UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Vivian Taís Fernandes Cipriano

**Perímetro escrotal: marcadores moleculares, bioquímicos e sua influência na
produção *in vitro* de embriões em bovinos**

RIBEIRÃO PRETO

2014

VIVIAN TAÍS FERNANDES CIPRIANO

**Perímetro escrotal: marcadores moleculares, bioquímicos e sua influência na
produção *in vitro* de embriões em bovinos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
de Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como parte dos requisitos para a
obtenção do grau de Doutor em Ciências

Área de concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lobo

RIBEIRÃO PRETO

2014

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR
QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE
ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Cipriano, Vivian Taís Fernandes

Perímetro escrotal: marcadores moleculares, bioquímicos e sua influência na produção *in vitro* de embriões em bovinos, Ribeirão Preto, 2014.
119p.

Tese de doutorado – apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.
Orientador(a): Lobo, Raysildo Barbosa

1. Perímetro escrotal. 2. Precocidade sexual. 3. SNPs. 4. Proteômica.
5. Produção *in vitro* de embriões.

Nome: Cipriano, Vivian Taís Fernandes

Título: Perímetro escrotal: marcadores moleculares, bioquímicos e sua influência na produção *in vitro* de embriões em bovinos

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

(FAPESP) Processos 2010/02413-2 e 2011/50463-1

FUNDAÇÃO DE AMPARO AO ENSINO PESQUISA E ASSISTÊNCIA DO
HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO
PRETO (FAEPA)

CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO DE PESQUISA (CNPQ)
COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
(CAPES)

ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS CRIADORES E PESQUISADORES (ANCP)

**Aos meus pais Gerson Cipriano e Ruth Fernandes da Silva Cipriano;
Meus avós Octávio Fernandes da Silva e Pedrosa Garcia da Silva
DEDICO...**

Agradecimentos

A Deus por ser infinitamente generoso e por me proporcionar chegar até aqui;

Ao meu orientador Prof. Dr. Raysildo Barbosa Lobo pela oportunidade e auxílios;

À profa. Dra. Cláudia Paro Paz pelas análises, ensinamentos, conversas e ajuda;

Ao Reginaldo Aparecido Vila pela paciência, pelos momentos divertidos e por todos ensinamentos;

À Marli, ao Silvio e ao Luíz pela ajuda técnica e pelos bate papos;

À Mara pela amizade e conversas diárias;

À secretária do departamento de genética Susie Nalon e todos seus colaboradores;

A todos alunos e professores do Bloco C da genética;

Às meninas da G.O. Cris, Ju Meola e Lilian... OBRIGADA!

Aos meus pais pelo apoio e amor infinito sem os quais eu não chegaria a lugar nenhum;

Aos meus avós (*in memoriam*) por orarem por mim diariamente e por serem minha inspiração;

Ao meu irmão por ser meu ídolo, meu exemplo e por me ajudar tanto profissional como pessoalmente;

À minha cunhada Graziella pelo apoio e ajuda em todos os âmbitos desde sempre;

Aos meus sobrinhos Giovanni e Antonella que foram meu maior presente ao longo desse doutorado, por me ensinarem o que é o verdadeiro amor e por fazerem todos os problemas desaparecerem;

Ao meu namorado Rodrigo por ser meu amigo de todas as horas, me ouvir, me aconselhar e estar sempre disposto a me ajudar;

Aos meus tios Tavinho, Dri, Yara e primos Kleber, Tatiana, Luciana, Tavico e Juju pelas orações e por serem uma família sólida e presente mesmo longe;

Aos meus primos Sandra, Zinho, Débora, Yudi e Bia pelas festas, pelo amor e pela ajuda mesmo longe;

À dona Ju por ser minha família aqui em Ribeirão, juntamente com toda a família Beton (se for citar todos não vai caber na tese...rs);

À Con, dona Isabel, Bete e à Fátima por serem como integrantes da nossa família nos ajudando todo o tempo;

Às minhas geris Nerrynha e Ma... amigas irmãs pra vida inteira! E ao irmão loiro Besssst Fausto Bruno;

Aos grandes amigos que fiz aqui e que vou levar pra toda a vida Anderson, Carol, Cris, Fer, Flavinha, Fran, Maller, Murilo, Nego, Pataxó, Rachel, Rafa, Sardinha, Willianzinho;

Às amigas de ontem, hoje e sempre Amanda, Ana Paula, Bru, Juliana, Lu, Sil e Vê;

E a todos que esqueci de citar, MUITO OBRIGADA!

**“Sei que os teus olhos sempre atentos permanecem em mim
E os teus ouvidos estão sensíveis para ouvir meu clamor
Posso até chorar, mas a alegria vem de manhã
És Deus de perto e não de longe
Nunca mudastes Tu és fiel!”**

RESUMO

Cipriano, VTF. Perímetro escrotal: marcadores moleculares, bioquímicos e sua influência na produção *in vitro* de embriões em bovinos.

Os programas de melhoramento genético objetivam a seleção de animais geneticamente e fenotipicamente superiores. Dentre as características selecionadas para aumentar o ganho genético do rebanho, o perímetro escrotal destaca-se por sua alta herdabilidade e correlação com precocidade sexual, peso do animal e morfologia espermática. A seleção fenotípica para perímetro escrotal pode ser auxiliada pela junção da DEP PE 365 (diferença esperada na progênie para perímetro escrotal aos 365 dias) com a biotecnologia reprodutiva PIVE (produção *in vitro* de embriões), e tecnologias moleculares como o uso de marcadores do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e marcadores bioquímicos (proteínas). Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo: verificar se os SNPs presentes nos genes atuantes na maturação sexual *B4GALT1* (*Beta 1,4- galactosyltransferase*), *FSHR* (*Follicle-stimulating hormone*), *LHR* (*Luteinizing hormone receptor*) e *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*) podem estar associados a maiores valores de DEP PE 365 em touros da raça Nelore; fazer o estudo global de proteínas no sêmen de touros da raça Nelore que possam ser indicativas de maior DEP PE 365 e verificar se a DEP PE 365 interfere negativamente ou positivamente nos resultados da PIVE. Para as análises de SNP, 178 touros foram divididos em dois grupos, sendo um com 104 animais de DEP PE 365 negativa e outro com 74 animais com DEP positiva. O DNA foi extraído do sangue destes animais e a região genômica de interesse foi amplificada e analisada por RFLP (*restriction fragment length polymorphism*). No caso da proteômica, dois *pools* de sêmen foram comparados entre si quanto aos seus perfis protéicos por LCMS (*Liquid chromatography–mass spectrometry*): um proveniente de três touros que produzem em média 17,6% de embriões/oócito *in vitro* e DEP PE 365 média de -0,3 (inferiores) e outro *pool* proveniente de três touros que produzem em média 34,25% de embriões/oócito, com DEP PE 365 média de 1,07 (superiores). Para verificar se a DEP PE 365 de touros utilizados na PIVE influencia na quantidade e cinética de embriões produzidos, 48 touros foram divididos em três grupos (superior, neutro e inferior) por meio da amplitude total de suas DEPs PE 365 e então utilizados na PIVE. Então, observou-se a quantidade e os tipos de blastocistos gerados por cada um dos grupos.

Os resultados do presente trabalho mostraram: o genótipo CC no SNP analisado no gene *LHR*, e o genótipo TT no SNP analisado no gene *IGF2* podem estar relacionados a animais de maiores DEP PE 365 ($p \leq 0.05$); proteínas envolvidas em vias metabólicas foram predominantes no grupo dos touros superiores e portanto podem ser prováveis marcadores bioquímicos de reprodutores com maiores DEP PE 365; touros com maiores DEPs PE 365 resultam na maior PIV de embriões favoráveis para serem transferidos para vacas receptoras (Bl e Bx; blastocisto e blastocisto expandido; $p \leq 0.05$). Tais resultados apresentam informações que podem auxiliar na seleção de animais com melhores dados fenotípicos de DEP PE 365 e, portanto, melhores reprodutores.

Palavras-chave: Perímetro escrotal; Precocidade sexual; SNPs; Proteômica; Produção in vitro de embriões.

ABSTRACT

Cipriano, VTF. Scrotal circumference in cattle: molecular and biochemistry markers and its influence on *in vitro* production of embryos.

The breeding programs aim the selection of phenotypically and genetically superior animals . Among the selected characteristics to increase genetic gain in the herd, scrotal circumference stands out for its high heritability and correlation with sexual precocity, animal weight and morphology . Phenotypic selection for scrotal circumference may be aided by the addition of EPD SC 365 (expected progeny difference for scrotal circumference at 365 days) to IVPE (*in vitro* production of embryos) reproductive biotechnology and molecular technologies such as the use of molecular markers like SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) and biochemical markers (proteins). Thus, this study aimed to: determine whether the SNPs present in genes B4GALT1 (Beta 1,4 - galactosyltransferase), FSHR (Follicle - stimulating hormone), LHR (Luteinizing hormone receptor) and IGF2 (Insulin- like growth factor 2) may be associated with higher values of EPD SC 365 in Nelore bulls; make global study of proteins in semen from Nelore bulls that may be indicative of greater EPD SC 365 and check if EPD SC 365 interferes negatively or positively on the results of IVPE. For the analysis of SNP, 178 bulls were divided into two groups, one with 104 animals of 365 negative EPD SC 365 and another with 74 animals with positive EPD SC 365. DNA was extracted from blood of these animals and genomic region of interest was amplified and analyzed by RFLP (restriction fragment polymorphism length). In the case of proteomics, two *pools* of semen were compared in respect to their protein profiles by LCMS (Liquid chromatography - mass spectrometry): One from three bulls that produce on average 17.6 % of *in vitro* embryo/oocyte and with EPD SC 365 average -0.3 (lower) and another *pool* from three bulls that produce on average 34.25% of *in vitro* embryo/oocyte with EPD SC 365 average of 1.07 (upper). To check if EPD SC 365 bulls used in IVPE influences the amount and kinetics of embryos, 48 bulls were divided into three groups (upper, lower and neutral) through the full range of their EPDs SC 365 and then used in IVPE. Then, it was observed the amount and types of blastocysts generated by each group. The results of this study showed: the CC genotype at SNP analyzed in LHR gene, and the TT genotype at SNP analyzed in the IGF2 gene may be related to larger EPD SC 365 animals ($p \leq 0.05$); proteins involved in metabolic pathways were

predominant in group of senior bulls and can therefore be likely biochemical markers of breeding with larger EPD SC 365; bulls with larger EPD SC 365 used in IVPE result in greater favor of embryos to be transferred to recipient cows (B1 and Bx; blastocyst and expanded blastocyst, $p \leq 0.05$). These results provide information that can assist in the selection of animals with improved phenotypic data EPS SC 365 and, therefore, the best breeders.

Keywords: Scrotal circumference, Sexual precocity; SNPs; Proteomics, *In vitro* production of embryos.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
2.1. PERÍMETRO ESCROTAL EM TOUROS	24
2.2. PERÍMETRO ESCROTAL E MARCADORES MOLECULARES DO TIPO SNPs (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLIYMORPHISM</i>)	25
2.3. PERÍMETRO ESCROTAL E PROTEÔMICA.....	28
2.4. PERÍMETRO ESCROTAL NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	29
2.4.1. Formação dos gametas utilizados na produção <i>in vitro</i> de embriões.....	31
3. OBJETIVOS	36
3.1. OBJETIVO GERAL.....	36
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4. MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1. PERÍMETRO ESCROTAL E MARCADORES MOLECULARES DO TIPO SNPs (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLIYMORPHISM</i>)	38
4.2. PERÍMETRO ESCROTAL E PROTEÔMICA	40
4.3. PERÍMETRO ESCROTAL NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES	45
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	49
5.1. PERÍMETRO ESCROTAL E MARCADORES MOLECULARES DO TIPO SNPs (<i>SINGLE NUCLEOTIDE POLIYMORPHISM</i>)	49
5.2. PERÍMETRO ESCROTAL E PROTEÔMICA.....	54
5.2.1 <i>Análise in silico</i>	62
5.3. PERÍMETRO ESCROTAL NA PRODUÇÃO <i>IN VITRO</i> DE EMBRIÕES.....	76
6. CONCLUSÕES	83
7. REFERÊNCIAS	85
8. ANEXOS	97
ANEXO I: DNA, RNA E SOLUÇÕES	97
ANEXO II: MANUSCRITO A SER SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO.....	100

Lista de Figuras

Figura 1. Separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida contendo os fragmentos obtidos do primeiro *pool* marcado com isotópico leve (A) e do segundo *pool* marcado com isotópico pesado (B) e a junção das duas amostras marcadas (A+B). Cinco faixas do gel de cada amostra (10KDa 20; 20 a 37; 37 a 75; 75 a 150 e 150 a 250kDa) foram recortadas para digestão trípica conforme ilustrado na figura. No poço um foi aplicado o marcador de peso molecular, no poço dois a amostra A, no poço três a amostra B e no poço quatro as amostras A e B.

Figura 2. *Pool* de oócitos grau I apresentando células do cumulus compactas, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo (aumento de 40x).

Figura 3. Classificação dos embriões 168 horas após a fertilização (aumento de 100X). Blastocisto inicial (Bi) iniciando a formação da blastocele, sendo que esta ocupa menos da metade do volume total do embrião; Blastocisto (Bl) com a cavidade expandindo e ocupando metade ou mais do volume total do embrião e com formação do botão embrionário; Blastocisto expandido (Bx) com zona pelúcida delgada, cavidade bastante desenvolvida e botão embrionário reduzido; Blastocisto eclodido (Be) com ruptura da zona pelúcida, e, processo de eclosão embrionária ou eclodidos.

Figura 4. Representação esquemática de *B4Galt1* (4a), *FSHR* (4b), *LHR* (4c) e *IGF2* (4d), bem como seu número de acesso ao *genebank*. As caixas pretas representam os éxons ao longo do gene. Os *primers* utilizados e os SNPs estão destacados em negrito.

Figura 5. Genótipos encontrados para os genes estudados (5a) *B4Galt1*, (5b) *FSHR*, (5c) *LHR* e (5d) *IGF2* após emprego da metodologia de RFLP. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb.

Figura 6. Análise funcional entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas para determinada função presentes no grupo A e as barras claras representam a quantidade de proteínas para determinada função presentes no grupo B.

Figura 7. Análises comparativas das rotas entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas do grupo A envolvidas em determinada rota e as barras claras representam a quantidade de proteínas do grupo B.

Figura 8. Análises comparativas das rotas entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas do grupo A envolvidas em determinada rota e as barras claras representam a quantidade de proteínas do grupo B.

Figura 9. Representação esquemática da glicólise, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B.

Figura 10. Representação esquemática da gliconeogênese, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B simultaneamente.

Figura 11. Representação esquemática do ciclo do ácido tricloroacético, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B.

Figura 12. Representação esquemática da cascata do EGF, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas no grupo A.

Figura 13. Representação esquemática do processo de disfunção mitocondrial, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas no grupo A.

Figura 14. Representação esquemática do processo de formação do eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas no grupo B.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Iniciadores utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse.

Tabela 2. Representação das características dos touros utilizados nos estudos de proteômica.

Tabela 3. Frequências alélicas e genótípicas para cada SNP estudado nos genes *B4GALT1*, *FSHR*, *LHR* e *IGF2* em função do fenótipo de DEP PE 365.

Tabela 4. Número de espermatozoides (sptz/ ml) contabilizados nos pellets e seu volume final (µl) após processamento das quatro amostras de sêmen, para cada uma dos seis touros utilizados.

Tabela 5. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo A, apresentadas em ordem decrescente de abundancia.

Tabela 6. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo B, apresentadas em ordem decrescente de abundancia.

Tabela 7. Proteínas encontradas nos grupos A e B.

Tabela 8. Média de oócitos utilizados e de embriões totais produzidos nas três replicatas, por touro, em função do numero de COC's utilizados.

Tabela 9. Produção média de embriões totais, por grupo de acordo com sua DEP PE 365 (*Kruskal-Wallis* $p>0.05$).

Tabela 10. Porcentagem média das três replicatas, do tipo de blastocisto produzido em D7, para cada touro, em relação ao número total de blastocistos sobreviventes até o D4.

Tabela 11. Média da porcentagem encontrada para cada tipo de blastocisto, com relação ao número de embriões totais produzidos, considerando-se os grupos de touros superior, neutro e inferior de acordo com sua DEP PE 365.

Lista de abreviaturas

AFLP	<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>
AI	Anáfase I
ANCP	Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
B4 Galt -1	Beta 1,4- galactosyltransferase
CIV	Complexos cumulus-oócito
COC	Cultivo <i>in vitro</i>
DEP	Diferença esperada na progênie
DEP PE 365	Diferença esperada na progênie para PE aos 365 dias
EGF	<i>Epidermal growth epidermal</i>
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	<i>Follicle stimulating hormone</i>
FSHR	<i>Follicle stimulating hormone receptor</i>
GAPDH	Gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase
IGF2	<i>Insulin-like growth factor 2</i>
LCMS	<i>Liquid chromatography–mass spectrometry</i>
LH	<i>Luteinizing hormone</i>
LHR	<i>Luteinizing hormone receptor</i>
MIV	Maturação <i>in vitro</i>
MI	Metáfase I
MII	Metáfase II
mtDNA	DNA mitocondrial
NADH	Hidrogênio niacina adenina dinucleotídeo
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
PE	Perímetro Escrotal
PIV	Produção <i>in vitro</i>
PII	Prófase II
RAPD	<i>Random Amplification of Polymorphic DNA</i>
RFLP	<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>

SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TE	Transferência de embriões

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

Dados do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA, 2012) indicam que o Brasil possui 197 milhões de cabeças de gado. No 1º trimestre de 2013, foram abatidas 8134 milhões de cabeças de bovinos no país, representando aumento de 12.7% frente ao 1º trimestre de 2012 (www.ibge.gov.br). Esses números impulsionam o crescimento do uso do melhoramento genético nos rebanhos resultando na seleção de animais mais rentáveis e superiores geneticamente e fenotipicamente. Buscando-se os melhores reprodutores, os programas de melhoramento genético analisam várias características reprodutivas como perímetro escrotal (PE) e precocidade sexual por meio da fertilização *in vitro* e da biologia molecular (Caetano et al., 2013; Nakata et al., 2009).

Quando se fala em precocidade sexual, o perímetro escrotal é o melhor indicador (Lirón et al., 2012; Siqueira et al., 2012). A Diferença Esperada na Progênie para PE aos 365 dias (DEP PE 365) consiste no valor que um touro agrega no PE da sua progênie, com relação à média de PE das outras progênies. Esta medida é tomada aos 365 dias de vida dos animais (Euclides Filho K, 1999; Henderson, 1984). Após o nascimento, o perímetro escrotal aumenta linearmente dos seis aos 12 meses de idade e é altamente correlacionado ao número de espermatozoides produzidos diariamente pelos testículos (Unanian, 2000). Selecionar animais de acordo com seu PE com o objetivo de se obter animais mais precoces é interessante já que a idade à puberdade, por apresentar alta herdabilidade (0,50) pode ser reduzida por meio de seleção (Araujo Neto et al., 2011).

A seleção de animais para PE utilizando-se tanto a biologia molecular como a fertilização *in vitro* tem despontado no cenário mundial como importantes ferramentas de auxílio na escolha, identificação, seleção e multiplicação mais rápida de animais geneticamente superiores (Marson et al., 2008). Dentre as tecnologias utilizadas, pode-se destacar a identificação de proteínas presentes em animais de maior DEP PE 365 (proteômica) bem como a pesquisa por *single nucleotide polymorphism* (SNP). Ambos, quando correlacionados a determinada característica podem ser utilizados como marcadores (Nakaya et al., 2009).

Outra metodologia que merece destaque na seleção animal é a produção *in vitro* (PIV) de embriões, a qual permite a obtenção de um grande avanço genético,

acelerando o processo de melhoramento dos rebanhos e aumentando a eficiência reprodutiva de fêmeas de alto valor reprodutivo, resultando também na diminuição do intervalo entre gerações. Além disso, a PIV vem a ser uma ferramenta de suporte para outras biotécnicas da reprodução como a clonagem (Diaz et al., 2011).

A PIV em bovinos consiste na produção de embriões por métodos laboratoriais que simulam as condições fisiológicas da vaca desde sua ovulação, fecundação até o desenvolvimento embrionário pré-implantacional. A técnica resulta na produção de embriões que podem ser selecionados e transferidos do ambiente laboratorial para o ambiente uterino de uma vaca receptora.

Utilizada em diversos países, é no Brasil que a PIV resulta em mais de 250.000 embriões bovinos/ano. Além desta técnica, destaca-se no país a transferência de embriões (TE), particularmente na raça Nelore que chegou a representar mais de 80% do total de embriões transferidos (Viana, 2008). A possibilidade de gerar um número bem maior de descendentes de um animal de alto valor genético é uma das vantagens que está atraindo cada vez mais os produtores a implantarem a produção *in vitro* de embriões (PIVE) em seu plantel, objetivando, principalmente, o melhoramento genético. Mais além, a junção dessa biotecnologia com o uso de marcadores moleculares do tipo SNP e marcadores bioquímicos como proteínas tem sido a alavanca para o melhoramento animal, favorecendo os criadores na seleção de melhores reprodutores de maneira mais rápida e confiável (Lôbo et al., 2012; Diaz et al., 2011; Pereira, 2000).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A utilização da PIV em bovinos é importante por favorecer os criadores na seleção de animais superiores quanto à sua capacidade de fecundação, reprodução e transmissão de características de interesse à sua progênie. Dentre os critérios de seleção, algumas características reprodutivas são analisadas nos programas de registros de desempenho visando os trabalhos de seleção como: fertilidade, peso adulto, perímetro escrotal e precocidade sexual (Campos et al., 2012; Yokoo et al., 2012; Yanagimachi, 1994).

2.1. Perímetro Escrotal em Touros

A partir da puberdade, as espermatogônias originam espermátócitos e estes se transformam em espermatozoides. No touro, cada ciclo de espermatogênese dura em torno de 45 dias (Hafez and Hafez, 2004). Existem evidências de que a idade à puberdade e a precocidade sexual possam ser indicadas pelo volume testicular. Além disso, esta medida é um dos fatores mais associados ao desempenho reprodutivo. A maneira mais utilizada para refletir o volume dos testículos é o perímetro escrotal, também chamado de circunferência escrotal (Lirón et al., 2012; Siqueira et al., 2012; Lunstra e Cundiff, 2003). A variável é de fácil mensuração, alta confiabilidade e repetibilidade quando tomada por diferentes técnicos (Quirino, 1998).

Tanto na raça Nelore quanto na raça Angus, o perímetro escrotal possui alta correlação com a idade à puberdade (0,50) (Lirón et al., 2012; Siqueira et al., 2012) e com o peso do animal (entre 0,69 e 0,94), uma das principais características de interesse econômico. Tais correlações tornam o PE um objeto de estudo ainda mais interessante (Caetano et al., 2013; Araujo Neto et al, 2011), visto que, em longo prazo, a seleção de touros com maior perímetro escrotal pode levar ao aumento do peso dos animais como um todo (Regatieri et al, 2012).

Adicionalmente, dados da literatura sugerem que o PE pode ser utilizado para selecionar animais mais férteis e com maior potencial reprodutivo (Silva et al., 2011^a; Siqueira et al., 2012), pois está diretamente relacionado à melhor qualidade e características morfológicas do espermatozoide; Além disso, esta característica apresenta correlações genéticas favoráveis com IPP (idade ao primeiro parto; correlação

-0,15) e 3P (PPP = probabilidade de parto precoce; correlação 0,30). A característica IPP refere-se ao potencial do animal para gerar filhas cujo primeiro parto seja mais (ou menos) precoce em relação à média das filhas dos outros animais. 3P expressa a probabilidade de um reprodutor produzir filhas que emprenhem precocemente e venham a parir bezerras vivos até 30 meses de idade (Araujo Neto et al., 2011; Boligon et al., 2007). Por apresentar uma alta herdabilidade, em torno de 0,50 até os 550 dias de idade em animais da raça Nelore, o PE é altamente transmissível à progênie (Noely et al., 2001) podendo ser aumentado por meio de seleção (Araujo Neto et al., 2011).

O valor que um touro agrega no perímetro escrotal de sua progênie pode ser comparado com a média de PE agregado às outras progênies pela DEP PE 365. Esta medida é tomada aos 365 dias de vida dos animais (Euclides Filho K, 1996; www.gen.fmrp.usp.br/gemac/pmgrn/sumario/ano1999/def_dep.html) já que quando se objetiva a redução da idade à puberdade através da seleção para PE, a mensuração deve ser feita antes dos 24 meses de idade por ser esse o período que antecede ou coincide com o início da sua atividade reprodutiva (Bergmann, 1998). Além disso, a seleção de animais para PE aos 12 meses (365 dias) de idade resulta na escolha de animais que apresentam maiores níveis de hormônios gonadotrópicos. É neste momento também que há maiores chances de se identificar animais em início de puberdade e atividade reprodutiva. Aos 18 meses de idade, os animais já estariam em fase pós-púbere. Concomitantemente, selecionar machos para PE aos 365 dias identifica os melhores animais desde a idade jovem, selecionando apenas aqueles superiores que mais irão contribuir para a evolução genética do rebanho (Siqueira et al., 2012; Brito et al., 2004; Lunstra e Cundiff, 2003; Bergmann, 1998).

2.2. Perímetro escrotal e Marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

O avanço no uso de marcadores moleculares do tipo SNP em bovinos tem auxiliado de maneira intensa na seleção de reprodutores. Esse tipo de metodologia de seleção genotípica complementa a seleção fenotípica realizada por DEPs tornando os dados coletados mais precisos, mais rápidos e mais confiáveis (Lobo et al., 2011; Marson et al., 2008).

A presença de SNPs no genoma foi observada primeiramente em 1989 (Orita et al., 1989). Para ser considerado um marcador do tipo SNP, este deve estar

fixado em mais de 1% da população, do contrário são chamados de mutações. Os SNPs são os maiores responsáveis pelas variações genotípicas intra-espécies (90%) podendo contribuir também com as variações fenotípicas, já que podem ocorrer em regiões codificadoras ou com função regulatória (Curtin e Camp, 2011). Porém, na maior parte das vezes ocorrem em espaços intergênicos, sem função determinada (Caetano, 2009).

Os SNPs podem ser denominados como a base molecular de vários tipos de marcadores moleculares que foram desenvolvidos com diferentes metodologias ao longo das últimas três décadas, como RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPDs (*Random Amplification of Polymorphic DNA*), AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), entre outros (Heubl, 2010). A utilização desses marcadores associados a características de produção é altamente aplicável (Santos et al., 2011).

Estudos com bovinos mostram que podem haver milhões de polimorfismos do tipo SNP no genoma de um indivíduo (*Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium*, 2009; Li et al., 2009). No caso da precocidade sexual, genes que possam ter seu SNP relacionado a essa característica podem ser utilizados como marcadores moleculares visando animais que atinjam a puberdade e sejam reprodutores mais cedo, e, portanto, mais favoráveis economicamente. (Marson et al., 2008).

Os genes *B4GALT1* (*Beta 1,4- galactosyltransferase*), *FSHR* (*Follicle stimulating hormone receptor*), *LHR* (*Luteinizing hormone receptor*) e *IGF2* (*insulin-like growth factor 2*) possuem alteração do tipo SNP as quais podem ser relacionadas ao perímetro escrotal e, conseqüentemente aos valores de DEP PE 365, atuando assim como marcadores.

Localizado no cromossomo oito de *Bos taurus*, o gene *B4GALT1* codifica a proteína beta 1,4- galactositransferase, podendo ser um dos responsáveis pelo crescimento escrotal. Este gene é traduzido em uma das 100 enzimas glicotransferases encontradas em mamíferos, a qual participa da biossíntese de carboidratos, que são extremamente importantes na formação do complexo de Golgi, movimento flagelar e plasma seminal. Este gene apresenta uma alteração no nucleotídeo 174, localizado no éxon oito que resulta na substituição do aminoácido arginina (G) por lisina (A) (www.ncbi.nlm.nih.gov).

O gene *B4GALT1* está envolvido em processos como maturação, motilidade espermática e fertilização (Matzuk et al, 2008). Além disso, este gene está relacionado com a ligação do espermatozóide à zona pelúcida, o desenvolvimento de características

sexuais secundárias, o desenvolvimento das células epiteliais, a metabolização da galactose, a reação acrossômica e a regulação celular do movimento flagelar (www.ncbi.nih.gov).

Outros dois genes supostamente envolvidos no perímetro escrotal e maturação sexual são os genes *FSHR* e *LHR* já que ambos controlam a proliferação e diferenciação das células de Sertoli e Leydig desde a fase pós-natal (Nogueira et al., 2006; Otsuka et al., 2001; Evans et al., 1997). O SNP analisado no gene *FSHR* localiza-se no cromossomo 11, éxon 10, onde a troca da base C por G resulta na troca do aminoácido glicina por alanina; enquanto que aquele estudado no gene *LHR* encontra-se no cromossomo 11, éxon 11 e a troca de C por T troca o aminoácido glicina pela valina (Marson et al., 2008).

As gonadotrofinas FSH e LH podem indicar o início da puberdade quando apresentam mudanças nos seus níveis circulantes. Isso porque estão envolvidas indiretamente com o fenômeno da espermatogênese. Por estímulos dos hormônios LH e FSH, as células de Leydig sintetizam a testosterona que atua diretamente na espermatogênese, estimulando-a. Em novilhas *Bos indicus* e *Bos taurus*, durante a maturação sexual, o receptor de gonadotrofina LHR tem sua secreção aumentada nesse período, enquanto a secreção do FSHR permanece inalterada (Robert et al., 2003).

Courot e Ortavant (1981) verificaram que em carneiros a espermatogênese é sensível às variações nos níveis de LH circulante, existindo correlação positiva entre o número, a renovação ou a eficiência da multiplicação das espermatogônias e as concentrações do hormônio no sangue periférico de carneiros adultos. Brito et al (2004) também confirmaram que o padrão de secreção do LH é o principal determinante da idade à puberdade em touros.

Ainda com relação ao crescimento e maturação sexual, o gene *IGF2* influencia importantes características de crescimento em bovinos (Ruvinsky 1999; de Koning et al. 2000). Este gene codifica um potente mitógeno fetal que estimula proliferação celular através de interações com o receptor transmembrana IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) (Chao & D' Amore 2008). Os efeitos mitogênicos que o IGF2 produz são regulados pelo receptor transmembranar IGF2R, o qual sequestra e internaliza o excesso de IGF2. O IGF2 é assim considerado como um importante estimulador do desenvolvimento de mamíferos (Brown et al 2009) podendo ser um dos responsáveis pelo crescimento e formação do perímetro escrotal, refletindo nos valores da DEP PE 365.

Em humanos, o gene *IGF2* está localizado no cromossomo 11 enquanto que nos bovinos, Schmutz e colaboradores (1996) mostraram dados de um mapeamento comparativo de hibridização *in situ* em que o gene *IGF2* está situado na porção distal do cromossomo 29. Esse gene contém dez éxons e o SNP avaliado encontra-se no éxon seis onde a substituição de T por C modifica o aminoácido ácido glutâmico pela prolina (Silva et al., 2011b; Flisikowski et al., 2005). Como já foi dito, estudos demonstraram associações do gene com fenótipo de crescimento, desenvolvimento e tamanho dos animais, podendo fazer do SNP localizado no *IGF2* um marcador molecular bastante interessante (Foulstone et al., 2005).

2.3. Perímetro escrotal e Proteômica

Uma das maneiras de se entender as funções moleculares relacionadas ao perímetro escrotal e à produção *in vitro* de embriões é o estudo das proteínas (proteoma) (Pixton et al., 2004) que fazem parte da formação do espermatozoide, capacitação, reação acrossômica e fertilização (Leahy e de Graaf, 2012; Braundmeier et al., 2001).

Estudos demonstraram que muitas proteínas estão relacionadas à fertilidade em touros, dentre elas, as proteínas das glândulas acessórias, o antígeno associado à fertilidade (FAA), a prostaglandina-D-sintetase e a osteoponina que estão presentes em maior quantidade em touros de alta fertilidade quando comparados àqueles de baixa fertilidade (Moura et al., 2011; Peddinti et al., 2008). Além destas, foi visto o envolvimento da proteína actina no movimento flagelar do espermatozoide e na reação acrossômica (Howe et al., 2001).

Ao longo das duas últimas décadas, os avanços na genômica melhoraram muito o conhecimento acerca da espermatogênese por meio da identificação de numerosos genes essenciais para o desenvolvimento do gameta masculino. Os progressos na tecnologia de sequenciamento do genoma e de microarranjo têm levado à identificação de centenas de genes expressos diferencialmente que são utilizados como marcadores de diversas características. No entanto, a proteômica também merece destaque já que identifica genes já traduzidos em proteínas e, portanto, com função importante (Chocu et al., 2012).

Desta forma, descrever e descobrir novas proteínas que possam ser relacionadas com características de interesse (como o PE) nos rebanhos é uma das maneiras de auxiliar na seleção de melhores animais. Mais do que isso, a possibilidade

de se fazer um estudo global que verifique todo o perfil proteico de um animal pode elucidar quais fatores (proteínas) são responsáveis por determinada característica de interesse ou, até mesmo, quais proteínas são indicadoras da inferioridade de determinado reprodutor (Feugang et al., 2010). Nesse sentido, a comparação de perfis proteicos entre reprodutores com melhores dados de DEP PE 365 e que produzam mais embriões *in vitro* com reprodutores que sejam inferiores para essas medidas pode trazer proteínas que atuem como marcadores bioquímicos.

2.4. Perímetro escrotal na produção *in vitro* de embriões

A PIVE teve sua expansão nas diferentes espécies pouco tempo após o nascimento do primeiro “bebê de proveta” Louise Brown em 1978, na Inglaterra (Steptoe e Edwards, 1978). Esta biotecnologia tem despontado no cenário mundial como ferramenta para o desenvolvimento da pecuária, podendo servir como instrumento para o melhor aproveitamento do potencial genético e reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal (Badr et al., 2007).

Em 1982, ocorreu o primeiro relato de bovino nascido após FIV. Na ocasião, Brackett e colaboradores publicaram o nascimento de um bezerro sadio, ocorrido no dia 9 de junho de 1981. Ele nasceu pesando 45kg e após alguns meses de observações não foram visualizadas alterações no desenvolvimento e no comportamento do animal (Brackett et al. 1982).

Por ser uma técnica que pode ser integralmente viabilizada sob condições artificiais, a PIV de embriões bovinos é bastante difundida e utilizada em diversos países (Gonçalves et al. 2008). No Brasil, a PIV passou a se expandir de maneira mais expressiva a partir da década de 90, resultando no destaque do país em relação aos totais mundiais (Stroud, 2011).

Para execução da PIV em ambiente laboratorial, oócitos passam por um processo de maturação *in vitro* (MIV). Posteriormente, os espermatozóides sofrem capacitação *in vitro* antes da fecundação e em seguida ocorre a fertilização *in vitro* (FIV). A próxima etapa consiste no cultivo *in vitro* (CIV) cujo ambiente (temperatura, umidade e quantidade de CO₂) deve ser extremamente controlado. O resultado final é a produção de embriões que posteriormente poderão ser selecionados e transferidos do

ambiente laboratorial para o ambiente uterino de uma receptora previamente sincronizada (Varago et al., 2008).

Embora as biotecnologias de PIV (MIV, FIV e CIV) já estejam bastante padronizadas e avançadas, a taxa de blastocistos obtidos por PIV em bovinos varia entre 30 a 40 %. Dentre as razões para esta variação inclui-se a heterogeneidade dos oócitos utilizados (Hyttel et al. 1997) que podem apresentar uma maturação citoplasmática incompleta refletindo na capacidade do desenvolvimento embrionário (Gonçalves et al., 2008) e as condições existentes em laboratório, que apesar de procurarem simular as condições *in vivo*, não o fazem em totalidade (Gonçalves et al., 2008). Além destes motivos, estudos demonstraram o efeito do touro na cinética e taxa de desenvolvimento de blastocistos (Sudano et al., 2011). Esse dado é importante já que embriões de clivagem rápida tendem a ser machos e aqueles de clivagem lenta tendem a ser fêmeas (Kochhar et al., 2003). Adicionalmente, a transferência de B1 (blastocisto) e Bx (blastocisto expandido) para vacas receptoras resulta em maiores taxas de prenhez, comparativamente à transferência dos blastocistos inicial (Bi) e eclodido (Be) (Lamb, 2005; Lopes et al., 2001). Entende-se por Bi, o blastocisto em que se está iniciando a formação da blastocele, sendo que esta ocupa menos da metade do volume total do embrião; B1 é o blastocisto cuja cavidade ocupa metade ou mais do volume total do embrião e com formação do botão embrionário; Bx são aqueles com zona pelúcida delgada, cavidade bastante desenvolvida e botão embrionário reduzido; e Be apresenta ruptura da zona pelúcida e processo de eclosão embrionária (Rheingantz et al., 2006).

A PIV apresenta inúmeras vantagens e aplicações como: determinação e controle do sexo dos produtos; aumento da eficiência dos programas de produção; rápida multiplicação de raças; facilidade de importação e exportação de material genético; formação de bancos de gametas congelados; aumento da eficiência do sêmen congelado de alto valor genético e estudo e desenvolvimento de outras biotecnologias reprodutivas, a partir da micromanipulação de embriões (Elias, 2007).

Por outro lado, o que se questiona é se as vantagens geradas pela técnica suplantam os problemas encontrados nos embriões gerados *in vitro*. Mais além, sabe-se que vários fatores podem interferir no desenvolvimento embrionário no período de pré-implantação, desde fatores intrínsecos aos gametas (qualidade da amostra) até fatores externos, como sistemas de cultivo, co-cultivo e fatores técnicos (Elias, 2007). Nesse sentido, sabendo-se do efeito que o touro pode ter no desenvolvimento embrionário e que a produção de B1 e Bx é mais desejável do que de Bi e Be, o que se questiona é se

maiores DEPs PE 365, medida utilizada para selecionar os reprodutores, interfere no tipo e na quantidade de blastocistos produzidos *in vitro*.

2.4.1. Formação dos gametas utilizados na produção *in vitro* de embriões

Oogênese

Em bovinos, cada oogônia inicia a meiose em torno de 80 dias de gestação, passando a ser chamada de oócito (Leal e Adona 2006). O ciclo celular, no entanto, é bloqueado no diplóteno da prófase da meiose I (PI), estadio chamado de vesícula germinativa (VG). Quando a puberdade é atingida, em torno de 12 meses em bovinos, grupos de oócitos, periodicamente, reiniciam a meiose, progredindo pelos estádios de metáfase I (MI), anáfase I (AI), telófase I (TI), prófase II (PII), estagnando novamente em metáfase II (MII). Ao fim da TI, ocorre a extrusão do primeiro corpúsculo polar, que contém pouca quantidade de citoplasma, enquanto o oócito secundário recebe quase a totalidade dos constituintes citoplasmáticos (Gilbert, 2003).

A segunda meiose só é concretizada se o oócito secundário for fertilizado. Com a penetração do espermatozoide, o gameta feminino avança pelas fases de anáfase II (AII) e telófase II (TII), expulsando o segundo corpúsculo polar, que igualmente ao primeiro, possui uma pequena quantidade de citoplasma. Dessa forma, a meiose oogênica conserva o volume citoplasmático em uma única célula (Gilbert, 2003).

Durante todo o desenvolvimento oogênico, várias células entram em atresia, independentemente do estadio em que se encontram. Uma fêmea que possui 2.700.000 oócitos no dia 110 de gestação apresenta apenas 70.000 ao nascimento (Hafez and Hafez, 2004).

Cada oócito é circundado por células somáticas, compondo o folículo ovariano. Entre elas, as células do *cumulus oophorus* através das junções *gap*, transferem elementos para o oócito e vice-versa, existindo, portanto, uma comunicação bidirecional entre as células do cumulus e o oócito (Dode, 2006). Os COC's (complexos cumulus-oócito) podem ser classificados em quatro categorias, de acordo com sua morfologia (Viana et al., 2004; Leibfried e First, 1979). O COC de qualidade morfológica grau I (GI) apresenta células do cumulus compactas presentes, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo. Grau II (GII) apresenta de duas a três camadas de células do cumulus compactas e ooplasma homogêneo. Grau III

(GIII) possui menos de duas camadas de cumulus, com parte da zona pelúcida exposta e ooplasma heterogêneo, contendo ou não, granulações. O grau IV (GIV) possui poucas células ou nenhuma célula do cumulus ao redor da zona pelúcida, citoplasma com muitas granulações, ou ainda, com células do cumulus em estado apoptótico sendo, portanto, inviável de se desenvolver. Estudos demonstraram que os COC's de grau I resultam em maiores taxas de fertilização (Tanghe et al., 2003).

Espematogênese

Diferentemente das oogônias, as espermatogônias originam espermatozoides durante toda a idade reprodutiva do animal, a partir da puberdade. As células da linhagem germinativa se diferenciam em espermatogônias que continuam a se proliferar por mitoses, formando as espermatogônias intermediárias. Em seguida, por mitose, as espermatogônias originam em espermátócitos (Hafez and Hafez, 2004; Gilbert, 2003). Estes por sua vez sofrem a primeira divisão meiótica, dando origem aos espermátócitos secundários, os quais sofrem a segunda divisão meiótica, dando origem às espermátides. As espermátides, após uma série de mudanças estruturais e de desenvolvimento, resultam no espermatozoide. Esse processo é denominado espermiogênese (Hafez and Hafez, 2004; Gilbert, 2003).

Para que o espermatozoide possa então se locomover, formam-se grânulos proacrossomáticos dentro do aparelho de Golgi, os quais se aderem ao envelope nuclear. A cauda começa a se desenvolver no pólo oposto àquele de aderência dos grânulos acrossomáticos. Em seguida, os grânulos se distribuem sobre a superfície do núcleo, e os componentes da cauda axonema se alongam para além da periferia do citoplasma celular. As espermátides são então rotacionadas, posicionando a região do núcleo próxima à parede do túbulo seminífero, e a cauda em direção ao lúmen. O núcleo deixa de ser esférico e se torna alongado e achatado e o citoplasma se desloca no sentido caudal (Hafez and Hafez, 2004). Ocorre também a substituição das proteínas espermáticas por protaminas formando um material fino e homogêneo que preenche todo o núcleo. Ao redor do axonema, na cauda, uma bainha fibrosa e novas fibras grossas subjacentes são formadas. Por fim, ocorre a formação do corpo residual (Hafez and Hafez, 2004). Após a espermição, que consiste na liberação das espermátides para dentro do lúmen dos túbulos seminíferos, ocorre a fagocitose dos corpos residuais pelas células de Sertoli, reciclando os componentes citoplasmáticos (Hafez and Hafez, 2004).

A habilidade inicial dos espermatozóides fertilizarem os oócitos acontece durante seu transporte ao longo do epidídimo. Durante esse trajeto, ocorre também uma compactação adicional da cromatina do núcleo espermático (Hafez and Hafez. 2004).

Fecundação

Para fertilizar o oócito, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, o espermatozoide precisa migrar entre as células do cumulus para atingir a zona pelúcida, na qual a ligação é mediada por receptores específicos. Ao entrar em contato com a zona pelúcida, o espermatozoide se liga ao receptor ZP3 (*Zona pellucida glycoprotein*), dando início à reação acrossômica, que libera enzimas que digerem a zona pelúcida. Em seguida, o espermatozoide se liga ao receptor ZP2, e juntamente com sua própria motilidade, consegue transpor a zona pelúcida, fundindo sua membrana plasmática com a do oócito (Gartner et al., 2007). Com isso, o material genético paterno é incorporado ao gameta feminino e mudanças no ooplasma levam ao bloqueio à polispermia, ou seja, evita que mais de um espermatozoide consiga entrar no oócito (Gonçalves et al. 2008, Hafez and Hafez 2004).

Após a fecundação, enquanto os pronúcleos se formam, eles se deslocam para a região central do ooplasma. Quando estes estão em íntima proximidade, os envelopes nucleares se desfazem e os cromossomos paternos e maternos se unem em um processo denominado singamia. A partir de então, com um genoma estabelecido, inicia-se o desenvolvimento embrionário do zigoto (Gonçalves et al. 2008, Hafez and Hafez 2004). O zigoto sofre inúmeras divisões mitóticas, sem que ocorra aumento da quantidade de citoplasma antes da divisão. Esse processo é denominado clivagem, e é ele o responsável por restabelecer a proporção citoplasmática-nuclear das células somáticas (Gonçalves et al. 2008, Hafez and Hafez 2004).

Após sucessivas clivagens, o embrião atinge o estágio de nove a 16 células e passa a ser chamado de mórula, podendo ser transferido, criopreservado ou cultivado até o estágio de blastocisto. Na mórula, começam a ser formadas ligações firmes e ligações do tipo gap entre as células, em um processo denominado compactação. Por meio deste processo, as células embrionárias se diferenciam em trofoblasto e embrioblasto. As células localizadas externamente formam o trofoblasto, trofotoderma ou massa celular externa, que irá formar os anexos embrionários. As células localizadas internamente formam o embrioblasto ou massa celular interna, que dará origem ao embrião

propriamente dito e aos seus anexos, o saco vitelínico e o âmnio (Gonçalves et al., 2008; Gilbert 2003).

Em bovinos, a blastocle começa a se formar quando o embrião apresenta por volta de 64 células. O fluido vindo do ambiente uterino ao redor do embrião passa por entre as células do trofoblasto e se acumula no interior da mórula compactada, dando origem ao blastocisto. Este continua se expandindo tanto pela aquisição de fluido, quanto pela contínua proliferação de células (Gonçalves et al., 2008). A expansão e contração do blastocisto causam a eclosão deste da zona pelúcida por volta do oitavo dia após a fertilização (Hafez and Hafez 2004).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Realizar um estudo acerca da relação entre DEP PE 365, PIVE e marcadores moleculares e bioquímicos em touros da raça Nelore.

3.2. Objetivos Específicos

- Verificar se há influência dos polimorfismos do tipo SNPs dos genes *B4GALT1*, *FSHR*, *LHR* e *IGF2* na DEP PE 365 de touros jovens da raça Nelore;
- Investigar a relação de touros com DEP PE 365 positiva e touros com DEP PE 365 negativa com a taxa e cinética de embriões produzidos pela técnica de fertilização *in vitro*;
- Comparar o perfil protéico entre touros com DEP PE 365 positiva e maior produção de embriões e touros com DEP PE 365 negativa e baixa produção de embriões, buscando-se marcadores bioquímicos para essas características.

MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Perímetro escrotal e marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

Foram utilizadas amostras de sangue periférico de 178 touros pertencentes ao Programa Nelore Brasil, os quais foram divididos em dois grupos de acordo com sua DEP PE 365 (www.ancp.org.br), obtendo-se um grupo com 104 animais de DEP positiva (DEP PE 365 +) variando de 0.04 a 1.28 e outro com 74 animais de DEP negativa (DEP PE 365 -) entre -0.72 a -0.06. A extração de DNA do sangue dos animais foi realizada de acordo com método de precipitação salina conforme descrito por Olerup e Zetterquist (1992) com algumas modificações.

As reações de amplificação foram conduzidas em um volume final de 25µl e consistiram de 100ng de DNA genômico, 50 mM de MgCl₂, tampão 1X (200mM Tris pH 8.4, 500mM KCl), 5 pmol de *primer*, 0.25mM dNTPs e 0.2U de enzima Taq DNA polimerase (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK).

Os *primers* utilizados para a obtenção dos fragmentos de interesse do gene *B4GALT1* foram desenhados utilizando-se os programas *Oligonucleotide Properties Calculator* e *CAP3*, além do software *gene runner* (versão 3.01; *Hastings Software Inc.*) e a base de dados NCBI. Esses programas ajudam na escolha do melhor par de *primers*, objetivando que a sequência *forward* e a *reverse* tenham temperatura de *melting* aproximada e não muito baixa para que se evite o anelamento inespecífico, já que *primers* podem anelar em alvos similares e amplificar produtos não específicos. Por outro lado, se esta for alta demais, a probabilidade do anelamento diminui e a quantidade de produto também. Além disso, a sequência deve ter no mínimo 17pb, para conferir especificidade do anelamento do *primer* e os *primers* com complementaridade de bases devem ser evitados para que não sejam formados dímeros. Para as análises referentes ao SNP do gene *FSHR*, após o insucesso do uso de dois jogos de *primers* desenhados, foram utilizados *primers* já descritos na literatura (Marson et al., 2008) os quais foram primeiramente analisados pelo programa *BLAST* (*Basic Local Alignment Search Tool*). O BLAST encontra regiões de similaridade entre sequências e identifica sequências de nucleotídeos ou proteínas a partir de sequências de um banco de dados. Os *primers* utilizados para amplificação da região de interesse dos genes *LHR* (Marson

et al., 2008) e *IGF2* (Silva et al., 2011b) também foram obtidos da literatura. Todos os *primers* utilizados estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. *Primers* utilizados para amplificação dos fragmentos de interesse de cada gene, bem como seu sítio de restrição, localização, referência e tamanho do amplicom obtido.

Gene/ Sítio de restrição	Cromossomo	<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Referência	Ampli- com (pb)
<i>B4Galt1</i> RFLP/ <i>NcoI</i>	8	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	TCCTTCACCCCTCATCACTC AAACCCAGACAGCTGGTCAC		524
<i>FSHR</i> RFLP/ <i>AluI</i>	11	<i>Foward</i> <i>Reverse</i>	CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCCTC CCCCCTAAGACATTTAGCCAAGAACT	Marson et al, 2008	306
<i>LHR</i> RFLP/ <i>HhaI</i>	11	<i>Forward</i> <i>Reverse</i>	CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC GCCATTCCAGTCATGCTCGGAGG	Marson et al, 2008	303
<i>IGF2</i> RFLP/ <i>MboII</i>	29	<i>Foward</i> <i>Reverse</i>	GCCTCTCGCTGTCCTCTC GAGGGGGCAGTTGAAGGAC	Silva et al., 2011	193

As ciclagens de temperatura consistiram em um aquecimento inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 30 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 58° C (*B4Galt1*), 68°C (*FSHR* e *LHR*) e 60° C (*IGF2*) por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Após 30 ciclos, foi adicionado um passo de extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 2% (Seaken, FMC Inc.) e corados com brometo de etídeo (0.5mg/ml).

Restriction Fragment Length Polymorphism - RFLP

Após a amplificação, os produtos de PCR foram submetidos à digestão enzimática contendo aproximadamente 100ng do produto amplificado e 0.4U da endonuclease de restrição correspondente, seguindo recomendações do fabricante. Após a digestão completa dos amplicons, os fragmentos foram visualizados em gel de poliacrilamida 10% corado com nitrato de prata 0.2% (anexo I).

As frequências alélicas e genotípicas para os dois grupos de animais (DEP PE 365 negativa e DEP PE positiva) foram determinadas de acordo com Weir (1996) e os resultados encontrados foram avaliados pelo teste ANOVA, considerando $p \leq 0.05$ significativo.

4.2. Perímetro escrotal e proteômica

A metodologia de escolha para fazer o estudo global do perfil protéico no sêmen dos touros foi a LCMS (*Liquid chromatography–mass spectrometry*) que consiste na elucidação de proteínas por meio de sequenciamento.

A preparação das amostras de sêmen foi feita no laboratório de micromanipulação de embriões do Departamento de Genética da FMRP-USP, enquanto que a extração de proteínas e as demais etapas da metodologia foram realizadas de modo terceirizado pela empresa Veritas Life Sciences.

Escolha e preparação das amostras

Os dados referentes à quantidade de embriões produzidos pelos touros utilizados no estudo foram coletados nas bases de nosso laboratório. As DEPs PE 365 foram adquiridas junto à Associação Nacional de Criadores e Pesquisadores (ANCP). Seis touros foram escolhidos de acordo com esses quesitos: três touros que produzem em média 17.6% de embriões/oócito *in vitro* e DEP PE 365 média de -0.3 (classificados como inferiores; grupo A); e três touros que produzem em média 34.25% de embriões/oócito, com DEP PE 365 média de 1.07 (classificados como melhores; grupo B). Esses grupos foram então comparados entre si, quanto aos seus perfis proteicos.

A tabela 2 apresenta os animais escolhidos e suas características.

Tabela 2. Representação das características dos touros utilizados nos estudos de proteômica.

Grupo A			Grupo B		
Touro	DEP PE 365	embriões %	Touro	DEP PE 365	embriões %
1	- 0.09	18.01	4	1.63	23.46
2	- 0.12	21.38	5	1.23	35.85
3	- 0.32	13.46	6	0.35	43.45
Média	-0.177	17.616	Média	1.07	34.253

DEP PE 365 = Diferença esperada na progênie para Perímetro Escrotal aos 365 dias; embriões % = porcentagem de embriões produzidos *in vitro*/ número de oócitos utilizados.

Para a metodologia LCMS eram necessárias 30µg de proteínas para cada ensaio. Após vários testes para verificar o rendimento proteico de cada palheta de sêmen congelado, concluiu-se que seriam necessárias quatro palhetas de 500µl de sêmen de

cada touro, totalizando 12 palhetas por *pool* (grupo A ou grupo B). Estas palhetas foram então descongeladas a 36° C por um minuto e lavadas em gradiente de percoll 45 e 90% diluído em meio TALP-Sêmen (NaCl 0.001 g/l, KCl 3.1×10^{-4} g/l, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 7.1×10^{-5} g/l, NaH_2PO_4 2.9×10^{-5} g/l, NaHCO_3 2.5×10^{-3} g/l, lactato de sódio 0.17%, Hepes 0.238 g/l, vermelho de fenol 0.0010 g/l) por 30 minutos a 800RPM (Feugang et al., 2010). Esse processo objetiva retirar o crioprotetor da amostra, bem como espermatozoides ruins, células somáticas e *debris*.

No pellet resultante foi feita a contagem de espermatozoides em câmara de Neubauer, para que os *pools* tivessem a mesma quantidade de espermatozoides de cada touro. As etapas subsequentes desde extração de proteínas até análise por espectrometria de massas avançada foram realizadas pela empresa Veritas Sciences.

Extração de proteínas

Os dois *pools* de amostras foram ressuspensos em 100µl de solução 0.1% SDS, 0.1% NP-40, 65 mM Tris pH 6.8, 2mM DTT (ditiotretol) e 1.25 µL do coquetel de inibidores de proteases (Sigma, cod. P2714-1BTL, Lote 118K4126). A lise das células para a extração das proteínas foi realizada em três ciclos de congelamento em nitrogênio líquido/descongelamento em gelo, seguido de ruptura com pistilos descartáveis (Sigma, cod. Z359947). Após centrifugação à 12.000G por 15 minutos à 4° C obteve-se o extrato proteico no sobrenadante.

Quantificação de Proteínas pelo Método de Bradford

A quantificação da massa de proteínas contidas em cada um dos *pools* foi realizada pelo método de *Bradford*, com o reagente Protein Assay Dye Reagent Concentrate (Bio-Rad. Cat. N° 500-0006 Lote: L9700067), conforme recomendações do fabricante. A curva padrão foi realizada com diferentes diluições de BSA (*bovine serum albumine*), preparada a partir de estoque adquirido comercialmente (Protein Standard 200mg/mL, Sigma, Cód. # P5369-10 mL Lote 110M6005). As amostras foram distribuídas em triplicata em placas de 96 poços. A absorbância em 595nm foi lida em espectrofotômetro (Molecular Devices, SpectraMax Plus 384). Através dos dados obtidos na quantificação, foi estimada a massa total de proteínas presentes em cada uma das amostras recebidas.

Redução e Marcação Isotópica das Proteínas

Cerca de 60µg (seriam necessárias 30µg) de cada uma das amostras foi alíquotada e utilizada para a análise proteômica deste estudo. Inicialmente, foi realizada a redução das pontes de dissulfeto das proteínas com 60µg de ditioneitol (DTT, GE, cód. 17-1318-02, Lote K42179653 133) e incubação a 100⁰C por 10 min. Em seguida, a marcação isotópica nas proteínas foi realizada nos resíduos de cisteínas através da alquilação com acrilamida, seguindo protocolo desenvolvido por Faça et al., 2006. O *pool* A foi marcado com 426 µg de acrilamida leve (*PlosOne Acrilamye PAGE*, Amersham Biosciences, cód.#17-1302-01, Lote K38302703 828) e o *pool* B foi marcado com 444 µg de acrilamida pesada (Isótopo pesado deuterado, 2,3,3'D3-Acrilamida-98% pureza, Cambrige Isotope Laboratories, Lote PR-14573, Andover, MA-USA). Os *pools* identificados como amostra A_light e amostra B_heavy foram incubadas por uma hora à temperatura ambiente.

Separação das Proteínas por Eletroforese em SDS-PAGE.

A eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizada como principal ferramenta analítica para a separação e caracterização das proteínas presentes nas amostras. Foram aplicados 20 µg de cada uma das seguintes amostras: amostra A_light, amostra B_heavy e amostra A_light + amostra B_heavy, em géis de poliacrilamida Precise Protein Gels 8-16 % (Thermo Scientific, Prod # 25203, Lote LJ2801518).

A eletroforese foi realizada com 80 V/gel por 2 horas em sistema Mini-PROTEAN II Electrophoresis System (Bio-Rad, EUA).

Foram utilizado 10µL de um padrão de peso molecular pré-corado (Bio-Rad, cód.161-0374, Lote L1610374). Para visualização das proteínas, os géis foram corados com *Coomassie Gel Code Blue Stain Reagent* (Thermo, cód. 24590) conforme recomendações do fabricante (Figura 1).

Figura 1. Separação das proteínas por eletroforese SDS-PAGE em gel de poliacrilamida contendo os fragmentos obtidos do primeiro *pool* marcado com isotópico leve (A) e do segundo *pool* marcado com isotópico pesado (B) e a junção das duas amostras marcadas (A+B). Cinco faixas do gel da corrida de cada amostra em KDa (10 a 20; 20 a 37; 37 a 75; 75 a 150 e 150 a 250) foram recortadas para digestão trípica conforme ilustrado na figura. No poço um foi aplicado o marcador de peso molecular, no poço dois a amostra A, no poço três a amostra B e no poço quatro as amostras A e B.

Lavagens das bandas no gel

As 15 faixas do gel foram recortadas para digestão trípica e lavadas quatro vezes em solução de bicarbonato de amônio 50 mM e acetonitrila 50%, sendo três lavagens por 15 minutos e uma lavagem *overnight*. Em seguida, foi realizada uma lavagem com acetonitrila 100% por cinco minutos e secagem das amostras por uma hora.

Digestão com Tripsina

A digestão das faixas recortadas do gel foi realizada com 0.5µg de tripsina (Promega,V511A, Lote 0000002472) num volume final de 20µL em bicarbonato de amônio 50mM. Após a rehidratação com tripsina, foram adicionados 200µL de bicarbonato de amônio 50mM. A digestão foi realizada a 37°C *overnight*.

Extração de Peptídeos do gel

Após a digestão, a solução de peptídeos foi coletada e seca em *speed vac*. Adicionalmente, foram realizadas duas extrações de peptídeos do gel com solução acetonitrila 50%/ ácido fórmico 2% (150 µL/ tubo) e uma última extração foi feita com a solução acetonitrila 100%/ ácido fórmico 2% (150 µL/ tubo) por uma hora à temperatura ambiente, sob agitação no vortex a cada 15 minutos. Os volumes coletados de todas as extrações foram secos em *speed vac*.

Análise por espectrometria de massas avançada

As amostras digeridas foram analisadas em espectrômetro de massas do tipo LTQ-ORBITRAP (Thermo-Finnigan) acoplado a um sistema de cromatografia de nanoflow (LC-MS/MS), disponível em parceiro da Veritas Sciences no exterior. Os dados adquiridos foram automaticamente processados pelo *Computational Proteomics Analysis System* – CPAS. Os peptídeos identificados que atingiram o critério mínimo de qualidade (peptideprophet score <0.7) foram considerados como de alta confiabilidade. Para as buscas, foi utilizado o banco de dados de sequência de proteínas bovinas *Ibovine* 3.75.

Escolha das proteínas a serem analisadas

A partir das proteínas encontradas exclusivamente nos grupos A e B e daquelas encontradas em ambos os grupos, foram selecionadas aquelas com maior valor de *Spectral Counts*, totalizando 86 para o grupo A e 86 para o grupo B. Para o grupo que continha as proteínas de A e B foram selecionadas 86 proteínas mais conhecidas. Para todas as proteínas selecionadas verificou-se se já existiam estudos prévios relacionando-as com fertilidade e/ou maturação sexual e/ou aspectos reprodutivos.

Análise *in silico*

As funções das proteínas escolhidas foram determinadas por análise funcional *in silico* com a ferramenta IPA (*Ingenuity Pathway Analysis* – (www.ingenuity.com)). Para isso, utilizou-se os parâmetros "*Molecules per Network=35, Networks per Analysis=25*" e somente consideradas as ligações diretas entre os genes nas redes hipotéticas. Foram utilizados todos os bancos de dados disponíveis para a busca de interações entre os genes, objetivando encontrar as funções e cascatas para cada grupo.

4.3. Perímetro escrotal na Produção *in vitro* de embriões

Os 48 touros da raça Nelore foram divididos em três grupos de acordo com a média da amplitude total de suas DEPs PE 365 (www.ancp.org.br), a qual gerou intervalo de 0.65 de DEP PE 365 para cada grupo (total = -0.74 a + 1.21). Sendo assim, os animais foram classificados em grupo superior (DEP PE 365 de 1.21 a 0.56); grupo intermediário (DEP PE 365 de 0.55 a -0.09) e grupo inferior (DEP PE 365 de -0.10 a -0.74). A partir desta divisão, os resultados para embriões totais produzidos e tipos de blastocistos gerados para cada grupo foram comparados entre os grupos.

Para a fertilização, cerca de 60 COCs por touro, por repetição, medindo aproximadamente 100 a 120 μ m de diâmetro foram aspirados de folículos ovarianos medindo de 3-8 mm utilizando-se seringa descartável de 10ml acoplada a uma agulha de 18G a partir de ovários de animais adultos. As vacas foram abatidas em matadouro, tendo seus ovários transportados para o laboratório em solução salina 0.9% estéril contendo antibióticos (penicilina, estreptomicina e neomicina) em recipiente térmico a 35°C, lavados em solução salina e acondicionados em banho a 35°C. O líquido folicular aspirado foi colocado em placas de Petri, dispostas sobre uma placa aquecedora (35°C).

Posteriormente, os COCs de qualidade morfológica grau I (GI), com células do cumulus compactas presentes, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo (figura 2) (Santos et al., 2008; Viana et al., 2004; Leibfried e First, 1979) foram selecionados em estereomicroscópio no aumento de 40 vezes.

Figura 2. *Pool* de oócitos grau I apresentando células do cumulus compactas, contendo mais de três camadas de células e ooplasma homogêneo (aumento de 40x).

Os COCs foram então lavados em meio tamponado H199 (TCM199 com sais de Earles, glutamina, NaHCO_3 e Hepes, sulfato de amicacina 83 μ g/ml, suplementado com piruvato 22 μ g/ml e 10% de Soro Fetal Bovino) e em meio de

maturação B199 (TCM199 com sais Earles, glutamina, NaHCO_3 , sulfato de amicacina $83\mu\text{g/ml}$, suplementado com piruvato $22\mu\text{g/ml}$, 10% de Soro Fetal Bovino, FSH $0.5\mu\text{g/ml}$, LH $50\mu\text{g/ml}$ e estradiol $1,0\mu\text{g/ml}$).

Após a lavagem, foram transferidos para microgotas de $100\mu\text{l}$ de meio B199, cobertas com óleo mineral, em placas descartáveis de 35mm de diâmetro. Foram colocados no máximo 20 COCs em cada microgota, sendo incubados a $38,8^\circ\text{C}$, com 5% de CO_2 e máxima umidade durante 22 a 24 horas, para a maturação oocitária. Após a maturação, as palhetas de sêmen foram descongeladas em banho a 36°C durante 60 segundos. Descongelado, o conteúdo dessas palhetas foi depositado sobre um gradiente descontínuo de Percoll 45 e 90% diluído em meio TALP-Sêmen e todo o conteúdo foi centrifugado por 30 minutos a 800RPM (Feugang et al., 2008). O *pellet* de espermatozoides foi então analisado quanto ao volume, concentração espermática e motilidade.

Foram adicionados cerca de dois milhões de espermatozoides por mililitro às microgotas de meio FIV (10ml de estoque FIV NaCl 0.011g/l , KCl $3.2 \times 10^{-4} \text{ g/l}$, $\text{MgCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ $8.8 \times 10^{-5} \text{ g/l}$, 0.034 g/l , 0.025 g/l , lactato de sódio 0.03 g/l , sulfato de amicacina $83\mu\text{g/ml}$, suplementado com heparina $10\mu\text{l/ml}$, piruvato $22\mu\text{l/ml}$, BSA sem ácidos graxos $6\mu\text{g/ml}$ e solução PHE $2\mu\text{M}$ de penicilamina, $1\mu\text{M}$ de hipotaurina e $0,25\mu\text{M}$ de epinefrina), cobertas com óleo mineral. Em seguida, os COCs foram lavados duas vezes em meio FIV e transferidos para as microgotas que continham os espermatozoides. As placas foram incubadas a $38,8^\circ\text{C}$, 5% de CO_2 em ar e máxima umidade por 12 horas para permitir a fertilização.

Após a fertilização, o excesso de células do cumulus e de espermatozoides foram retirados, e os prováveis zigotos foram transferidos para placas contendo microgotas de $50\mu\text{l}$ de meio de cultivo CR2 (NaCl 108mM , KCl 3mM , NaHCO_3 25mM , Hemicálcio lactato 0.5mM , piruvato 0.4mM , beta-mercaptoetanol 2%, l-glutamina 1mM , penicilina 100UI/ml , estreptomicina 100ug/ml , vermelho fenol $5,6 \times 10^{-4}\text{mM}$, 10% Soro Fetal Bovino e sulfato de amincacina $83\mu\text{l/ml}$) com no máximo 10 zigotos por microgota, cobertas com óleo mineral, e co-cultivados com monocamadas de células do cumulus aderidos.

Após 96h da fertilização (no dia quatro – D4) foi feita refrescagem do meio, sendo retirados os excessos de células do cumulus, os embriões inviáveis ou em estágios atrasados, permanecendo apenas os embriões que possuíam de 16 a 32 células,

os quais foram contabilizados, gerando uma porcentagem de embriões totais produzidos em função do número de COC's utilizados, independente de sua classificação.

168 horas após a FIV (no dia sete – D7) foi feita uma contagem do número de embriões viáveis, e estes foram classificados quanto ao estágio de desenvolvimento em Bi, Bl, Bx ou Be (Figura 3).

Figura 3. Classificação dos embriões 168 horas após a fertilização (aumento de 100X). Blastocisto inicial (Bi) iniciando a formação da blastocele, sendo que esta ocupa menos da metade do volume total do embrião; Blastocisto (Bl) com a cavidade expandindo e ocupando metade ou mais do volume total do embrião e com formação do botão embrionário; Blastocisto expandido (Bx) com zona pelúcida delgada, cavidade bastante desenvolvida e botão embrionário reduzido; Blastocisto eclodido (Be) com ruptura da zona pelúcida, em processo de eclosão embrionária ou eclodidos.

A partir da contagem total e classificação dos embriões, estes foram relacionados à DEP PE365 do touro proveniente, objetivando-se elucidar qual dos três grupos gera qual tipo de blastocisto e em qual quantidade.

Os resultados foram analisados estatisticamente pela correlação de *Kruskal-Wallis*, considerando $p \leq 0.05$. Todos os ensaios de produção *in vitro* foram realizados em triplicata.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Perímetro escrotal e marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*)

A figura 4 apresenta os genes *B4GALT1*, *FSHR*, *LHR* e *IGF2*, evidenciando os segmentos analisados, os *primers* utilizados e seus respectivos SNPs.

Figura 4. Representação esquemática dos SNPs e dos amplicons estudados para os genes *B4GALT1* (4a), *FSHR* (4b), *LHR* (4c) e *IGF2* (4d), bem como seu número de acesso ao *genebank*. As caixas pretas representam os éxons ao longo do gene. Os primers utilizados e os SNPs estão destacados em negrito.

Os genótipos encontrados para cada SNP estudado nos genes *B4GALT1*, *FSHR*, *LHR* e *IGF2* estão apresentados na figura 5 onde pode ser observado que após a digestão enzimática, o SNP avaliado no gene *B4GALT1* (Figura 5.a) não demonstrou variação genotípica entre os grupos estudados. Já para o SNP estudado no gene *FSHR* estão presentes os genótipos CG e GG (Figura 5.b). Para os SNPs pesquisados nos genes *LHR* e *IGF2* foram encontrados os genótipos CC, CT e TT (Figuras 5.c e 5.d).

Figura 5. Genótipos encontrados para os SNPs estudados no genes *B4Galt1* (5a), *FSHR* (5b), *LHR* (5c) e *IGF2* (5d) após emprego da metodologia de RFLP. Foi utilizado marcador de peso molecular de 100pb.

A tabela 3 apresenta as frequências genotípicas e alélicas para cada genótipo encontrado em função do grupo de touros estudados (DEP PE 365 - e DEP PE 365 +). Para o polimorfismo avaliado no gene *B4GALT1* foi encontrado apenas o genótipo AA, sendo suas frequências alélicas, em ambos os grupos $f(A) = 1$ e $f(G) = 0$; e as genotípicas $(AA) = 1$; $(GA) = 0$ e $(GG) = 0$. Para o polimorfismo pesquisado no gene *FSHR*, foram encontrados os genótipos GG e CG, cujas frequências genotípicas para o grupo com DEP PE 365 - foram $f(GG) = 0.135$, $f(CG) = 0.865$ e as frequências alélicas foram $f(C) = 0.432$ e $f(G) = 0.568$. No grupo com DEP PE 365 + as frequências genotípicas e alélicas foram, respectivamente, $f(GG) = 0.048$, $f(CG) = 0.951$, $f(C) = 0.476$ e $f(G) = 0.524$ ($p = 0.8454$).

O polimorfismo estudado no gene *LHR* apresentou genótipos CC, TT e CT, com frequências genotípicas de 0.055, 0.739 e 0.205, respectivamente, no grupo com DEP -. As frequências alélicas foram $f(C) = 0.158$ e $f(T) = 0.842$. Já no grupo com DEP +, as frequências foram $f(CC) = 0.433$, $f(TT) = 0.519$, $f(CT) = 0.048$, $f(C) = 0.457$ e $f(T) = 0.543$ ($p < 0.0001$).

Com relação ao polimorfismo analisado no gene *IGF2*, o grupo com DEP - resultou nas seguintes frequências genotípicas para CC, TT e CT, respectivamente: 0.657, 0.095 e 0.246. As frequências alélicas do gene *IGF2* foram $f(T) = 0.220$ e $f(C) =$

0.780. Já no grupo de DEP +, as frequências genotípicas e alélicas foram as seguintes: $f(CC) = 0.371$, $f(TT) = 0.238$ e $f(CT) = 0.390$; $f(C) = 0.567$ e $f(T) = 0.433$ ($p = 0.0083$) (Tabela 3).

Tabela 3. Frequências alélicas e genotípicas para cada SNP estudado nos genes *B4GALT1*, *FSHR*, *LHR* e *IGF2* em função do fenótipo de DEP PE 365.

<i>B4Galt1</i>/ RFLP <i>NcoI</i>	f (AA)	f (GA)	f (GG)	f (A)	f (G)	<i>p</i>
DEP PE 365 -	1	0	0	1	0	N/A
DEP PE 365 +	1	0	0	1	0	
<i>FSHR</i>/ RFLP <i>AluI</i>	f (CC)	f (GG)	f (CG)	f (C)	f (G)	0.8454
DEP PE 365 -	0	0.135	0.865	0.432	0.568	
DEP PE 365 +	0	0.048	0.951	0.476	0.524	
<i>LHR</i>/ RFLP <i>HhaI</i>	f (CC)	f (TT)	f (CT)	f (C)	f (T)	<0.0001
DEP PE 365 -	0.055	0.739	0.205	0.158	0.842	
DEP PE 365 +	0.433	0.519	0.048	0.457	0.543	
<i>IGF2</i>/ RFLP <i>MboII</i>	f (CC)	f (TT)	f (CT)	f (C)	f (T)	0.0083
DEP PE 365 -	0.657	0.095	0.246	0.780	0.220	
DEP PE 365 +	0.371	0.238	0.390	0.567	0.433	

B4GALT1 (Beta 1,4- galactosyltransferase), *FSHR* (Follicle-stimulating hormone receptor), *LHR* (Luteinizing hormone receptor) e *IGF2* (Insulin-like growth factor 2)/ RFLP (Restriction fragment length polymorphism); Enzimas de restrição *NcoI*, *AluI*, *HhaI*, *MboII*; DEP PE 365 (-) = negativa, DEP PE 365(+) = positiva; f (frequências alélicas ou genotípicas). ANOVA $p \leq 0.05$.

Os dados apresentados para o SNP estudado no gene *FSHR* não apresentaram significância estatística ($p = 0.8454$). No caso do SNP localizado no gene *LHR*, o genótipo CC apresentou-se em maior número nos animais com DEP PE 365 + enquanto o TT predominou no grupo de DEP PE 365 - ($p < 0.0001$).

Adicionalmente, nos resultados para o SNP pesquisado no gene *IGF2*, houve predomínio do genótipo TT no grupo de DEP PE 365 +, enquanto que no grupo de DEP PE 365 - prevaleceu o genótipo CC ($p = 0.0083$). O gene *B4Galt1* mostrou a prevalência de apenas um genótipo (AA) para o SNP avaliado dentre os animais estudados, tanto naqueles com DEP PE 365 + como nos negativos.

Os estudos acerca de marcadores moleculares relacionados com características reprodutivas são de fundamental relevância nos programas de

melhoramento genético de bovinos por auxiliar na seleção dos melhores reprodutores, resultando no aumento da eficiência reprodutiva e, conseqüentemente, na maior rentabilidade da cadeia produtiva (Pereira, 2000). Nesse sentido, o PE tem sido amplamente utilizado nos processos de melhoramento dos rebanhos por ser uma característica muito importante quando se fala em reprodução (Lunstra e Cundiff, 2003).

O PE apresenta alta herdabilidade e por isso tem sido utilizado em programas de seleção visando aumentar as taxas de fertilidade e precocidade sexual (Dias et al., 2003; Pereira, 2000). Ter alta herdabilidade indica que há variabilidade genética aditiva considerável para esta característica (Cyrillo et al., 2001; Ortiz Peña et al., 2001). Adicionalmente, foi demonstrado que o PE está geneticamente correlacionado com a IPP e libido em bovinos, além de influenciar diretamente na qualidade seminal resultando em alta motilidade espermática (60-80%) e melhor morfologia (Silva et al., 2011a). Economicamente, o sêmen de boa qualidade implica em um rápido retorno do capital investido na manutenção de um reprodutor, principalmente quando este sêmen se destina à inseminação artificial e o reprodutor apresenta outras características de interesse que determinam o seu intenso uso nos rebanhos (Silva et al., 1993). Por outro lado, a ausência de seleção para precocidade sexual pode resultar em rebanhos geneticamente inferiores, com idade produtiva tardia, menos rentáveis e com intervalo entre gerações aumentado. Estudos demonstraram que a campo, enquanto alguns touros da raça Nelore chegaram a apresentar 55% das filhas prenhas aos 14 meses, outros apresentaram apenas 1 ou 2%, indicando claramente que filhas de determinados touros atingem a puberdade mais cedo enquanto filhas de outros touros são mais tardias (Eler, Ferraz e Teixeira, 2010).

O uso de marcadores moleculares do tipo SNP complementa a seleção fenotípica realizada pelas DEPs, tornando os dados coletados mais precisos, de maneira mais rápida e confiável, auxiliando na seleção de animais de maior valor reprodutivo (Pegolo et al., 2012; Marson et al., 2008). Diante disso, os dados levantados por esta pesquisa apresentaram SNPs que podem estar relacionados à DEP PE 365. O gene *B4GALT1* está envolvido na maturação espermática, motilidade espermática e fertilização. Além disso, tem suas funções na ligação do espermatozoide à zona pelúcida, desenvolvimento de características sexuais secundárias, reação acrossômica e regulação celular do movimento flagelar (Matzuk et al., 2008; Shi, *et al.* 2004). Apesar dessas informações, a presença exclusiva do genótipo AA neste estudo mostrou que este

polimorfismo não deve ser utilizado como indicador de DEP PE 365 em touros da raça Nelore. Porém, trata-se de um dado novo, já que há pouca informação na literatura acerca de polimorfismos nesse gene relacionados com características reprodutivas na raça Nelore. No entanto, outros estudos utilizando o mesmo gene na raça holandesa demonstraram variação alélica. Essa variação mostrou-se mais relacionada à produção de leite do que com a maturação sexual (Shahbazkia *et al.* 2012).

A predominância do genótipo CG para o gene *FSHR* no grupo de touros de DEP + não apresentou diferença estatística ($p = 0.8454$) e, portanto, este não se aplica como indicador de DEP PE 365 na raça estudada.

A respeito dos genes *LHR* e *IGF2*, pode-se dizer que os polimorfismos estudados podem estar associados à DEP PE 365 devido à sua distribuição genotípica entre os animais estudados e ao seu envolvimento no processo de maturação espermática (Brown *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2006).

No caso do gene *LHR*, os dados coletados apresentaram que o genótipo CC pode estar relacionado às melhores DEPs PE 365 ($p < 0.0001$), pois foi observado com maior frequência nos animais de DEP 365 +. Este resultado está alinhado com outras pesquisas que também demonstraram resultados positivos no uso de polimorfismos do gene *LHR* como marcadores de características reprodutivas em bovinos (Liron *et al.*, 2012; Marson *et al.*, 2008).

Com relação ao gene *IGF2*, estudos anteriores demonstraram associações desse gene com fenótipo de crescimento e desenvolvimento dos animais, podendo fazer do SNP estudado um potencial marcador molecular (Foulstone *et al.*, 2005). No presente estudo, verificou-se que o genótipo TT para o SNP analisado neste gene é melhor selecionador de animais de maiores DEPs PE 365 ($p = 0.0083$).

Muitos outros SNPs têm sido utilizados como marcadores moleculares. Estudo utilizando a raça Angus selecionou os genes *GNRHR*, *LHR* e *IGF1* e analisou a influência de seus polimorfismos na idade à puberdade em machos. Como resultado, o gene *IGF1* mostrou-se um potente regulador da idade à puberdade nos animais estudados (Liron *et al.*, 2012). Em touros da raça holandesa, estudos nos genes *STAT5A*, *FGF2* e *PGR* confirmaram a associação de SNPs nesses genes relacionados a características reprodutivas (Cochran *et al.*, 2013). Em vacas da raça Jersey, SNPs presentes no gene *CWC15* mostraram relação direta com sua eficiência reprodutiva (Sonstegard *et al.*, 2013). Adicionalmente, em humanos também foi visto que

polimorfismos localizados nos genes *LIN28B* e *KISS1* estão associados à puberdade (Park et al., 2012; Tommiska et al., 2011).

Características reprodutivas são importantes alvos para o melhoramento genético bovino. Marcadores moleculares que possam detectar precocemente animais com essas características mais desejáveis auxiliam tanto as pesquisas realizadas acerca desse tema quanto os criadores (Faria et al., 2012; Pegolo et al., 2012).

5.2. Perímetro escrotal e Proteômica

Para as análises do perfil proteico das amostras de sêmen do grupo A (touro que produzem em média 17.6% de embriões/oócito *in vitro* e DEP PE 365 média de -0.3) e do grupo B (touro que produzem em média 34.25% de embriões/oócito, com DEP PE 365 média de 1.07), o sêmen de quatro palhetas provenientes de cada touro foi selecionado pelo percoll e os espermatozoides foram contados. A tabela 4 apresenta a concentração final de espermatozoides e volume final do *pellet* para cada touro, após serem capacitados em gradiente de Percoll.

Tabela 4. Número de espermatozoides (sptz/ ml) contabilizados nos *pellets* e seu volume final (µl) após o processamento das quatro amostras de sêmen, para cada uma dos seis touros utilizados.

		Concentração (sptz/ml)	Volume do <i>pellet</i> (µl)	Espermatozoides totais
Grupo A	Touro 1	11.85 x 10 ⁹	100	11.8 x 10 ⁸
	Touro 2	13.15 x 10 ⁹	130	17.09 x 10 ⁸
	Touro 3	15.7 x 10 ⁹	100	15.7 x 10 ⁸
Grupo B	Touro 4	22.3 x 10 ⁹	100	22.3 x 10 ⁸
	Touro 5	37.5 x 10 ⁹	90	33.75 x 10 ⁸
	Touro 6	12.65 x 10 ⁹	100	12.65 x 10 ⁸

Sabendo-se que o touro um apresentava o menor número de células totais entre os touros a serem avaliados (11.85 x 10⁸), para se fazer os *pools* de cada um dos dois grupos de touros, foram utilizadas 11.85 x 10⁸ células de cada touro no seu respectivo *pool*. Após análise das amostras por LCMS foram identificadas respectivamente, 715, 467 e 215 proteínas com alto de grau de confiabilidade nas amostras A, B e AB (p < 0.05), respectivamente.

Na tabela 5, estão listadas as proteínas que foram selecionadas com maior valor de *Spectral Counts* e que estavam presentes apenas no grupo A. Na tabela 6, encontram-se as proteínas que foram selecionadas com maior valor de *Spectral Counts* e não hipotéticas e que estavam presentes apenas no grupo B. Por fim, na tabela 7 são apresentadas as proteínas selecionadas presentes em ambos os grupos.

Tabela 5. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo A, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(continua)

ID	GENE	MW	SpecCounts		
			A	B	A/B (counts)
IPI00688921	CAPZB	33741	34	-	Somente A
IPI00714379	ATP5O	23320	13	-	Somente A
IPI00688728	CYLC1	74817	12	-	Somente A
IPI00702157	LAP3	56289	12	-	Somente A
IPI00712252	ATP5H	18692	12	-	Somente A
IPI00716830	VAPA	27856	12	-	Somente A
IPI00702197	RSPH9	31294	11	-	Somente A
IPI00924228	EFCAB6	173001	11	-	Somente A
IPI00693235	ATP5F1	28822	9	-	Somente A
IPI00708779	COX2	26021	9	-	Somente A
IPI00686362	RSPH3	68700	8	-	Somente A
IPI00701826	KIAA1984	62388	8	-	Somente A
IPI00704474	ACADM	46573	8	-	Somente A
IPI00687906	FUNDC2	20577	7	-	Somente A
IPI00693011	SDHB	31518	7	-	Somente A
IPI00699124	C1H21orf33	28699	7	-	Somente A
IPI00703716	UQCRB	13476	7	-	Somente A
IPI00711642	NDUFA12	17090	7	-	Somente A
IPI00867339	HSPA2	69809	7	-	Somente A
IPI01000557	PFKP	86006	7	-	Somente A
IPI01003651	CCDC147	104979	7	-	Somente A
IPI00686580	AFG3L2	89388	6	-	Somente A
IPI00692474	C23H6orf81	41172	6	-	Somente A
IPI00692907	DLST	48973	6	-	Somente A
IPI00708054	CSTF1	48354	6	-	Somente A
IPI00924220	HYDIN	575792	6	-	Somente A
IPI00685350	CCDC136	146569	5	-	Somente A
IPI00691241	CYB5D1	26721	5	-	Somente A

Tabela 5. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo A, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(continuação)

IPI00700802	CLPP	29704	5	-	Somente A
IPI00704021	NDUFA13	16673	5	-	Somente A
IPI00924261	LOC100336644	31284	5	-	Somente A
IPI00685603	KRT27	49907	4	-	Somente A
IPI00686546	CCT2	57475	4	-	Somente A
IPI00691815	SLC25A1	33876	4	-	Somente A
IPI00692158	ACOT13	16857	4	-	Somente A
IPI00692765	ATP5I	8321	4	-	Somente A
IPI00693688	LYPD4	26872	4	-	Somente A
IPI00694202	LYPLA1	24596	4	-	Somente A
IPI00694814	RDH11	37649	4	-	Somente A
IPI00696375	MSLN	44291	4	-	Somente A
IPI00700588	FILIP1	137613	4	-	Somente A
IPI00707168	TFAM	28907	4	-	Somente A
IPI00707212	NDUFS8	23896	4	-	Somente A
IPI00715477	CSNK2A2	41270	4	-	Somente A
IPI00715758	FAM162A	17737	4	-	Somente A
IPI00716958	GSTO2	28845	4	-	Somente A
IPI00717509	LETM1	81818	4	-	Somente A
IPI00782881	APOO	22562	4	-	Somente A
IPI00843128	FAM71A	63922	4	-	Somente A
IPI00867419	EXOC6	93322	4	-	Somente A
IPI00924085	ARMC3	96506	4	-	Somente A
IPI00944415	DNAH9	511300	4	-	Somente A
IPI01002007	LOC100139319	171317	4	-	Somente A
IPI00685095	CST3	16265	3	-	Somente A
IPI00685530	WBP2NL	31966	3	-	Somente A
IPI00687922	PPEF1	75050	3	-	Somente A
IPI00689853	DGUOK	31985	3	-	Somente A
IPI00690293	NDUFA7	12677	3	-	Somente A
IPI00690345	RPIA	32841	3	-	Somente A
IPI00692522	NDUFV2	27307	3	-	Somente A
IPI00694849	COX5B	13834	3	-	Somente A
IPI00695134	ESRRA	45424	3	-	Somente A
IPI00696774	SPP1	30969	3	-	Somente A
IPI00698552	ABHD10	33983	3	-	Somente A
IPI00699242	DYNLT1	12452	3	-	Somente A

Tabela 5. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo A, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(conclusão)

IPI00700619	SDHC	18389	3	-	Somente A
IPI00702468	CRYZ	35383	3	-	Somente A
IPI00703225	RGS22	144743	3	-	Somente A
IPI00704166	PFKM	93427	3	-	Somente A
IPI00704408	PSMA8	29203	3	-	Somente A
IPI00708720	NDUFS2	52556	3	-	Somente A
IPI00710726	CCT8	59609	3	-	Somente A
IPI00711194	SLC25A11	34172	3	-	Somente A
IPI00712479	NDUFS6	13413	3	-	Somente A
IPI00715598	LOC526524	11945	3	-	Somente A
IPI00715748	PSMA6	27399	3	-	Somente A
IPI00760414	DYDC1	20730	3	-	Somente A
IPI00823701	LOC782233	11407	3	-	Somente A
IPI00839302	OAZ3	27527	3	-	Somente A
IPI00841348	CHSY3	100049	3	-	Somente A
IPI00903755	BRP44	14282	3	-	Somente A
IPI00906454	NDUFS7	20122	3	-	Somente A
IPI01001756	WDR16	61362	3	-	Somente A
IPI01002554	C8H9orf11	18645	3	-	Somente A
IPI00685133	DNAH2	508289	2	-	Somente A
IPI00685228	EDC3	28916	2	-	Somente A

ID= identificação da proteína, Gene= nome do gene, MW= massa molecular da proteína em Da, Spec Counts= contagem de espectros, A/B= razão entre amostra A e B.

Tabela 6. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo B, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(continua)

ID	GENE	MW	SpecCounts		
			A	B	A/B (counts)
IPI00701642	PGD	53077	-	6	Somente B
IPI00706203	HEXB	61262	-	6	Somente B
IPI00708128	PLCB4	117110	-	6	Somente B
IPI00708169	ANO2	114210	-	6	Somente B
IPI00731839	COL4A6	162902	-	6	Somente B
IPI00826022	-	145153	-	6	Somente B
IPI00866884	GUF1	74766	-	6	Somente B
IPI00923993	-	101764	-	6	Somente B

Tabela 6. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo B, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(continuação)

IPI00692588	KRT13	48999	-	4	Somente B
IPI00693602	PRKACB	40904	-	4	Somente B
IPI00694741	PAF1	60280	-	4	Somente B
IPI00694853	LOC525101	54038	-	4	Somente B
IPI00697223	GGH	35683	-	4	Somente B
IPI00698594	GDI1	50566	-	4	Somente B
IPI00699237	GLB1	73413	-	4	Somente B
IPI00701983	DOCK1	218351	-	4	Somente B
IPI00702718	DAK	59125	-	4	Somente B
IPI00703421	LCMT1	38009	-	4	Somente B
IPI00707469	KRT79	57721	-	4	Somente B
IPI00710528	NME7	22455	-	4	Somente B
IPI00711728	FAM166A	36204	-	4	Somente B
IPI00716415	KRT6C	58896	-	4	Somente B
IPI00721280	MAP2	61287	-	4	Somente B
IPI00837571	-	37181	-	4	Somente B
IPI00841286	-	134819	-	4	Somente B
IPI00842908	GEN1	103266	-	4	Somente B
IPI00852492	EPS15	100208	-	4	Somente B
IPI00854523	TEKT3	56681	-	4	Somente B
IPI00867243	EPS15L1	88004	-	4	Somente B
IPI00906099	C7	93090	-	4	Somente B
IPI01001524	COL5A3	171977	-	4	Somente B
IPI01002612	LOC100335848	26981	-	4	Somente B
IPI01003824	LOC100337016	204340	-	4	Somente B
IPI01017668	FHOD1	160633	-	4	Somente B
IPI00709590	KRT4	58046	0	4	Somente B
IPI00999324	LOC100336868	105779	0	4	Somente B
IPI01000226	LOC100295593	15860	0	4	Somente B
IPI00686463	DEPDC5	162531	-	2	Somente B
IPI00690138	B4GALT4	39461	-	2	Somente B
IPI00691968	GUSB	74470	-	2	Somente B
IPI00693159	LOC788826	73249	-	2	Somente B
IPI00693374	KIAA0020	73345	-	2	Somente B
IPI00694255	GSN	80731	-	2	Somente B
IPI00695550	-	88855	-	2	Somente B

Tabela 6. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo B, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(continuação)

IPI00698860	ZNF567	75170	-	2	Somente B
IPI00700885	ZFHX2	277542	-	2	Somente B
IPI00702075	KRT12	57001	-	2	Somente B
IPI00702743	UQCR10	7458	-	2	Somente B
IPI00703280	LOC517777	10180	-	2	Somente B
IPI00703612	GNS	62776	-	2	Somente B
IPI00705222	NPAT	154882	-	2	Somente B
IPI00705363	ZNF507	105070	-	2	Somente B
IPI00705745	VAMP8	11357	-	2	Somente B
IPI00707152	ISYNA1	60761	-	2	Somente B
IPI00708694	LOC100336473	165188	-	2	Somente B
IPI00709272	ABHD12	45220	-	2	Somente B
IPI00710799	F2	70506	-	2	Somente B
IPI00713744	E2F3	49133	-	2	Somente B
IPI00713942	MEFV	85369	-	2	Somente B
IPI00715562	LGALS3BP	62127	-	2	Somente B
IPI00715599	GLDC	112975	-	2	Somente B
IPI00716217	LOC521269	66621	-	2	Somente B
IPI00728474	-	18075	-	2	Somente B
IPI00730941	MYCBP	11997	-	2	Somente B
IPI00760467	RNF141	25509	-	2	Somente B
IPI00824879	SCGB1D2	11293	-	2	Somente B
IPI00999429	LOC100336698	62975	-	2	Somente B
IPI00876799	RANGAP1	62952	-	2	Somente B
IPI00908190	ULBP27	28727	-	2	Somente B
IPI00912566	LOC100138887	84309	-	2	Somente B
IPI00923922	RFT1	60522	-	2	Somente B
IPI00999363	LOC100295741	17605	-	2	Somente B
IPI01000014	HIVEP3	257747	-	2	Somente B
IPI01000047	ATP2B2	132542	-	2	Somente B
IPI01000443	PPM1M	55131	-	2	Somente B
IPI01002570	CUTC	29274	-	2	Somente B
IPI01002580	CKAP4	57298	-	2	Somente B
IPI01002773	STRN4	95995	-	2	Somente B
IPI01002837	LOC100337445	79483	-	2	Somente B
IPI01003050	LOC100296541	13750	-	2	Somente B
IPI01017869	MPDZ	219960	-	2	Somente B

Tabela 6. Proteínas encontradas exclusivamente no grupo B, apresentadas em ordem decrescente de abundância.

(conclusão)

IPI01028060	GZMH	27064	-	2	Somente B
IPI00688962	C1H21orf56	38283	0	2	Somente B
IPI00701704	RSPH1	30565	0	2	Somente B
IPI00827312	LOC783195	15253	0	2	Somente B
IPI00842683	EFCAB6	75017	0	2	Somente B

ID= identificação da proteína, Gene= nome do gene, MW= massa molecular da proteína em Da, Spec Counts= contagem de espectros, A/B= razão entre amostra A e B.

Tabela 7. Proteínas encontradas nos grupos A e B.

(continua)

ID	GENE	MW	SpecCounts		
			A	B	A/B (counts)
IPI00693601	SLC2A3	54119	21	30	1.42
IPI00691920	PGCP	51679	9	30	3.31
IPI00699260	CS	51773	7	28	3.96
IPI00693100	PEBP4	25146	14	26	1.83
IPI00714315	KRT10	54848	7	28	3.96
IPI00694715	CES5A	64339	10	21	2.13
IPI00905389	SPAG6	55443	9	21	2.37
IPI00714446	GPI	62871	5	21	4.26
IPI00702650	HADHA	84816	38	19	0.50
IPI00710375	ECI2	42772	13	19	1.47
IPI00686702	SERPINA5	45297	7	19	2.74
IPI00710010	MSH4	104447	6	19	3.20
IPI00760454	CAPZA3	35066	17	17	1.00
IPI00711664	FH	54691	15	17	1.14
IPI00697915	HADHB	53704	14	17	1.22
IPI00721270	KRT14	51911	15	17	1.14
IPI00701135	RPS10	18898	6	19	3.20
IPI00705618	SUCLG2	46691	20	13	0.64
IPI00714468	IDH2	50739	16	13	0.80
IPI00999486	LOC100336821	23842	11	13	1.16
IPI00706169	ACAD9	65185	7	13	1.83
IPI00701189	CYLC2	53562	26	11	0.41
IPI00697045	PHB2	33357	13	11	0.82
IPI00694952	C3H1orf56	33057	12	11	0.89
IPI00908111	LOC100295485	85928	11	11	0.97

Tabela 7. Proteínas encontradas nos grupos A e B.

(continuação)

IPI00691338	COX5A	16735	9	11	1.18
IPI00697827	UQCRC2	48149	8	11	1.33
IPI00695508	CALM	16838	6	11	1.78
IPI00706331	CC2D1B	94103	4	11	2.66
IPI00717148	TEKT2	49886	2	11	5.33
IPI00688478	ATP5O	14150	0	11	NA
IPI00689604	ASH1L	332556	8	9	1.05
IPI00706544	CPVL	60136	17	9	0.50
IPI00712360	HIBADH	35410	17	9	0.50
IPI00696577	DNASE1L3	33909	8	9	1.07
IPI00692516	PFKP	86050	7	9	1.22
IPI00700762	AK3	25671	7	9	1.22
IPI00687246	VDAC2	31620	6	9	1.42
IPI00702858	HSPE1	10932	6	9	1.42
IPI00705621	ACTL7B	45563	6	9	1.42
IPI00715499	ETFB	27699	5	9	1.70
IPI00696556	SLC2A5	55393	4	9	2.13
IPI00698864	PRCP	56671	4	9	2.13
IPI00867334	DPP7	53642	4	9	2.13
IPI00687334	IMMT	82958	12	6	0.53
IPI00715057	BSP1	15481	116	75	1.56
IPI00712321	SPAM1	62299	50	58	0.87
IPI00703110	YWHAZ	27745	7	9	0.82
IPI00760446	ANG	16938	11	6	1.72
IPI00706594	TUBB2C	49831	17	183	0.09
IPI00707076	HSPA1L	70389	33	51	0.65
IPI00700712	RNASE1	16377	46	34	1.35
IPI00685556	NGF	26669	4	2	1.88
IPI00690111	TXNRD2	54623	12	6	0.53
IPI00711149	PGAM2	28685	17	32	0.53
IPI00705170	SPACA3	18099	5	9	0.59
IPI00760486	HSPB9	16784	11	6	1.72
IPI00698670	LOC100335558	100046	4	2	1.88
IPI00692165	MPI	46369	5	2	2.35
IPI00906031	PPP1CC	36984	29	34	0.85
IPI00702428	PRSS54	36921	7	9	0.82
IPI00705340	CST6	16356	5	4	1.17
IPI00705378	SLC25A6	32877	5	4	1.17

Tabela 7. Proteínas encontradas nos grupos A e B.

					(conclusão)
IPI00760484	SPACA5	17580	7	4	1.64
IPI00692839	SERPINE2	44007	5	4	1.17
IPI00705159	ATP1A1	112643	14	2	6.57
IPI00703950	ATP1A4	113686	13	15	0.87
IPI00705226	ALDH2	56653	1	9	0.12
IPI00694306	ACR	45465	53	85	0.62
IPI00695217	SLC25A31	35694	64	55	1.16
IPI00685161	TXNRD1	54724	11	9	1.29
IPI01001359	ACRBP	61039	76	47	1.62
IPI00699601	ACSL6	78043	14	2	6.57
IPI00999380	TTN	3715836	11	9	1.29
IPI00714193	ASRGL1	32050	11	9	1.29
IPI00713792	LYZL4	16293	10	9	1.17
IPI00699728	CRISP2	27143	6	4	1.41
IPI00696700	LYZL1	16779	14	2	6.57
IPI00685221	PGK2	44758	40	45	0.89
IPI00696041	SORD	38099	2	13	0.16
IPI00711804	CD59	13663	5	2	2.35
IPI00694295	ATP5A1	59720	68	60	1.14
IPI00696912	ACSS1	74310	17	26	0.67
IPI00708438	SUCLG1	36167	6	13	0.47
IPI00695426	TUBA3E	49926	2	13	0.16
IPI00705819	NUP210L	209622	5	2	2.35
IPI00867084	MGC157332	30575	29	38	0.76

ID= identificação da proteína, Gene= nome do gene, MW= massa molecular da proteína em Da, Spec Counts= contagem de espectros, A/B= razão entre amostra A e B.

5.2.1 Análise *in silico*

As funções das proteínas selecionadas mostradas nas tabelas 5, 6 e 7 foram analisadas *in silico* e então comparadas entre os grupos A e B (figura 6). Ambos os grupos de animais apresentaram proteínas reponsáveis por funções metabólicas, celulares, defesa e maturação sexual, todas importantes para sua sobrevivência. Exclusivamente no grupo B (cujos touros apresentam qualidade superior em relação à DEP PE 365 e à produção *in vitro* de embriões) foram observadas proteínas relacionadas à doença nutricional e proteínas transportadoras. Adicionalmente, maior

quantidade de proteínas no grupo B relacionadas à morfologia, sinalização celular, metabolismo de ácidos nucleicos, recombinação, replicação e reparo de DNA foram descritas. Todas estas etapas desde replicação e reparo de DNA, metabolismo de ácidos nucleicos, sinalização celular, morfologia, recombinação até os processos de transporte de substâncias realizados por proteínas carreadoras, precisam acontecer de maneira orquestrada em quaisquer tipos celulares para garantir sua sobrevivência e desenvolvimento (Nelson e Cox, 2000). A ausência total ou parcial de proteínas com essas funções no grupo A pode ser uma das explicações para a quantidade inferior de embriões gerados pelos touros desse grupo, bem como para suas menores medidas de DEP PE 365 visto que seu desenvolvimento pode ser menos eficiente do que o desenvolvimento dos animais do outro grupo que possuem proteínas com estas funções. Por outro lado, os animais do grupo B também apresentaram proteínas relacionadas a doenças metabólicas, desordem hereditária e desordem no desenvolvimento. Tal fato pode ser justificado visto que doenças são geradas por um organismo quando este necessita combater determinado distúrbio para manter a sua homeostasia para sua sobrevivência (Chizzotti et al., 2007).

Figura 6. Análise funcional entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas para determinada função presentes no grupo A e as barras claras representam a quantidade de proteínas para determinada função presentes no grupo B.

Além da análise comparativa das funções das proteínas entre os grupos, foi realizada a análise *in silico* da participação dessas proteínas em diferentes vias do organismo (figuras 7 e 8).

Foi observada maior presença das proteínas do grupo A (grupo inferior) em vias relacionadas com disfunção mitocondrial, degradação de l-cisteína e glutamato, glicerol, biossíntese e degradação de aspartato, fermentação de piruvato e na via do EGF (*epidermal growth epidermal*) (figura 7). O que se pode dizer com relação a essas rotas é que todas são de extrema importância para o fornecimento de energia para o espermatozoide principalmente para sua motilidade e capacidade fecundante. Porém, todas dependem da funcionalidade mitocondrial. Os presentes resultados revelaram proteínas relacionadas à disfunção mitocondrial no mesmo grupo A, o que poderia prejudicar as funções espermáticas como um todo e consequentemente influenciar negativamente no seu desenvolvimento (Assumpção et al., 2002).

As proteínas do grupo B foram relacionadas às vias de degradação da 4-hidroxiprolina, arginina, prolina e lactose, vias das pentoses fosfato, ativação de protrombina, motilidade espermática, via da melatonina, sinalização de andrógenos, biossíntese de acetilcoa, sinalização de eNOS (óxido nítrico sintase endotelial) e junções GAP (figuras 7 e 8). Estas vias são importantes por serem responsáveis pela remoção e síntese de componentes essenciais para sobrevivência celular como carboidratos e aminoácidos (Nelson e Cox, 2000) além daquelas atuantes como sinalizadoras de andrógenos os quais são necessários para o desenvolvimento e manutenção de características sexuais e espermatogênese e estão diretamente relacionados com a fertilidade e a motilidade espermática (Andersson, 1992). Adicionalmente, proteínas envolvidas nas vias de sinalização de eNOS o qual pode favorecer a ligação do espermatozoide à zona pelúcida e nas junções GAP também foram descritas (Nelson e Cox, 2000; Zamir et al., 1995). Todos esses componentes proteicos presentes no grupo B estão relacionados com a sobrevivência, desenvolvimento e maturação espermática, bem como sua motilidade e capacidade de fertilizar o oócito (Assumpção et al., 2002; Batias et al., 2000).

Figura 7. Análises comparativas das rotas entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas do grupo A envolvidas em determinada rota e as barras claras representam a quantidade de proteínas do grupo B.

Figura 8. Análises comparativas das rotas entre os grupos A e B, onde as barras mais escuras representam a quantidade de proteínas do grupo A envolvidas em determinada rota e as barras claras representam a quantidade de proteínas do grupo B.

Na figura 8, observa-se uma grande quantidade de vias importantes exclusivas do grupo B como: vias de degradação de arginina, prolina e lactose, via de biossíntese de acetil-CoA, via de sinalização de andrógenos, via das pentoses fosfato e via de síntese de protrombina. É importante salientar que a via responsável pela motilidade espermática também está presente apenas nos animais do grupo B. A ausência dessas vias no perfil proteico dos animais pertencentes ao grupo A pode ser mais um fator influente na qualidade inferior desses animais quando comparados com o grupo B.

Ao serem analisadas as vias onde as proteínas de ambos os grupos estão envolvidas, observou-se uma predominância de proteínas com participação em vias metabólicas como gliconeogênese, glicólise e ciclo de krebs (figuras 9, 10 e 11). Entende-se por glicólise a quebra da glicose realizada por enzimas citosólicas originando moléculas de piruvato, ATP (adenosina trifosfato) e NADH (hidrogênio niacina adenina dinucleotídeo). O processo “inverso” denominado gliconeogênese consiste na síntese de glicose a partir de moléculas como piruvato, essencial para manutenção do nível mínimo de glicose no organismo. O ciclo de Krebs é responsável pela oxidação do piruvato a CO_2 , enquanto ATP é gerado pela transferência de elétrons ao oxigênio na fosforilação oxidativa (Nelson e Cox, 2000).

Figura 9. Representação esquemática da glicólise, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B simultaneamente.

Figura 10. Representação esquemática da gliconeogênese, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B simultaneamente.

Figura 11. Representação esquemática ciclo de krebs, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas nos grupos A e B simultaneamente.

A importância dessas vias para o espermatozoide é alta visto que a glicose é a principal fonte de energia para esta célula, onde a queda do teor de ATP diminui sua motilidade dentre outras funções importantíssimas como fertilidade e direcionalidade (Câmara e Guerra, 2008).

Adicionalmente, proteínas encontradas no grupo A apresentaram envolvimento na via do EGF e na disfunção mitocondrial (figuras 12 e 13). A via do EGF está associada à sinalização celular que inclui a proliferação, diferenciação, mobilidade e sobrevivência celular através da estimulação de uma cascata de cinases (Higashiyama et al., 2008). Além disso, participa das modificações no citoesqueleto, o que é bastante importante já que o citoesqueleto mantém o formato do espermatozoide, está presente em seu flagelo e é responsável pela direcionalidade da célula durante seu movimento (Mújica et al., 2003; Juárez-Mosqueda, 2000).

Figura 12. Representação esquemática da cascata do EGF, onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas no grupo A.

Em relação à disfunção mitocondrial, ter proteínas no sêmen que estejam envolvidas nesse processo pode ser preocupante já que a mitocôndria apresenta em seu interior o mtDNA capaz de transcrever proteínas atuantes na fosforilação oxidativa, além de ser essencial para a fisiologia espermática, movimentação celular e produção de energia a partir da geração de ATP. Consequentemente, proteínas envolvidas em alterações mitocondriais podem interferir negativamente nas características espermáticas e na fertilidade (Câmara e Guerra, 2008).

No grupo B, foram encontradas proteínas envolvidas nas vias que formam eNOS (figura 14), o qual é uma isoforma do NOS (óxido nítrico sintase). O NO (óxido nítrico) é um radical livre de meia vida curta que sob baixas concentrações favorece a ligação à zona pelúcida em humanos, a motilidade em hamsters (Yeoman et al., 1998) e humanos e a reação acrossômica em camundongos (Herrero et al., 1997) e touros (Zamir et al., 1995). Desta forma, a presença de proteínas no semen que atuam nesta via pode ser favorável para sua fertilidade.

Figura 14. Representação esquemática do processo de formação do eNOS (óxido nítrico sintase endotelial), onde as regiões destacadas em laranja representam proteínas encontradas no grupo B.

A busca de dados prévios sobre fertilidade e dados reprodutivos acerca das proteínas selecionadas nos grupos A e B na literatura mostrou que no grupo A, existem

algumas proteínas relacionadas a características positivas de reprodução e crescimento como a cristalina, retinol desidrogenase, serina fosfatase, determinadas *heat shock proteins* (HSPs70), *F-actin-capping protein subunit beta* (CAPZB), *ATP synthase subunit O* (ATP5O), Ciclo-oxigenase-2 (COX2), *Cytochrome b protein* (Cyb) e *WD repeat domain* (WDR) (Kaewmala et al., 2012; Skarnes et al., 2011; Empinado, 2011; Rosenkrans et al., 2010; Simonis et al., 2009; Atchison et al., 2003; Robinson et al., 2003; Pendeville et al., 2001). Porém, a maioria das proteínas nesse grupo são indicativas de diminuição da fertilidade e prejuízo do desenvolvimento. Dentre elas, destaca-se dineína, a proteína ligadora de espermatozóide (BSP1), a apolipoproteína B, cistatina, *Vesicle-associated membrane protein-associated protein A* (VAPA), *leucine aminopeptidase 3* (LAP3), fosfofrutokinase, *ATPase Family Gene 3-Like 2* (AFG3L2), *cleavage stimulation factor complex* (CSTF - 64), *Prostate-specific membrane antigen* (PMSA), *cystatin-related epididymal spermatogenic* (CRES), e algumas fosfatases (Bongiorni et al., 2012; Zeng et al., 2012; D'amours et al., 2010; Kim et al., 2010; Minhan et al., 2010; Caixeta et al., 2009; Maltecca et al., 2009; Vanselow et al., 2008; Dass et al., 2007; Huang et al., 1996)

No grupo B ocorreu o oposto. Houve um predomínio de proteínas já relacionadas à fertilidade e bom desenvolvimento como a Hexosaminidase B (HexB), *RNA Polymerase II Associated Factor* (PAF1), citocromo C, algumas metil transferases, a proteínas plceta e outras (Mackay et al., 2013; Park et al., 2012; Belleannees et al., 2011; Kashir et al., 2011; Zahariev et al., 2007; Turner et al., 1999).

De maneira geral, os dados obtidos apresentaram um grande volume de proteínas envolvidas em funções metabólicas em ambos os grupos. Porém, houve uma predominância dessas funções ao se estudar as proteínas do grupo B (touro melhor). Isso pode levar a inferir que estas funções estão mais ligadas à maturação sexual, fertilidade e capacidade fecundante do espermatozoide. Sendo assim, proteínas envolvidas nas rotas metabólicas podem ser indicadoras de melhores reprodutores.

5.3. Perímetro escrotal na produção *in vitro* de embriões

Para os 48 touros analisados em triplicata, a média do número de COC's utilizados, bem como a porcentagem de embriões produzidos por touro em função do número de COC's utilizados estão apresentados na tabela 8. Os animais foram divididos em três grupos de acordo com a média da amplitude total de suas DEPs PE 365 gerando um grupo superior (DEP PE 365 de 1.21 a 0.56); um grupo intermediário (DEP PE 365 de 0.55 a -0.09) e um grupo inferior (DEP PE 365 de -0.10 a -0.74). A partir desta divisão, os resultados para embriões totais produzidos e tipos de blastocistos gerados para cada grupo foram comparados entre si.

Tabela 8. Média de oócitos utilizados e de embriões totais produzidos nas três repetições, por touro, em função do número de COC's utilizados. (continua).

Touro	DEP PE 365	Média oócitos	Média % embriões
1	1.21	57.6	40
2	1.06	56.4	23.8
3	0.98	56.4	38.6
4	0.97	56	37.9
5	0.93	55	30.4
6	0.84	58	34.7
7	0.79	51	28.2
8	0.73	55.7	22
9	0.71	58.7	32
10	0.69	55	30
11	0.66	56	29.3
12	0.62	51.7	33.7
13	0.61	55.7	37.7
14	0.55	47	34.7
15	0.55	48.4	28.4
16	0.54	49	29.8
17	0.54	55.7	38.4
18	0.5	51.4	33
19	0.41	54.4	46.5
20	0.35	58	36.1
21	0.35	53	35.7
22	0.31	58	34.5

Tabela 8. Média de oócitos utilizados e de embriões totais produzidos nas três repetições, por touro, em função do número de COC's utilizados.

(conclusão)

23	0.29	53.7	51.6
24	0.27	54.7	40.6
25	0.27	54.7	33.8
26	0.26	57.7	31.6
27	0.26	54.7	15.7
28	0.26	45	32.2
29	0.26	61.2	34.5
30	0.25	49	34.6
31	0.12	54.7	37.3
32	0.07	57	35
33	0.06	62.7	30.7
34	0.05	54	43.9
35	0.01	58.4	41.3
36	-0.02	49	47
37	-0.04	69.4	40
38	-0.05	51.4	31.9
39	-0.11	47.7	27.5
40	-0.22	56.4	34.3
41	-0.34	53	40.2
42	-0.35	44.7	43.6
43	-0.38	71.7	36.4
44	-0.39	53.7	30.5
45	-0.43	55.4	32.7
46	-0.47	56.4	26.9
47	-0.47	67.4	36.9
48	-0.74	54	44.5

Os touros foram divididos de acordo com a amplitude total de sua DEP PE 365: 1.21 a 0.56 (grupo superior); 0.55 a -0.09 (grupo intermediário) e -0.10 a -0.74 (grupo inferior).
Animais de 1 a 13 (grupo superior); de 14 a 38 (grupo intermediário) e de 39 a 48 (grupo inferior).

Calculando-se a produção média de embriões por grupo foram obtidos os resultados demonstrados na tabela 9. Nesta, pode ser observado uma maior produção de blastocistos, independente de sua classificação, pelos touros pertencentes aos grupos inferior e neutro ($p>0.05$).

Tabela 9. Produção média de embriões totais por oócito, por grupo de acordo com sua DEP PE 365 (Kruskal-Wallis $p>0.05$).

Média % embriões		
Grupo superior	Grupo neutro	Grupo inferior
32.176	35.952	35.350

Com relação ao tipo de blastocisto (Bi, Bl, Bx e Be) produzido por touro, a média das três replicatas, observada 168 horas (D7) pós FIV, em função da quantidade total de embriões sobreviventes até 96 horas (D4) pós FIV, estão na tabela 10.

Tabela 10. Porcentagem média das três replicatas, do tipo de blastocisto produzido em D7, para cada touro, em relação ao número total de blastocistos sobreviventes até o D4.

(continua)

Touro	DEP PE 365	Média % Bi	Média % Bl	Média % Bx	Média % Be
1	1.21	10.98%	16.00%	63.56%	9.46%
2	1.06	10.56%	17.91%	54.96%	16.58%
3	0.98	7.38%	20.59%	66.74%	5.29%
4	0.97	10.60%	18.99%	61.96%	8.45%
5	0.93	14.64%	13.74%	71.62%	0.00%
6	0.84	10.66%	9.94%	73.52%	5.88%
7	0.79	8.29%	19.48%	68.72%	3.51%
8	0.73	14.78%	30.42%	50.27%	4.52%
9	0.71	9.76%	16.31%	67.82%	6.11%
10	0.69	12.49%	18.92%	61.39%	7.20%
11	0.66	7.68%	7.86%	82.71%	1.75%
12	0.62	7.09%	8.91%	75.53%	8.47%
13	0.61	11.88%	23.64%	61.91%	2.56%
14	0.55	5.56%	12.06%	79.05%	3.33%
15	0.55	5.13%	15.54%	73.28%	6.06%
16	0.54	5.80%	17.50%	72.69%	4.01%
17	0.54	10.56%	23.61%	60.83%	5.00%
18	0.5	10.09%	9.76%	66.56%	13.60%
19	0.41	4.10%	11.66%	65.95%	18.30%
20	0.35	4.86%	16.30%	73.02%	5.81%
21	0.35	3.70%	14.91%	77.91%	3.48%
22	0.31	8.78%	21.17%	60.84%	9.22%
23	0.29	3.62%	7.28%	73.63%	15.48%
24	0.27	7.94%	11.68%	68.19%	12.19%

Tabela 10. Porcentagem média das três replicatas, do tipo de blastocisto produzido em D7, para cada touro, em relação ao número total de blastocistos sobreviventes até o D4.

					(conclusão)
25	0.27	1.75%	17.94%	66.97%	13.33%
26	0.26	18.67%	23.32%	58.02%	0.00%
27	0.26	3.92%	12.01%	75.98%	8.09%
28	0.26	12.09%	16.44%	69.39%	2.08%
29	0.26	8.35%	11.86%	66.11%	13.68%
30	0.25	6.98%	20.10%	71.07%	1.85%
31	0.12	6.51%	24.60%	58.97%	9.92%
32	0.07	4.76%	28.41%	61.63%	5.20%
33	0.06	6.83%	20.36%	71.63%	1.19%
34	0.05	5.29%	10.14%	78.56%	6.00%
35	0.01	9.34%	16.54%	57.95%	16.16%
36	-0.02	15.85%	17.33%	55.12%	11.70%
37	-0.04	8.69%	16.44%	67.52%	7.35%
38	-0.05	18.47%	13.80%	57.27%	10.46%
39	-0.11	20.23%	12.05%	58.71%	9.02%
40	-0.22	2.38%	14.94%	75.02%	7.66%
41	-0.34	14.53%	14.22%	58.85%	12.40%
42	-0.35	21.74%	16.96%	45.90%	15.40%
43	-0.38	3.63%	17.36%	67.39%	11.61%
44	-0.39	12.13%	14.09%	61.64%	12.13%
45	-0.43	20.36%	16.05%	51.25%	12.35%
46	-0.47	23.67%	15.47%	49.14%	11.73%
47	-0.47	11.20%	14.05%	56.60%	18.16%
48	-0.74	13.79%	16.45%	60.03%	9.73%

Os touros foram divididos de acordo com a amplitude total de sua DEP PE 365: 1.21 a 0.56 (grupo superior); 0.55 a -0.09 (grupo intermediário) e -0.10 a -0.74 (grupo inferior).

Animais de 1 a 13 (grupo superior); de 14 a 38 (grupo intermediário) e de 39 a 48 (grupo inferior).

A média geral de Bi, Bl, Bx e Be produzidos por grupo em D7, em relação à produção total de embriões em D4 está apresentada na tabela 11.

Tabela 11. Média da porcentagem encontrada para cada tipo de blastocisto, com relação ao número de embriões totais produzidos, considerando-se os grupos de touros superior, neutro e inferior de acordo com sua DEP PE 365.

		Média			
		%Bi	%Bl	%Bx	%Be
Grupo	Superior	10.52	17.13 ^a	66.21 ^a	6.14
	Neutro	7.91	16.43 ^a	67.04 ^a	8.34
	Inferior	14.37	15.16 ^a	58.45 ^a	12.02

Porcentagem média de blastocistos inicial (%Bi), Blastocisto (%Bl), Blastocisto expandido (%Bx) e Blastocisto eclodido (%Be) produzidos pelos três grupos de touros.

^a *Kruskal-Wallis* diferiu entre médias ($p \leq 0.05$).

Nas tabelas 10 e 11 pode-se observar que os grupos que mais produziram Bl e Bx, os quais são blastocistos mais indicados para serem transferidos para uma vaca receptora por resultarem em maiores taxas de prenhez, foram os grupos com DEP PE 365 neutra e superior. Além disso, o grupo inferior produziu maior número de Bi e Be, os quais são menos interessantes para serem transferidos (Lopes et al., 2001; Lamb, 2005). Isso demonstra que o critério de seleção de touros com melhores DEPs PE 365 interfere positivamente na cinética embrionária *in vitro* ($p \leq 0.05$).

Muitos fatores podem ser responsáveis pela diferença nas taxas de prenhez em função do tipo de blastocisto transferido. Dentre eles, foi descoberto um fator que pode apresentar-se em diferentes concentrações dependendo do blastocisto gerado, chamado PIF (*PreImplantation Factor*). Esse fator, visto em camundongos, é um peptídeo secretado por embriões viáveis indispensável para gestação. Pesquisadores demonstraram que os níveis de PIF aumentam ao longo do desenvolvimento embrionário em função da fase Bi, Bl, Bx ou Be. (Stamatkin et al., 2011). Outra explicação para resultados de prenhez diferentes de acordo com o blastocisto transferido pode ser a variação das ondas de cálcio que também oscilam ao longo do desenvolvimento embrionário e podem variar sua concentração em função do tipo de blastocisto, o que pode influenciar no sucesso da prenhez (Malcuit et al., 2006).

A seleção de melhores embriões para serem transferidos para vacas receptoras baseada no tipo de blastocisto é de grande importância já que os resultados de gestação obtidos variam em função desse processo. Em humanos, um estudo demonstrou diferença significativa nas taxas de gravidez quando se comparou o estágio em que o embrião era transferido, obtendo-se 70,6% de gravidez quando se transferiu

Bx e 20,0% quando eram transferidos Bi (Almodin et al., 1999). Em bovinos, embriões transferidos na fase de Bi apresentaram 67.4% de poliploidias enquanto Bl e Bx apresentaram 27.9% (Sugimura et al., 2012).

Sabe-se que essas variações nas taxas de desenvolvimento de embriões PIV podem ser decorrentes exclusivamente do touro utilizado, uma vez uniformizado o sistema de cultivo e mantendo rigor na seleção dos oócitos (Sudano et al., 2011). O uso de touros selecionados para DEP PE 365 na realização da FIV é muito importante por gerar animais mais rentáveis e com características de interesse zootécnico como idade ao primeiro parto, precocidade sexual dentre outras. Eler, Ferraz e Teixeira (2010) demonstraram que a ausência de seleção para precocidade sexual pode resultar em rebanhos inferiores e pouco rentáveis.

Em um rebanho onde se objetiva o progresso genético e a superioridade fenotípica, acasala-se o uso de animais geneticamente superiores com as biotécnicas reprodutivas. Assim, resulta-se em maior número de descendentes melhorados e rentáveis. Por processos naturais de reprodução também se consegue selecionar os melhores animais, porém os descendentes são gerados em menor quantidade e em maior tempo. Isso porque a seleção de bovinos de forma natural normalmente utiliza um número maior de animais superiores, os quais precisam ser mantidos mais tempo no rebanho para que haja reposição, podendo comprometer o melhoramento genético devido ao aumento do intervalo de gerações. Esse problema é contornado pela PIV, a qual permite um número muito maior de descendentes por touro, além de diminuir o intervalo de gerações pois, por utilizar um grupo extremamente seletivo de animais, a quantidade de touros necessária para sua reposição é pequena. Ao longo do tempo, utilizar-se PIV propicia maior acurácia de seleção, pois animais com maior número de descendentes avaliados apresentam, no geral, mérito genético estimado de forma mais precisa (Lôbo et al., 2013; Sudano et al., 2011).

Até o presente momento, não foi encontrado na literatura nenhum estudo com relação à influência da DEP PE 365 no desenvolvimento e cinética embrionária *in vitro*. O que pôde ser visto é que utilizar-se animais selecionados para DEP PE 365 na tecnologia de FIV é favorável à cinética embrionária na raça Nelore. Esse dado incentiva a continuidade desse tipo de seleção aliado à FIV nos programas de melhoramento genético.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Dos quatro SNPs verificados nesse trabalho quanto à sua influência na DEP PE 365 em touros da raça Nelore, aquele estudado no gene *B4GALT1* resultou em apenas um genótipo na população estudada, enquanto que o SNP analisado no gene *FSHR* apresentou variação alélica, porém sem diferença significativa ($p = 0.8454$). Tais resultados inferem que ambos SNPs não podem ser utilizados como marcadores de maior DEP PE 365 na população estudada. Por outro lado, foi demonstrado que para o SNP avaliado no gene *LHR*, o genótipo CC pode estar relacionado à maior DEP PE 365 ($p < 0.0001$) e para o SNP analisado no gene *IGF2*, o genótipo TT é indicativo de animais de maior DEP PE 365 ($p = 0.0083$). Ambos podem ser sugeridos como marcadores moleculares para seleção de animais baseada na DEP PE 365.

O estudo global de proteínas (proteômica) no sêmen dos animais realizado neste trabalho sugere que proteínas envolvidas em rotas metabólicas podem ser prováveis marcadores bioquímicos de reprodutores com maiores DEP PE 365, além de selecionar animais que produzam maior quantidade de embriões *in vitro*.

A utilização de touros com maiores DEP PE 365 na PIV produzem mais blastocistos do tipo B1 e Bx *in vitro*, os quais são melhores para serem transferidos para vacas receptoras, por resultarem em maiores taxas de prenhez. Essa prática contribui para o melhor aproveitamento do potencial genético e reprodutivo dos rebanhos, diminuindo o intervalo entre gerações e acelerando o melhoramento genético animal.

Os achados apresentaram alguns dos mecanismos moleculares, bioquímicos e biotecnológicos que podem ser associados à seleção de animais com melhores dados fenotípicos de DEP PE 365 e, portanto, melhores reprodutores.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

- Almodin C.G., Pereira L.A., Minguetti- Camara V.C. (1999) Co-cultura de embriões humanos em células vero e transferência em fase de blastocisto. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet*, vol.21, n.7, pp. 409-414.
- Andersson, M. 1992. Relationship between GnRH-induced maxima, sperm motility and fertility in Ayrshire bulls. *Anim. Reprod. Sci.*, 27(2):107-111.
- Araujo Neto, F. R., Lôbo, R. B., Mota, M. D. S., & Oliveira, H. N. (2011). Genetic parameter estimates and response to selection for weight and testicular traits in Nelore cattle. *Genetics and molecular research : GMR*, 10(4), 3127–40. doi:10.4238/2011.December.19.1
- Assumpção MEOA, Haipeck K, Lima AS; Mello MRB, Oliveira LJ, Oliveira VP, Tavares LMT, Visintin JÁ. 2002. Evaluation of in vitro sperm capacitation with heparin and calcium ionophore in bulls. *Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.* vol.39 no.3 São Paulo 2002.
- Atchison, F. W. (2003). Pin1 regulates the timing of mammalian primordial germ cell proliferation. *Development*, 130(15), 3579–3586. doi:10.1242/dev.00584
- Badr, H., Bongioni, G., Abdoon, a S. S., Kandil, O., & Puglisi, R. (2007). Gene expression in the in vitro-produced preimplantation bovine embryos. *Zygote (Cambridge, England)*, 15(4), 355–67. doi:10.1017/S0967199407004315
- Batias C, Siffroi JP, Fenichel P, Pointis G, Segretain D. 2000. Connexin43 gene expression and regulation in the rodent seminiferous epithelium. *J Histochem Cytochem* 48:793-80
- Belleannees, C., Labas, V., Teixeira-Gomes, A. P., Gatti, J. L. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. (2011). *Journal of Proteomics*. Volume 74, Issue 1, Pages 59–78
- Bergmann, JAG;, CR; Vale Filho, VR; Andrade, VJ; Pereira, JCC. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. In: *World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, 6, 1998.
- Boligon, A. A., Roberto, P., Rorato, N., & Albuquerque, L. G. De. (2007). *Revista Brasileira de Zootecnia* Correlações genéticas entre medidas de perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas de fêmeas da raça Nelore

Genetic correlations between male scrotal circumference and female productive and reproductive t.

- Bongiorni, S., Mancini, G., Chillemi, G., Pariset, L., & Valentini, A. (2012). Identification of a short region on chromosome 6 affecting direct calving ease in Piedmontese cattle breed. *PloS one*, 7(12), e50137.
- Bovine Genome Sequencing and Analysis Consortium. 2009. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. *Science* 324(5926):522-8.
- Brackett B.G., Bousquet D., Boice M.L., Donawick W.J., Evans J.F., Dressel M.A. (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol Reprod.* Aug;27(1):147-58.
- Braundmeier AG, Miller DJ: The search is on: finding accurate molecular markers of male fertility. *Journal of dairy science* 2001, 84(9):1915-1925.
- Brito, L. F. C., Silva, A. E. D. F., Unanian, M. M., Dode, M. a N., Barbosa, R. T., & Kastelic, J. P. (2004). Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, 62(7), 1198–217.
doi:10.1016/j.theriogenology.2004.01.006
- Brown, J., Jones, E. Y., & Forbes, B. E. (2009). Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends in biochemical sciences*, 34(12), 612–9.
- Caetano, AR. SNP markers: basic concepts, applications in animal breeding and management and perspectives for the future. R. Bras. Zootec. 38 no.spe. 2009.
- Caixeta, E. S., Ripamonte, P., Machado, M. F., da Silva, R. B., Price, C., Barros, C. M., and Buratini Jr, J. Expression of mRNA encoding glycolytic enzymes in bovine cumulus cells during in vitro maturation: effects of time and FSH. (2009). *Reprod. Fertil. Dev.* 22, 272–272
- Campos W.E., Saueressig M.G., Saturnino H.M., de Souza B.M., Amaral T.B., Ferreira F. (2005) Manejo reprodutivo em gado de corte. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 54 p.
- Characterization of Bovine Follicular Oocytes and Their Ability to Mature In Vitro L . Leibfried and N . L . (1979), 76–86.

- Chizzotti, M. L., Filho, S. C. V., Tedeschi, L. O., Chizzotti, F. H. M., & Carstens, G. E. (2007). Angus bulls , steers , and heifers The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Energy and protein requirements for growth and maintenance of F 1 Nellore $\times$ Red Angus bulls , steer, 1971–1981. doi:10.2527/jas.2006-632
- Chocu S, Calvel P, Rolland AD, Pineau C. Spermatogenesis in mammals: proteomic insights. *Syst Biol Reprod Med*. Aug;58(4):179-90. 2012.
- Courot M, Ortavant R. Endocrine control of spermatogenesis in the ram. *J Reprod Fertil Suppl*. 30:47-60. 1981.
- Curtin K, Camp NJ. Fine-scale structure of the genome and markers used in association mapping. *Methods of Molecular Biology*. 713:71-88. 2011.
- D'Amours, O., Frenette, G., Fortier, M., Leclerc, P., & Sullivan, R. (2010). Proteomic comparison of detergent-extracted sperm proteins from bulls with different fertility indexes. *Reproduction (Cambridge, England)*, 139(3), 545–56.
- Dass, B., Tardif, S., Park, J. Y., Tian, B., Weitlauf, H. M., Hess, R. A., Carnes, K., Griswold, M. D., Small, C. L., MacDonald, C. C. Loss of polyadenylation protein tau-CstF-64 causes spermatogenic defects and male infertility. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 104: 20374-20379, 2007.
- De Koning, D.-J., Bovenhuis, H., & van Arendonk, J. a M. (2002). On the detection of imprinted quantitative trait loci in experimental crosses of outbred species. *Genetics*, 161(2), 931–8. Retrieved from
- Diaz, I. P. S., Oliveria, H. N., Bezerra, L. A., Lobo, R. B. (2011). Genotype by environment interaction in Nelore cattle from five Brazilian states. *Genetics and Molecular Biology (Impresso)*, v. 34, p. 435-442.
- Dressel, M. A., Square, P., & Veterinary, B. (1982). Normal Development in the Cow, 147–158.
- Econ, D. E. V., Character, M. P., De, S. C., Sele, N. D. E., & Corte, E. M. B. D. E. (2002). Ivan Borba Formigoni.
- Eler, J.P., Ferraz, J.B.S., Teixeira, L.A. (2010) Seleção para precocidade em novilhas de corte. In: Editor: Alexandre Vaz Pires. (Org.). *Bovinocultura de corte*. Piracicaba: Fealq, v. II, p. 801-811.
- Elias FP. 2007. Avaliação do efeito do touro e da biópsia de um blastômero na sobrevivência de embriões produzidos *in vitro*. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

- Euclides Filhos, K.; Dode, M.A.N.; Ueno, V.G.; Figueiredo, G.R. de; Silva, L.O.C. da. Puberdade em touros mestiços Simental-Nelore e Aberdeen Angus-Nelore. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 33., 1999, Fortaleza. Anais Fortaleza: SBZ, 1996, p. 108-109
- Evans ACO, Fortune JE. Selection of the dominant follicle in cattle occurs in the absence of differences in the expression of messenger ribonucleic acid for gonadotropin receptors. *Endocrinology*, v.138, p.2936-2971, 1997.
- Faria L. C., Queiroz, S.A., Buzankas, M. E., Venturini, G.C., MUNARI, D.P., Oliveira, J.A., Lôbo, R. B. (2012). ANÁLISE GENÉTICA DE CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS NA RAÇA BRAHMAN. *Archivos de Zootecnia*, v. 61, p. 236, 2012.
- Feugang JM, Rodriguez-Osorio N, Kaya A, Wang H, Page G, Ostermeier GC, Topper EK, Memili E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reprod Biomed Online*. 2010 Sep;21(3):312-24. Epub 2010 Jun 20.
- Flisikowski, K., Maj, A., Zwierzchowski, L., Adamowicz, T., Switonski, M., Hiendleder, S., & Pareek, C. (2005). Nucleotide Sequence and Variation of IGF2 Gene Exon 6 in Bos Taurus and Bos Indicus Cattle. *Animal Biotechnology*, 16(2), 203–208.
- Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J. L., Harper, J., Jacobs, C., ... Hassan, a B. (2005). Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *The Journal of pathology*, 205(2), 145–53.
- GARTNER, Leslie P.; Hiatt, James P. *Tratado de Histologia em Cores* (em português brasileiro). São Paulo: Elsevier, 2007. 576 p.
- Gilbert SF. 2003. *Biologia do desenvolvimento*. Ribeirão Preto: Funpec.
- Gonçalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. (2008) *Biotécnicas aplicadas à reprodução animal*. São Paulo: Roca.
- Hafez ESE, Hafez B. 2004. *Reprodução Animal*. São Paulo: Manole.
- Henderson, C. R. (n.d.). *Applications of Linear Models in Animal Breeding Models*.
- Herrero, M.B., Goin, J.C., Boquet, M. The nitric oxide synthase of mouse spermatozoa. *FEBS Lett.*, v.411, p.39-42, 1997.
- Heubl, G. New aspects of DNA-based authentication of Chinese medicinal plants by molecular biological techniques. *Planta Med.* 76(17):1963-74. 2010

- Howes EA, Hurst SM, Jones R. Actin and actin-binding proteins in bovine spermatozoa: potential role in membrane remodeling and intracellular signaling during epididymal maturation and the acrosome reaction. (2001) *J Androl.* Jan-Feb;22(1):62-72.
- Huang, L. S., Voyiaziakis, E., Chen, H. L., Rubin, E. M., & Gordon, J. W. (1996). A novel functional role for apolipoprotein B in male infertility in heterozygous apolipoprotein B knockout mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(20), 10903–7.
- Hyttel P, Fair T, Callesen H, Greve T. Oocyte growth, capacitation and final maturation in cattle. *Theriogenology* 47: 23-32. 1997.
- IBGE, Diretoria de Pesquisas, Coordenação de Agropecuária, Pesquisa Trimestral do Abate de Animais, 2008.I-2013.I.
- Kaewmala, K., Uddin, M.J., Cinar, M.U., Große-Brinkhaus, C., Jonas, E., Tesfaye, D., Phatsara, C., Tholen, E., Looft, C., Schellander, K. Investigation into association and expression of PLC ζ and COX-2 as candidate genes for boar sperm quality and fertility. (2012). *Reproduction in Domestic Animals* 47: 2.
- Kashir, J., Konstantinidis, M., Jones, C., Lemmon, B., Lee, H. C., Hamer, R., Coward, K. (2012). A maternally inherited autosomal point mutation in human phospholipase C zeta (PLC ζ) leads to male infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 27(1), 222–31.
- Kochhar H.S., Kochhar K.P., Basrur P.K., King W.A. (2003) Influence of the duration of gamete interaction on cleavage, growth rate and sex distribution of in vitro produced bovine embryos. *Animal Reproduction Science* 77:33–49.
- Lamb C. (2005) Factors affecting pregnancy rates in an IVF embryo transfer program. *Joint Proceedings of the AETA and the CETA*;31-36.
- Leahy, T. and de Graaf, S. P. (2012) Seminal plasma and its effect on ruminant spermatozoa during processing. *Reproduction in Domestic Animals*, 47 Supplement 4: 207-213.
- Li, H; Handsaker, B; Wysoker, A; Fennell, T; Ruan, J; Homer, N; Marth, G; Abecasis, G; Durbin, R. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Oxford Journals.* 25: Issue16. 2009.
- Lirón, J. P., Prando, A. J., Fernández, M. E., Ripoli, M. V, Rogberg-Muñoz, A., Goszczynski, D. E., Giovambattista, G. (2012). Association between

- GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC genetics*, 13(1), 26.
- Lobo, R. B., Nrumah, D., Grossi, D. A., Barros, P.S., Paiva, P., Bezerra, L.A., Oliveria, H.N., Silva, M.V.B. (2011). Implementation of DNA Markers to Produce Genomically - Enhanced EPDs in Nellore Cattle. *Acta Scientiae Veterinariae*. v. 1, p. 23-27.
- Lopes R.F.; Forell F., Oliveira A.T. (2001) Splitting and biopsy for bovine embryo seing under field conditions. *Theriogenology*, v 56, n 9, p 1383-1392.
- Loper, F. B., Magnabosco, C.U., Paulini, F., Da Silva, M.C., Miyagi, E.S., Lôbo, R.B. (2013). Genetic Analysis of Growth Traits in Polled Nellore Cattle Raised on Pasture in Tropical Region Using Bayesian Approaches. *Plos One*, v. 8, p. e75423.
- Lunstra, D. D., & Cundiff, L. V. (2003). The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at : Growth and pubertal development in Brahman- , Boran- , Tuli- , Belgian Blue- , Hereford- and Angus-sired F1 bulls 1 , 2, 1414–1426.
- MacKay, K. B., Tu, Y., Young, S. G., & Clarke, S. G. (2013). Circumventing embryonic lethality with *Lcmt1* deficiency: generation of hypomorphic *Lcmt1* mice with reduced protein phosphatase 2A methyltransferase expression and defects in insulin signaling. *PloS one*, 8(6), e65967.
- Malcuit, C., Kurokawa, M., & Fissore, R. a. (2006). Calcium oscillations and mammalian egg activation. *Journal of cellular physiology*, 206(3), 565–73.
- Maltecca, F., Magnoni, R., Cerri, F., Cox, G. a, Quattrini, A., & Casari, G. (2009). Haploinsufficiency of AFG3L2, the gene responsible for spinocerebellar ataxia type 28, causes mitochondria-mediated Purkinje cell dark degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 29(29), 9244–54.
- Marson, E. P., Ferraz, J. B. S., Meirelles, F. V, Balieiro, J. C. C., & Eler, J. P. (2008). Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos taurus* x *Bos indicus* beef composite population. *Genetics and molecular research : GMR*, 7(1), 243–51.
- Moura, AA; Andrade, CR; Souza, CEA; Rêgo, JPA; Martins, JAM; Oliveira, RV; Menezes, EBS. *Seminal plasma proteins, sperm functions and molecular*

- markers of fertility*. Rev. Bras. Reprod. Anim., Belo Horizonte, v.35, n.2, p.139-144, abr./jun. 2011.
- Nakaya, Y; Kizaki, K; Takahashi, T; Patel, OV; Kazuiyoshi, H. The characterization of DNA methylation-mediated regulation of bovine placental lactogen and bovine prolactin-related protein-1 genes. BMC Molecular Biology. 10:19. 2009.
- Nelson DL, Cox MM. 2000. Lehninger Principles of Biochemistry. USA: Worth Publishers
- Noely, J., Cyrillo, G., Razook, A. G., Figueiredo, L. A. De, Martins, L., Neto, B., ... Mercadante, Z. (2001). Estimativas de Tendências e Parâmetros Genéticos do Peso Padronizado aos 378 Dias de Idade , Medidas Corporais e Perímetro Escrotal de Machos Nelore de Sertãozinho , SP 1 Estimates of Genetic Parameters and Trends for Body Weight at 378 Days , Body Measur, 30(1), 56–65.
- Nogueira, M. F. G., Jr, J. B., Price, C. A., & Castilho, A. C. S. (2007). Expression of LH Receptor mRNA Splice Variants in Bovine Granulosa Cells : Changes With Follicle Size and Regulation by FSH In Vitro, 686(December 2006), 680–686.
- Otsuka, F; Yamamoto, S; Erickson, GF; Shimasaki, S. Bone morphogenetic protein-15 inhibits folliclestimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. J Biol Chem, v.276, p.11387-11392. 2001.
- Park, S. W., Lee, S.-T., Sohn, Y. B., Cho, S. Y., Kim, S.-H., Kim, S. J., Kim, C. H., et al. (2012). LIN28B polymorphisms are associated with central precocious puberty and early puberty in girls. *Korean journal of pediatrics*, 55(10), 388–92.
- Park, Y. J., Kwon, W.S., Oh, S.A., Pang, M.G. Fertility-Related Proteomic Profiling Bull Spermatozoa Separated by Percoll. (2012). *Journal of Proteome Research* (8), 4162-4168
- Peddinti, D., Nanduri, B., Kaya, A., Feugang, J.M., Burgess, S.C., Memli, E., 2008- Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC System Biology* 2, 1-13.

- Pegolo, N.T., Laloe, D., De Oliveira, H.N., Lôbo, R.B., Fouilloux, M.N. (2012). Trends of the genetic connectedness measures among Nelore beef cattle herds. *Journal of Animal Breeding and Genetics* (1986), v. 129, p. 20-29.
- Pereira, J. C. C. *Melhoramento Genético Aplicado à Produção Animal*. 2012. 6a ed.
- Quirino, CR; Bergmann, JAG. Heritability of scrotal circumference adjusted and unadjusted for body weight in Nelore bulls using uni and bivariate animal models. *Theriogenology*, 48(7):1398-1396, 1998.
- Regatieri I.C., Boligon A.A., Baldi F., Albuquerque L.G. (2012) Genetic correlations between mature cow weight and productive and reproductive traits in Nelore cattle. *Genet Mol Res*. Aug 29;11(3):2979-86.
- Rheingantz, M. G. T., Pegoraro, L. M. C., Dellagostin, O. A., & Pimentel, A. M. (2006). The sex ratio of in vitro produced bovine embryos is affected by the method of sperm preparation.
- Robert, C; Gagné, D; Lussier, JG; Bousquet, D; Barnes, FL; Sirard, MA. Presence of LH receptor mRNA in granulosa cells as a potential marker of oocyte developmental competence and characterization of the bovine splicing isoforms. *Reproduction*, v.125, p.437-446. 2003.
- Robinson, K. M., Taube, J. R., Reed, M. A., Duncan, M. K. Role of β B2-Crystallin in Fertility. (2003). *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 44: E-Abstract 2136.
- Rosenkrans ; C, Banks A, Reiter S, Looper M: Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with heat shock protein 70 genetic polymorphisms. *Anim Reprod Sci*. 2010, 119 :178–182
- Rosenkrans, C., Banks, A., Reiter, S., Looper, M. Calving traits of crossbred Brahman cows are associated with Heat Shock Protein 70 genetic polymorphisms (2010). *Animal Reproduction Science*. Volume 119, Issue 3 , Pages 178-182.
- Ruvinsky, a. (1999). Basics of gametic imprinting. *Journal of animal science*, 77 Suppl 2, 228–37.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd edn, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, 1989.
- Santos P, Chaveiro A, Simoes N, Moreira da Silva F. Bovine oocyte quality in relation to ultrastructural characteristics of zona pellucida, polyspermic penetration and developmental competence. *Reprod Domest Anim* 43: 685-689. 2008.

- Santos, C, Phillips C, Fondevila M, Porras-Hurtado L, Carracedo A, Souto L, Lareu MV. A study of East Timor variability using the SNPforID 52-plex SNP panel. *Forensic Sci Int Genet.* Jan;5(1):e25-6. 2011.
- Shahbazkia, H. R., Aminlari, M., & Cravador, A. (2012). Association of polymorphism of the $\beta(1, 4)$ -galactosyltransferase-I gene with milk production traits in Holsteins. *Molecular biology reports*, 39(6), 6715–21.
- Shi, S., Williams, S. A., Seppo, A., Kurniawan, H., Chen, W., Ye, Z., Stanley, P. (2004). Inactivation of the *Mgat1* Gene in Oocytes Impairs Oogenesis , but Embryos Lacking Complex and Hybrid N-Glycans Develop and Implant, 24(22), 9920–9929. doi:10.1128/MCB.24.22.9920
- Silva, A. M., Rios, A. F. L., Ramos, E. S., & Lôbo, R. B. (2011b). gene polymorphisms and characteristics of economic interest in Nellore cattle, 21(3), 2140–2147.
- Silva, M. R., Pedrosa, V. B., Silva, J. C. B., Eler, J. P., Guimarães, J. D., & Albuquerque, L. G. (2011a). Testicular traits as selection criteria for young Nellore bulls. *Journal of animal science*, 89(7), 2061–7.
- Simonis, N., Rual J.F., Carvunis, A.R., Tasan, M., Lemmens I, Hirozane-Kishikawa T, Hao T, Sahalie JM, Venkatesan K, Gebreab F, Cevik S, Klitgord N, Fan C, Braun P, Li N, Ayivi-Guedehoussou N, Dann E, Bertin N, Szeto D, Dricot A, Yildirim MA, Lin C, de Smet AS, Kao HL, Simon C, Smolyar A, Ahn JS, Tewari M, Boxem M, Milstein S, Yu H, Dreze M, Vandenhaute J, Gunsalus KC, Cusick ME, Hill DE, Tavernier J, Roth FP, Vidal M. Empirically controlled mapping of the *Caenorhabditis elegans* protein-protein interactome network (2009). *Nat Methods.* Jan;6(1):47-54.)
- Siqueira, J. B., Oba, E., Pinho, R. O., Quintino, H. P., Eler, J. P., Miranda Neto, T., Guimarães, J. D. (2012). Heritability estimate and genetic correlations of reproductive features in Nellore bulls, offspring of super precocious, precocious and normal cows under extensive farming conditions. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47(2), 313–8.
- Skarnes, W. C.; Rosen, B.; West, A. P.; Koutsourakis, M.; Bushell, W.; Iyer, V.; Mujica, A. O.; Thomas, M.; Harrow, J.; Cox, T.; Jackson, D.; Severin, J.; Biggs, P.; Fu, J.; Nefedov, M.; De Jong, P. J.; Stewart, A. F.; Bradley, A. A conditional knockout resource for the genome-wide study of mouse gene function (. (2011). *Nature.* 474 (7351): 337–342.

- Stamatkin, C. W., Roussev, R. G., Stout, M., Absalon-medina, V., Ramu, S., Goodman, C., Barnea, E. R. (2011). PreImplantation Factor (PIF) correlates with early mammalian embryo development-bovine and murine models, 1–11.
- Step toe P.C., Edwards R.G. (1978) Birth after the reimplantation of a human embryo.
- Stroud, B. 2011. Report to the President and the Board of Governors of the IETS: Statistics and Data Retrieval Committee. Embryo Transfer Newsletter, December.
- Sudano M.J., Crespilho A.M., Fernandes C.B., Junior A.M., Papa F.O., Rodrigues J., Machado R., Landim-Alvarenga Fda C. (2011) Use of bayesian inference to correlate in vitro embryo production and in vivo fertility in zebu bulls. *Vet Med Int* 2011:436381.
- Sugimura S., Akai T., Hashiyada Y., Somfai T., Inaba Y., Hirayama M., Yamanouchi I., Matsuda H., Kobayashi S., Aikawa Y., Ohtake M., Kobayashi E., Konishi K., Imai K. (2012) Promising System for Selecting Healthy In Vitro–Fertilized Embryos in Cattle. *PLoS One*. 7(5): e36627.
- Tanghe, S., Van Soom, A., Mehrzad, J., Maes, D., Duchateau, L., & de Kruif, A. (2003). Cumulus contributions during bovine fertilization in vitro. *Theriogenology*, 60(1), 135–149.
- Tommiska, J., Sørensen, K., Aksglaede, L., Koivu, R., Puhakka, L., Juul, A., & Raivio, T. (2011). LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. *BMC research notes*, 4(1), 363.
- Turner, R. M., Eriksson, R. L., Gerton, G. L., & Moss, S. B. (1999). Relationship between sperm motility and the processing and tyrosine phosphorylation of two human sperm fibrous sheath proteins, pro-hAKAP82 and hAKAP82. *Molecular human reproduction*, 5(9), 816–24.
- Unanian, M. M., Emidio, A., Feliciano, D., Mcmanus, C., & Cardoso, P. (2000). Características Biométricas Testiculares para Avaliação de Touros Zebuínos da Raça Nelore Testicular. Biometrics Characteristics to Evaluate the Nellore Zebu Breed Bulls. 29(1), 136–144.
- Vanselow, J., Nürnberg, G., Koczan, D., Langhammer, M., Thiesen, H.-J., & Reinsch, N. (2008). Expression profiling of a high-fertility mouse line by microarray analysis and qPCR. *BMC genomics*, 9(2), 307.

- Varago F.C., Mendonça L.F., Lagares M.A. (2008) Bovine in vitro embryo production: state of art and perspective of a constant evolution technique. *Rev Bras Reprod Anim*, Belo Horizonte, v.32, n.2, p.100-109, abr./jun.
- Weir, B. S. (n.d.). *Genetic Data Analysis II Methods for Discrete*.
- Yanagimachi, R. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote*. 2:371-372. 1994.
- Yeoman, R.R.; Jones, W.D.; Rizk, B.M. Evidence of nitric oxide regulation of hamster sperm hyperactivation. *J. Androl.*, v.19, p.58-64, 1998.
- Yokoo, M.J. ; Lôbo, R.B.; Rosa, G.J.M., Magnabosco, C.U.; Alabuquerque, L.G. . Características reprodutivas e suas associações com outras características de importância econômica na raça Nelore. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 64, p. 91-100, 2012.
- Zamir, N.; Barkan, D.; Keynan, N. et al. Atrial natriuretic peptide induce acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. *Am. J. Physiol.*, v.269, p.216-221, 1995
<http://www.anep.org.br/sumario-conteudo/85#.UrtfOfRDvO0>. Acesso em 2010, 2011 e 2012.
- http://www-gen.fmrp.usp.br/~pmgrn/sumario/ano1999/def_dep.html. Acesso em: 12 de janeiro de 2010.
- http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?locusId=281781. Acesso em: 20 de janeiro de 2010.
- [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Bt&CID=5141&log\\$=unigeneTable](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/UniGene/clust.cgi?ORG=Bt&CID=5141&log$=unigeneTable). Acesso em 21 de janeiro de 2010.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?term=beta%20galactosyl%20transferase%20bos%20taurus>. Acesso em 16 de janeiro de 2010.

ANEXOS

8. ANEXOS

Anexo I: DNA, RNA e soluções

Gel para PCR não digerido

Para a visualização da qualidade e integridade de amostras de DNA amplificadas, antes de sua digestão, géis de agarose 1% (m/v) foram preparados em tampão Tris-Acetato com EDTA (TAE; 40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA). As amostras foram aplicadas em gel e submetidas à eletroforese por 4V/cm em tampão de corrida TAE 1X.

Tampão TAE 50x

Tris base	242 g
Ácido acético	57,1 ml
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	100 ml
Água destilada (q.s.p.)	1000 ml

Gel “loading buffer” para DNA/ RNA

0,25% azul de bromofenol
0,25% xilenocianol
40% sacarose em água
Brometo de etídeo (1 µg/µL)

O *loading* deve ser armazenado a 4° C.

Gel para PCR pós digestão

Tris-borate (TBE)

5X

Tris base	54g
Ácido bórico	27,5g
EDTA 0,5M pH 8	20ml

Acrilamida 40%

Acrilamida	38g
NN´metilbisacrilamida	2g
Água	qsp 100ml.

Aquecer à 37° C para dissolver.

Tampão de Parada (loading Buffer) 6X

Azul de bromofenol	0,25%
Xilenocianol	0,25%
Glicerol em água	30%

Tampão de Corrida

TBE 20X modificado	60ml
Completar o volume para	1000ml

Fixador

Ácido nítrico	1500µl
Água milli-Q	100ml

Revelador

Carbonato de sódio	6g
--------------------	----

Água	200ml
------	-------

Colocar na geladeira para dissolver.

Corante

Prata	0,2g
-------	------

Água milli-Q	100ml
--------------	-------

“Stopping” da reação

Ácido acético	5ml
---------------	-----

água milli – Q	95ml
----------------	------

Anexo II: Manuscrito a ser submetido para publicação

The influence of *B4GALT1*, *LHR*, *FSHR* and *IGF2* polymorphism on scrotal circumference in Nellore bulls

**Cipriano, VTF¹; Miranda-Furtado, CL^{1,2}; Mioranza, A¹; Paz, CCP¹; Vila, RA¹;
Ramos, ES^{1,2}; Lôbo, RB¹**

**¹Departament of Genetics, Ribeirao Preto Medical School, Av. Bandeirantes, 3900.
Ribeirão Preto/ SP**

**²Department of Obstetrics and Gynecology, Ribeirao Preto Medical School, Av.
Bandeirantes, 3900 - Ribeirão Preto/ SP**

Corresponding author: vivicipriano@hotmail.com; tel: 55 16 36024909

Abstract

The bovine scrotal circumference is a trait of high heritability and positive genetic correlation with sexual precocity, AFB (age at first birth) and sperm morphology. The animal selection for scrotal circumference is performed by EPD SC 365 (expected progeny differences for scrotal circumference at 365 days), and SNPs (Single Nucleotide Polymorphism). In this context, we verified whether SNPs present on the acting genes on sexual maturity *B4galt1* (Beta 1,4-galactosyltransferase), *LHR* (Luteinizing hormone receptor), *FSHR* (Follicle stimulating hormone receptor), and *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) could be molecular markers for EPD SC 365 in Nellore bulls. Additionally, we analyzed the correlation between EPD SC 365 and EPD AFB among the studied animals. 104 animals of negative EPD SC 365 were selected and 74 animals with positive EPD and the SNPs were analyzed by RFLP (Restriction fragment length polymorphism). The EPD SC 365 showed correlation of -0,23 ($p = 0.0026$) with EPD AFB on the analyzed animals, showing that these traits are correlated. The *B4galt1* gene showed

only the AA genotype only on the SNP studied. For the SNP of FSHR gene, there was no statistical difference ($p=0.8454$). In the analysis of the SNP in the *LHR* gene was found that the CC genotype may be related to a greater scrotal circumference $p < 0.0001$), and the analyzed SNP on *IGF2* gene, the TT genotype may be the best indicator of bigger SC ($p = 0.0083$) animals, with these genes being possible markers for EPD SC 365, and may also be used in the animal selection with lower age at first calving, due to its high correlation between these traits.

Key Words: animal breeding, breeding value, scrotal circumference, SNP, Nellore.

Introduction

The bovine breeding programs seek select genetically superior animals for certain traits of economic interest in order to transfer this superiorities to progenies. Among the selection criteria, some traits are evaluated to obtain better reproducers such as fertility, longevity, adult weight, scrotal circumference and sexual precocity (Lirón *et al.* 2012).

Sexual precocity is the reduction of age at puberty, which increases the reproductive efficiency of the herd, generating greater genetic gains by providing greater selection intensity (Formigoni, 2002). There is evidence that sexual precocity is genetically related to testicular volume (Lirón *et al.* 2012; Siqueira *et al.* 2012). Testicular volume is one of the most associated with reproductive fertility, performance factors and also interferes with physical and morphological traits of the sperm (Lirón *et al.* 2012; Brito *et al.* 2004).

The SC (scrotal circumference) is a reliable indicator of age at puberty in bulls (Lunstra e Cundiff, 2003). Moreover, it also has the advantage of being an easy to measure and of high reliability and repeatability variable. This measure is directly correlated with weight (0.69 a 0.94), AFB (age at first birth: 0.15), and PPB (probability of premature birth: 0.30). The AFB trait refers to the animal's potential to generate daughters whose first birth is more (or less) premature compared to the average of daughters of other animals. PPB expresses the probability

of a reproducer to generate daughters that impregnate prematurely and will calve early in up to 30 months old (Araujo Neto *et al.* 2011).

For having a high heritability, around 0.50 to 550 days of age in Nellore bulls, the EP is highly transmissible to the progeny (Cyrillo *et al.* 2001; Ortiz Pena *et al.* 2001). The estimate of how much the animal can contribute to his progeny compared to the average of other progeny is called "the expected progeny difference" (EPD). This measure has been an important tool for breeding programs to generate information about the value that a bull adds to his progeny compared to the average of other progeny for the trait of interest (Henderson, 1984). Thus, one can compare these traits between bulls and rank them. Among the tested EPD, the EPD SC at 365 days (EPD SC 365) of the animal's life (Olson *et al.* 1998) is the most widely used measure for the selection of the best reproducers on sexual precocity (Siqueira *et al.* 2012; Brito *et al.* 2004; Lunstra e Cundiff, 2003).

Besides the phenotypic evaluation of herds aided by EPD, the use of molecular markers of SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) type has been an important tool in bovine breeding programs, assisting in the selection of the best reproducers, accelerating the results obtained by phenotypic analysis and making the collected data more accurate and reliable (Marson *et al.* 2008). In the bovine genome, several polymorphisms SNP has been used in the selection of important reproductive traits for breeding programs (Li *et al.* 2009., Marson *et al.* 2008). The identification of informative SNPs for the trait of interest is an important selection tool since they can be used as molecular markers in search of superior animals. In the case of sexual precocity, animals with shorter reproductive cycles are selected, providing greater economic gain to producers (Marson *et al.* 2008).

There are some important genes for the maturation processes and sexual precocity. Among them, we can highlight the *B4galt1* gene (Beta 1,4 - galactosyltransferase), *LHR* (Luteinizing hormone receptor), *FSHR* (Follicle-stimulating hormone), and *IGF2* (Insulin-like growth factor 2). The *B4galt1* gene is translated into a glycosyltransferase involved in the biosynthesis of important carbohydrates for flagellar movement, binding of sperm to the zona pellucida, development of secondary sexual traits, and composition of seminal plasma (Matzuk

et al. 2008). The *LHR* and *FSHR* genes act by controlling the proliferation and differentiation of Sertoli and Leydig cells from the postnatal period until puberty and sexual maturity (Nogueira *et al.* 2006; Otsuka *et al.* 2001). The *IGF2* gene influences important traits of growth and development in bovine (Ruvinsky 1999; de Koning *et al.* 2002). This also stimulates cell proliferation (Brown *et al.* 2009; Chao & D' Amore 2008) and may be related to the increase of scrotal circumference (Flisikowski *et al.* 2005).

Because they are related to important pathways of reproductive development, the identification of SNPs in *B4Galt1*, *FSHR*, *LHR*, and *IGF2* genes that may be segregating with scrotal circumference, causing variation in this trait may provide data for marker-assisted selection, may be an important tool in the selection processes. Thus, the aim of this study was to determine the relationship of these polymorphisms with scrotal circumference in young Nelore bulls (*Bos taurus indicus*).

Material and methods

Peripheral blood samples were collected from bulls belonging to the Programa Nelore Brasil, which were divided into two groups according to their EPD SC 365, thus obtaining a group with 104 animals of positive EPD (EPD SC 365+) ranging from 0.04 and 1.28 and another with 74 animals of negative EPD (EPD SC 365-) between - 0.72 to -0.06. DNA extraction was performed according to saline precipitation method as described by Olerup and Zetterquist (1992) with some modifications.

The primers used to obtain fragments of interest to *B4galt1* (NCBI), *FSHR* (Marson et al, 2008), *LHR* (Marson et al, 2008), and *IGF2* (Smith et al, 2011a) genes are shown in Table 1.

Table 1. Sequences of the *primers* used to amplify the fragments of interest.

Gene/ Restriction site	Chromosom e	Primers	Sequence 5' - 3'	Reference	Product size (bp)
<i>B4Galt1</i>	8	Forward	TCCTTCACCCCTCATCACTC		524
RFLP/ <i>NcoI</i>		Reverse	AAACCCAGACAGCTGGTCAC		
<i>FSHR</i>	11	Foward	CTGCCTCCCTCAAGGTGCCCCTC	Marson <i>et al.</i> 2008	306
RFLP/ <i>AluI</i>		Reverse	CCCCCTAAGACATTTAGCCAAGAACT		
<i>LHR</i>	11	Forward	CCTCCGAGCATGACTGGAATGGC	Marson <i>et al.</i> 2008	303
RFLP/ <i>HhaI</i>		Reverse	GCCATTCCAGTCATGCTCGGAGG		
<i>IGF2</i>	29	Foward	GCCTCTCGCTGTCCTCTC	Silva <i>et al.</i> 2011a	193
RFLP/ <i>MboII</i>		Reverse	GAGGGGGCAGTTGAAGGAC		

Restriction site size (bp) *B4Galt1* (Beta 1,4- galactosyltransferase), *FSHR* (Follicle stimulating hormone receptor), *LHR* (Luteinizing hormone receptor), *IGF2* (Insuline growth factor 2); RFLP (Restriction fragment lengh polymorphism).

Amplification reactions were conducted in a final volume of 25pl and consisted of 100ng genomic DNA, 50mM MgCl₂, 1X buffer (200mM Tris pH 8.4, 500mM KCl), 5pmol of primer, 0.25mM dNTPs and 0.2U of Taq DNA polymerase enzyme (Invitrogen, Life technologies, Paisley, UK)

The temperature cycling consisted of an initial heating at 94° C for 5 minutes followed by 30 cycles of denaturation at 94° C for 30 seconds, annealing at 58° C (*B4Galt1*), 68° C (*LHR* and *FSHR*) and 60° C (*IGF2*) for 30 seconds and extension at 72° C for 30 seconds. After 30 cycles, it was added a final extension step at 72° C for 10 minutes. The amplification products were separated on a 2% agarose gel (Seaken, FMC Inc.) and stained with ethidium bromide (0.5mg/ml).

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)

After amplification, the PCR products were subjected to enzymatic digestion containing approximately 100ng of the amplified product and 0.4U of the corresponding restriction endonuclease, following the manufacturer's recommendations. After complete digestion of amplicons, the fragments were visualized on 10% polyacrylamide gels stained with silver nitrate 0.2%.

The allele and genotype frequencies for the two groups of animals (EPD SC 365- and EPD SC 365+) were determined according to Weir (1996) and the results were evaluated through ANOVA testing, considering $p \leq 0.05$ significant.

Correlation EPD SC365 and EPD AFB

In addition to the study of SNPs, a Pearson correlation analysis using PROC CORR of SAS statistical program was performed for the data set of the animals studied.

Results

Figure1 shows the analyzed fragments in the studied genes and their respective SNPs (NCBI).

Figure 1. Schematic representation of *B4Galt1* (1a), *FSHR* (1b), *LHR* (1c) and *IGF2* (1d). Black boxes represent the exons along the gene. The used primers and SNPs are highlighted in bold.

The found genotypes for each studied SNP in *B4Galt1*, *FSHR*, *LHR*, and *IGF2* genes are shown in Figure 2 where it can be observed that after digestion, the *B4Galt1* gene showed only one genotype (Figure 2a), thus demonstrating no genotypic variation between the groups. As for the *FSHR* gene the CG and GG (Figure 2b) genotypes are present. For the studied SNPs in *LHR* and *IGF2* genes, the CC, CT and TT (Figures 2.c and 2.d) genotypes were found.

Figure 2. Genotypes found for the studied genes (a) *B4Galt1*, (b) *FSHR*, (c) *LHR*, and (d) *IGF2*.

The table 2 shows the genotype and allele frequencies for each genotype found EPD ending on the group of bulls studied (EPD SC 365- and EPD SC 365+). For *B4Galt1* gene's polymorphism was found only the AA genotype, and their allelic frequencies in both groups $f(A) = 1$ and $f(G) = 0$, and the genotype $(AA) = 1$; $(GA) = 0$ and $(GG) = 0$. For the *FSHR* gene's polymorphism, the GG and CG genotypes were found, whose genotype frequencies for the group with EPD SC 365 - were $f(GG) = 0.135$, $f(CG) = 0.865$ and allele frequencies were $f(C) = 0.432$ $f(G) = 0.568$. In the group with EPD SC 365+ genotypic and allelic frequencies were, respectively, $f(GG) = 0.048$, $f(CG) = 0.951$, $f(C) = 0.476$ and $f(G) = 0.524$ ($p = 0.8454$).

The *LHR* gene's polymorphism showed CC, CT and TT genotypes, with genotype frequencies of 0.055, 0.739 and 0.205, respectively, in the group with EPD -. Allele frequencies were $f(C) = 0.158$ and $f(T) = 0.842$. In the group with EPD +, the frequencies were $f(CC) = 0.433$, $f(TT) = 0.519$, $f(CT) = 0.048$, $f(C) = 0.457$ and $f(T) = 0.543$ ($p < 0.0001$).

Regarding the *IGF2*'s polymorphism, the group with EPD - resulted in the following genotypic frequencies for CC, CT and TT, respectively: 0.657, 0.095 and 0.246. The

allele frequencies of the *IGF2* gene were $f(T) = 0.220$ and $f(C) = 0.780$. In the group of EPD +, genotypic and allelic frequencies were as follows: $f(CC) = 0.371$, $f(TT) = 0.238$ and $f(CT) = 0.390$; $f(C) = 0.567$ and $f(T) = 0.433$ ($p = 0.0083$).

Table 2. Allele and genotype frequencies for each SNP according to the phenotype of EPD SC 365.

<i>B4galt1/ RFLP NcoI</i>	f (AA)	f (GA)	f (GG)	f (A)	f (G)	<i>p</i> value
EPD SC 365 -	1	0	0	1	0	N/A
EPD SC 365 +	1	0	0	1	0	
<i>FSHR/ RFLP AluI</i>	f (CC)	f (GG)	f (CG)	f (C)	f (G)	
EPD SC 365 -	0	0.135	0.865	0.432	0.568	0.8454
EPD SC 365 +	0	0.048	0.951	0.476	0.524	
<i>LHR/ RFLP HhaI</i>	f (CC)	f (TT)	f (CT)	f (C)	f (T)	
EPD SC 365 -	0.055	0.739	0.205	0.158	0.842	<0.0001
EPD SC 365 +	0.433	0.519	0.048	0.457	0.543	
<i>IGF2/ RFLP MboII</i>	f (CC)	f (TT)	f (CT)	f (C)	f (T)	
EPD SC 365 -	0.657	0.095	0.246	0.780	0.220	0.0083
EPD SC 365 +	0.371	0.238	0.390	0.567	0.433	

B4Galt1 (beta 1,4 - galactosyltransferase), *FSHR* (Follicle-stimulating hormone receptor), *LHR* (Luteinizing hormone receptor), and *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) / RFLP (Restriction fragment length polymorphism); Restriction Enzymes *NcoI*, *AluI*, *HhaI*, *MboII*; EPD SC 365 (-) = negative, EPD SC 365 (+) = positive; f (allelic or genotypic frequencies). $p \leq 0.05$.

The data showed for the studied SNP in the *FSHR* gene were not statistically significant ($p = 0.8454$). In the case of the SNP located in the *LHR* gene, the CC genotype was present in greater number in animals with EPD SC 365+ while the TT predominated in the group of EPD EP 365- ($p < 0.0001$).

Additionally, the results for the SNP of *IGF2* gene predominated TT genotype in the group of EPD SC 365+, whereas in the group of EPD SC 365- prevailed the CC genotype (p

= 0.0083). The *B4galt1* gene showed a prevalence of only one genotype (AA) among the studied animals, in both of those with EPD SC 365 positive and negative.

As the SC is directly related to AFB (Araujo Neto *et al*, 2011), it was verified that the Pearson correlation coefficient between expected progeny difference for the 178 animals (EPD SC365 and EPD AFB) was -0.23 ($p < 0.01$).

Discussion

The importance of studies on molecular markers related to reproductive traits is of fundamental importance in bovine breeding programs to help select the best reproducers, resulting in an increased reproductive efficiency and hence greater profitability in the supply chain. In this sense, the SC has been widely used in herds genetic enhancement programs because it is a very important trait when it comes to reproduction (Lunstra e Cundiff, 2003).

Compared with other reproductive traits, the SC has a high heritability (approximately 0.50) and is directly associated with sexual precocity, being an important trait when selecting the most premature animals in order to increase fertility rates of the herd (Dias *et al.*, 2003). The high heritability for SC indicates that there is a considerable additive genetic variability for this trait (Cyrillo *et al*, 2001; Ortiz Pena *et al*, 2001.). Thus, economically, the quality semen implies a rapid return of capital invested in the maintenance of a reproducer, especially when this semen it is intended for artificial insemination and the reproducer has other traits of interest that determine their intense use in livestock (Silva *et al.*, 1993).

The SC, in addition to directly influence semen quality, resulting in high sperm motility (60-80%) and improved morphology is genetically correlated with libido and AFB in bovine animals (Silva *et al.*, 2011b). In this study we verified the correlation between the EPD SC 365 and EPD AFB traits in the study population to confirm these findings in literature. Such traits were highly correlated (- 0.23) and so, with higher values for scrotal circumference at 365 days indicate that the progeny of these animals have a lower age at first birth. This suggests that EPD SC 365 is an important measure to be used in the selection of the best reproducers.

When it aims at the reduction of age at puberty through selection for SC, the most appropriate measurement is at 12 months of age to result in the selection of animals that have higher levels of gonadotropic hormones, culminating in puberty, beginning of reproductive activity of male and females, earlier conceptions in the first breeding season and advance dates from the first calving. In addition, to select males for SC at 365 days identifies the best animals from the young age (Quirino *et al.*, 1999). On the other hand, the absence of selection for sexual precocity can result in genetically inferior herds, with late productive age, less profitable and increased intervals between generations. Studies have shown that, while some Nellore bulls achieved to present 55% of pregnant daughters at 14 months, others had only 1 or 2%, clearly indicating that daughters of some bulls reach puberty earlier while daughters of other bulls are more late (Eler, Ferraz e Teixeira., 2010).

The use of molecular markers of SNP type complements the phenotypic selection made by the EPD s, making the collected data more accurate, reliably, and faster (Marson *et al.*, 2008). The *B4Galt1* gene is conserved in human, dogs, chickens, and mice and is involved in the maturation, sperm motility, in the fertilization process, sperm binding to the zona pellucida, and sexual traits development (Shi *et al.*, 2004). Despite this information, the exclusive presence of the AA genotype in this study showed that this polymorphism should not be used as a marker of EPD SC 365 in Nellore bulls due to not showing variation in the groups studied. However, this result is new since there is not enough information in the literature to date regarding the studied polymorphism in this gene in Nellore. Other studies using the same gene in Holstein bulls showed allelic variation which was more related to milk production than with sexual maturation (Shahbazkia et al., 2012).

The results observed for the SNP of *FSHR* gene showed no statistical difference between the studied groups ($p = 0.8454$), indicating that this SNP is not appointed to assist in the identification of bulls precocity. One should note that this result may have been generated due to sample size or the breed used in this study, requiring further studies to confirm the results.

Regarding the *LHR* and *IGF2* genes, it can be said that the studied polymorphisms present themselves as potential markers of EPD SC 365 due to its genotype distribution among the studied animals and their involvement in sperm maturation process (Brown *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2006). In the case of the *LHR* gene, the found CC genotype may be related to the greater EPD SC 365 ($p < 0.0001$), as was predominantly present in animals EPD 365+. This result is in line with other studies that have also shown positive results in the use of the *LHR* gene polymorphisms as markers for reproductive traits (Liron *et al.*, 2012; Marson *et al.*, 2008). Regarding the *IGF2* gene, studies have shown associations of this gene with phenotype of growth, development and size of the animals, possibly making the studied SNP a potential molecular marker (Foulstone *et al.*, 2005). In the present study, we found that the TT genotype for the analyzed SNP is the best selector of animals with greater EPD SC 365 ($p = 0.0083$). A similar study using the Angus breed, selected the genes *GNRHR*, *LHR* and *IGF1*, and associated their polymorphisms with the age of puberty in male cattle. As results, *IGF1* is a regulator of the arrival to puberty in male calves and is involved in the events that precede and initiate puberty in bull calves (Liron *et al.*, 2012).

Many other SNPs located in different genes have been used as molecular markers. In bulls of Holstein breed, studies in *STAT5A*, *FGF2*, and *PGR* genes confirmed the association of SNPs in these genes related to reproductive traits (Cochran *et al.*, 2013). In Jersey cows, SNPs present in *CWC15* gene showed a direct relation with their reproductive efficiency (Sonstegard *et al.*, 2013). Additionally, it has also been reported in humans that polymorphisms located in *LIN28B* and *KISS1* genes are associated with puberty (Park *et al.*, 2012; Tommiska *et al.*, 2011).

Reproductive traits are important research targets to animal enhancement. The early prediction using genetic markers is therefore the goal is for livestock breeding. This paper, besides reaffirming the strong correlation between EPD SC 365 and EPD AFB, showed SNPs located in *LHR* and *IGF2* genes that may be indicators of greater SC and consequently be used in selecting sexually premature bulls in Nellore breed. This fact contributes to the research

conducted about molecular markers as it aids in phenotypic selection of the best reproducers suggesting that these SNPs may be potential markers for the EPD SC 365 trait.

Thanks

To funding agencies FAPESP (Foundation for Research Support of the State of São Paulo) and CNPq (National Council for Scientific and Technological Development). To ANCP (National Association of Breeders and Researchers) and research professor Pedro Alejandro Vozzi for the statistical analysis.

References

Araujo Neto, F. R., Lôbo, R. B., Mota, M. D. S., & Oliveira, H. N. (2011). Genetic parameter estimates and response to selection for weight and testicular traits in Nelore cattle. *Genetics and molecular research : GMR*, 10(4), 3127-40.

Bagnicka, E., Siadkowska, E., Strzalkowska, N., Zelazowska, B., Flisikowski, K., Krzyzewski, J., & Zwierzchowski, L. (2010). Association of polymorphisms in exons 2 and 10 of the insulin-like growth factor 2 (IGF2) gene with milk production traits in Polish Holstein-Friesian cattle. *The Journal of dairy research*, 77(1), 37-42.

Brito, L. F. C., Silva, A. E. D. F., Unanian, M. M., Dode, M. a N., Barbosa, R. T., & Kastelic, J. P. (2004). Sexual development in early- and late-maturing Bos indicus and Bos indicus x Bos taurus crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology*, 62(7), 1198-217.

Brown, J., Jones, E. Y., & Forbes, B. E. (2009). Keeping IGF-II under control: lessons from the IGF-II-IGF2R crystal structure. *Trends in biochemical sciences*, 34(12), 612-9.

Chao, W., & D'Amore, P. a. (2008). IGF2: epigenetic regulation and role in development and disease. *Cytokine & growth factor reviews*, 19(2), 111-20.

Cochran, S. D., Cole, J. B., Null, D. J., & Hansen, P. J. (2013). Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. *MCgenetics*, 14(1), 49.

De Koning, D.-J., Bovenhuis, H., & van Arendonk, J. a M. (2002). On the detection of imprinted quantitative trait loci in experimental crosses of outbred species. *Genetics*, 161(2), 931-8.

Dias, L. T., Faro, L. El, & Albuquerque, L. G. De. (2003). Estimativas de Herdabilidade para Perímetro Escrotal de Animais da Raça Nelore 1 Heritability Estimates for Scrotal Circumference in Nelore Cattle R 2003, 1878-1882.

Econ, D. E. V., Character, M. P., De, S. C., Sele, N. D. E., & Corte, E. M. B. D. E. (2002). Ivan Borba Formigoni.

Eler, J.P., Ferraz, J.B.S., Teixeira, L.A. (2010). Seleção para precocidade em novilhas de corte. In: Editor: Alexandre Vaz Pires. (Org.). Bovinocultura de corte. *Piracicaba: Fealq*, v. II, p. 801-811.

Emidio, A., Feliciano, D., Unanian, M. M., Maria, C., Cordeiro, T., & Freitas, A. R. De. (2002). Relação da Circunferência Escrotal e Parâmetros da Qualidade do Sêmen em Touros da Raça Nelore , PO Relationship of Scrotal Circumference and the Semen Quality Parameters in Nellore Purebred Bulls, 1157-1165.

Flisikowski, K., Maj, A., Zwierzchowski, L., Adamowicz, T., Switonski, M., Foulstone, E., Prince, S., Zaccheo, O., Burns, J. L., Harper, J., Jacobs, C., Hassan, a B. (2005). Insulin-like growth factor ligands, receptors, and binding proteins in cancer. *The Journal of pathology*, 205(2), 145-53.

Henderson, C. R. (n.d.). Applications of Linear Models in Animal Breeding Models.

Hiendleder, S., & Pareek, C. (2005). Nucleotide Sequence and Variation of IGF2 Gene Exon 6 in Bos Taurus and Bos Indicus Cattle. *AnimalBiotechnology*, 16(2), 203-208.

Li, Q., McKenzie, L. J., & Matzuk, M. M. (2008). Revisiting oocyte-somatic cell interactions: in search of novel intrafollicular predictors and regulators of oocyte developmental competence. *Molecular human reproduction*, 14(12), 673-8.

Lirón, J. P., Prando, A. J., Fernández, M. E., Ripoli, M. V, Rogberg-Munoz, A.,

Goszczynski, D. E., Giovambattista, G. (2012). Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC genetics*, 13(1), 26.

Lunstra, D. D., & Cundiff, L. V. (2003). The online version of this article , along with updated information and services , is located on the World Wide Web at: Growth and pubertal development in Brahman- , Boran- , Tuli- , Belgian Blue- , Hereford- and Angus-sired F1 bulls 1 , 2, 1414-1426.

Manuscript, A. (2009). NIH Public Access, 19(2), 111-120.

Marson, E. P., Ferraz, J. B. S., Meirelles, F. V, Balieiro, J. C. C., & Eler, J. P. (2008). Effects of polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a Bos taurus x Bos indicus beef composite population. *Genetics and molecular research : GMR*, 7(1), 243-51.

Nogueira, M. F. G., Jr, J. B., Price, C. A., & Castilho, A. C. S. (2007). Expression of LH Receptor mRNA Splice Variants in Bovine Granulosa Cells : Changes With Follicle Size and Regulation by FSH In Vitro, 686.

Olson, T. a, Euclides Filho, K., Cundiff, L. V, Koger, M., Butts, W. T., & Gregory, K. E. (1991). Effects of breed group by location interaction on crossbred cattle in Nebraska and Florida. *Journal of animal science*, 69(1), 104-14.

Othman, O. E. (2013). RFL polymorphism of three fertility genes in Egyptian buffalo, 7(2), 94-101.

Otsuka, F., Yamamoto, S., Erickson, G. F., & Shimasaki, S. (2001). Bone morphogenetic protein-15 inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing FSH receptor expression. *The Journal of biological chemistry*, 276(14), 11387-92.

Park, S. W., Lee, S.-T., Sohn, Y. B., Cho, S. Y., Kim, S.-H., Kim, S. J., Jin, D.-K. (2012). LIN28B polymorphisms are associated with central precocious puberty and early puberty in girls. *Korean journal of pediatrics*, 55(10), 388-92.

Quirino, C., Bergmann, J., Vale Filho, V., Andrade, V., & Pereira, J. (1999). Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in nellore bulls. *Theriogenology*, 52(1), 25-34.

- Ruvinsky, A. (1999). Basics of gametic imprinting. *Journal of animal science*, 77 Suppl 2, 228-37.
- Sciences, R. (2008). reproductive Fertility in Herd Bulls, (June).
- Shahbazkia, H. R., Aminlari, M., & Cravador, A. (2012). Association of polymorphism of the P(1, 4)-galactosyltransferase-I gene with milk production traits in Holsteins. *Molecular biology reports*, 39(6), 6715-21.
- Shi, S., Williams, S. A., Seppo, A., Kurniawan, H., Chen, W., Ye, Z., Stanley, P. (2004). Inactivation of the Mgat1 Gene in Oocytes Impairs Oogenesis , but Embryos Lacking Complex and Hybrid N-Glycans Develop and Implant, 24(22), 9920-9929.
- Silva, A. M., Rios, A. F. L., Ramos, E. S., & Lôbo, R. B. (2011a). Association between IGF2 and CYP21 gene polymorphisms and characteristics of economic interest in Nellore cattle, 21(3), 2140-2147.
- Silva, M. R., Pedrosa, V. B., Silva, J. C. B., Eler, J. P., Guimarães, J. D., & Albuquerque, L. G. (2011b). Testicular traits as selection criteria for young Nellore bulls. *Journal of animal science*, 89(7), 2061-7.
- Siqueira, J. B., Oba, E., Pinho, R. O., Quintino, H. P., Eler, J. P., Miranda Neto, T., Guimarães, J. D. (2012). Heritability estimate and genetic correlations of reproductive features in Nellore bulls, offspring of super precocious, precocious and normal cows under extensive farming conditions. *Reproduction in domestic animals = Zuchthygiene*, 47(2), 313-8.
- Sonstegard, T. S., Cole, J. B., VanRaden, P. M., Van Tassell, C. P., Null, D. J., Schroeder, S. G., McClure, M. C. (2013). Identification of a nonsense mutation in CWC15 associated with decreased reproductive efficiency in Jersey cattle. *PloS one*, 8(1), e54872.
- Tommiska, J., Sorensen, K., Aksglaede, L., Koivu, R., Puhakka, L., Juul, A., & Raivio, T. (2011). LIN28B, LIN28A, KISS1, and KISS1R in idiopathic central precocious puberty. *BMC research notes*, 4(1), 363.
- Weir, B. S. (n.d.). Genetic Data Analysis II Methods for Discrete. NCBI. Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=b4galt1>. Accessed on April 19th, 2010.