar, meu co-orientador;

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da UFRGS, pelo convívio e amizade durante o curso;

Aos integrantes do Núcleo de Estudos em Sistemas de Produção de Bovinos de Corte e Cadeia Produtiva (NESPRO), por terem sempre me ajudado, principalmente às gurias, Vanessa, Maria, Fernanda, Rúbia, Cláudia, Helena e Marcela;

A Ione, pelo auxílio recebido sempre que necessário;

Aos meus amigos doutores Celso Koetz Júnior da Universidade do Norte do Paraná (UNOPAR), Eduardo Antunes Dias e Gabriel Ribas Pereira da UFRGS, pelo inestimável convívio de amizade e respeito. Muito do que fiz nesses quatro anos passou pela compreensão de vocês. “Tá agarrado”;

Aos proprietários das estâncias Nova Aurora e Anjo da Guarda de Uruguaiana - RS, da estância Santa Maria de Bagé – RS, e da Cabanha 2 Cachoeiras de Londrina - PR.

MUITO OBRIGADO!

AVALIAÇÃO REPRODUTIVA DE TOUROS BRAFORD POR MEIO DE MARCADORES MOLECULARES STRs e SNPs E DA TERMOGRAFIA INFRAVERMELHO¹

Autor: Sílvio Renato Oliveira Menegassi

Orientador: Júlio Otávio Jardim Barcellos

Co-Orientadores: João Batista de Souza Borges e Paulo Ricardo Loss Aguiar

Resumo – A identificação de alelos e genótipos associados a características reprodutivas, somente foi possível a partir do desenvolvimento e da localização de marcadores moleculares polimórficos no genoma, especialmente os *short tandem repeated* (STRs) e os *single nucleotide polymorphysm* (SNPs). A termografia infravermelho tem sido amplamente empregada como um método não invasivo na determinação da temperatura da superfície corporal, mostrando-se uma técnica promissora na avaliação da adaptação a efeitos ambientais. Portanto, O objetivo geral deste estudo foi identificar marcadores moleculares relacionados à fertilidade de touros e utilizar a termografia infravermelho na avaliação adicional ao exame da aptidão reprodutiva desses animais, medindo-se a temperatura da superfície escrotal. A amostra constou de 87 touros submetidos à análise e acompanhamento da mensuração do perímetro escrotal (PE), dos 7 aos 24 meses de idade. Esses touros foram analisados andrologicamente aos 24 meses pela Classificação Andrológica por Pontos (CAP). Subsequentemente, 17 reprodutores da amostra tiveram seu PE medido e foram examinados e pontuados pelo CAP aos 28, 32 e 36 meses de idade. Não foi verificada associação entre os marcadores STRs BMS3004, HEL5, AFZ1, IDVGA51 e ILSTS002 e a desempenho reprodutivo em ambos os experimentos. O SNP FSHR mostrou significativa relação com o genótipo GG para menor PE aos 24 meses. Os genótipos CG e GG foram significativos para identificação do PE inferior a 29 cm e o genótipo CC para maior pontuação no CAP. Durante o experimento II no SNP FSHR foi encontrada relação ao maior PE aos 7 meses, 24 meses, 28 meses, 32 meses e 36 meses de idade com o genótipo CC, mas nada foi encontrado de relação com o CAP em ambos os marcadores. Em conclusão, observamos uma forte associação do SNP FSHR com o genótipo GG para PE reduzido e CAP superior no genótipo CC, e a possibilidade de quando encontrado os genótipos CG e GG, encontrar um PE inferior a dois desvios a menos da média da raça. Durante o experimento II também foram avaliados os efeitos sazonais do ambiente sobre a qualidade do sêmen em reprodutores, utilizando-se termografia infravermelho. Variações de gradiente de temperatura escrotal foram significativamente maiores no outono (4.5°C) e inverno (4.0°C) do que na primavera (2.9°C) e verão (0.9°C) (P<0,05). Temperaturas do globo ocular foram mais baixas no inverno (27.6°C) e outono (26.8°C) em relação ao verão (33.9°C) e primavera (31.1°C) (P<0,05). Motilidade do sêmen, movimento de massa e vigor diminuíram no verão em comparação com as outras estações. Concluiu-se que a termografia infravermelho pode ser adotada como um método indireto para avaliar gradiente testicular e suas consequências aos aspectos físicos seminais.

¹Tese de Doutorado em Zootecnia – Produção Animal, Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil (88p.) Fevereiro, 2014.

EVALUATION OF REPRODUCTIVE BULLS BRAFORD THROUGH MOLECULAR MARKERS STRS AND SNPS AND THE TERMOGRAFY INFRARED RADIATION¹

Author: Silvio Renato Oliveira Menegassi

Adviser: Júlio Otávio Jardim Barcellos

Co-Advisers: João Batista de Souza Borges and Paulo Ricardo Loss Aguiar

Abstract - The identification of alleles and genotype associated with these features was only possible through the development and localization of polymorphic molecular markers in the bovine genome, especially the *short tandem repeated* (STR) and *single nucleotide polymorphysm* (SNP). Infrared thermography has been widely used as a noninvasive method for determining the temperature of the body surface. This technhique shows a promising method to assess the adaptation of environmental effects. Therefore, the aim of this study was to identify molecular markers that are linked to bulls fertility. We also evaluted the uses of infrared thermography to evaluate the reproductive performance of bulls, measuring the surface temperature of the scrotum. Samples were collected from of 87 bulls submitted to analysis from 7 to 36 mo of age measurement of scrotal circumference and analyzed by BBSE. Subsequently, 17 bulls the previous sample measured and had their PE and was examined by BBSE at 28, 32 and 36 mo old. There was no significant association between markers BMS3004 STRs, HEL5, AFZ1, IDVGA51 ILSTS002 and reproductive performance in both experiments. The FSHR SNP showed a significant association with the GG genotype for low SC at 24 mo. The CG and GG genotypes were different for identification of SC less than 29 cm and CC genotype for highest score the BBSE. During the second experiment, in relation to the SNP FSHR at 7, 24, 28, 32 and 36 mo of age were found different with the CC genotype, but no correlation was found in relation to the BBSE in both markers. In conclusion, we observed a strong association of FSHR SNP genotype GG higher for SC and BBSE reduced the possibility of CC genotype and when found the CG and GG genotypes. During the second experiment also, we evaluated the seasonal effects of the environment on semen quality in breeding using infrared thermography images data that were collected using an infrared camera. Changes in temperature scrotal gradient were significantly higher in autumn (4.5° C) , winter (4.0°C) and spring (2.9°C) compared to the summer (0.9°C) ($P < 0.05$). Ocular temperatures were lower in winter (27.6°C) and autumn (26.8°C) compared to summer (33.9°C) and spring (31.1°C) ($P < 0.05$). Sperm motility, mass motion and vigor decreased in the summer compared with other seasons. It was concluded that infrared thermography can be used as an indirect method to assess testicular gradient and its consequences to the seminal physical aspects.

¹Doctoral thesis in Animal Science– Faculdade de Agronomia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (88 p.)February, 2014.

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	14
1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Marcadores moleculares	18
2.2 Microsatélites	19
2.3 Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)	21
2.4 Classificação andrológica por pontos (CAP)	21
2.5 Termografia infravermelho em reprodução	23
3. HIPÓTESES	26
4. OBJETIVOS	26
CAPÍTULO II	27
ArtigoI	28
Resumo	29
Abstract	30
Introdução	31
Material e métodos	32
Resultados	35
Discussão	37
Conclusões	39
Referencias	39
CAPÍTULO III	57
ArtigoII	58
Abstract	60
Introduction	61
Materials and methods	62
Results	66
Discussion	67
Conclusions	69
References	69
CAPÍTULO IV	77
5. CONCLUSÃO	78
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
7. REFERÊNCIAS	81
8. APÊNDICES	87
comandos SAS	87
9.VITA	91

RELAÇÃO DE TABELAS

	Página
 CAPÍTULO II	
Tabela 1. Classificação andrológica por pontos de bovinos <i>Bos taurus</i> .	45
Tabela 2. Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo e referências da técnica empregada.....	46
Tabela 3. Frequências alélicas identificadas nos STRs AFZ-1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51, BMS3004.....	47
Tabela 4. Frequência alélica dos marcadores SNPs FSHR e LHR.....	48
Tabela 5. Frequências genotípicas identificadas nos SNPs, FSHR, LHR	49
Tabela 6. PE, Classe e CAP dos STR e SNP pesquisados.....	50
Tabela 7. Marcadores STRs	51
Tabela 8. Marcadores SNPs.....	52
 CAPÍTULO III	
Table1. Effect of season on climate and physiological changes, spermiogenesis and seminal parameters from bulls subjected to analyses using temperature humidity index.....	73
Table 2. Correlations between the temperature-humidity index during spermiogenesis, thermographic variables of testicles and ocular globe of bulls.....	74

RELAÇÃO DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO II	
Figura 1. Evolução do PE para os alelos FSH. CG menor PE (Heterozigose)	53
Figura 2. Evolução do PE para os alelos LH. Heterozigose mantém PE abaixo	54
Figura 3. Evolução da CAP para FSHR	55
Figura 4. Evolução da CAP para LHR	56
CAPÍTULO III	
Figure 1. Infrared thermography images of the same animal collected during different season of the year. (a) Ocular globe temperature in the summer; (b) temperature gradient of testicular scrotum in the summer; (c) Ocular globe temperature in the autumn; (d) temperature gradient of testicular scrotum in the autumn; (e) Ocular globe temperature in the winter; (f) temperature gradient of testicular scrotum in the winter; (g) Ocular globe temperature in the spring; (h) temperature gradient of testicular scrotum in the spring; ΔTG (temperature gradient variation).....	75
Figure 2. Daily mean values of ambient air temperature ($^{\circ}C$), relative humidity of air (%) and THI during the experimental period. Temperature-humidity index (THI), black arrow indicates the day of semen collection, short lines indicates 18-day period before semen collection, long dash line indicates THI average of 83.8 from the 18-day prior to semen collection at summer.....	76

LISTA DE APÊNDICES

Apêndice 1: Comandos do SAS	87
--	-----------

LISTA DE ABREVIATURAS

ASMA-	Automated Sperm Morphometry Analyses
BBSE	Bull Breeding Soundness Evaluation
CAP	Classificação Andrológica por Pontos
CASA	Computer Assited Sperm Analisys
CBRA	Colégio Brasileiro de Reprodução Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMA	Defeitos maiores
DME	Defeitos menores
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DPT	Temperature from distal pole
DT	Total de defeitos
GT	Gradiente térmico
H	Humidity
IGF	Fator de crescimento semelhante à insulina
INMET	Instituto Nacional de Meteorologia
INV	Inverno
IRT	Infrared termography
ITU	Índice de temperatura e umidade
M	Motility
MAD	Major spermatozoa defects
MID	Minor spermatozoa defects
MAS	Marker assisted selection
MM	Mass Motion
OUT	Outono
PCR	Reação em cadeia de polimerase
PE	Perímetro escrotal
PPT	Temperature from proximal pole
PRI	Primavera
QTL	Quantitative traits locus
RH	Umidade relativa do ar
SAS	Statistical analysis systems
SC	Scrotal circumference
SNP	Single nucleotide polymorphism
STR	Short tandem reapeded

T	Temperatura
Tb	Turbilhão
TD	Total defects
Tdb	Temperatura do bulbo seco
TG	Thermal gradient
THI	Temperature-humidity index
TPP	Temperatura do pólo proximal
TPD	Temperatura do polo distal
U	Umidade
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UFSM	Universidade Federal de Santa Maria
ULBRA	Universidade Luterana do Brasil
UTRs	Untranslated regions
VER	Verão
VIG	Vigor
WCABP	Western Canadian Association of Bovine Practitioners

Cerca trova

Dante Alighieri

“As pessoas que possuem alguma força de caráter carregam consigo, assim como os planetas, a sua atmosfera em suas órbitas.”

Thomas Hardy

CAPITULO I

1. INTRODUÇÃO

A reprodução está entre as variáveis que afetam a produtividade dos rebanhos e chama atenção o quanto ela é responsável pelos baixos índices produtivos na pecuária de corte tradicional. O sistema de acasalamento por monta múltipla de touros é preponderante nos sistemas de cria e sua eficiência é dependente da fertilidade dos touros. O exame da aptidão reprodutiva possibilita conhecer a fertilidade potencial do touro e sua importância é reportada por vários autores como Lagerloff (1936), Silva et al. (1981), Fonseca et al. (1997), Moraes et al. (1998) e Menegassi et al. (2011, 2011a). Para prognosticar o potencial reprodutivo dos touros, vários guias são utilizados: o do Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 1998), o *Bull Breeding Soundness Evaluation* (BBSE, 2000) da The Western Canadian Association of Bovine Practitioners (WCABP), a Classificação Andrológica por Pontos (CAP) para *Bos taurus taurus* (Chenoweth and Ball, 1980) e para *Bos taurus indicus* (Valle Filho, 1995, 1999; Fonseca et al., 1997).

As variações encontradas entre os touros e sua fertilidade reforçam a necessidade de se realizar o exame periodicamente. As reprovações dos touros avaliados podem apresentar taxas que variam enormemente dependendo da idade, raça, do estágio e do local em que se encontra a propriedade, do tipo de exame e até mesmo do técnico que o realiza, mostrando que sempre serão encontrados touros inaptos (Menegassi et al., 2012). Embora o exame da aptidão reprodutiva (exame andrológico) venha sendo realizado desde a década de 20 do século passado e que muitas escolas clássicas tenham contribuído e influenciado esse tipo de avaliação, até hoje a estimativa da fertilidade em touros é realizada em nível de campo, sem ferramentas preditoras desse potencial, devido ao fato de a fertilidade ser multifatorial. Porém, entre os fatores inerentes à reprodução como idade, puberdade, qualidade do sêmen, circunferência escrotal, libido e habilidade física, a idade à puberdade e a circunferência escrotal têm forte componente genético, (Bergmann, 1996) portanto, há possibilidade de serem preditas. Neste sentido, o uso de provas complementares como marcadores moleculares para alta fertilidade, perfil protéico do plasma seminal, termografia infravermelho, entre outras, merecem um estudo mais criterioso e detalhado, de forma a auxiliar na escolha mais precisa de qual touro servirá vacas a campo e de qual touro será coletado sêmen em centrais de inseminação.

As marcas na seqüência de DNA próximas à região de interesse (genes) permitem o acompanhamento da segregação de alelos por gerações e, por conseqüência, da característica de interesse a elas associada.

Como a capacidade de produção de um animal (fenótipo) é o resultado da interação entre o material genético (genótipo) e o ambiente, a identificação de marcadores representa a possibilidade de seleção de animais também com base no genótipo, antes mesmo da expressão do fenótipo. Por meio da avaliação de marcadores moleculares pode-se conseguir uma seleção animal mais rápida e eficiente, possibilitando a determinação do mérito genético de um animal jovem sem a necessidade de avaliação da produção ou da progênie. Os marcadores moleculares, portanto, têm sido uma ferramenta importante na identificação das mutações que influenciam características controladas por um

ou poucos genes.

No entanto, a maioria das características de interesse econômico apresenta padrão poligênico de herança, sendo determinada por inúmeros genes de grande e/ou pequeno efeito individual e por forte influência de fatores ambientais. A identificação dos alelos associados a essas características complexas nas populações, somente foi possível a partir do desenvolvimento e da localização de marcadores moleculares polimórficos no genoma, especialmente os microssatélites (STRs) e os polimorfismos de base única (SNPs), permitindo a construção de mapas genéticos saturados e, conseqüentemente, o mapeamento de locos de características quantitativas (QTLs).

Estudos relacionados à expressão gênica envolvendo técnicas de PCR quantitativa, micro arranjos e seqüenciamento poderão permitir a compreensão do número, função, contribuição e localização dos genes envolvidos no controle das características quantitativas (Coutinho et al., 2010). Portanto, a seleção de futuros touros por meio da predição de genótipos favoráveis com o uso da técnica de marcadores moleculares possibilitará, além do ganho genético e da fertilidade, uma evolução bastante significativa de menor tempo para a seleção de reprodutores.

Animais são submetidos a variações ambientais extremas dependendo de quando são utilizados no acasalamento, o que pode interferir na sua fertilidade e causar prejuízos à eficiência reprodutiva do rebanho. As condições ambientais são determinadas pela avaliação da temperatura e da umidade, expressas por meio de um índice de conforto térmico denominado Índice de Temperatura e Umidade (ITU). Atualmente, é considerado como premissa básica que índices de ITU superiores a 72 caracterizam um ambiente estressante para bovinos (Ravagnolo e Misztal, 2000; Bouraoui et al., 2002; West, 2003; Correa-Calderon et al., 2004; Bohmanova, 2007). No entanto, nenhum índice foi projetado especificamente com base em análises da temperatura escrotal e da qualidade espermática de touros, durante a estação de monta em regiões subtropicais. Atualmente, a maioria dos estudos conduzidos para avaliar os efeitos do estresse do calor em touros foi realizada em câmaras climáticas ou por meio da insulação escrotal, para simular o efeito ambiental (Gabaldi, 1999; Kastelic, 2001).

Altas temperaturas podem comprometer mecanismos termorregulatórios do corpo na dissipação do calor e configurar um quadro de estresse térmico (Tizikara et al., 1985; Chemineau, 1994). Nesses ambientes pode ocorrer uma elevação na temperatura testicular com prejuízos no ciclo espermatogênico e na qualidade seminal (Roberts, 1986; Marai et al., 2008). A aclimação ao calor é uma característica evolutivamente conservada permitindo o ajuste às mudanças persistentes na temperatura ambiente que envolve uma continuidade de alterações fisiológicas adaptáveis na expressão do gene (Horowitzand-Assadi, 2010). A termografia infravermelho tem sido amplamente empregada como um método não invasivo de alta acurácia na determinação da temperatura da superfície escrotal (Coulter, 1988), mostrando-se uma técnica promissora na avaliação da adaptação de animais a efeitos ambientais (Paim et al., 2013).

Portanto, o objetivo geral deste estudo foi identificar marcadores

moleculares relacionados à fertilidade de touros, além de utilizar a termografia infravermelho na avaliação adicional ao exame da aptidão reprodutiva desses animais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Marcadores moleculares

Os programas de seleção animal são comumente baseados em critérios relacionados às características de desempenho ponderal em detrimento às de natureza reprodutiva, mesmo sendo a eficiência reprodutiva um índice de peso na avaliação do sistema produtivo (Fries, 1999). Isto se deve ao fato de que a variação genética depende da variação alélica em um grande número de locos e a expressão gênica destes locos é altamente afetada por fatores do meio ambiente. Testes moleculares têm sido realizados com o intuito de decifrar a estrutura genética e história evolutiva de diversos organismos biológicos. O gado domesticado, por exemplo, tem sido o sujeito de numerosos estudos determinando a variação genética intra e interpopulacional do rebanho bovino, o que tem esclarecido as relações bioquímicas, citológicas e moleculares das diferentes raças (MacHugh, 1996).

Com o aumento do conhecimento sobre o genoma animal e, conseqüentemente, da posição e efeito de locos principais para características quantitativas tornou-se possível a utilização de marcadores moleculares juntamente com as técnicas tradicionais de seleção, hoje baseadas exclusivamente no aspecto fenotípico do animal (Dentine, 1999). A busca do seqüenciamento de diferentes genomas tem gerado subsídios científicos para a formação de mapas genéticos complexos, nos quais é possível localizar genes específicos ou regiões próximas a genes que permitem monitorar características de interesse econômico. A partir do advento de mapas genéticos saturados, os marcadores genéticos têm sido muito utilizados na identificação de parentesco e no monitoramento da introgressão gênica (Garcia, 2006).

As novas tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitiram determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente chamados marcadores moleculares, que são regiões com endereço próprio no cromossomo e que apresentam polimorfismo, ou seja, variam de indivíduo para indivíduo. Pesquisas estão sendo realizadas com o intuito de cruzar as informações genotípicas baseadas nos mapas genéticos com informações fenotípicas coletadas a campo, para assim identificar aqueles marcadores associados aos *Quantitative Trait Locus (QTLs)*. Os avanços na descoberta de marcadores genéticos aplicáveis à seleção e melhoramento em animais possibilitaram a descoberta, em bovinos, de polimorfismos de diversos hormônios e variantes moleculares nos genes receptores hormonais (Pringle et al., 1997; Campagnari, 2002; Liefers et al., 2002; Li et al., 2004; Di Stasio et al., 2005), e em enzimas relacionadas a importantes vias metabólicas, como por exemplo, as enzimas calpaína e calpastatina relacionadas à maciez da carne (Barendse, 1997; Page et al., 2002; Grisart et al., 2004, Casas et al., 2005). Abordagens mais específicas que permitam o conhecimento de parâmetros genéticos relativos às características da variabilidade das respostas dos touros é uma necessidade inerente à aplicabilidade desta biotécnica.

As primeiras aplicações de marcadores moleculares na produção animal envolveram a identificação de características condicionadas por um loco

detectar, e por isso já existe a determinação de marcadores associados ao gene da Leptina (Almeida et al., 2003), do LH β (Weimer et al., 2007), do FSH β (Duarte et al., 2005) e da IGF-IR (Oliveira et al., 2002), que permitem selecionar animais com maior potencial para ganho de peso ou para um melhor desempenho reprodutivo na fertilização de vacas. Estes marcadores segregam de modo mendeliano e estão relacionados a características monogênicas ou apresentam distribuição compatível com as características poligênicas esperadas, como as ligadas à reprodução, podendo ser protéicos (antígenos e isoenzimas), seqüenciais de ácido desoxirribonucléico (DNA) de genes conhecidos, e ou de fragmentos de seqüência com função desconhecida (Ferreira e Grattapaglia, 1998; Davise DeNise, 1998). Os marcadores de DNA apresentam maiores níveis de polimorfismos do que os protéicos, pois permitem a obtenção de dados de regiões não transcritas bem como a identificação de mutações silenciosas (Aittomaki et al., 1995).

Os pesquisadores Davis e DeNise (1998) dividiram a *Marker Assisted Selection (MAS)* em três etapas ou fases de desenvolvimento, sendo elas: i) fase de detecção - um ou mais marcadores moleculares associados com o QTL são identificados e o efeito do alelo e a localização do QTL no genoma são estimados; ii) fase de avaliação - os marcadores previamente detectados são testados em populações alvos ou famílias para determinar se o marcador e o QTL estão segregando nas populações; iii) fase de implementação - os dados são combinados com fenótipos e informações de pedigree na avaliação genética para a predição de indivíduos com méritos genéticos. A maioria das características de interesse econômico é quantitativa, apresentando, então, interação genótipo x ambiente e genótipo x manejo. A MAS pode ser útil para selecionar essas características, permitindo a eliminação de genótipos desfavoráveis em uma única geração, reduzindo os custos dos testes de progênie, facilitando os esquemas de acasalamento, maximizando os efeitos heteróticos e possibilitando a identificação de efeitos transgressivos em raças sintéticas. A MAS é particularmente útil para a seleção de características de baixa herdabilidade de difícil mensuração, e a seleção de indivíduos que embora não exibam traços em questão, influenciam, por exemplo, o efeito do genótipo de touros na produção de suas filhas. Permite ainda a seleção de animais jovens antes do desenvolvimento dos caracteres reprodutivos (Weimer, 2003), porém, sua aplicação necessita do conhecimento prévio da variabilidade genética dos animais e da detecção de associações entre os caracteres quantitativos e os marcadores moleculares. As decisões sobre o que selecionar devem ser baseadas nos aspectos econômicos, para que o produto genético possa ser utilizado comercialmente e para que o procedimento de seleção a ser utilizado, seja uma combinação da seleção assistida por marcadores e pela seleção de alelos de *QTL* (Montgomery & Kinghorn, 1997; Spelman & Bovenhuis, 1998).

2.2. Microssatélites

Um tipo de marcador é os microssatélites ou *Short Tandem Repeat (STR)*, que são pequenas seqüências não codificadoras de 1 a 6 pares de bases repetidas, normalmente em número menor do que 100 repetições (Tautz, 1993). Por apresentarem alto polimorfismo, codominância, facilidade de

detecção por PCR, facilidade de determinação dos alelos e genótipos, e por ocorrerem com grande frequência ao longo do genoma da maioria dos organismos eucariotos, os microssatélites têm sido usados extensivamente para caracterização de raças, mapeamento genético e no auxílio de programas de melhoramento (Tautz, 1993).

O polimorfismo de microssatélites é resultado do número variável de elementos repetitivos. De acordo com Comings (1998) e Li et al. (2004), os STR localizam-se preferencialmente em regiões promotoras e favorecem o DNA a adquirir a conformação DNA-Z. Cada bloco de repetições é geralmente menor do que 100 pares de nucleotídeos (Tautz, 1989). Do mesmo modo que outras regiões repetitivas do genoma, a variação do número de repetições em cada loco é provavelmente resultante de erros no deslocamento da DNA polimerase “Slippage” durante a replicação do DNA (Regitano e Coutinho, 2001).

Comings (1998) propôs que microssatélites exerçam efeito sobre a expressão dos genes aos quais estejam associados, sendo esta ação dependente do tamanho da repetição. Isso se baseia na observação de que seqüências ricas em purinas e pirimidinas alternadas (CA)_n como os microssatélites apresentam a capacidade de formar o DNA-Z em condições fisiológicas. Como há uma tendência para as seqüências de DNA-Z não se distribuírem ao acaso, e sim, se concentrarem nas regiões de iniciação da transcrição, os microssatélites por se localizarem também nestas regiões teriam um papel potencial na regulação gênica. Para Schroth et al. (1992), a formação de DNA-Z pode influenciar a expressão do gene por facilitar o contato com fatores de transcrição, pois esta conformação expõe as bases da molécula.

Segundo Li et al. (2004), as regiões de microssatélites podem ocorrer em regiões codificadoras de proteínas, em regiões 3' ou 5' não traduzidas (UTRs- Untranslated Regions) e em introns, exercendo forte influência sobre a expressão gênica, não importando se a localizados a 5' ou a 3' dos genes ou dentro dos mesmos, em introns ou exons. Esses autores mostraram que os microssatélites podem influenciar a expressão do gene por levar à perda ou ganho de função gênica, afetando a transcrição ou a tradução se localizados a 5' do gene, por levar a ocorrência de “slippage” na duplicação do DNA, por afetar o “splicing” do pré mRNA e o transporte para o citoplasma (se localizados em introns) ou por interferir na formação de heterocromatina.

A localização dos STRs BMS3004, ILSTS002, IDVGA-51, HEL5 E AFZ1 é a seguinte: i) BMS3004 está localizado na posição 1.7 cM do cromossomo BTA18 (Stone et al., 1996; Kappes et al., 1997). É um trinucleotídeo (CCA)_n que se encontra a uma distância de 46.5cM a 5' do gene LH, localizado na posição 48.2 cM do mesmo cromossomo; ii) ILSTS002 está localizado na posição 55.9 cM do cromossomo BTA18 (Kemp et al., 1992). É um dinucleotídeo (CA)_n que se encontra a uma distância de 7.7 cM a 3' do gene LH; iii) IDVGA-51 é um dinucleotídeo (CT)_n que se encontra na posição 84 cM do cromossomo BTA4 (Kappes et al., 1997) a uma distância de 3 cM a 5' do gene obese, localizado na posição 87 cM do mesmo cromossomo; iv) HEL5 está mapeado na posição 13 cM do cromossomo BTA21 (Bishop et al., 1994). É um dinucleotídeo (CA)_n que se encontra na mesma posição do gene IGF1R;

iiii) AFZ1 está localizado na posição 68 cM do cromossomo BTA21 (Jorgensen et al., 1996). É um dinucleotídeo (CA)_n que se encontra a uma distância de 49 cM a 3' do gene IGF1R.

Os microssatélites podem ser empregados na identificação de regiões cromossômicas onde se localizam QTLs. A identificação de microssatélites por técnica de PCR pode ser feita com o uso de iniciadores (*primers*) complementares às seqüências que flanqueiam o microssatélites, permitindo gerar padrões alélicos que, se associados a dados fenotípicos de interesse, possibilitarão a seleção precoce de seus portadores. A maior dificuldade técnica está relacionada à identificação dos genótipos, principalmente nos locos microssatélites constituídos por repetições de um a dois nucleotídeos, nos quais, dois alelos adjacentes diferem entre si por apenas um ou dois pares de bases, respectivamente (Regitano e Coutinho, 2001).

2.3. Polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs)

Dentre os diversos marcadores moleculares destacam-se os *SNP*, variações de seqüências de DNA que ocorrem quando um nucleotídeo A,T,C ou G, na seqüência do genoma, é alterado. Os SNPs ocorrem em grande quantidade no genoma e normalmente são constituídos por dois alelos que se diferenciam por um par de bases. Os dois SNPs já identificados e utilizados para a seleção de aspectos reprodutivos são o FSHR (Houde et al., 1994) e o LHR (Marson et al., 2005), ambos localizados no cromossomo 11.

Os recentes avanços dos sistemas de seqüenciamento automatizado têm possibilitado a identificação de variações individuais resultantes, por exemplo, de mutações de ponto, substituições, deleções e adições de um nucleotídeo que, uma vez caracterizadas, constituem os marcadores SNPs. Conhecendo-se a mutação, pode-se genotipar o SNP com o uso de endonucleases específicas após a amplificação do DNA. Os SNPs são marcadores localizados em qualquer parte do genoma, podendo ter implicações diretas nas funções da proteína correspondente (Regitano e Coutinho, 2001). Para mapeamento, cinco marcadores SNPs fornecem aproximadamente a mesma informação que um loco microssatélites, de tal forma que os mapas de SNPs devem ter densidade maior do que os microssatélites (Beuzen et al., 2000).

2.4. Classificação andrológica por pontos (CAP)

Um dos fatores determinantes da eficiência reprodutiva dos rebanhos de corte é a fertilidade do touro, expressa pela qualidade do sêmen que está associada à biometria testicular, e pela capacidade de serviço (Fonseca et al., 1991; Fonseca et al., 1997a). Certamente, essa afirmação se deve ao fato de que, quanto maior a eficiência reprodutiva, melhores serão os resultados alcançados nas áreas de manejo reprodutivo, seleção e produção animal (Guimarães, 1999).

Segundo Vale Filho (1997), muitas escolas clássicas de andrologia influenciaram no processo de avaliação, diagnóstico e classificação de touros no Brasil. Lagerlöff (Suécia) e Willians (Estados Unidos), nas décadas de 30 a 60; Blom (Dinamarca), a partir de 1950 até os dias atuais; Bonsma (África do

Sul), nas décadas de 60 e 70; Galloway (Austrália), nas décadas de 70 e 80; Chenoweth (USA), nas décadas de 80 e 90 e Vale Filho (Brasil), a partir de 1970 até a atualidade, ou de Barth (Canadá) a partir dos anos 90. Porém, Chenoweth & Ball (1980) desenvolveram um padrão de avaliação andrológica de touros denominado "Bulls Breeding Soundness Evaluation" (BBSE) para touros europeus (*Bos taurus taurus*) destinados à reprodução. No Brasil, o método muito utilizado foi desenvolvido por Vale Filho (1988) que criou o sistema de "Classificação Andrológica por Pontos" (CAP) para a seleção de touros zebuínos (*Bos taurus indicus*).

O BBSE classifica os animais de acordo com perímetro escrotal em função da faixa etária, conjuntamente com aspectos físicos e morfológicos do sêmen, sendo pontuados no máximo em 40, 20 e 40 pontos, respectivamente (anexo B). Por este sistema, os animais podem ser enquadrados em três categorias quanto ao potencial reprodutivo: satisfatórios (de 60 a 100 pontos), questionáveis (de 30 a 59 pontos) e insatisfatórios (de 0 a 29 pontos) (Chenoweth & Ball, 1980).

Vale Filho (1989; 1997) e Vale Filho et al. (1995; 1999) propõem o uso do CAP como metodologia de trabalho, sendo estabelecido um índice de 0 a 100 pontos para comparação entre touros sob o ponto de vista andrológico. Vale Filho (1988) sugere o dobro da idade para o mesmo perímetro escrotal, proposta para *Bos taurus taurus*, destacando o fato de que, dependendo do nível nutricional, tais medidas somente serão alcançadas em uma idade muito avançada. Segundo Vale Filho (1989) e Vale Filho et al. (2001), a estimativa de um índice andrológico como o CAP auxilia na comparação entre touros de uma mesma raça quanto a sua capacidade fecundante, avaliada por meio do perímetro escrotal e aspectos físicos e morfológicos do sêmen. Fonseca (2000) sugere que o CAP não deve ser indicado para reprodutores que participam de exposições e concorrem a prêmios de melhores da raça, porque esses animais recebem alimentação diferenciada e, como consequência, alcançam pesos muito elevados precocemente, o que determina maior desenvolvimento do perímetro escrotal.

Fonseca et al. (1989), com a finalidade de obter uma tabela de simples aplicação que pudesse prever a fertilidade de touros *Bos taurus indicus* propuseram uma tabela específica para avaliação andrológica do reprodutor de origem índica. De forma similar ao padrão norte-americano BBSE e Vale Filho (1988), o método avalia três características reprodutivas: perímetro escrotal (40 pontos), aspectos físicos do sêmen (20 pontos) e aspectos morfológicos do sêmen (40 pontos), porém com valores diferentes no perímetro escrotal em diferentes faixas etárias. No entanto, com o melhoramento e os avanços genéticos de rebanhos (*Bos taurus indicus*) que já vinham sendo selecionados há alguns anos, essa mesma tabela proposta por Fonseca et al. (1989) foi reformulada e atualizada. Para isso, foram avaliados mais de 2000 animais predominantemente da raça Nelore (Fonseca et al., 1997a). A tabela proposta por Fonseca et al. (1997a) determina uma nova classificação do perímetro escrotal de acordo com a faixa etária e também propõe modificações na pontuação quanto aos aspectos físicos e morfológicos do sêmen, pontuados no máximo em 25 e 35 pontos, respectivamente. Atualmente, o CBRA (1998) preconiza duas tabelas de pontuação, uma instituída por Fonseca et al.

(1997a) para touros *Bos taurus indicus* e outra para touros *Bos taurus taurus* segundo os padrões de Chenoweth & Ball (1980).

Assim, considerando-se a interpretação técnica das características reprodutivas que compõem as tabelas, Fonseca et al. (1992) sugerem que ao final do somatório de pontos, os touros sejam considerados:

a) aptos - aqueles que não apresentam restrição de qualquer natureza sendo subdivididos em três categorias: excelentes, muito bons e bons, de acordo com a pontuação obtida.

b) aptos com restrição - aqueles que apresentam alguma característica indesejável em algum parâmetro avaliado, mas que se pressupõe reversível ou de alta variabilidade, por exemplo, um defeito individual acima do percentual indicado como limite, ou motilidade espermática abaixo de 50 %. Nesses casos, novos exames serão realizados e, enquanto a característica indesejável não for corrigida, o animal pode ser utilizado com número menor de vacas.

c) inaptos temporários - aqueles que apresentam quadros comuns de problemas genéticos e adquiridos, porém sem condição de diferenciação no momento por falta de indicadores biológicos. Novos exames serão realizados após cuidados terapêuticos e/ou de manejo. Se o problema for de causa genética o animal será descartado; se for adquirido, o animal será liberado para o serviço após total recuperação.

d) inaptos definitivos (descarte) - aqueles que apresentam quadros conclusivos de patologias irreversíveis, herdáveis ou não, como por exemplo, a hipoplasia gonadal, a disfunção genética dos epidídimos, alterações de aprumos e degeneração testicular de caráter irreversível. Os animais que não alcançaram o perímetro escrotal mínimo estabelecido para a sua faixa etária também são considerados inaptos à reprodução.

2.5. Termografia infravermelho na reprodução

O potencial reprodutivo varia consideravelmente entre touros, e a seleção dos critérios para escolher touros com superior capacidade reprodutiva permanece pobremente definida. Infelizmente não há um teste simples ou uma medida acurada que tenha um grande valor de predição (Kastelic et al., 2001).

A temperatura superficial do escroto reflete as temperaturas do testículo e epidídimo (Purohit et al., 1985). Entretanto, vários são os fatores que contribuem para a regulação da temperatura testicular. O plexo pampiniforme é uma rede venosa complexa que rodeia a artéria testicular. Essa estrutura é chamada de "cone vascular testicular" (Hees et al., 1984) e é onde o sangue arterial é refrigerado à medida que o calor é transferido da artéria à veia em um sistema clássico de transferência de calor contracorrente (Hees et al., 1984). O sistema sanguíneo e linfático subcutâneo é extenso e rico em vasos sanguíneos localizados superficialmente, facilitando a transferência de calor (Cook et al., 1994). O músculo liso das arteríolas cutâneas está inervado pelo sistema nervoso simpático, que ocasiona dilatação no calor e contração no frio. Um aumento da temperatura escrotal causa dilatação das arteríolas por ação direta do calor e por remoção reflexa do tônus vasoconstritor simpático. O colo escrotal definido e pendulaste estabelece uma área extensa para a perda de calor, afastando os testículos do abdômen. A túnica dartos que é uma camada delgada de músculo liso abaixo da pele escrotal é controlada por nervos

simpáticos e se relaxa ou contrai, frente ao calor ou frio, respectivamente. O músculo cremaster também participa desses efeitos quando pode se contrair no frio ou relaxar no calor, porém, como músculo estriado que é, não consegue uma contração por período muito longo.

Quando Kastelic (1996) mediu a temperatura média de três áreas escroto-testiculares avaliadas (superior, média e inferior), encontrou 30.4°C, 29.8°C e 28.8°C (temperatura superficial escrotal), 33.3°C, 33.0°C e 32.9°C (temperatura subcutânea escrotal) e 34.4°C, 34.4°C e 34.5°C (temperatura intratesticular), tendo um gradiente de temperatura de 1.6°C, 0.4°C e 0.2°C respectivamente, refletindo que o gradiente de temperatura mais pronunciado foi o da superfície escrotal, que é oposto ao gradiente intratesticular.

Barth and Oko (1989) estabeleceram que, quando as espermatogônias não são afetadas pela incidência da temperatura e umidade, o intervalo entre a interrupção do estresse calórico e a restauração dos espermatozoides normais encontrado no ejaculado corresponde ao intervalo desde o início da diferenciação espermática (espermiogênese) até a ejaculação (maturação epididimária). Pesquisadores têm mostrado que a temperatura da superfície escrotal é altamente correlacionada com a temperatura do fundo de saco escrotal (Coulter, 1988), e que o termograma originado pelo termógrafo tem acurácia na informação sobre a termorregulação testicular, essencial para a produção e qualidade espermática (Waites, 1970; Setchell, 1978).

A espermatogênese é um processo fisiológico longo e sensível que depende de uma temperatura testicular em torno de 2°C a 6°C abaixo da temperatura corporal para que sejam produzidos espermatozoides férteis. A elevação da temperatura testicular por efeitos adversos causa danos à produção, à qualidade espermática (Wolf et. al., 1985; Coulter, 1988), e à fertilidade do macho (Waites, 1970; Setchel, 1978) e tem sido documentada em várias espécies animais. Em 1936, Lagerlof induziu experimentalmente a elevação da temperatura testicular, levando a um aumento significativo das patologias espermáticas. A insulação testicular e o uso de câmaras climáticas passaram a ser métodos experimentais para o estudo dessas possíveis alterações encontradas na morfologia espermática, ocasionadas por uma possível degeneração testicular, sendo que a volta à normalidade depende da severidade do insulto térmico.

Como a estação de monta dos bovinos ocorre nos períodos mais quentes do ano, isso pode vir a prejudicar a eficácia e eficiência reprodutiva dos rebanhos de cria, portanto é importante saber se o ambiente (temperatura, umidade do ar, radiação e velocidade do vento) pode interferir na espermatogênese a ponto de desqualificar um touro à monta a campo em um rebanho de vacas. Brito et al. (2002) relatam que a temperatura e umidade são fatores ambientais que podem estar relacionados com mudanças na qualidade do sêmen.

Quando a temperatura do testículo aumenta, a proporção de espermatozoides defeituosos também aumenta e a recuperação espermática depende da magnitude e duração do aumento da temperatura (Kastelic, 2001). Touros que exibem uma temperatura escrotal alterada têm uma menor porcentagem de espermatozoides com cabeças e caudas normais, e uma maior porcentagem de espermatozoides com gotas protoplasmáticas proximais

(Lunstra & Coulter, 1997). Uma ferramenta valiosa que pode ajudar no diagnóstico desse tipo de alteração é a termografia infravermelho que pode ser usada em qualquer área, desde que haja variação de temperatura. Vários estudos têm demonstrado os efeitos adversos da temperatura testicular elevada sobre a quantidade e qualidade seminal, e a fertilidade subsequente do touro (Correa-Calderon, 2004).

A termografia infravermelho é uma tecnologia que provê uma imagem de emissão infravermelho de um objeto determinado, permitindo uma estimativa da temperatura superficial deste objeto com a aproximação de 0,1°C (Coulter et al., 1988). Sendo assim, quando a temperatura ambiental for elevada em concordância com a umidade relativa do ar e influenciar no estresse dos animais, a termografia infravermelho poderá ser útil como método auxiliar na avaliação da sanidade reprodutiva dos touros a campo, principalmente.

3. HIPÓTESES

Há presença de marcadores moleculares em machos bovinos que apresentam variabilidade nas pontuações da CAP.

O uso da termografia infravermelho detecta variações térmicas na região escrotal que estão associadas com a qualidade espermática do macho bovino.

4. OBJETIVOS

Gerais

- Identificar marcadores moleculares relacionados à fertilidade de touros;
- Buscar, por meio da termografia infravermelho, a determinação do gradiente de temperatura escrotal que possa influenciar na espermatogênese dos machos reprodutores.

Específicos

- Realizar a detecção de marcadores moleculares visando identificar precocemente a qualidade espermática;
- Confirmar a associação entre os marcadores moleculares BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, Hel5, FSHR, LHR e AZF1 e os diferentes parâmetros do exame andrológico componentes da CAP.

CAPÍTULO II

Artigo I

**Avaliação da qualidade seminal e o perímetro escrotal de touros Braford
por meio de marcadores moleculares STRs e SNPs**

Trabalho a ser enviado para publicação

RESUMO

Fatores genéticos ligados à reprodução possuem uma herdabilidade baixa; o tempo e a pressão de seleção são fatores fundamentais para fixar os genes desejáveis em uma população. Foram analisadas e acompanhadas as associações moleculares com a performance reprodutiva de cinco repetições pequenas em *tandem* (STRs – BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, AFZ1) e dois polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs – receptor do FSH e receptor do LH), próximos a genes envolvidos com a função reprodutiva em um rebanho da raça Braford. O primeiro experimento constou da totalidade de 87 touros da raça Braford dos 7 aos 24 meses de idade que foram analisados andrologicamente pela CAP. O segundo experimento constou de 17 touros que continuaram a ser examinados através da CAP aos 28, 32 e 36 meses de idade e que participaram do experimento anterior, com a diferença de que foram acompanhados posteriormente, por motivo do desempenho durante a estação de monta. O número de alelos variou de 2 a 8, tendo uma frequência de 0.6% nos alelos 169 e 175 dos marcadores HEL5 e ILSTS002 respectivamente a 75% no alelo T do marcador do receptor do LH. Não foi verificada associação significativa entre os marcadores STRs BMS3004, HEL5, AFZ1, IDVGA51 e ILSTS002 e a performance reprodutiva em ambos os experimentos. Entretanto, no experimento I, o SNP LHR mostrou sugestiva relação com a identificação de PE inferior a 29 cm aos 24 meses ($P=0.07$). O SNP FSHR mostrou significativa relação com o genótipo GG para menor PE ($P=0.02$) aos 24 meses, os genótipos CG e GG para identificação do PE inferior a 29 cm ($P=0.003$) e o genótipo CC para maior pontuação no CAP. No experimento II, em que foi analisado o PE aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses e o CAP aos 24, 28, 32 e 36 meses, no SNP LHR foi encontrada sugestiva relação do genótipo TT com um PE menor aos 7 meses de idade ($P=0.08$). No SNP FSHR foi encontrada relação ao maior PE aos 7 meses ($P=0.02$), 24 meses ($P=0.01$), 28 meses ($P=0.03$), 32 meses ($P=0.02$) e 36 meses de idade ($P=0.03$) com o genótipo CC, porém não foi encontrada relação com a CAP em ambos os marcadores. Em conclusão, foi observada uma forte associação do SNP FSHR com o genótipo GG para menor PE e CAP superior para o genótipo CC e a possibilidade de quando encontrado os genótipos CG e GG encontrarmos PE abaixo da média em dois desvios padrão, aos dois anos de idade.

Palavras-chave: Marcadores moleculares, STRs, SNPs, perímetro escrotal, classificação andrológica por pontos.

ABSTRACT

Genetic factors related to reproduction have low heritability to selection factors are of fundamental importance to fix desirable genes associated to a define population. We analyzed the molecular associations with reproductive performance in a herd of five small tandem regions (STRs - BMS3004, ILSTS002, IDVGA51, HEL5, and AFZ1) and two single nucleotide polymorphisms (SNPs - FSH receptor and LH receptor), genes involved in reproductive function. Samples were collected from 87 bulls submitted to analysis from 7 to 36 mo of age. The first experiment consisted of all 87 Braford bulls from 7 to 24 mo of age and analyzed by bull breeding soundness examination (BBSE). The second experiment consisted of 17 bulls examined by the PAC at 28, 32 and 36 mo of age and animals were part of the same previous experiment I. The number of alleles ranged from 2 to 8, having a frequency of 0.6% in the 169 and 175 alleles for ILSTS002 and HEL5, respectively. We also observed that 75% T alleles were observed for LH receptor. There was no significant association between markers BMS3004 STRs, HEL5, AFZ1, IDVGA51 and ILSTS002 and reproductive performance in both experiments. However, in experiment I, the SNP LHR showed suggestive relation to the identification of scrotal circumference (SC) less than 29 cm at 24 mo ($P=0.07$). The FSHR SNP showed a significant association with the GG genotype for low SC ($P=0.02$) at 24 months, the CG and GG genotypes to identify SC less than 29 cm ($P=0.003$) and CC genotype for highest score in BBSE. In the second experiment, the SC were analyzed at 7, 24, 28, 32 and 36 mo and the BBSE at 24, 28, 32 and 36 mo for LHR in the SNP, suggests the ratio TT genotype with a smaller SC was observated 7 mo of age ($P=0.08$). We observed a difference for FSHR in relation to the largest SCat 7 ($P=0.02$), 24 ($P=0.01$) 28 ($P=0.03$) 32 ($P=0.02$) and 36 ($P=0.03$) mo of age with the CC genotype, but was not found in relation to the BBSE in both markers. A strong association of FSHR genotype showing a GG higher for SC and BBSE and a lower CC genotype. In conclusion, we observed a strong association of FSHR SNP genotype GG higher for SC and BBSE reduced the possibility of CC genotype and when found the CG and GG genotypes.

Keywords: Molecular markers, STRs, SNPs, scrotal circumference, BBSE.

INTRODUÇÃO

O impacto da fertilidade dos touros em rebanhos tem sido enfatizado por vários pesquisadores (Barth & Waldner, 2002; Kastelic & Thundathil, 2008) e dentro do contexto geral e tradicional do exame da aptidão reprodutiva inclui-se a medição do perímetro escrotal (PE), o qual tem correlação alta com o peso vivo e o volume testicular (Menegassi et al., 2011a; Fordyce et al., 2013). O perímetro escrotal é um bom indicador de produção diária de espermatozóides, especialmente em touros jovens que a mantém relativamente constante em cerca de $9-12 \times 10^6$ por grama de testículo/dia (Entwistle et al., 1992). Animais que apresentam maior perímetro escrotal possuem fenotipicamente e geneticamente características reprodutivas que são transmitidas a ambos os sexos, incluindo as maiores porcentagens de espermatozóides móveis e morfológicamente normais (Coulter & Foote, 1979; Smith et al., 1989; Corbet et al. 2013). Além disso, o perímetro escrotal pode ser utilizado como um indicador de puberdade do touro (Wildeus et al., 1984), pois tem sido definido como capaz de produzir um ejaculado com ≥ 50 milhões de espermatozóides com motilidade $\geq 10\%$.

A fertilidade é influenciada por ampla gama de fatores, porém nenhum teste único de diagnóstico pode prever, com precisão, a fertilidade (Kastelic & Thundathil, 2008). Entretanto, a avaliação do touro deve ser realizada por meio de uma medida exata da circunferência escrotal. As características seminais são afetadas por vários fatores como a idade, o volume testicular, o conteúdo nutricional da dieta, a época e o local do exame, a sazonalidade ambiental e a condição corporal dos touros (Chacon et al., 2002; Fuerst-Waltl et al., 2006; Teixeira et al., 2011).

As análises quantitativas e qualitativas do sêmen, a avaliação do aparelho genital, o exame clínico geral e o comportamental (libido e habilidade de monta) têm sido descritos como as etapas do exame da aptidão reprodutiva e usados para a determinação da capacidade fecundante de reprodutores bovinos (Kealey et al., 2006; Alexander, 2008; Waldner et al., 2010; Menegassi et al., 2011b). Estudos têm sugerido associações indesejáveis entre o meio ambiente e a fertilidade em reprodutores (Rhoads, 2013; Nichi, 2006; Brito, 2003), influenciando na eficiência reprodutiva de bovinos de corte.

A dificuldade de prever o potencial reprodutivo de um macho parece ser devido à utilização de animais que podem expressar subfertilidade a campo, ou mesmo em coleta de sêmen nas centrais de inseminação por vários motivos. As características espermáticas, tais como a motilidade ou a porcentagem de espermatozóides normais formam uma relação positiva com uma alta fertilidade, que muitas vezes pode ser considerada uma relação assintótica, portanto, nunca conclusiva (Flowers, 2013). Devido à dificuldade em detectar o potencial reprodutivo do animal torna-se necessário o desenvolvimento de testes que possam melhor expressar a capacidade fertilizante de um reprodutor. A utilização de biotécnicas reprodutivas tem fornecido novas ferramentas para os programas de melhoramento animal e, dessa forma, contribuído para melhorar a eficiência da produção de bovinos de corte. No entanto, os avanços têm sido lentos, especialmente em razão da dificuldade na identificação dos genes responsáveis pelas características fenotípicas de interesse zootécnico. Além disso, os fatores genéticos como a

composição da raça (Barth & Waldner, 2003; Koivisto et al., 2009; Silva et al., 2011) podem afetar as características seminais. A maior parte das características de interesse econômico apresenta padrão de manifestação quantitativo, sendo conseqüentemente controlado por vários genes, cujos efeitos se somam para construir o fenótipo final. Entretanto, alguns genes apresentam papel majoritário na expressão dessas características por serem responsáveis por grande parte da manifestação do fenótipo, sendo denominados assim, como genes principais (Montaldo & Meza-Herrera, 1998). Marcadores moleculares poderão ser utilizados para prever doenças e ainda antecipar a potencialidade reprodutiva de machos (Palmer, 2013). Estudos para determinar a presença de marcadores moleculares para essas características ainda são reduzidos.

Weimer et al. (2007) detectaram associação positiva para o gene do hormônio luteinizante β (LH β) e os marcadores ILSTS002 e BMS3004 em relação ao intervalo de parto em bovinos. No caso de gene IGF1R, Oliveira et al. (2002) observaram maior intervalo entre partos para os marcadores HEL5 e AFZ1. O gene da Leptina está diretamente relacionado com alelos do marcador IDVGA51, aumentando o intervalo entre partos em fêmeas bovinas (Almeida et al., 2003). Os hormônios gonadotróficos luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH), cuja ação é mediada via ligação a receptores de membrana específicos em células alvo apresentam funções essenciais à manifestação da idade à puberdade. De acordo com Aittomaky (1995), deleções ou mutações nos genes receptores podem alterar as interações hormônio/receptor, mudando a transdução do sinal endocrinológico, podendo interferir na resposta fisiológica esperada. Assim, a estratégia de avaliação dos hormônios gonadotróficos na manifestação da puberdade deve estar associada ao estudo dos genes e seus receptores.

O objetivo deste estudo foi avaliar a utilização de marcadores moleculares na predição do PE aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses de idade, e correlacionar a presença desses marcadores com parâmetros de qualidade espermática e com a classificação dos touros pela CAP.

MATERIAL E MÉTODOS

Experimento I

O presente experimento foi conduzido em um rebanho comercial de 87 reprodutores machos da raça Braford localizados no município de Uruguaiana, região da fronteira oeste do Rio Grande do Sul, Brasil. A localização geográfica da propriedade é de 29°56'8.82", de latitude sul e de 56°55'25.18", longitude oeste. O clima na região é classificado como Cfa, de acordo com a classificação de Köppen-Geiger.

Todos os touros foram mantidos nas mesmas condições de alimentação: até os sete meses de idade com leite materno; aos sete meses foram desmamados e então alocados em pastagem cultivada de azevém (*Lolium multiflorum*) até os 12 meses; entre os 12 e 18 meses estiveram em pastagem consorciada de sorgo forrageiro (*Sorghum bicolor*) e milheto (*Pennisetum americanum*); entre os 18 e 24 meses de idade novamente foram para pastagens cultivadas de azevém. Durante todo o período receberam suplementação mineral e água *ad libitum*. Todos os reprodutores apresentaram

boas condições corporais durante todo o experimento com um escore corporal variando de 3,5 a 4,5, onde o escore 1 representa um animal muito magro e o escore 5 um animal muito gordo.

As coletas de sangue e a medição do PE foram realizadas em março do ano de 2011, no desmame aos 7 meses de idade, e em setembro de 2012 aos 24 meses de idade, quando foi realizado também o exame de aptidão reprodutiva avaliada pela CAP, segundo os padrões preconizados por Chenoweth & Ball (1980).

Experimento II

O segundo experimento foi realizado com 17 touros que fizeram parte do Experimento I, com a diferença de que estes touros foram avaliados, após os 24 meses, aos 28, 32 e 36 meses de idade. A finalidade foi caracterizar os marcadores moleculares com a verificação da variabilidade da pontuação alcançada na CAP durante uma maior sequência de exames do que no primeiro experimento.

Classificação andrológica por pontos

A CAP classifica os animais de acordo com o PE em função da faixa etária, conjuntamente com aspectos quantitativos e qualitativos do sêmen, sendo pontuados no máximo em 40, 20 e 40 pontos respectivamente. Por este sistema, os animais são classificados em três categorias quanto ao potencial reprodutivo: satisfatórios (de 60 a 100 pontos), questionáveis (de 30 a 59 pontos) e insatisfatórios (de 0 a 29 pontos), conforme demonstrado na tabela 1 (Chenoweth & Ball, 1980).

O PE foi medido após a colocação dos testículos em uma posição ventro caudal no fundo de saco, ao redor do maior diâmetro com uma fita milimetrada (Ideal Instruments®, A Neogen Company). Foram realizadas quatro coletas de sêmen por touro durante um ano (uma por estação), por meio do eletro ejaculador tipo Autojac-Neovet® (Neovet, MG, Brazil) no módulo manual. As coletas de sêmen foram realizadas nos dias 20/10/2011, 03/02/2012, 17/04/2012 e 07/07/2012, correspondendo, respectivamente, às estações primavera (Pri), verão (Ver), outono (Out) e inverno (Inv), no experimento II. No experimento I, a coleta foi realizada no dia 20/10/2011 (primavera).

Para tentar identificar touros com perímetros escrotais reduzidos, o que chamamos de Classe, utilizou-se trabalho que referencia como média da raça Braford para os dois anos, PE de 34,93 cm, com dois desvios padrão, total de 5,82 cm (Menegassi et al., 2011). Portanto, foram considerados identificados os touros com PE inferior a 29 cm, que poderiam ser considerados hipoplásicos.

O turbilhão (Tb) foi medido antes da diluição do sêmen e expresso em cruces, variando de zero a cinco. O vigor (V) numa escala crescente de zero a cinco e a motilidade (M) em porcentagem foram avaliados com a diluição do sêmen em solução fisiológica em microscópio ótico (Leica CME, Buffalo, New York, USA) em aumento de 100x. Uma alíquota de sêmen foi adicionada a formol salino tamponado (1:10) e posteriormente armazenado para a avaliação morfológica dos espermatozoides em contraste de fase, usando-se como contra prova um esfregaço em lâmina, corado com eosina-negrosina.

Os defeitos maiores (DMA - defeito de acrossoma, cabeça anormal, cabeça dupla, cabeça pequena anormal, gota protoplasmática proximal, peça intermediária anormal, cauda acessória e cauda fortemente dobrada), os defeitos menores (DMe - gota protoplasmática distal, implantação abaxial, cauda dobrada e cabeça normal solta) e os defeitos totais (DT) foram considerados na contagem de 200 células espermáticas de cada animal avaliado. Para essas análises foi utilizada a classificação adotada pelo BBSE (2000) da Western Canadian Association of Bovine Practitioners (WCABP).

Coleta de amostras para extração de DNA e determinação dos genótipos

As amostras de sangue foram coletadas por punção da veia coccígea com anticoagulante ácido etileno diamino tetra acético (EDTA), refrigeradas e transportadas ao Laboratório de Biotecnologia do Hospital Veterinário da ULBRA, e armazenadas até o momento da extração do DNA, realizada conforme método de Miller et al. (1988). A identificação do cromossomo, onde estão mapeados, gene alvo e referências da técnica empregada estão referenciados na Tabela 2.

Sete marcadores moleculares foram avaliados, sendo cinco STRs e dois SNPs.

Os STRs analisados foram o AFZ-1 e HEL5 que são associados ao gene do receptor para IGF-1 (IGF-1R), o ILST002 e BMS3004 associados ao gene LH β , e o IDVGA51 associado ao gene da Leptina. Todos os microssatélites foram investigados através da amplificação do DNA pela *Polymerase Chain Reaction* (PCR), com “primers” e temperaturas de anelamento específicas. As reações tiveram um volume final de 25 μ l e continham 50ng de DNA. Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10,5 %, não desnaturante, com tampão de TBE (Tris, Ácido Bórico e EDTA) pH 8,3, 300 V, 10 mA por aproximadamente 24h (Lahiri et al., 1997). Após a coloração com nitrato de prata, os fragmentos foram analisados, usando para comparação o marcador de peso molecular de 25 pb.

Para os marcadores do tipo SNPs, (FSHR e LHR), o DNA foi amplificado por PCR e o produto gerado foi fragmentado com enzimas de restrição, AluI e HhaI respectivamente. Os produtos da amplificação da PCR foram analisados em gel vertical de poliacrilamida 10,5%, não desnaturante, com tampão de TBE, pH 8,3, 300 V, 10 mA por aproximadamente 24h (Lahiri et al., 1997). As reações tiveram um volume final de 25 μ l e continham 50ng de DNA. Após a coloração com nitrato de prata, os fragmentos foram analisados, usando-se para comparação, o marcador de peso molecular de 25 pb. Para a análise dos SNPs, o produto de amplificação que apresenta dois fragmentos (400 e 690 pb) foi clivado com a endonuclease *Sau3A1* conforme o protocolo do fabricante. A endonuclease cliva os dois fragmentos permitindo a identificação de dois polimorfismos: no fragmento de 400 pb a ausência do sítio de restrição corresponde ao alelo A, enquanto no alelo B, a *Sau3A1* gera dois produtos de 310 e 90 pb. O fragmento de 690 pb é clivado nos portadores do alelo 2 produzindo produtos de 470 e 220 pb; o alelo 1 correspondente à ausência de sítio de restrição.

Análises estatísticas

Para avaliar a probabilidade de marcadores moleculares identificarem animais com o PE reduzido (em dois desvios padrão em relação à média da raça para a idade), os touros foram classificados em 0 e 1 (Classe), onde 0 representa os animais com PE próximo à média da raça (34,93 cm) e 1 representa os animais com o PE reduzido em pelo menos 2 desvios padrão (5,82 cm). Os dados de CAP e PE dos 87 touros foram analisados usando o PROC GLM (SAS Institute, 2013) enquanto que os dados de CAP e PE dos 17 touros foram analisados como medida repetida no tempo, pelo mesmo procedimento. Diferenças estatísticas foram consideradas quando o $P < 0,05$.

RESULTADOS

Experimento I

As frequências alélicas identificadas nos STRs AFZ-1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51, BMS3004, e nos SNPs FSHR e LHR estão dispostas na tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3

Frequências alélicas identificadas nos STRs AFZ-1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51, BMS3004

AFZ-1		HEL5		ILSTS002		IDVGA51		BMS3004	
Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%
113	4.5	151	6.4	125	0.6	173	3.8	125	3.8
117	18.6	153	21.8	131	3.2	175	37.8	127	2.6
119	21.2	155	9.6	133	6.4	177	7.7	129	48.7
121	24.4	157	0.6	135	27.6	179	5.1	132	35.3
123	18.6	163	2.6	137	22.4	181	7.1	135	3.2
125	11.5	165	21.2	139	27.6	183	26.9	138	6.4
127	1.3	167	28.2	141	11.5	185	11.5		
		169	9.6	175	0.6				
Total	100.0		100.0		100.0		100.0		100.0

Tabela 4

Frequência alélica dos marcadores SNPs FSHR e LHR

FSHR		LHR	
Alelo	%	Alelo	%
C	74%	C	25%
G	26%	T	75%
Total	100%	Total	100%

Tabela 5

Frequências genotípicas identificadas nos SNPs FSHR, LHR

FSHR		LHR	
Genótipo	%	Genótipo	%
CG	34.6	TT	5.2
CC	15.4	CC	62.8
GG	50.0	TC	32.0
Total	100.0	Total	100.0

Os genótipos dos SNPs detectados com maior frequência foram o FSHR*GG (50,0%) e LHR*CC (62,8%) da população estudada (Tabela 5).

Estabeleceu-se como "Classe" um PE menor do que 29 cm (2 desvios padrão a menos do que a média da raça) tendo sido observados na ficha do exame andrológico, dois genótipos homocigotos GG para o marcador do FSHR, e quatro genótipos heterocigotos CG. Para o marcador LHR foram encontrados 2 genótipos homocigotos TT.

Quando classificados por "Classe" observamos os genótipos CG (0,40) e GG (0,40) quando comparados ao genótipo CC (0,03) do marcador FSHR ($P=0.003$). Na avaliação do PE 24 meses observamos os genótipos CG (34,40cm) e CC (34,70cm) quando comparados ao genótipo homocigoto GG (31,60cm) do marcador FSHR ($P=0.025$). Quando classificados por pontuação (CAP) observamos os genótipos CG (35,50) e GG (48,60) quando comparados ao genótipo CC (72,15) do marcador FSHR ($P<0.001$)(Tabela 6). Com relação ao marcador LHR foi observado genótipo TT em 0,33 em comparação ao CC (0,05) e TC (0,07) para classificação por "Classe" ($P= 0,04$). Já nos demais

marcadores não foi encontrada nenhuma significância sobre o PE aos 7 e 24 meses, e nem com o CAP (Tabela 6). Não foi encontrada diferença entre os alelos dos marcadores STRs AFZ1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51 e BMS3004 para o PE aos 7 e 24 meses e o CAP aos 24 meses (Tabela 6).

Experimento II

Não foi encontrada diferença entre os alelos dos marcadores STRs AFZ1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51 e BMS3004 para o PE aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses e entre o CAP aos 24, 28, 32 e 36 meses de idade (Tabela 7).

Para os SNPs FSHR foram encontradas diferenças para o menor PE aos 24 meses (32,1cm), 28 meses (31,6cm), 32 meses (32,9cm) e 36 meses (31,7cm) para o genótipo CG em relação aos demais alelos ($P < 0,05$). Para o marcador LHR foi encontrada sugestiva diferença para o genótipo TT aos 7 meses de idade (18,0cm) em comparação aos demais alelos ($P = 0,08$). Não foi encontrada diferença para os SNPs FSHR e LHR e a avaliação da capacidade reprodutiva realizada pela CAP (Tabela 8).

O crescimento do PE dos machos sintéticos foi similar para os três genótipos do marcador FSHR até os 24 meses de idade, identificando o alcance à puberdade (Figura 1), porém o PE menor foi observado no genótipo heterozigoto CG. Similarmente, para o marcador LHR houve um crescimento do PE até 24 meses, sendo alcançado um PE menor no genótipo TT aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses (Figura 2).

Os genótipos para o marcador FSHR apresentaram elevação da CAP até os 32 meses de idade, com exceção para o genótipo heterozigoto CG que teve aumento somente dos 28 aos 32 meses de idade (Figura 3). Os homozigotos TT mantiveram baixa pontuação na maioria das avaliações pela CAP, com uma única exceção aos 32 meses (Figura 4).

DISCUSSÃO

Os marcadores selecionados para desenvolver este estudo estão ligados a genes envolvidos no sistema hormonal da reprodução. O PE que ajuda a prever a puberdade e o exame andrológico realizado pela CAP servem de avaliação para estimar o potencial de fertilidade individual do touro ou do rebanho. A associação destes marcadores com a eficiência reprodutiva foi observada principalmente em trabalhos anteriores, com a utilização de fêmeas (Aguiar, 2008; Gottschall, 2011).

Para os marcadores moleculares STRs não houve diferença no índice expresso em pontuação pela CAP, Classe e PE. Esse fato pode ser decorrência da variabilidade da CAP (aprovado, questionável, reprovado) e de a população em estudo ter sido selecionada há mais de 40 anos, apresentando valores de herdabilidade para características reprodutivas com menor evolução em relação a rebanhos comerciais ainda em evolução.

Os resultados do presente estudo demonstram que na presença dos marcadores moleculares SNPs para os receptores de FSH e LH foram detectadas associações ao PE e à pontuação alcançada pela CAP, nos animais da raça Braford. Campagnari (2002) e Marson (2004) não encontraram o marcador para FSHR associado à precocidade sexual em Zebuínos. Em

contraste, diversos autores e os resultados deste estudo demonstraram uma associação entre o marcador FSHR e o PE, que está por sua vez associado à precocidade sexual e à fertilidade de reprodutores (Coulter & Foote, 1979; Smith et al., 1989; Entwistle et al., 1992; Corbet et al., 2013), estando associado, no experimento I, aos genótipos CC do marcador FSHR como maior PE aos 24 meses de idade, à maior pontuação no CAP e à menor possibilidade de identificar um PE menor que 29 cm. No marcador LHR não houve sugestão de algum genótipo identificar um PE inferior a 29 cm.

Quando analisado o experimento II, o marcador FSHR apresentou maior PE aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses também no genótipo CC.

A importância do PE nas análises encontradas deve-se ao fato de ele ser um ótimo indicador do início da puberdade nos machos, que está vinculado ao peso vivo do animal, estando mais relacionado ao desenvolvimento fisiológico do que cronológico. Além disso, a maturação sexual envolve uma complexa interação entre fatores endócrinos que resultam no desenvolvimento do trato reprodutivo, dependente de fatores genéticos e ambientais, influenciados principalmente pelo manejo nutricional (Patterson, 1992) e por ser de importante pontuação dentro da avaliação pela CAP.

Tais achados foram referenciados também quando o hormônio FSH foi usado como biomarcador para identificar, na urina, em uma população de mulheres, o pico ovulatório (Hongxia, 2002). Liron et al. (2012) não observaram qualquer parâmetro que possa estar associado com a puberdade e o marcador LHR-1499L, em machos da raça Angus. Desta forma, fica demonstrado que a ação dos hormônios gonadotrópicos é dependente da sua ligação aos receptores específicos, presentes na superfície da membrana plasmática das células alvo, nas gônadas (Fortune, 1994), referenciados por Aittomaky (1995), onde deleções ou mutações nos genes receptores podem alterar a interação hormônio-receptor, mudando a transmissão do sinal endocrinológico, podendo afetar na resposta esperada, como pode ter sido o caso dos SNPs LHR que somente sugeriu uma associação parcial.

Outros marcadores como os SNPs na região promotora do gene do FSH β mostraram ser úteis quando relacionados à qualidade seminal. Davis et al. (2012) pesquisando e avaliando o sêmen em 34 touros de três raças distintas pelo Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) observaram, na raça Brahman, que os touros homocigotos para G783A, tiveram uma menor percentagem de defeitos menores e totais do que os touros heterocigotos (<0.03). Touros homocigotos GG também tiveram a possibilidade de ter menores defeitos maiores (<0.09), e touros heterocigotos CT tiveram a possibilidade de ter um incremento na percentagem de defeitos totais (<0.06).

Porém, nas raças Simental, Charoles e Limousin, o hormônio FSH β teve a qualidade do sêmen associada, diferentemente de Davis, à baixa concentração, maiores deformidades espermáticas e baixa integridade do acrossoma (Dai, 2009).

Em nossos estudos, não foi verificada essa associação, mesmo sendo a qualidade seminal, um fator de importante pontuação dentro da CAP, talvez por se tratar de diferentes marcadores para a mesma ação.

Em contraste, Lin et al. (2006) demonstraram que em Javalis existe uma relação com outro marcador do gene da β -actina (ACTB) localizado no

cromossomo 3, associado à concentração, motilidade, gota protoplasmática e espermatozóide normais. O processo da espermatogênese à fecundação é complexo e é controlado por um grande número de genes, incluindo o gene ACTB que está expresso no espermatozóide e é distribuído nas regiões acrossomal e post acrossomal dos espermatozóides ejaculados, potencialmente envolvido nas alterações da membrana durante a reação acrossômica, com uma implicação importante na função espermática (Casale et al., 1988).

Gottchall (2011) observando a ação de marcadores FSHR e LHR e tendo como variável a fertilidade das vacas medida pelas taxas de nascimento, não encontrou associação, contraditoriamente a nossos achados onde houve associação com a CAP e o PE, assim como a possibilidade de encontrar animais com PE inferior a 29cm, denotando hipoplasia testicular.

Em contraste, Aguiar et al. (2008) encontraram uma associação positiva entre as fêmeas adultas da raça Nelore e o marcador FSHR na resposta superovulatória, quando há presença de heterozigose.

A ação dos hormônios gonadotróficos é dependente das ligações em seus receptores específicos, presentes na superfície da membrana plasmática das células alvo, nas gônadas (Fortune et al., 1994). Porém, Aittomaky et al. (1995) relatam que deleções ou mutações nos genes desses receptores gonadotróficos podem alterar a interação hormônio/receptor, mudando a transmissão do sinal endocrinológico e podendo interferir na resposta esperada.

Nossos achados mostraram que os marcadores LHR e FSHR tiveram relação direta com o CAP e o PE. Nossos resultados foram representativos devido ao PE e não à qualidade do sêmen, que no CAP tem fator de 40% na pontuação final alcançada.

CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que: os STRs testados não estiveram associados aos parâmetros reprodutivos avaliados nessa população, e que por meio dos SNPs LHR, apenas algumas associações foram possíveis de serem demonstradas. Entretanto, foi observada uma forte associação do SNPs FSHR com o genótipo GG para menor PE e CAP superior para o genótipo CC, e quando encontrados os genótipos CG e GG há a possibilidade de encontrar PE com dois desvios padrão abaixo da média da raça Braford, aos dois anos de idade.

BIBLIOGRAFIA

AGUIAR, P.R.L. **Estudo de marcadores moleculares (microsatélites) em vacas doadoras de embriões com diferentes respostas superovulatórias.** Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008. 112p.

AITTOMAKY, K. et al. Mutation in FSH receptor gene cause hereditary hipergonadotropica ovarian failure. **Cell**, Cambridge, v. 82, n. 6, p. 959-968, 1995.

ALEXANDER, J.H. Bull breeding soundness evaluation:

- apractioner's perspective. **Theriogenology**, Stoneham, v. 70, p. 469-472, 2008.
- ALMEIDA, S. E. M. et al. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 123, p. 106-113, 2003.
- BARENDSE, W.J. et al. A medium-density genetic linkage maps of the bovine genome. **Mammalian Genome**, v. 8, p. 21-28, 1997.
- BARTH, A.D.; WALDNER, C. L. Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.43, p. 274-284, 2002.
- BARTH, A.D. and OKO, R.J. Abnormal morphology of bovine spermatozoa. 1^o ed. **Ames Iowa State University Press**, 1989.
- BRITO, L. F. C. et al. Effects of scrotal insulation on sperm production, semen quality, and testicular echotexture in Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 79, p. 1-15, 2003.
- CASALE, A.; CAMATINI, M.; SKALLI, O.; GABBIANI, G. Characterization of actin isoforms in ejaculated boar spermatozoa. **Gamete Res.**, v. 20, p. 133–144, 1988.
- CHEMINEAU. P. Environmental and animal reproduction. **World Anim.** v.77, p.2-14, 1994.
- CHACÓN, J.E.; PEREZ H.; RODRÍGUEZ-MARTINEZ, M. Seasonal variations in testicular consistency, scrotal circumference and spermiogramic parameters of extensively reared Brahman (Bos indicus) bulls in tropic. **Theriogenology**, Stoneham, v. 58, p.41-50, 2002.
- CORBET, N.J. et al. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. **Animal Production Science**, Sydney, v. 53, p. 101–113, 2013.
- COULTER, G.H.; FOOTE, R.H. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: A review **Theriogenology**, Stoneham, v. 11, p. 297–311, 1979.
- COOK, R.B.; COULTER, G.H.; KASTELIC, J.P. The testicular vascular cone scrotal thermoregulation and their relationship to sperm production and seminal quality in beef bulls. **Theriogenology**, Stoneham, v. 41, p. 653-671, 1994.
- COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, São Paulo, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.
- DAI, L. et al. Effects of novel single nucleotide polymorphisms of the FSH beta-

subunit gene on semen quality and fertility in bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 114, p. 14-22, 2009.

DAVIS, A.J. et al. Single nucleotide polymorphisms of the follicle-stimulating hormone- β gene and effects on semen quality. In: Kreider, D. L. (Ed.). **Arkansas Animal Science Department Report** Arkansas: AASD, 2012. p. 18-23.

ENTWISTLE K.W. A brief update on male reproductive physiology. In: Holroyd RG, editor. Bull fertility, Queensland: Department of Primary Industries, **Conference and Workshop Series**; QC93008, p. 1-6, 1992.

FLOWERS, W.L. Sperm characteristics that limit success of fertilization. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 3022-3029, 2013.

FORDYCE, G. et al. Scrotal circumference of Australian beef bulls. **Theriogenology**, Stoneham, p. 1-8, 2013.

FORTUNE, J.E. Ovarian follicular growth and development in mammals. **Biological of Reproduction**, Champaign, v.50, p.225-232, 1994.

FUERST-WALD, B. et al. Effect of age and environmental factors of semen production and semen quality of Australian Simmenthal bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 95, p. 27-37, 2006.

GOTTCHALL, C.S. Controle do ciclo estral e taxa de prenhez em matrizes de corte bovinas: Efeitos hormonais, Genéticos e Ambientais. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011. 190 p.

HEES, H.; LEISTER, R. ; KOHLER, T.; WROBEL, K.H. Vascular morphology of the bovine spermatic cord and testis. Ligth and scanning electron microscopic studies on the testicular artery and pampiniform plexus. **Cell Tissue Research**, Rajkot, v. 237, p. 31-38, 1984.

HONGXIA, L.; et al. Urinary follicle-stimulating hormone peak as a biomarker for estimating the day of ovulation. **Fertility and Sterility**, Oxford, v.77, n. 5, p. 961-966, 2002.

HOUDE, A.; LAMBERT, A.; SAUMANDE, J.; SILVERSIDES, D.W.; LUSSIER, J.G. Structure of the bovine follicle stimulating hormone receptor complementary DNA and expression in the bovine tissues. **Molecular Reproduction Development** , v.27, p.220, 1996.

KASTELIC, J.P.; COOK, R.B.; COULTER, G.H.; WALLINS, G.L.; ENTZ, T. Environmental factors affecting measurements of bovine scrotal surface temperature withinfrared thermography. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 41, p. 153-159, 1996.

KASTELIC, J.P.; THNDATHIL, J.C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 43, p. 368-373, 2008.

KEALY, C.G. et al. Genetic parameters estimates for scrotal circumference and semen characteristics of line 1 hereford bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 84, p. 283-290, 2006.

KEMP, S.J.; BREZINSKY, L.; TEALE, A.J. ILSTS002: a polymorphic bovine microsatellite. **Animal Genetics**, v. 23, p. 184, 1992

KOIVISTO, M. B. et al. The effect of season on semen characteristics and freezability in *Bos indicus* and *Bos taurus* in the southeastern region of Brazil. **Reproduction in Domestic Animals**, Berlin, v. 44, p. 587-592, 2009.

LIN, C.L.; PONSUKSILI, S.; THOLEN, E.; JENNEN, D.G.J.; SCHELLANDER, K.; WIMMERS, K. Haplotype analysis of b-actin gene for its association with sperm quality and boar fertility. **J. Anim. Breed. Genet.**, Berlin, v. 123, p. 384-388, 2006.

LIRÓN, J.P. et al. Association Between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. **BMC Genetics**, London, v.13:26, 2012.

LUNSTRA, D.D.; COULTER, G.H. Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p.767-774, 1997.

MARSON, E.P. et al., Efeito dos polimorfismos dos genes do LHR e do FSHR sobre a precocidade sexual em novilhas de corte de diferentes composições raciais. **V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal**, Pirassununga, 2005.

MENEGASSI, S.R.O. et al. Measurement of scrotal circumference in beef bulls in Rio Grande do Sul. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 63, n. 1, p. 87-93, 2011a.

MILLER, S.A.; Dykes, D.D.; Polesky, H.F. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. **Nucleic Acids Research**, v. 16, p. 1215, 1988.

MONTGOMERY, G.W. ; KINGHORN, B.P. Recent developments in gene mapping and progress towards marker-assisted selection in sheep. **Australian Journal of Agriculture Research**, v. 48, p. 1-12, 1997.

MONTALDO, H.H.; MEZA-HERRERA, C.A. Use of molecular markers and major genes in the genetic improvement of livestock. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaíso, v. 1, p. 83-89, 1998.

NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, Stoneham, v. 66, p. 822-828, 2006

PALMER, S.S.; BARNHART, K.T. Biomarkers in reproductive medicine: the promise, and can it be fulfilled? **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 99, n. 4, p. 954-962, 2013.

PATTERSON, D.J.; PERRY, R.C.; KINACOFÉ, G.H.; BELLOWS, R.A. STAIGMILLER, R.B. ; CORAH, L.R. Management considerations in heifers development and puberty. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 70, p. 4018-4035

RHOADS, R. P.; BAUMGARD, L.H.; SUAGEE, J.K. Metabolic priorities during heat stress with an emphasis on skeletal muscle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 91, p. 2492-2503, 2013.

SCHROTH, G.P. et al. Mapping Z-DNA in the human genome- computer- aided mapping reveals a nonrandom distribution of potential Z-DNA forming sequences in human genes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 267, p. 11846-11855, 1992.

SILVA, M.R. et al. Testicular traits as selection criteria for young Nelore bulls. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 9, p. 2061-2067, 2001.

SMITH, B.A.; BRINKS, J.S.; RICHARDSON, G.V. Relationships of sire scrotal circumference to offspring reproduction and growth. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 67, p. 2881–2885, 1989.

TAUTZ, D. Notes on the dysfunction and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. In: *DNA Fingerprinting: State of the Science*, Switzerland, p. 21-28, 1993.

TEIXEIRA, H.C.A. et al. Seasonal influence on semen traits and freezability from locally adapted Curralero bulls. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 44, p. 587-592, 2011.

WALDNER, C.L.; KENNEDY, R. I.; PALMER, C. W. A description of the findings from bull breeding soundness evaluation and the association with pregnancy outcomes in a study of western Canadian beef herds. **Theriogenology**, Stoneham, v. 74, p. 871-883, 2010.

WEIMER, T.A. Diagnóstico Genético Molecular aplicado à produção animal. IN: **Diagnóstico Genético-Molecular**, MARKS, E.K. (org); p. 203-218, ULBRA-Canoas, 2003.

WEIMER, T. A. et al. Identification of molecular markers on bovine chromosome 18 associated to calving interval in a Brangus-Ibagé cattle herd. **Ciência Rural**,

Santa Maria, v. 37, n. 5, p. 1502-1505, 2007.

WILDEUS, S.; HOLROYD, R.G.; ENTWISTLE, K.W. Patterns of pubertal development in Sahiwal and Brahman cross bulls in tropical Australia. I. Growth and semen characteristics. **Theriogenology**, Stoneham, v. 22, p. 361-373, 1984.

Tabela 1Classificação andrológica por pontos de bovinos *Bos taurus*

Circunferência Escrotal em cm					
Idade (meses)	12-14	15 - 20	21 – 30	> 30	Escore
Muito Bom	> 34	>36	>38	>39	40
Bom	30 - 34	31 - 36	32 – 38	34 - 39	24
Satisfatório	< 30	< 31	< 32	< 34	10
Pobre	< 30	< 31	< 32	< 34	10

Motilidade Espermática			
	%Progressivo	Vigor	Escore
Muito Bom	75	5	20
Bom	60 < 75	4 < 5	12
Satisfatório	30 < 60	3 < 4	10
Pobre	< 30	< 3	3

Morfologia Espermática			
	% Defeitos maiores	% Defeitos Totais	Escore
Muito Bom	< 10	< 25	40
Bom	10 < 19	26 < 39	25
Satisfatório	20 < 29	40 < 59	10
Pobre	> 29	> 59	3

Interpretação	
60 pontos ou +	Touro Satisfatório
30 a 59	Touro Questionável
< 30	Touro Insatisfatório

Fonte: Chenoweth e Ball (1980)

Tabela 2

Marcadores analisados, identificação do cromossomo onde estão mapeados, gene alvo e referências da técnica empregada.

Marcadores	Cromossomo	Gene Alvo	Referências
AFZ1	21	IGF-IR	Jorgensen et al., 1996
BMS3004	18	LH β	Kappes et al., 1997
HEL5	21	IGF-IR	Bishop et al., 1994
ILSTS002	18	LH β	Kemp et al., 1992
IDVGA51	4	Leptina	Kappes et al., 1997
FSHR	11	FSHR	Houde et al., 1994
LHR	11	LHR	Marson et al., 2005

Tabela 3

Frequências alélicas identificadas nos STRs AFZ-1, HEL5, ILSTS002, IDVGA51, BMS3004

AFZ-1		HEL5		ILSTS002		IDVGA51		BMS3004	
Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%	Alelo	%
113	4.5	151	6.4	125	0.6	173	3.8	125	3.8
117	18.6	153	21.8	131	3.2	175	37.8	127	2.6
119	21.2	155	9.6	133	6.4	177	7.7	129	48.7
121	24.4	157	0.6	135	27.6	179	5.1	132	35.3
123	18.6	163	2.6	137	22.4	181	7.1	135	3.2
125	11.5	165	21.2	139	27.6	183	26.9	138	6.4
127	1.3	167	28.2	141	11.5	185	11.5		
		169	9.6	175	0.6				
Total	100.0		100.0		100.0		100.0		100.0

Tabela 4

Frequência alélica dos marcadores SNPs FSHR e LHR

FSHR		LHR	
Alelo	%	Alelo	%
C	74%	C	25%
G	26%	T	75%
Total	100%		100%

Tabela 5

Frequências genotípicas identificadas nos SNPs FSHR, LHR

FSHR		LHR	
Genótipo	%	Genótipo	%
CG	34.6	TT	5.2
CC	15.4	CC	62.8
GG	50.0	TC	32.0
Total	100.0	Total	100.0

Tabela 6

Perímetro escrotal, Classe e CAP dos STR e SNP pesquisados.

Alelos	AFZ1			Pr>F	HEL5			Pr>F	BMS3004			Pr>F
	≤119	113-127	≥121		≤129	125-138	≥132		≤163	151-169	≥165	
N	20	40	27	Pr>F	28	43	16	Pr>F	15	42	30	Pr>F
PE 7	23,1	24,0	23,7	0,967	23,0	24,4	23,0	0,343	24,1	23,8	23,47	0,850
PE24	34,4	34,6	34,2	0,674	34,4	34,7	33,9	0,548	34,9	34,6	34,1	0,723
Classe	0,150	0,075	0,037	0,681	0,107	0,093	0,000	0,557	0,066	0,095	0,066	0,880
CAP 24	68,5	67,0	71,3	0,594	68,5	67,9	70,9	0,848	67,3	69,3	68,5	0,985

Alelos	ILSTS002			Pr>F	IDVGA51			Pr>F	LHR			Pr>F	FSHR			Pr>F
	≤137	125-175	≥139		≤179	173-185	≥181		TT	CC	TC		CG	CC	GG	
N	28	46	13	Pr>F	9	77	1	Pr>F	6	54	27	Pr>F	5	77	5	Pr>F
PE 7	23,11	24,07	23,93	0,583	22,98	23,89	19,2	0,254	25,63	23,70	23,41	0,696	26,30	23,70	21,60	0,244
PE24	34,60	34,40	34,40	0,902	33,55	34,57	37,0	0,351	33,30	34,55	34,65	0,467	34,40 ^a	34,70 ^a	31,60 ^b	0,025
Classe	0,035	0,087	0,154	0,502	0,11	0,07	0	0,989	0,33 ^a	0,05 ^b	0,07 ^b	0,046	0,40 ^a	0,03 ^b	0,40 ^a	0,003
CAP 24	67,20	69,40	69,10	0,572	66,39	68,89	74,0	0,935	54,16	69,9	69,51	0,270	35,50 ^b	72,15 ^a	48,60 ^b	<0,001

Tabela 7

Perímetro Escrotal e CAP dos STR e SNP pesquisados.

Variáveis	AFZ1			BMS3004			HEL5			IDVGA51			ILSTS002		
	≤113	≥121	113-125	≤129	≥132	125-138	≤161	≥165	151-169	≤179	≥181	173-185	≤135	≥137	131-141
N	4	4	9	6	2	9	7	4	6	1	-	16	2	6	9
PE 7	23,0	24,0	22,2	22,0	19,7	24,0	23,0	23,3	22,3	30,0	-	22,3	24,0	22,1	23,7
PE 24	33,8	36,1	34,3	34,6	35,2	34,5	34,1	36,1	34,3	37,0	-	34,5	36,7	33,7	34,8
PE 28	33,5	35,1	33,7	34,4	34,5	33,6	33,7	35,2	33,4	35,5	-	33,9	37,2	33,1	33,8
PE 32	35,0	37,2	35,3	35,0	36,5	35,9	34,4	37,5	36,0	38,0	-	35,5	36,7	34,3	36,3
PE 36	34,0	35,3	34,2	34,7	34,0	34,3	34,3	35,7	33,6	36,0	-	34,3	37,2	33,3	34,5
CAP 24	62,2	50,0	61,0	54,0	80,0	57,0	51,71	70,0	59,3	59,0	-	58,7	59,0	57,3	59,6
CAP 28	57,5	66,2	63,0	69,0	68,5	56,6	65,7	65,7	56,5	52,0	-	63,1	77,0	63,8	58,2
CAP 32	72,7	64,5	62,8	56,0	65,0	72,0	59,0	77,5	65,3	89,0	-	64,1	77,5	55,0	70,0
CAP 36	48,7	30,0	37,9	36,8	49,0	37,4	37,1	33,2	48,3	30,0	-	39,1	54,0	27,5	42,5

N = número de observações; PE = Perímetro Escrotal aos 7 a 36 meses de idade (cm) CAP = Classificação Andrológica por Pontos aos 24 a 36 meses de idade (de 0 a 100).

Tabela 8

Perímetro Escrotal e CAP dos SNP pesquisados.

Variáveis	FSHR			Pr>F	LHR			Pr>F
	CG	CC	GG		TT	CC	TC	
N	8	3	6		1	10	6	
PE7	20,5 ^B	27,1 ^A	23,7 ^{AB}	0,02	18,0	23,8	22,0	0,08
PE 24	32,1 ^B	38,1 ^A	36,3 ^{AB}	0,01	28,0	34,6	35,8	0,12
PE 28	31,6 ^B	37,8 ^A	35,1 ^{AB}	0,03	28,0	33,8	35,2	0,20
PE 32	32,9 ^B	38,3 ^A	38,0 ^A	0,02	28,0	35,9	36,5	0,09
PE 36	31,7 ^B	38,5 ^A	36,0 ^{AB}	0,03	28,0	34,8	34,8	0,21
CAP 24	55,8	53,6	65,0		38,0	60,1	59,9	
CAP 28	56,1	68,6	67,8		45,0	62,2	65,8	
CAP 32	61,6	68,0	69,6		70,0	62,7	69,7	
CAP 36	36,8	45,0	37,7		23,0	40,3	38,3	

N = número de observações; PE = Perímetro Escrotal aos 7 a 36 meses de idade; CAP = Classificação Andrológica por Pontos aos 24 a 36 meses de idade.

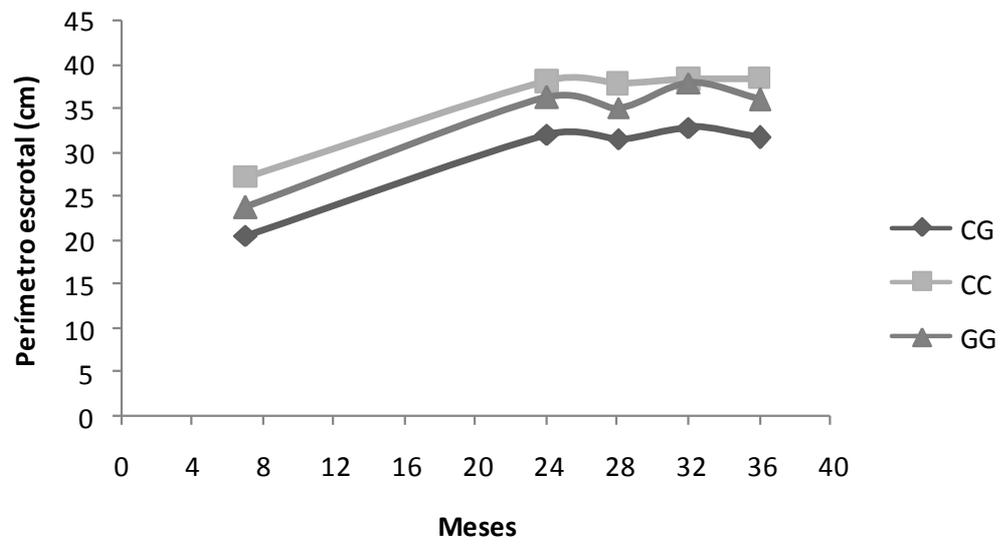


Figura 1. Evolução do PE para o marcador FSHR aos 7, 24, 28, 32 e 36 meses.

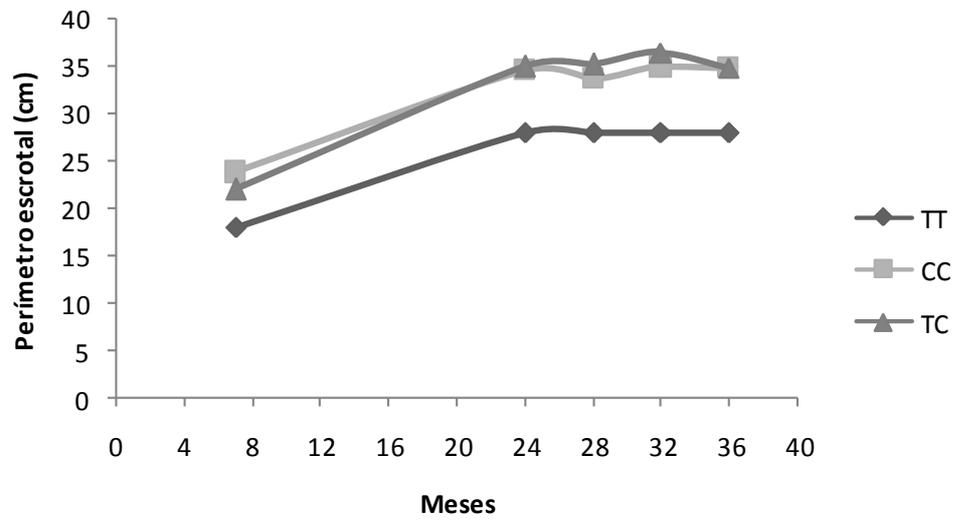


Figura 2. Evolução do PE para os alelos LHR para os 7, 24, 28, 32 e 36 meses.

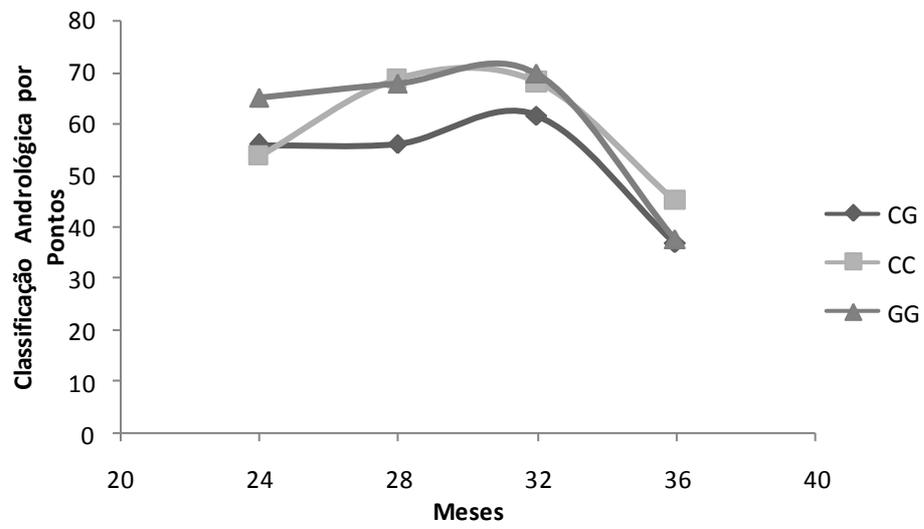


Figura 3. Evolução e involução da CAP para o marcador FSHR.

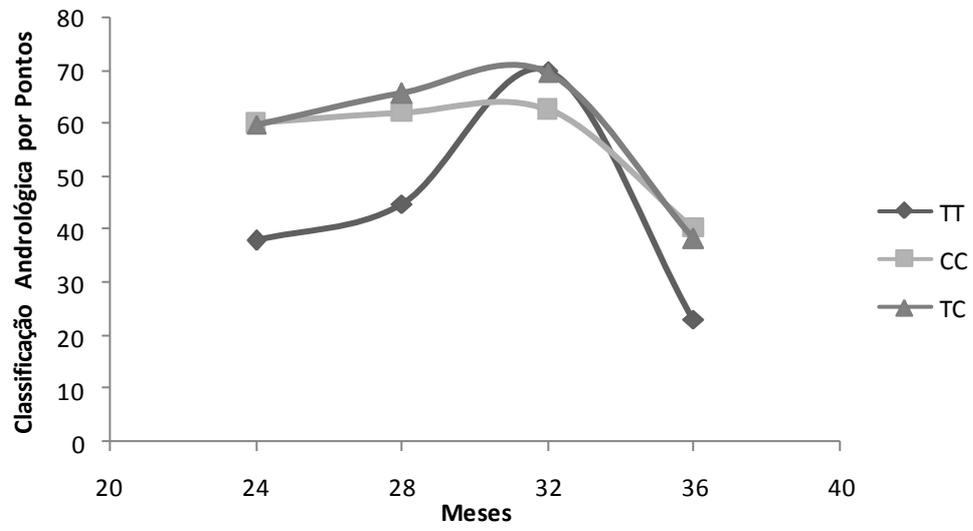


Figura 4. Evolução e involução da CAP para o marcador LHR.

CAPITULO III

Artigo II

An observation on scrotal skin thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in bulls¹

¹Trabalho aceito para publicação de acordo com as normas do International Journal of Biometeorology

An observation on scrotal skin thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in bulls

Silvio Renato Oliveira Menegassi a, Júlio Otavio Jardim Barcellos a, Eduardo Antunes Dias b, Celso Koetz Jr. c, Vanessa Peripolli a, Concepta McManus d, Gabriel Ribas Pereira e,*, Maria Eugênia Andrighetto Canozzi a, Flávio Guiselli Lopes c

a Department of Animal Science, Federal University of Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil;

b Centre for Studies and Research in Agribusiness - CEPAN, Federal University of Rio Grande do Sul, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil;

c College of Veterinary Medicine, University of Northern Paraná, 86041-120 Londrina, PR, Brazil;

d University of Brasília and INCT Pecuária, 70910-900, Brasília, DF, Brazil;

e Department of Population Health and Reproduction, School of Veterinary Medicine, University of California, Davis, CA 95616, USA.

* Corresponding author:

Av. Bento Gonçalves, n.: 7.712, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil.

Tel.: +55 51 3308 6958; +55 51 3308 6048.

E-mail: gabrielribaspereira@gmail.com, gabriel.pereira@ufrgs.br

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the seasonal effects of the environment on semen quality in bulls using infrared thermography. Sperm motility (M), mass motion (MM) and vigor (VIG) from 17 Bradford bulls aged approximately 24 months were evaluated. Infrared thermography (IRT) images data were collected using an infrared camera FLIR T 300 and the software Quick Report1.2 SP2 used to determine the temperature of the proximal and distal poles of the testis, as well as the gradient between them. Semen was collected by electroejaculation and sperm morphology was evaluated using a phase-contrast microscope. The seasonal effects on physiological, seminal and climatic variables were analyzed by the GLM and CORR procedures using SAS®. Microclimatic factors were recorded in hourly intervals considering daily mean temperature and mean relative humidity for the calculation of the daily values of temperature-humidity index (THI) for 1 year. Temperature gradient variations of the testis were significantly higher in the autumn (4.5oC), winter (4.0oC) and spring (2.9oC) compared to summer (0.9oC) ($P < 0.05$). Ocular globe temperatures were lower in the winter (27.6oC) and autumn (26.8oC) compared to summer (33.9oC) and spring (31.1oC) ($P < 0.05$). Semen motility, MM and VIG decreased in the summer in comparison to the other seasons, even though ocular temperatures did not vary between spring and summer. It has been concluded that infrared thermography can be adopted as an indirect method in order to assess testicular gradient and its consequences to sperm physical and quantitative aspects.

Keywords: Temperature and humidity index, infrared thermography, reproductive, seasons, bovine.

INTRODUCTION

In breeding systems, mating mostly occurs using multiple mounting bull groups, and their bio-economical effectiveness depends on bull fertility and performance in the field. As mating takes place during the hottest months, bulls are subject to environmental variations that interfere with their fertility and herd reproductive effectiveness (Berry et al., 2011; Menegassi et al., 2011). Therefore, the successful evaluation of seasonal effects on thermoregulation and reproductive changes is crucial to identify these alterations in bovine physiology and health.

High temperatures may compromise body thermoregulatory mechanisms and heat dissipation, which causes thermal stress (Tizikara et al., 1985; Armstrong et al., 1994; Marai et al., 2008). On hot days in subtropical regions, the testicular temperature may increase and impair both the spermatogenic cycle and the semen quality, which may cause decreased bull fertility (Ladds, 1985; Roberts, 1986). Nichi et al. (2006) concluded that high temperatures interfere with the oxidative metabolism of glucose in spermatogenic cells as a result of mitochondrial dysfunctions and the generation of reactive oxygen species (ROS). These metabolic alterations occur as a result of thermal stress and exhaust cellular energy reserves that lead to new adaptive strategies in homeothermic metabolism (Baumgard and Rhoads, 2013; Rhoads et al., 2013). The sperm cells may use such adaptation strategies to maintain metabolic homeostasis.

Most studies assessing the effects of heat stress on bull reproductive performance are conducted by simulating the natural environment either in climatic chambers or by scrotal insulation (Kastelic, 1996b; Fernandes et al., 2008). These studies usually assess temperature and humidity variables, which are expressed as a thermal comfort index that is represented as a Temperature-Humidity Index (THI). A basic premise is that THI equal or higher than 72 characterizes an environmental stress for bulls (West, 2003; Correa-Calderon et al., 2004; Bohmanova et al., 2007). However, few studies have assessed bull sperm quality during the mating season in situations of high THI due to difficulties in conducting experiments in a natural environment (Ravagnolo et al., 2000; Bouraoui et al., 2002).

Infrared thermography (IRT) has been used to assess scrotal thermoregulation and mammary gland disorders and to evaluate animals' physiological responses to high temperatures (Knizkova et al., 2007; Paim et al., 2013). Since the 1980s, infrared thermography has been used on bulls as a non-invasive method to determine scrotal surface temperature (Coulter, 1988). The objective of this study was to evaluate the heat effects on Braford bull sperm quality during warm seasons using scrotal gradient

temperatures determined by infrared thermography. This technique has the potential to become an additional approach in evaluating bull breeding soundness and determining fertility.

MATERIALS AND METHODS

Local and climate data

The experiment was conducted in the Southern part of Brazil, at Nova Aurora Farm located at 29°56'8.82" south latitude and 56°55'25.18" west longitude. The climate is classified as Cfa, according to Köppen-Geiger. Temperature (T) and humidity (H) data were collected hourly by an automatic weather station at the National Institute of Meteorology (INMET) located at 29°84'35" south latitude and 57°08'25" west longitude. The average temperature and relative humidity were the following: summer (32.3°C and 72%), autumn (23.7°C and 69.5%), winter (22.4°C and 70%) and spring (25.9°C and 68%). The total rainfall observed during each season was 353.4 mm (summer), 222.6 mm (autumn), 297.2 mm (winter) and 666.8 mm (spring).

Reproductive evaluation

Seventeen Braford bulls (5/8 Hereford x 3/8 Nellore) aged approximately 24 months at the beginning of the study were kept in the shade under the same environmental and nutritional conditions. The animals were fed at pasture with mineral supplementation and water *ad libitum*. The bulls' body condition score was 3.5 on a scale ranging from 1 (extremely emaciated) to 5 (very obese) during the entire experiment. All animals had a breeding soundness examination at the beginning of each of the four seasons. The examination consisted of a comprehensive general clinical examination, special clinical examination, seminal evaluation and behavioral assessment.

To measure the scrotal circumference (SC), testes were pulled down to the bottom of the scrotum, and a millimeter tape was positioned around the largest circumference. An immediate repetition of this operation was performed to confirm the results. Four ejaculates (one per season) were collected from each bull using a manually operated Autojac-Neovet electro-ejaculator (Autojac®, Neovet, Campinas, SP, Brazil). For semen collection, bulls were restrained to facilitate rectal probe insertion, and feces were evacuated manually by insertion and removal of a gloved arm three to four times. An electroejaculator probe with three ventrally oriented longitudinal electrodes was used to deliver a sequence of electrical impulses to each bull. The electrical stimulation ceased once a minimum sample was obtained and

collection continued until the bull ceased to ejaculate. Prior to the start of the experimental period, we evaluated THI and reproductive parameters on September 10th (2011). After, collections were performed on February 3rd, April 28th, July 16th and September 13th (2012), which corresponded to spring, summer, autumn and winter, respectively.

Mass activity or wave motion was determined by placing a drop of semen on a prewarmed microscope slide and the edge of the drop was examined using 40x magnification. Mass motion (MM) received a score ranging from zero to five: 0 = no swirl, + = no swirl with generalized oscillation of individual sperm only, ++ = very slow distinct swirl, +++ = slow distinct swirl, ++++ = moderately fast distinct swirl and eddies and +++++ = fast distinct swirls and eddies with the appearance of good quality semen. Sperm motility was examined under a bright-field microscope (LEICA CME, Buffalo, New York, USA) at a magnification of 100x with a 5 μ L aliquot of semen placed on a warmed (37°C) slide and covered with a coverslip. Sperm motility (M) was evaluated as the percentage of sperm movement (0 to 100%). Vigor (VIG) was evaluated using a scale from 0 to 5 based on sperm progressive movement, where 0 = none; 1 = very weak; 2 = weak; 3 = intermediate; 4 = strong; and 5 = very strong.

In addition, each semen aliquot was diluted in buffered saline-formaldehyde (1:10) and sperm morphology was analyzed using a phase-contrast microscope. The sperm were also evaluated with eosin-nigrosin staining using a bright field microscope. Major sperm defects (MaD) were considered as the following: acrosome defect, abnormal head, double head, abnormal small head, proximal protoplasmic droplet, midpiece defect, accessory tail and strongly bent tail. Minor sperm defects (MiD) included distal protoplasmic droplet, abaxial implantation, bent tail and detached head. The total defects (TD) were considered in 200 sperm cells from each animal and a sperm classification was performed as previously described by the Bull Breeding Soundness Evaluation of the Western Canadian Association of Bovine Practitioners (Barth, 2000).

Calculation of temperature-humidity index

The ambient temperature and relative humidity were recorded at hourly intervals throughout the experimental period and were used for the calculation of the daily values of THI for one year. The THI was estimated in each season of the year, and the critical limit for triggering thermal stress was equal or higher than 74 (Nienaber, 2007). Following criteria adopted by Pineda and Faulkner (1980), a period of

432 h prior to semen collection was used for temperature-humidity index (THI) analysis that corresponds to the 18-day spermiogenesis phase. The THI data were estimated from the following equation as previously described by Thom (1959):

$$\text{THI} = 0.8 \times T_{\text{db}} + \text{RH} (T_{\text{db}} - 14.4) + 46.4$$

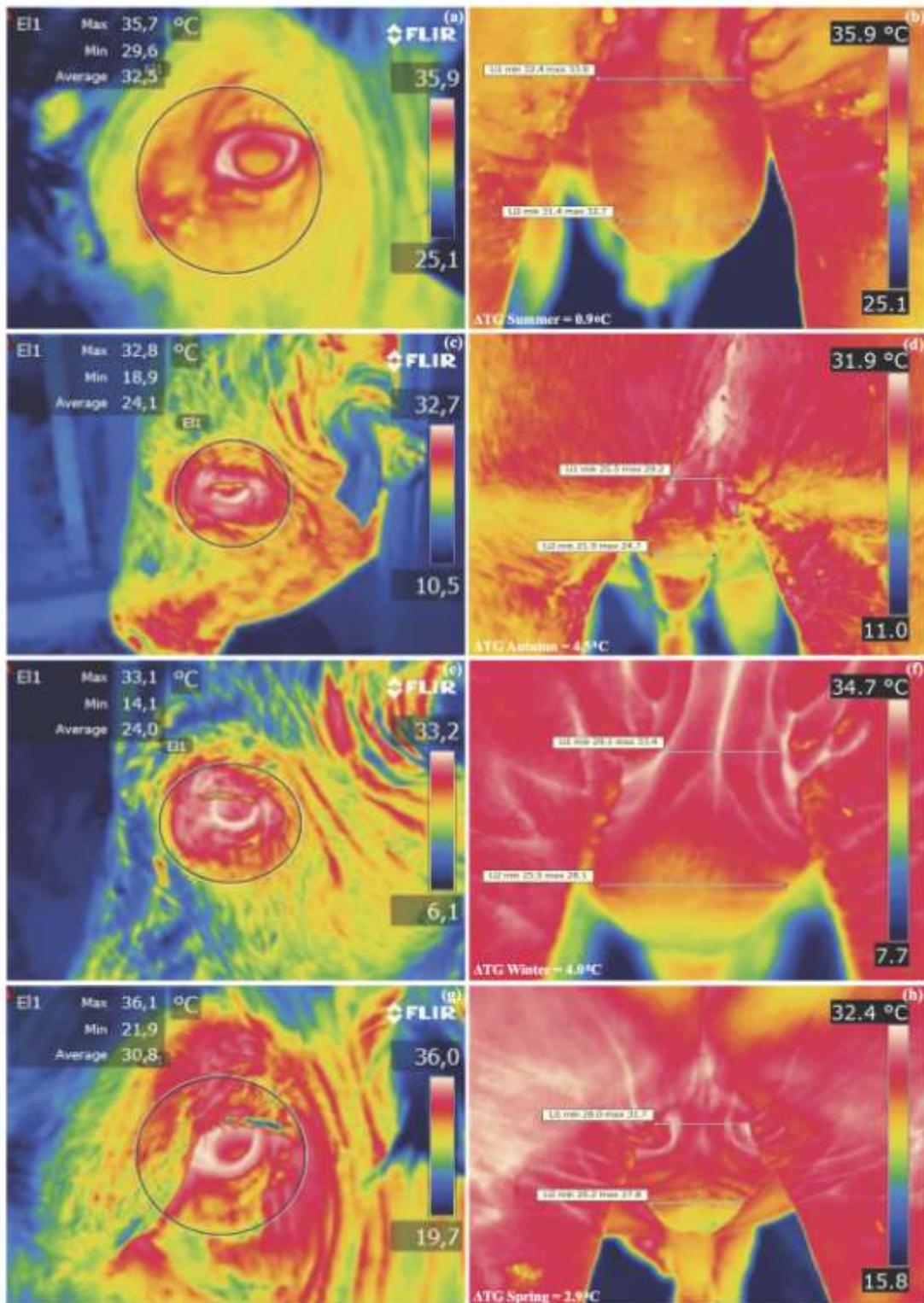
where T_{db} = dry-bulb air temperature ($^{\circ}\text{C}$) and RH = relative humidity in decimal form.

Infrared thermography measurement and analysis

The values of emissivity and reflected temperature were constant for all of the images taken during the experiment (0.98 and 20.0°C , respectively). The air temperature on the day of image collection were the following: summer (20.3°C), autumn (13.8°C), winter (10.1°C) and spring (13.7°C). The air humidity on the day of collection were the following: summer (64.3 %), autumn (72.5 %), winter (94.5 %) and spring (86 %).

Thermograph images were collected using a FLIR T300 infrared camera and thermograms were analyzed by FLIR QuickReport v.1.2 software to determine the temperature of proximal and distal testicular poles. We also evaluated the gradient between the images at 76,800 pixel (320×240) resolution with a thermal sensitivity of less than 0.05°C .

The mean temperature of the scrotal surface of each bull was evaluated by positioning the IRT camera one meter from each testicular pair oriented perpendicular to the scrotum. The temperatures from the proximal (PPT) and distal (DPT) poles of the scrotum were measured using a line one pixel high located from side to side to the scrotum image for each region. The thermal gradient (TG) variation between these two extremities was also evaluated in this manner. To evaluate the bull's thermal status, a lateral image one meter from the animals' head was recorded and a circle was drawn around the orbital region including the ocular globe, the skin surrounding the ocular cavity and the lacrimal gland (OcT). These data were used to measure the temperature as shown in Fig. 1. This ocular region is very sensitive to thermoregulation variations associated with heat stress (Schaefer et al., 2007).



Statistics analyses

The seasonal effects on physiological variables (PPT, DPT, TG, OcT), seminal variables (MM, M, VIG, MaD, MiD, TD) and climatic variables (THI and THI > 74) were analyzed with GLM using

SAS ® v.9.3 (Statistical Analysis Software, Cary, North Carolina). The means were compared using a Tukey test and $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. The relationships between physiological variables and THI were assessed using a correlation procedure (SAS, 2011).

RESULTS

Microclimatic factors were recorded in hourly intervals. The daily mean temperature and mean relative humidity were used for the calculation of the daily values of THI for one year, as shown in Fig. 2. We obtained an average THI in the experimental period of 83.0, 71.9, 69.3 and 77.5, during summer, autumn, winter and spring, respectively (Table 1). The THI spermatogenesis obtained from the 18-days prior to semen collection were 83.8, 73.4, 65.1 and 70.7 during summer, autumn, winter and spring, respectively (Table 1). The ΔTG (temperature gradient variation) and THI for the OcT and testicular scrotum temperatures for one animal during the study period are presented in Fig. 1.

The results obtained along the four seasons of the year using infrared thermography examinations of the PPT (32.6°C) and DPT (30.3°C) of the scrotum were higher in the summer ($P < 0.01$) than in the other seasons (Table 1). In addition, the effects of high temperatures during the spring (31.1°C) and summer (33.9°C) produced higher temperature values for OcT measurements than in the autumn (26.8°C) and winter (27.6°C) ($P < 0.01$; Table 1). The average MM (2.58), M (52.64) and VIG (2.70) of the semen decreased in the summer relative to the other seasons ($P < 0.01$; Table 1). However, although the summer temperature influenced the characteristics related to MM, M and VIG, no alterations in the spermiatic pathology were identified (MaD, MiD and TD). Higher THI values during spermiogenesis (18-day prior to semen collection) caused increased temperatures in both scrotum poles, PPT (32.6°C) and DPT (30.3°C) and lower TG (0.9°C) ($P < 0.01$; Table 1).

Physiological variables such as PPT, DPT and OcT were highly correlated with THI (0.69; 0.78; 0.64, respectively). The TG was negatively correlated with THI ($P < 0.05$; -0.44). For the seminal variables, MaD (-0.45; $P < 0.05$) and TD (-0.50; $P < 0.01$) presented a negative correlation with TG. The OcT had a positive correlation with DPT (0.74; $P < 0.01$) and THI (0.64; $P < 0.01$) and a negative correlation with TG (-0.55; $P < 0.01$). There was a negative correlation between DPT and M (-0.41; $P < 0.01$). The DPT was also negatively correlated with VIG (-0.33; $P < 0.05$). The TG had a positive correlation between M and VIG, which had values of 0.36 and 0.35, respectively ($P < 0.05$; Table 2).

DISCUSSION

The present study demonstrated that infrared thermography can be used as an indirect technique to evaluate the effect of environmental stress on bull reproductive parameters. Several studies demonstrated the effects of thermal stress on sperm quality using artificial techniques such as scrotal insulation and climatic chambers (Kastelic et al., 1996b; 1997). Recently, Malama et al. (2013) evaluated THI and sperm chromatin changes in rams. The results suggested that the scrotal microenvironment can interfere with the process of sperm chromatin stabilization in the epididymis and showed a sensitive response to the fluctuations of air temperature and THI. In the current study, the temperatures measured by THI were consistent with the historical mean for the Brazilian subtropical region (INMET). It is likely that neither temperature nor humidity were high enough to cause damage that had direct consequences on sperm morphology. However, physical aspects such as M and VIG were affected. Similarly, our results are partially in agreement with reports by Brito (Brito et al., 2002; 2004), who did not find any alteration either in semen production or quality when comparing *Bos taurus* and *Bos indicus* in the Brazilian subtropical region. This result may have been due to the small differences between the climatic variables during the two years of the study. In contrast, a research study in tropical climates with Simmental and Nellore breeds found variations in morphology, M, VIG and MM during all seasons of the year (Nichi et al., 2006).

It is known that metabolic alterations occur as a result of thermal stress and may lead to the exhaustion of cellular energy reserves. The same metabolic pathways may change according to the source of energy supply, leading to new adaptive strategies in homoeothermic metabolism (Baumgard and Rhoads, 2013; Rhoads et al., 2013). The effects of weather conditions on sperm quality during the hot season in Braford bulls using infrared thermography technology to record changes in testes temperature are not well understood. The sperm cells may have used adaptation strategies to maintain of their metabolic functions. Although we did not find significant differences in sperm defects by season, in the summer, 10.5% of major defects were related to proximal cytoplasmic droplet in 66% of the animals. Lunstra and Coulter (1997) found 13.4% of cells had cytoplasmic droplets in bulls presenting an abnormal testicular temperature pattern. Thus, as sperm maturation is directly related to M, VIG and MM. Thus, adverse environmental conditions in the summer are likely to interfere with these parameters due to the higher susceptibility of the epididymis tail and the distal pole of the scrotum to external conditions.

In *Bos indicus* bulls, the testicular artery is longer relative to the testicular volume and may contribute to a lower intra-epididymal temperature. In *Bos taurus*, this distance is shorter. In composite breeds, this length is intermediate and favors thermoregulation in higher temperatures (Brito et al., 2004). Hence, the use of composite bulls in our study (5/8 Hereford x 3/8 Nellore) may have enabled better testicular thermoregulation without significant morphological alterations during spermiogenesis. Fuerst-Waltl et al. (2006) found a significant effect of environmental temperature on the percentage of mobile sperm and their viability during the 11-day period preceding semen collection. Austrian Simmental bulls had an average M of 66.6% and VIG of 2.93 after three semen collections, which corresponds to the period of spermatid maturation in the epididymis (Fuerst-Waltl et al., 2006).

In regions with higher THI values, testicular changes tend to be more affected (Hahn and Mader, 1997) due to the longer periods above the critical value during the day. The high temperatures cause difficulty in dissipating body heat at night. The use of experimental models that adjust radiation and wind speed are critical to manage environmental mitigation and protect the animals by ensuring their thermal comfort (Mader et al., 2010). In this experiment, the average THI in summer was 83.0 and did not cause significant morphological changes in the semen. In our study, there was no indication for testicular damage there were no significant differences in sperm morphology over the seasons. However, we may infer that the THI of 83.8 observed during the 18-day prior to semen collection is detrimental for semen MM, M and VIG based on our group of animals. In contrast, findings by Dikmen and Hansen (2009) defined a THI limit of 78.2 for milk cows.

Seminal characteristics were affected by the THI observed during the spermiogenesis phase, which was 18 days before the semen collection. The bulls in this experiment showed physiological responses that were directly related to changes in temperature. There may have been greater changes in the summer, but these changes were not sufficient to cause significant damage to sperm morphology. Infrared thermography is a technique that can sufficiently assess scrotal temperature gradients (Kastelic, 1996b). The minimal temperature gradient between proximal and distal poles of the scrotum observed in warm climate leads to increased damage of sperm MM, M and VIG (Kastelic, 1996a; 1996b). In a study by Coulter (1988), sperm M was approximately 42% in a temperature gradient ranging from 2°C to 4°C. Consistent with this result, we observed a temperature gradient of 0.9°C and M of 53% during summer. Other researchers also used infrared thermography in evaluating bull health by recording the scrotal

temperature gradient as a parameter to evaluate reproductive alterations while using a controlled external environment (Lunstra and Coulter, 1997; Kastelic, 1996b). Our study design aimed to observe semen variations using the same parameter under a less controlled environment.

CONCLUSIONS

The THI average of 83.8 was critical for sperm MM, M and VIG in bulls under less controlled conditions even though no alterations in the spermatic pathology were identified. We concluded that infrared thermography can be adopted as an indirect method of assessing testicular gradients and its consequences to sperm physical and quantitative aspects.

Conflict of interest statement

The authors declare that there is no conflict of interest that could be perceived as prejudicing the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

This study was supported by The Brazilian Council of Scientific and Technological Development (CNPq) and The Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel/CAPES, Brazil (Project CAPES/PNPD n. 2842/2010). The authors thank Rubia Branco Lopes and Claudia Medeiros Camargo for technical help and Nova Aurora and Anjo da Guarda Farms for providing the animals and technical assistance for this study.

REFERENCES

- Armstrong DV (1994) Heat Stress Interaction with Shade and Cooling. *J Dairy Sci* 77:2044-2050.
- Barth AD (2000) Bull Breeding Soundness Evaluation Manual, 2nd Ed. The Western Canadian Association of Bovine Practitioners, Saskatoon, SK, 74 pp.
- Baumgard LH, Rhoads RP (2013) Effects of heat stress on post-absorptive metabolism and energetics. *Annu Rev Anim Biosci* 1:311-317.
- Berry DP, Evans RD, Parland SMc (2011) Evaluation of bull fertility in dairy and beef cattle using cow field data. *Theriogenology* 75:172-181.
- Bohmanova J, Misztal I, Cole JB (2007) Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. *J Dairy Sci* 90:1947-1956.

- Bouraoui R, Lahmar M, Majdoub A, Djemali M, Belyea R (2002) The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. *Anim Res* 51:479-491.
- Brito LFC, Silva AED, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP (2002) Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 70:181-190.
- Brito LFC, Silva AED, Barbosa RT, Kastelic JP (2004) Testicular thermoregulation in *Bos indicus*, crossbred and *Bos taurus* bulls: relationship with scrotal, testicular vascular cone and testicular morphology, and effects on semen quality and sperm production. *Theriogenology* 61:511-528.
- Correa-Calderon A, Armstrong D, Ray D, DeNise S, Enns M, Howinson C (2004) Thermoregulatory responses of holstein and brown swiss heat-stressed dairy cows to two different cooling systems. *Int J Biometeorol* 48:142-148.
- Coulter GH (1988) Thermography of bull testes, 12th Technical Conference of Artificial Insemination and Reproduction. Columbia, SC: National Association of Animal Breeders; p. 58-63.
- Dikmen S, Hansen PJ (2009) Is the temperature-humidity index the best indicator of heat stress in lactating dairy cows in a subtropical environment. *J Dairy Sci* 92:109-116.
- Fernandes CE, Dode MAN, Pereira D, Silva AED (2008) Effects of scrotal insulation in Nellore bulls (*Bos taurus indicus*) on seminal quality and its relationship with in vitro fertilizing ability. *Theriogenology* 70:1560-1568.
- Fuerst-Waltl B, Schwarzenbacher H, Perner C, Solkner J (2006) Effects of age and environmental factors on semen production and semen quality of Austrian Simmental bulls. *Anim Reprod Sci* 95:27-37.
- Hahn GL, Mader TL (1997) Heat waves in relation to thermoregulation, feeding behavior and mortality of feedlot cattle. In: 5th International Livestock Environment Symposium, ASAE, Minneapolis, MN, pp. 563-567.
- INMET [Internet]. INMET Uruguaiana: Normais Climatológicas; 1970- 2007, [updated 2013 May 16; cited 2013 Jun 7]. Available from: <http://www.inmet.gov.br>.
- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH (1996a) Contribution of the scrotum and testes to scrotal and testicular thermoregulation in bulls and rams. *J Reprod Fertil* 108:81-85.

- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH, Wallins TE (1996b) Environmental factors affecting measurement of bovine scrotal surface temperature with infrared thermography. *Anim Reprod Sci* 41:153-159.
- Kastelic JP, Cook RB, Coulter GH (1997) Contribution of the scrotum, testes and testicular artery to scrotal/testicular thermoregulation in bulls at two ambient temperatures. *Anim Reprod Sci* 45:255-261.
- Kelly CF, Bond TE (1971) Bioclimatic factors and their measurement. In: *A Guide to Environmental Research on Animals*. Printing and Publishing Office, National Academy of Science Washington, DC, pp. 7-92.
- Knizkova I, Kunc P, Gurdil GAK, Pinar Y, Selvi KC (2007). Applications of infrared thermography in animal production. *J Facul Agr* 22:329-336.
- Ladds PW (1985) The male genital system. In: Jubb KVF, Kennedy PC, Palmer N (Eds.), *Pathology of Domestic Animals*. Academic Press, Orlando, FL, pp. 409-459.
- Lunstra DD, Coulter GH (1997) Relationship between scrotal infrared temperature patterns and natural-mating fertility in beef bulls. *J Anim Sci* 75:767-774.
- Mader TL, Johnson LJ, Gaughant JB (2010) A comprehensive index for assessing environmental stress in animals. *J Anim Sci* 88:2153-2165.
- Malama E, Bollwein H, Taitzoglou IA, Theodosiou T, Boscos CM, Kiossis E (2013) Chromatin integrity of ram spermatozoa. Relationships to annual fluctuations of scrotal surface temperature and temperature-humidity index. *Theriogenology* 80:533-541.
- Marai IFM, El-Darawany AA, Fadiel A, Abdel-Hafez MAM (2008) Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. *Trop Subtrop Agroecosyst* 8:209-234.
- Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Lampert VN, Borges JBS, Peripolli V (2011) Bioeconomic impact of bull breeding soundness examination in cow-calf systems. *Rev Bras Zootec* 40:441-447.
- Nichi M, Bols PEJ, Züche RM, Barnabe VH, Goovaerts IGF, Barnabe RC, Cortada CMN (2006) Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 66:822-828.
- Nienaber JA, Hahn GL (2007) Livestock production system management responses to thermal challenges. *Int J Biometeorol* 52:149-157.

- Paim TP, Borges BO, Lima PMT, Gomes EF, Dallago BSL, Fadel R, Menezes AM, Louvandini H, Canozzi MEA, Barcellos JOJ, McManus C (2013) Thermographic evaluation of climatic conditions on lambs from different genetic groups. *Int J Biometeorol* 57:59-66.
- Pineda MH, Faulkner LC (1980) Biology of sex. In: McDonald LE (Ed.), *Veterinary Endocrinology and Reproduction*. Lea & Febiger, Philadelphia, pp. 208-234.
- Ravagnolo O, Mistzal I, Hoogenboom G (2000) Genetic component of heat stress in cattle, development of a heat index function. *J Dairy Sci* 83:2120-2125.
- Rhoads RP, Baumgard LH, Suagee JK (2013) Metabolic priorities during heat stress with an emphasis on skeletal muscle. *J Anim Sci* 91:2492-2503.
- Roberts SY (1986) Infertility in male animals. In: Roberts SJ (Ed.), *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*. Edwards Brothers, Michigan, IN, pp. 752-793.
- Schaefer AL, Cook NJ, Church JS, Basarab J, Perry B, Miller C, Tong AKW (2007) The use of infrared thermography as an early indicator of bovine respiratory disease complex in calves. *Res Vet Sci* 83:376-384.
- Statistical Analysis System (SAS). SAS/STAT user's guide: statistics. v. 9.3. Cary, NC: Statistical Analysis System; 2011.
- Thom EC (1959) The discomfort index. *Weatherwise* 12:57-59.
- Tizikara C, Akinokun O, Chiboka O (1985) A review of factors limiting productivity and evolutionary adaptation of tropical livestock. *World Rev Anim Prod* 21:41-46.
- West JW (2003) Effects of heat-stress on production in dairy cattle. *J Dairy Sci* 86:2131-2144.

Table 1.
Effect of season on climate and physiological changes, spermiogenesis and seminal parameters from bulls subjected to analyses using temperature humidity index.

Variables	Summer	Autumn	Winter	Spring	Pr > F
THI	83.0a	71.9b	69.3b	77.5ab	0.0001
THI spermiogenesis	83.8a	73.4b	65.1b	70.7b	0.0001
Physiological changes					
PPT	32.6a	29.2bc	28.3c	30.5b	0.0001
DPT	30.3a	24.1c	23.7c	26.6b	0.0001
TG	0.9b	4.5a	4.0a	2.9ab	0.0003
OcT	33.9a	26.8b	27.6b	31.1a	0.0001
Seminal parameters					
MM	2.58b	3.76a	3.76a	4.50a	0.0007
M	52.64b	75.00a	87.67a	86.07a	0.0001
VIG	2.70b	3.76a	4.23a	4.42a	0.0001
MaD	19.94a	15.38a	16.00a	13.00a	0.3845
MiD	6.82a	5.02a	5.70a	5.85a	0.6763
TNS	73.24a	79.60a	68.30a	81.15a	0.2371

THI: temperature humidity index; PPT: proximal pole temperature (°C); DPT: distal pole temperature (°C); TG: temperature gradient; OcT: ocular temperature (°C); MM: mass motion (0-5); M: motility (%); VIG: vigour (0-5); MaD: major defects (%); MiD: minor defects (%); TNS: total normal sperm (%). Different letters on the same row are considered statistically different ($P \leq 0.05$).

Table 2.

Correlations between the temperature-humidity index during spermiogenesis, thermographic variables of testicles and ocular globe of bulls.

Variable	THI	PPT	DPT	TG	OcT	MaD	TD	M
PPT	0.69**							
DPT	0.78**	0.64**						
TG	-0.44*	0.55**	-0.70**					
OcT	0.64**	0.55**	0.74**	-0.55**				
MaD	0.07	-0.06	0.24*	-0.45*	0.16			
TD	0.12	-0.01	0.31*	-0.50**	0.19	0.93**		
M	-0.39**	-0.25*	0.41**	0.36*	-0.23	-0.04	-0.09	
VIG	-0.30**	-0.15	-0.33*	0.35*	-0.10	-0.01	-0.22	0.90**

THI: temperature humidity index; PPT: proximal pole temperature; DPT: distal pole temperature; TG: temperature gradient; OcT: ocular temperature; MaD: major defects; TD: total defects (%); M: motility (%); VIG: vigor. *P< 0.05; **P< 0.01.

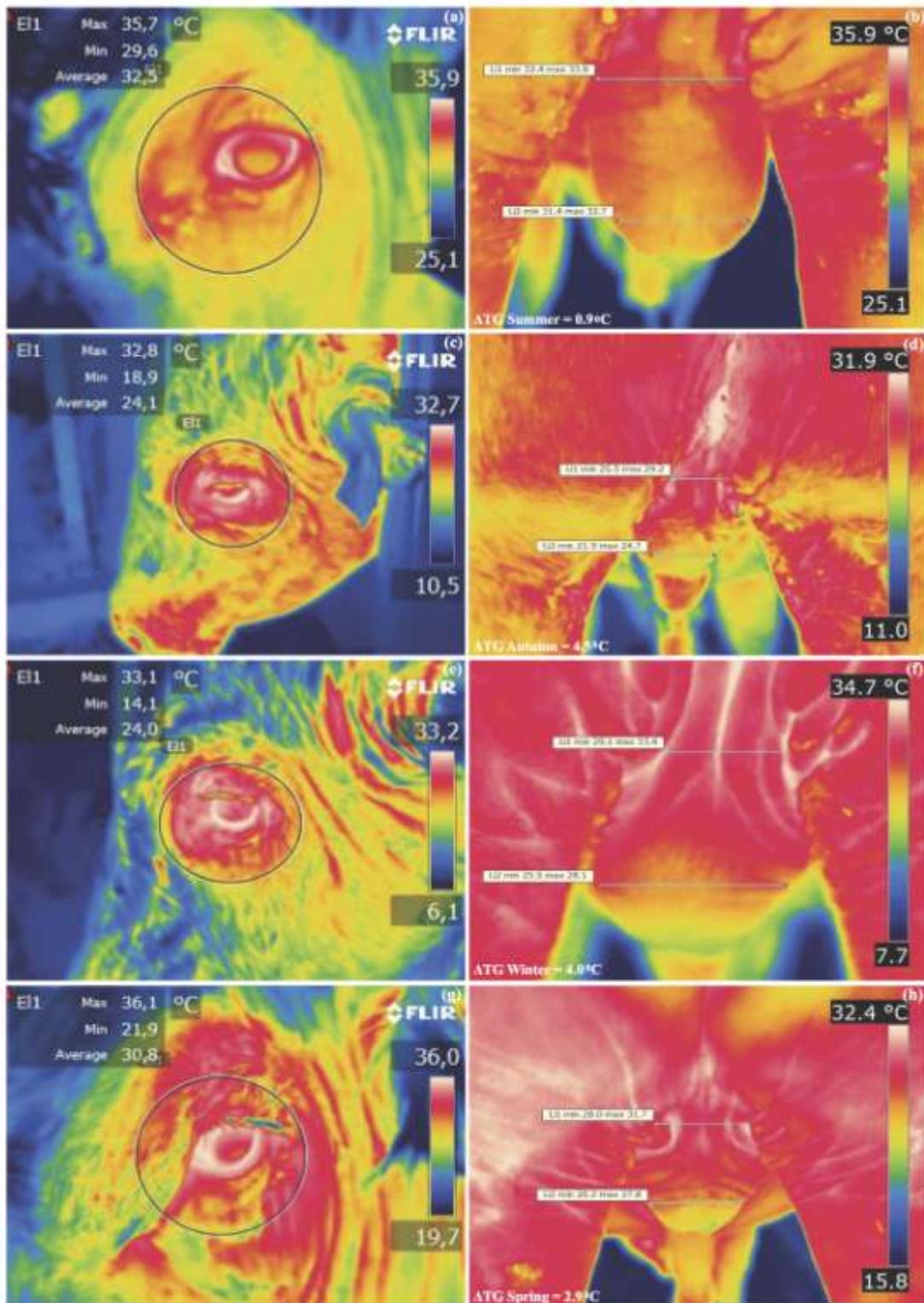


Figure 1. Infrared thermography images of the same animal collected during different season of the year. (a) Ocular globe temperature in the summer; (b) temperature gradient of testicular scrotum in the summer; (c) Ocular globe temperature in the autumn; (d) temperature gradient of testicular scrotum in the autumn; (e) Ocular globe temperature in the winter; (f) temperature gradient of testicular scrotum in the winter; (g) Ocular globe temperature in the spring; (h) temperature gradient of testicular

scrotum in the spring; ΔTG (temperature gradient variation).

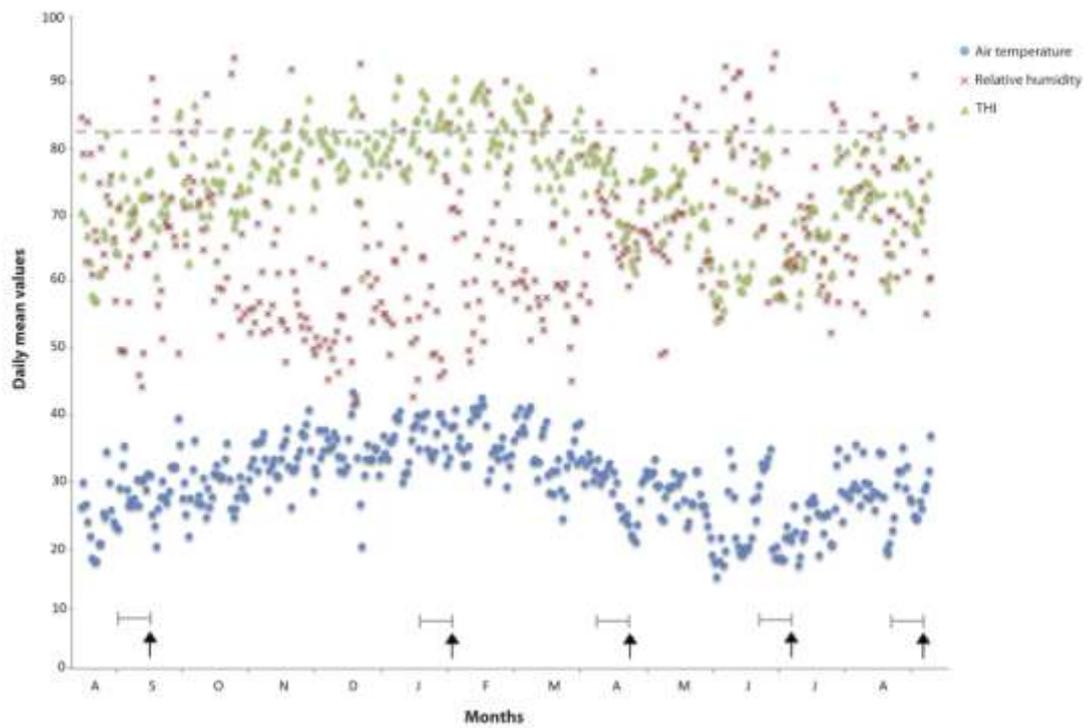


Figure 2. Daily mean values of ambient air temperature ($^{\circ}\text{C}$), relative humidity of air (%) and THI during the experimental period. Temperature-humidity index (THI), black arrow indicates the day of semen collection, short lines indicates 18-day period before semen collection, long dash line indicates THI average of 83.8 from the 18-day prior to semen collection at summer.

CAPÍTULO IV

5. CONCLUSÕES

A identificação dos STRs e dos SNPs associados às características reprodutivas nas populações estudadas permite a seleção de futuros reprodutores por meio da predição de genótipos, com o uso da técnica de marcadores moleculares. Além do ganho genético e da fertilidade, possibilita uma evolução bastante significativa devido ao menor tempo para a seleção desses reprodutores.

Nesse estudo foi observada uma forte associação do SNPs FSHR com o genótipo GG para menor PE e CAP superior para o genótipo CC, e quando encontrados os genótipos CG e GG há a possibilidade de encontrar PE com dois desvios padrão abaixo da média da raça Braford, aos dois anos de idade.

A termografia infravermelho tem sido amplamente empregada como uma técnica acurada na determinação da temperatura, e quando foi utilizada nesse experimento para determiná-la na superfície escrotal, mostrou-se um procedimento promissor na avaliação da adaptação animal a efeitos ambientais. Com as observações encontradas sobre a motilidade do sêmen, o movimento de massa e o vigor espermático durante o verão, em comparação com as outras estações, pode-se concluir que a termografia infravermelho pode ser adotada como um método auxiliar na avaliação do gradiente de temperatura escrotal e suas conseqüências nos aspectos da qualidade seminal, em touros Braford da população estudada.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fertilidade potencial de touros é usualmente avaliada para o trabalho de campo, analisada pela capacidade de acasalamento e pelo exame físico. Esses métodos são úteis para triagem de touros de baixa fertilidade, embora não permita a determinação precisa das taxas de prenhez que touros possam alcançar. Observações da libido e a da capacidade de monta são os principais métodos de avaliação de acasalamento no campo e devem ser partes integrantes de um exame andrológico. A avaliação *in vitro* de sêmen, complementar ao exame clínico é de alto valor diagnóstico, podendo avaliar a função testicular e epididimária, permitindo a eliminação de casos de infertilidade ou subfertilidade.

Embora estes métodos permitam uma precisão razoável para determinar o potencial de fertilidade de um touro, eles não levam em consideração outras restrições para a fertilidade. Encontrar um exame ou teste confiável o suficiente para prever o potencial da fertilidade de um sêmen ou de um touro para utilização em inseminação artificial (IA) ou monta a campo, ainda é considerado bastante difícil pelos pesquisadores, pelas correlações modestas observadas entre os resultados obtidos *in vitro* e a fertilidade a campo. A fertilidade do macho é complexa e dependente de centenas de proteínas e espermatozóides interagindo em vários níveis do trato genital masculino e feminino, até a chegada ao oócito para o pareamento. Vai da nidação desse embrião no útero ao reconhecimento da gestação após duas semanas aproximadamente, fases essas onde o meio ambiente se insurge como adversário. Por esta razão, o exame laboratorial dos espermatozóides deve incluir a avaliação de atributos mais relevantes para a fertilização e o desenvolvimento embrionário. O uso da Classificação Andrológica por Pontos é uma avaliação clássica da saúde reprodutiva de um touro, mas não consegue prever com acurácia, sua utilização como reprodutor, dando somente uma base para o manejo desses animais, seja frente às temporadas de monta a campo, seja utilizando-os para centrais de IA.

Estratégias para a descoberta de preditores *in vitro* do sêmen e da fertilidade dos machos que vão a campo requerem novos tipos de avaliações, inclusive a que talvez denote mais demora e investimento: a etologia animal. Aprovado um touro para trabalhar a campo, como será seu comportamento? Como interagirá com outros animais, touros e vacas? E a ciclicidade do rebanho estará colocando esse macho em prova realmente? E as avaliações de doses de sêmen para IA? De que modo as diferenças entre a fertilidade *in vitro/in vivo* podem ser detectadas com precisão?

Os efeitos da qualidade de sêmen de um touro na eficiência reprodutiva em um rebanho de cria são bem documentados, mas modestamente entendidos. Nossa habilidade para usar, *in vitro*, a avaliação do sêmen e prever a fertilidade potencial de uma amostra desse sêmen, raramente explica mais do que 50 a 60% da variação entre touros.

A consequência dessa medíocre taxa por serviço de parição é que precisa ser gerida de forma a evitar maior perda de potencial da fertilidade que cada animal tem que conceber.

Em outras palavras, a gestão da fertilidade na bovinocultura é, na

realidade, gestão para minimizar o risco de infertilidade. Neste contexto, o enfoque da avaliação de touros precisa necessariamente buscar maiores alternativas nos testes já conhecidos, e outros que possibilitem melhor acurácia do potencial reprodutivo dos touros, além das melhorias de equipamentos como o CASA, a avaliação do estado da membrana plasmática do espermatozóide, a integridade da cromatina, o uso da citometria de fluxo, o emprego de corantes fluorescentes (sondas fluorescentes), a utilização do sistema *Automated Sperm Morphometry Analyses* (ASMA), dentre outros.

Sendo assim, essa tese teve como objetivo apresentar duas alternativas que possibilitem uma melhor visão desse reprodutor, tanto a campo como fornecedor de material fecundante em centrais de inseminação artificial. Baseou-se na premissa de que um parâmetro muito importante é o PE que remete a idade à puberdade e perímetro escrotal como forte componente genético, tendo grande possibilidade de serem preditos. Nesse sentido, foi pesquisado o uso de provas complementares como marcadores moleculares para alta fertilidade, de forma a auxiliar na escolha mais precisa de qual touro servirá vacas a campo ou de qual será coletado sêmen em centrais de inseminação.

No entanto, a fertilidade do touro é apenas um dos muitos fatores que contribuem para o desempenho reprodutivo geral dos rebanhos. Enquanto o processo de avaliação da fertilidade de touros tem avançado na medida em que o valor e as limitações dos métodos como a libido, exame clínico e do sêmen tornam-se melhor compreendidos, fatores que determinam o desempenho de touros em rebanhos permanecem ainda indescritíveis, fazendo com que outros métodos de avaliação, que demonstrem a adaptabilidade desses machos ao ambiente que os desafia, sejam utilizados, como a termografia infravermelho.

Se nosso país é um dos maiores produtores de alimentos do mundo, ocupando posição de destaque, e se sabemos que a população mundial cresce em valores infinitos precisamos sair dessa zona de conforto em que as partes trabalham isoladas. Pesquisadores precisam oferecer subsídios práticos de rápida colocação no mercado; extensionistas devem e precisam ser treinados nessas novas tecnologias que imprimirão crescimento em nível econômico às populações atendidas; governos precisam ser operativos com essa demanda mundial por alimentos; produtores devem ser mais proativos e encantados na arte de produzir mais, mais barato e melhor, e não basta cada segmento tentar isoladamente fazer seu dever de casa.

Em tal contexto, o nível de sucesso que temos em predizer a fertilidade de touros é, talvez, um feito notável.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, S. E. M. et al. Molecular markers in the LEP gene and reproductive performance of beef cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, Berlin, v. 120, n. 2, p. 106-113, 2003.

BARTH, A. **Bull Breeding Soundness Evaluation Manual**. Canadá: The Western Canadian Association of Bovine Practitioners, 2000. 75 p.

BERGMANN, J. A. G. et al. Estimativas de parâmetros genéticos do perímetro escrotal e do peso corporal em animais da raça Nelore. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 48, n. 1, p. 69-78, 1996.

BEUZEN, N. D.; STEAR, M. J.; CHANG, K. C. Molecular markers and their use in animal breeding. **The Veterinary Journal**, London, v. 160, n. 1, p. 42-52, 2000.

BISHOP, D. K.; WETTEMANN, R. P.; SPICER, L. J. Body energy reserves influence the onset of luteal activity after early weaning of beef cows. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 72, n. 10, p. 2703-2708, 1994.

BOHMANOVA, J.; MISZTAL, I.; COLE, J. B. Temperature-humidity indices as indicators of milk production losses due to heat stress. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 90, n. 4, p. 1947-1956, 2007.

BOURAQUI, R. et al. The relationship of temperature-humidity index with milk production of dairy cows in a Mediterranean climate. **Animal Research**, France, v. 51, n. 6, p. 479-491, 2002.

BRITO, L. F. C. et al. Effects of environmental factors, age, and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI bulls in Brazil. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 70, n. 3-4, p. 181-190, 2002.

CAMPAGNARI, F. **Novas variantes moleculares dos genes receptores de hormônio Liberador de Gonadotrofinas (GnRHR) e do hormônio Folículo Estimulante (FSHR) em fêmeas *Bos primigenius indicus* (Nelore)**. 2002. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

CASAS, E. et al. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 83, n. 1, p. 13-19, 2005.

CHENOWETH, P. J.; BALL, L. Breeding soundness evaluation in bulls. In: MORROW, D. A. (Ed.). **Current therapy in theriogenology**. Philadelphia: WB Saunders, 1980, p. 330-339.

COLÉGIO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL. **Manual para exame andrológico a avaliação de sêmen animal**. Belo Horizonte: CBRA, 1998. 49 p.

CORREA-CALDERON, A. et al. Thermoregulatory responses of holstein and brown swiss heat-stressed dairy cows to two different cooling systems. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v. 48, n. 3, p. 142-148, 2004.

COULTER, G.H. Thermography of bull testis. In: TECH. CONF. ARTIFIC. INSEM. REPROD., 12., 1988, Milwaukee. **Proceedings...** Milwaukee: National Association of Animal Breeders, 1988. p. 58-62.

DAVIS, G. P.; DENISE, S. K. The impact of genetic markers on selection. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 76, n. 9, p. 2331-2339, 1998.

DENTINE, M. R. Market assisted selection. In: FRIES, R.; RUVINSKY, A. (Ed.). **The Genetics of Cattle**. [S.l.]: CABI, OXON, 1999.

DI STASIO, L. et al. Polymorohism of the GHR gene and relationships with meat production and quality. **Animal Genetics**, Oxford, v. 36, n. 2, p. 138-140, 2005.

DUARTE, L. B. H.; MORAES, J. C. F.; WEIMER, T. A. Diversity of microsatellites linked to the FSHB gene, their usefulness for individual indentification and association with reproductive performance. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 1, p. 145-149, 2005.

FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análises genéticas**. 2. ed. Brasília: EMBRAPA - CENARGEM, 1988. 220 p.

FONSECA, V. O. et al. Classificação andrológica de touros zebus (*Bostaurusindicus*) com base na biometria testicular e características morfofísicas do sêmen. Uma nova proposição. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, supl. 1, p. 187, 1989.

FONSECA, V. O. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bostaurusindicus*) em montanatural: proporção touro:vaca 1:40 e fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 15, n. 1-2, p. 103-108, 1991.

FONSECA, V. O. et al. Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bostaurusindicus*) acasalados com elevado número de vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 49, n. 1, p. 53-62, 1997b.

FONSECA, V. O.; FRANCO, C. S.; BERGMANN, J. A. G. Potencial reprodutivo e econômico de touros Nelore acasalados coletivamente na proporção de um

touro para 80 vacas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 52, n. 1, p. 77-82, 2000.

FONSECA, V. O. et al. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de semen animal**. Belo Horizonte: Colégio Brasileiro de Reprodução Animal, 1992, 79 p.

FONSECA, V. O.; SANTOS, N. R.; MALINSKI, P. R. Classificação andrológica de touros zebus (*Bos Taurus indicus*) com base no perímetro escrotal e características morfofísicas do sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 2, p. 36-47, 1997.

FRIES, R.; RUVINSKY, A. **The genetic of Cattle**. New York: CABI Publishing, 1999. 710 p.

GABALDI, S. H. et al. Efeitos da elevação da temperatura testicular nas características espermáticas em touros Nelores. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 23, n. 3, p. 222-224, 1999.

GARCIA, J. F. Uso de marcadores moleculares para a seleção. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL APLICADA, 2., 2006, Londrina. **Anais...** Londrina: [s.n.], 2006. p. 195-201.

GRISART, B. et al. Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **PNAS**, USA, v. 101, p. 2398-2403, 2004.

GUIMARÃES, J. D. Maximização do uso de touros a campo. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, 1., 1999, Viçosa. **Anais...**Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1999. p. 279-295.

HOROWITZ, M.; ASSADI, H. Heat acclimation-Mediated cross-tolerance in cardioprotection: do HSP70 and HIF 1alpha play a role? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1188, p. 199-206, 2010.

JORGENSEN, C. B.; KONFORTOV, B. A.; MILLER, J. R. A polymorphic microsatellite locus (AFZ1) derived from a bovine brain cortex cDNA library. **Animal Genetics**, Oxford, v. 27, n. 3, p. 220, 1996.

KAPPES, S. M. et al. A second-generation linkage map of the bovine genome. **GenomeResearch**, New York, v. 7, p. 235- 249, 1997.

KASTELIC J. P. Termorregulación del testículo del toro. In: SIMPOSIO INTERNACIONAL DE REPRODUCCIÓN ANIMAL, 4., 2011, Córdoba. **Anais...** Córdoba: IRAC, 2011. p. 1-7.

LARGELOF, N. Infertility in male domestic animals. **Veterinary Medicine**, Chicago, v. 33, p. 550-561, 1936.

LI, C.; et al. Assesment of a positional candidate gene myf5 and igf1 for growth on bovine chromosome 5 in commercial lines of Bostaurus. **Journal Animal Science**, Champaign, v. 82, n. 1, p. 1-7, 2004.

LIEFERS, S. C.; et al. Associations between leptin gene polymorphisms and production, live weight, energy balance, feed intake, and fertility in holstein heifers. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 85, n. 6, p. 1633-1638, 2002.

MAC HUGH, D. E. **Molecular biogeography and genetic struture of domesticated cattle**. 1996. 257 f.. Tese (Doutorado) - University of Dublin, Dublin, 1996.

MARAI, I. F. M. et al. Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, México, v. 8, n. 3, p. 209-234, 2008.

MENEGASSI, S. R. O. et al. Behavioral assessment during breeding soundness evaluation of beef bulls in Rio Grande do Sul. **Animal Reproduction**, Belo Horizonte, v. 8, n. 3-4, p. 77-80, 2011.

MENEGASSI, S. R. O. et al. Causes of rejection of beef bulls in breeding soundness evaluation, **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 41, n. 7, p. 1648-1653, 2012.

MORAES, J. C. F.; HORN, M. M.; ROSADO JUNIOR, A. G. Exame Andrológico em Touros: qualidade dos indicadores da aptidão reprodutiva em distintos grupos raciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 28, n. 4, p. 647-652, 1998.

OLIVEIRA, J. F. C. et al. Characterization of productive aspects in BrangusIbagé cows with distinct levels of fertility. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, p. 663-667, 2002.

PAGE, B. T. et al. Evaluation of single-nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 80, n. 12, p. 3077-3085, 2002.

PAIM, T. P. et al. Thermographic evaluation of climatic conditions on lambs from different genetic groups. **International Journal of Biometeorology**, Lisse, v. 57, n. 1, p. 59-66, 2013.

PRINGLE, T. D. et al. Carcass characteristics, the calpain proteinase system, and age tenderness if Angus and Brahman crossbreed steers. **Journal of Animal Science**, Champaign, v. 75, p. 2955-2961, 1997.

RAVAGNOLO, O. et al. Genetic component of heat stress in cattle, development of a heat index function. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 83, n. 9, p. 2120-2125, 2000.

REGINATO, L. C. A.; COUTINHO, L. L. **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2001. 215 p.

ROBERTS, S. Y. Infertility in male animals. In: ROBERTS, S. J. (Ed.). **Veterinary Obstetrics and Genital Diseases**. Michigan: Edwards Brotheres, 1986. p. 752-793.

SETCHELL, B. P. The scrotum and thermoregulation. In: **The Mammalian Testis**. Ithaca: Cornell University Press, 1978. 90 p.

SILVA, J. F. et al. Avaliação da Fertilidade Potencial de Touros. In: SIMPÓSIO NACIONAL DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 9., 1981, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: SNRA, 1981.

SPELMAN, R. J.; BOVENHUIS, H. Moving from QTL experimental results to the utilization of QTL in breeding programmes. **Animal Genetics**, Oxford, v. 9, n. 2, p. 77-84, 1998.

STONE, R. T. et al. Characterization of 109 bovine microsatellites. **Animal Genetics**, Oxford, v. 28, p. 62-66, 1997.

TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 17, n. 16, p. 6463-6471, 1989.

TIZIKARA, C.; AKINOKUN, O.; CHIBOKA, O. A review of factors limiting productivity and evolutionary adaptation of tropical livestock. **World Review of Animal Production**, Rome, v. 21, n. 4, p. 41-46, 1985.

VALE FILHO, V. R. Andrologia no touro: avaliação genital, exame de sêmen e classificação por pontos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 21, n. 3, p. 7-13, 1997.

VALE FILHO, V. R. et al. Classificação andrológica por pontos (CAP) de touros Nelore usados em monta natural como metodologia de trabalho. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 11., 1995, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1995. p. 285.

VALE FILHO, V. R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 7., 1988, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte: CBRA, 1988. p. 418-438. v. 1.

VALE FILHO, V. R. Padrões de sêmen bovino, para o Brasil: análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 1989. Belo Horizonte. **Palestras...** Belo Horizonte: CBRA, 1989. p. 94-118. v. 1.

VALE FILHO, V. R. et al. Parâmetros genéticos da classificação andrológica por pontos (CAP), em touros da raça Nelore. **Revista Brasileira de**

Reprodução Animal, Belo Horizonte, v. 23, p. 253-255, 1999.

VALE FILHO, V. R. et al. Perfil andrológico de touros da raça Tabapuã (*Bostaurusindicus*) de um e dois anos de idade, criados extensivamente nos estados de Minas Gerais, Bahia e Espírito Santo, Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 25, n. 2, p. 189-192, 2001.

WAITES, G. M. H. Temperature regulation and the testis. In: JOHNSON, A. D.; GOMES, W. R.; VANDEMARK, N. L. (Ed.). **The Testis**. New York: Academic Press, 1970. p. 241-265.

WEST, J. W. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, Stanford, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003.

WOLFE, D. F. et al. Effect of unilateral orchiectomy on semen quality in bulls. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Schaumburg, v. 186, n. 12, p. 1291-1293, 1985.

8. APÊNDICES

Apêndice I

Comandos do SAS

```
data pe;
input TOURO PE10m PE2anos classe CAP AFZ1e AFZ1d AFZclass BMS3004e
BMS3004d BMS3004class FSH Hel5e Hel5d Hel5class IDVGA51e IDVGA51d IDVGAclass
ILSTS002e ILSTS002d ILSTclass LHR;
```

```
datalines;
```

```
9754 30.2 39.5 0 71.50 119 117 11 129 138 12 3 155 155 11 175 185 12 135 141 22 4
10092 23.3 37.5 0 63.75 123 119 12 129 132 12 3 167 169 22 175 183 12 137 137 11 4
9860 22.8 31.0 0 47.33 119 117 11 129 132 12 5 153 169 12 179 181 12 135 137 11 4
9920 24 28 1 0.00 119 119 11 127 129 11 3 153 169 12 175 179 11 139 141 22 4
9876 24 29 1 0.00 113 119 11 125 129 11 5 153 161 11 173 185 12 135 139 12 5
9764 28.3 31.3 1 0.00 123 119 12 129 132 12 3 169 169 22 175 183 12 135 139 12 3
10024 18.5 31.5 0 57.00 113 113 11 125 129 11 5 151 165 12 175 183 12 131 135 11 5
10398 21.5 35.5 0 68.75 125 117 12 129 138 12 5 151 167 12 175 185 12 135 139 12 5
9846 25.7 36.0 0 42.50 125 117 12 125 135 12 3 155 169 12 175 183 12 135 139 12 4
9864 29.5 41.0 0 77.00 121 117 12 129 129 11 4 153 153 11 175 183 12 135 135 11 4
9790 30.0 36.0 0 57.50 125 125 22 129 132 12 4 167 167 22 175 177 11 135 139 12 5
10312 22.0 36.5 0 46.00 121 121 22 129 129 11 4 153 165 12 175 183 12 137 137 11 5
10210 20.2 29.0 0 42.00 123 119 12 125 129 11 4 151 161 11 173 183 12 135 139 12 4
9936 24.5 33.5 0 45.25 123 123 22 129 132 12 4 153 169 12 175 183 12 135 139 12 4
10300 19.5 35.5 0 66.00 123 121 22 129 129 11 4 167 167 22 175 183 12 135 137 11 5
10424 18.1 28.0 1 44.00 121 113 12 127 132 12 4 153 165 12 179 185 12 137 139 12 3
9900 22.5 32.0 0 46.00 123 117 12 129 129 11 4 165 165 22 175 183 12 137 139 12 4
10230 19.0 34.0 0 72.00 121 119 12 132 132 22 4 165 169 22 175 183 12 133 137 11 4
10096 20.5 32.0 0 56.25 121 119 12 129 132 12 4 165 167 22 175 183 12 137 139 12 4
10036 18.7 32.5 0 84.00 113 113 11 125 129 11 4 165 165 22 173 181 12 137 139 12 4
10420 18.5 36.0 0 59.50 121 117 12 127 129 11 4 167 167 22 175 181 12 137 139 12 4
10010 19.6 35.0 0 84.00 119 113 11 125 132 12 4 151 167 12 173 185 12 137 139 12 4
10054 26.5 36.5 0 76.00 121 113 12 127 132 12 4 167 167 22 173 183 12 139 141 22 4
9956 24.5 35.0 0 84.00 121 117 12 125 132 12 4 165 165 22 175 183 12 139 141 22 4
9898 24.5 37 0 68.50 121 119 12 127 129 11 4 151 165 12 175 181 12 139 141 22 5
10188 16.0 30.5 0 70.00 125 117 12 127 132 12 4 153 167 12 175 179 11 139 141 22 5
9838 27.0 38.0 0 92.00 125 117 12 129 129 11 4 151 165 12 173 183 12 135 139 12 4
9762 28.4 34.5 0 76.00 125 119 12 129 132 12 4 153 163 11 175 177 11 135 139 12 3
10224 22.5 37.0 0 84.00 125 125 22 129 129 11 4 167 167 22 175 185 12 135 135 11 4
9988 26.0 37.0 0 84.00 125 125 22 129 129 11 4 153 167 12 175 185 12 139 139 22 3
9780 32.0 35.5 0 84.00 121 121 22 129 138 12 4 153 167 12 173 183 12 133 139 12 4
10118 22.5 33.5 0 76.00 123 123 22 129 129 11 4 167 167 22 175 183 12 135 139 12 4
9960 26.4 36.5 0 74.00 125 117 12 129 132 12 4 153 167 12 175 183 12 135 139 12 4
9834 27.0 36.0 0 84.00 125 117 12 132 135 22 4 153 169 12 175 183 12 133 139 12 5
9776 24.5 31.0 0 52.50 123 123 22 132 135 22 4 167 167 22 175 183 12 135 135 11 5
9808 26.5 35.5 0 66.50 123 117 12 132 132 22 4 167 167 22 175 183 12 133 141 12 4
9752 26.0 30.5 0 64.50 121 119 12 132 135 22 4 151 155 11 175 185 12 133 139 12 4
10176 21.5 33.0 0 84.00 121 121 22 129 132 12 4 167 167 22 175 185 12 135 139 12 4
9848 24.5 32.0 0 60.00 121 119 12 129 132 12 4 167 167 22 175 183 12 137 137 11 4
10378 20.10 34.0 0 84.00 119 119 11 129 132 12 4 153 167 12 175 183 12 131 135 11 4
10192 21.5 34.5 0 76.00 121 117 12 125 138 12 4 155 169 12 175 183 12 135 135 11 5
10426 28.3 42.0 0 79.50 119 117 11 129 132 12 4 153 153 11 175 181 12 131 135 11 5
9826 24.6 36.5 0 74.00 123 123 22 129 135 12 4 153 167 12 175 183 12 135 139 12 5
9974 27.5 35.0 0 76.50 123 123 22 129 132 12 4 153 165 12 173 181 12 135 139 12 4
9948 25.0 34.5 0 76.50 121 121 22 129 129 11 4 167 167 22 175 181 12 135 139 12 4
9926 21.5 34.5 0 76.00 123 123 22 129 132 12 4 163 163 11 175 183 12 135 135 11 4
```

```

9934 22.5 29.5 0 70.00 123 123 22 129 129 11 4 153 165 12 175 183 12 137 141 12 5
10308 20.0 32.0 0 54.50 125 125 22 132 132 22 4 153 167 12 179 183 12 135 137 11 3
10258 18.0 28.0 1 64.50 123 121 22 129 132 12 4 153 167 12 175 183 12 137 141 12 5
10146 19.2 37.0 0 74.00 121 121 22 129 132 12 4 165 165 22 181 185 22 137 141 12 4
9870 26.5 37.0 0 52.00 123 119 12 129 132 12 4 153 167 12 175 183 12 137 139 12 5
9840 26.5 36.0 0 76.00 121 119 12 129 129 11 4 155 155 11 175 183 12 135 135 11 5
9748 33.0 37.0 0 66.50 123 123 22 129 132 12 4 167 169 22 175 183 12 135 135 11 3
9786 26.0 34.0 0 16.00 121 119 12 129 132 12 4 163 165 12 175 183 12 135 135 11 4
9884 26.0 35.0 0 84.00 123 119 12 129 132 12 4 153 165 12 177 183 12 139 139 22 5
10432 27.8 38.0 0 92.00 121 119 12 129 132 12 4 153 165 12 175 183 12 131 139 12 5
9880 22.0 33.0 0 66.50 121 121 22 132 138 22 4 165 165 22 179 183 12 125 135 11 5
9842 21.0 33.5 0 84.00 123 121 22 129 132 12 4 153 153 11 177 185 12 135 139 12 4
10428 29.0 34.0 0 76.00 121 121 22 129 132 12 4 165 165 22 177 183 12 137 139 12 5
10042 19.5 30.5 0 62.00 117 117 11 132 138 22 4 151 169 12 177 185 12 139 139 22 4
10030 29.0 37.0 0 66.50 121 117 12 129 132 12 4 153 165 12 177 185 12 131 139 12 4
10076 20.0 34.0 0 76.00 121 121 22 129 132 12 4 155 155 11 177 185 12 135 135 11 4
10048 19.4 35.5 0 76.00 119 119 11 129 132 12 4 151 169 12 179 181 12 139 139 22 5
10018 20.7 36.5 0 68.00 123 117 12 129 132 12 4 151 169 12 179 181 12 137 137 11 4
9818 28.2 34.0 0 84.00 117 117 11 132 132 22 4 167 167 22 175 185 12 133 133 11 4
10138 25.0 34.0 0 76.00 119 117 11 132 132 22 4 165 165 22 175 183 12 137 137 11 5
9872 26.0 33.0 0 76.00 125 125 22 129 132 12 4 169 169 22 177 185 12 137 141 12 4
9844 28.0 36.0 0 76.50 125 117 12 129 132 12 4 151 167 12 175 185 12 141 141 22 4
9772 29.0 35.5 0 74.00 121 119 12 129 132 12 4 153 165 12 175 185 12 133 175 12 4
10070 20.0 31.0 0 70.00 121 119 12 129 129 11 4 169 169 22 175 185 12 135 137 11 4
9924 30.5 38.0 0 100.00 119 117 11 129 129 11 4 153 167 12 177 183 12 137 141 12 4
10022 18.0 30.5 0 53.00 123 119 12 129 129 11 4 155 155 11 175 183 12 137 137 11 4
10098 26.5 40.0 0 94.50 123 119 12 129 129 11 4 153 153 11 175 185 12 137 141 12 4
9750 28.0 36.0 0 84.00 121 113 12 129 129 11 4 153 165 12 175 181 12 137 141 12 4
9852 23.2 35.5 1 60.00 119 117 11 129 129 11 4 151 167 12 177 185 12 135 135 11 4
10190 19.0 35.5 0 100.00 117 117 11 129 129 11 4 155 165 12 175 183 12 137 139 12 5
10222 19.0 34.5 0 76.00 117 117 11 129 129 11 4 155 155 11 175 175 11 137 141 12 5
10296 20.5 35.0 0 84.00 123 119 12 132 138 22 4 167 169 22 173 177 11 137 141 12 4
9964 24.5 38.0 0 92.00 119 119 11 129 129 11 4 155 165 12 175 183 12 137 137 11 5
10116 21.5 34.5 0 74.00 127 127 22 132 132 22 4 165 165 22 175 177 11 135 139 12 4
9836 25.0 36.0 0 76.00 121 121 22 129 132 12 4 153 167 12 175 175 11 139 139 22 5
9866 20.0 36.0 0 74.00 123 117 12 132 132 22 4 167 167 22 179 183 12 137 139 12 4
10184 20.5 35.0 0 84.00 123 121 22 132 138 22 4 153 165 12 175 183 12 137 141 12 4
10264 22.5 35.5 0 63.00 119 119 11 132 138 22 4 153 153 11 175 183 12 135 139 12 4
10150 25.0 36.0 0 74.00 119 119 11 132 138 22 4 157 165 12 175 183 12 137 139 12 4
10212 22.5 33.0 0 84.00 121 119 12 129 129 11 4 153 167 12 175 175 11 133 133 11 4
10204 21.5 31 1 70 123 119 12 129 132 12 5 167 167 22 173 183 12 139 139 22 4

```

```

procglmdata= pe;
class AFZclass BMS3004class FSH Hel5class IDVGAclass ILSTclass LHR;
model PE10m PE2anos classe CAP = AFZclass BMS3004class FSH Hel5class IDVGAclass
ILSTclass LHR;
means AFZclass BMS3004class FSH Hel5class IDVGAclass ILSTclass LHR/tukey lines;
run;
quit;

```

```

data pe;
input Touro AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo CAP1 - CAP4;;

```

```

datalines;
9754 11 12 5 11 12 12 4 69 74 90 53
9790 22 12 4 22 11 12 5 59 52 89 30
9846 12 12 5 12 12 12 4 59 37 44 27
9860 11 12 3 12 12 12 4 49 25 70 70
9864 12 11 4 11 12 11 4 63 85 85 75
9900 12 11 3 11 12 22 4 45 70 23 23
9936 22 12 5 12 12 12 4 33 70 55 23
10024 11 11 3 11 12 11 5 55 70 70 33
10092 12 12 5 22 12 22 4 76 76 76 27
10096 12 12 3 12 12 22 4 70 62 70 23
10398 12 12 3 12 12 12 5 61 69 84 61
10300 22 11 5 22 12 12 5 69 74 84 37
10312 22 11 4 11 12 22 5 39 69 30 30
10424 12 12 3 11 12 22 3 38 45 70 23
10126 11 22 3 22 12 22 5 76 61 61 39
10210 12 11 3 11 12 12 4 53 47 45 23
10230 12 22 5 12 12 12 4 84 76 69 59
;

```

```

procglmdata= pe;
class AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo ;
model CAP1-CAP4 = AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi
IDVGAcom181 ILSTS002Classifi
LHcurtolongo;
repeated month;
means AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo/tukey lines;
run;
quit;

```

```

data pe;
input Touro AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo PE1-PE5;

datalines;
9754 11 12 5 11 12 12 4 30.2 38 36.5 39.5 39.5
9790 22 12 4 22 11 12 5 30 37 35.5 38 36
9846 12 12 5 12 12 12 4 25.7 37 35.5 39 36
9860 11 12 3 12 12 12 4 22.8 29 29.5 31 31
9864 12 11 4 11 12 11 4 29.5 40 41 40 43
9900 12 11 3 11 12 22 4 22.5 32 32 32 32
9936 22 12 5 12 12 12 4 24.5 35 33.5 37 33.5
10024 11 11 3 11 12 11 5 18.5 33.5 33.5 33.5 31.5
10092 12 12 5 22 12 22 4 23.3 37.5 36.5 39 37.5
10096 12 12 3 12 12 22 4 20.5 32.5 31 34 32
10398 12 12 3 12 12 12 5 21.5 37 36.5 38 35.5
10300 22 11 5 22 12 12 5 19.5 35 34.5 37 35.5
10312 22 11 4 11 12 22 5 22 37.5 37 37 36.5
10424 12 12 3 11 12 22 3 18.1 28 28 28 28
10126 11 22 3 22 12 22 5 20.5 35 34.5 36 34
10210 12 11 3 11 12 12 4 20.2 30 28.5 31 30
10230 12 22 5 12 12 12 4 19 35.5 34.5 37 34
;
proc glm data= pe;
class AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo;
model PE1-PE5 = AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo;
means AFZlclassific BMS3004classif FSHcurtolongo Hel5Classifi IDVGAcom181
ILSTS002Classifi
LHcurtolongo/tukey lines;
run;
quit;

```

9. VITA

Silvio Renato Oliveira Menegassi, nascido em Porto Alegre, no dia 14 de março de 1950. Filho de Waldemar Menegassi e Elayne Oliveira Menegassi. Coursou o ensino fundamental e médio no Instituto Porto Alegre (IPA). Entre 1969 e 1972 cursou Medicina Veterinária na Universidade Federal de Santa Maria (UFSM).

Em março de 2008, ingressou no curso de mestrado no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, como bolsista CNPq, desenvolvendo trabalho de dissertação sobre a Importância do Exame Andrológico em Touros na Avaliação Bioeconômica de Sistemas de Cria.

Em março de 2010, ingressou no curso de doutorado no Programa de Pós-graduação em Zootecnia, como bolsista CNPq, desenvolvendo trabalho de tese sobre a Predição da Fertilidade de Touros Braford por meio de Marcadores Moleculares e Termografia Infravermelho.