

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA  
Colegiado do Curso de Pós-Graduação em Ciência Animal**

**Estudo clínico-andrológico e genético-molecular da subfertilidade em  
touros da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*)  
no Estado de Minas Gerais**

Guilherme Silva Moura

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG  
2013

Guilherme Silva Moura

**Estudo clínico-andrológico e genético-molecular da subfertilidade em  
touros da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*)  
no Estado de Minas Gerais**

Tese apresentada à Escola de Veterinária da  
Universidade Federal de Minas Gerais, como  
requisito parcial para obtenção do grau de  
Doutor em Ciência Animal.

Área de Concentração: Reprodução Animal

Orientador: *Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho*

Co-orientador: *Prof. Venício José de Andrade*

Co-orientador: *Profa. Maria Raquel Santos Carvalho*

BELO HORIZONTE  
ESCOLA DE VETERINÁRIA - UFMG  
2013

M929e Moura, Guilherme Silva, 1980-  
Estudo clínico-andrológico e genético-molecular da subfertilidade em touros da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*) no Estado de Minas Gerais / Guilherme Silva Moura. – 2013.

95 p. : il.

Orientador: Vicente Ribeiro do Vale Filho

Co-orientador: Venício José de Andrade, Maria Raquel Santos Carvalho

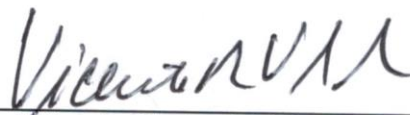
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

Inclui bibliografia

1. Gir (Zebu) – Reprodução – Teses. 2. Fecundidade – Teses. 3. Andrologia veterinária – Teses. 4. Testículos – Doenças – Teses. 5. Reprodução animal – Teses. I. Vale Filho, Vicente Ribeiro do. II. Andrade, Venício José de. III. Carvalho, Maria Raquel Santos. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Escola de Veterinária. V. Título.

CDD – 636.208 926

Tese defendida e aprovada em 25 de abril de 2013, pela Comissão Examinadora constituída por:



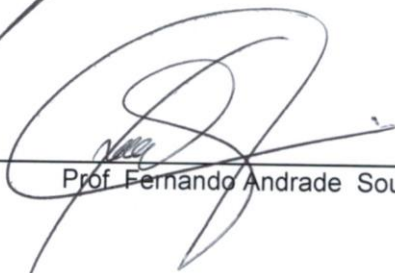
---

Prof. Vicente Ribeiro do Vale Filho  
Presidente



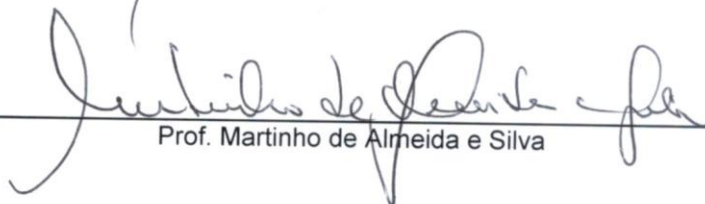
---

Prof. Guilherme Ribeiro Valle



---

Prof. Fernando Andrade Souza



---

Prof. Martinho de Almeida e Silva



---

Dr. Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva

*À minha mãe Magda, pelo incentivo,  
apoio, amor e modelo de vida.*

Dedico

*“No meio da dificuldade encontra-se a  
oportunidade.”*

*“O importante é não parar de questionar.”*

Albert Einstein

---

## AGRADECIMENTOS

---

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), à Escola de Veterinária e ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, pela oportunidade da realização do curso de doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

À FAPEMIG, pelo financiamento do material utilizado durante o experimento.

Ao professor Vicente Ribeiro do Vale Filho, pela orientação, pela amizade e pelos conselhos fundamentais para realização deste trabalho.

Ao professor Venício José de Andrade, pela co-orientação, pela amizade, e pelo apoio no laboratório.

À professora Maria Raquel Santos Carvalho, pela co-orientação, pelo apoio nas análises genético-moleculares, e pela amizade.

Aos professores Fernando Andrade Souza, Guilherme Ribeiro Valle e Martinho de Almeida e Silva e ao Dr. Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva, por fazerem parte da banca examinadora.

Aos demais professores responsáveis pela minha formação acadêmica, pelos ensinamentos e conselhos.

Aos integrantes do Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, por permitirem e realizarem as análises de DNA em suas dependências.

A Izinara, pela amizade, por sempre estar a disposição em ajudar e por ter realizado as análises genético-moleculares no Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

A EMBRAPA - Gado de Leite, por propiciar as análises em GWAS das amostras coletadas, em especial aos Drs. Marcus Vinicius Gualberto Barbosa da Silva e Marco Antônio Machado.

Aos integrantes Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Parasitologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Por permitirem o uso de suas dependências. Em especial à Professora Héliida Monteiro de Andrade pelos ensinamentos passados.

Ao Dr. Nilson José de Azevedo, por ser um mediador entre a equipe e os proprietários das fazendas.

Aos proprietários das fazendas que cederam os animais e acomodações, pela acolhida, receptibilidade, amizade e por permitir a realização do experimento.

Aos amigos e funcionários das fazendas, pela ajuda prestada.

Aos Animais, por serem objeto do meu estudo.

Ao amor da minha vida, Luli, pelo apoio e companheirismo durante esta minha jornada e pelo seu amor.

Ao meu PAI, pelo exemplo e ensinamentos. Saudades eternas.

Aos meus irmãos Júnior, Marcelo e João Alfredo, às minhas cunhadas Tatiana, Josélia e Leia, as minhas sobrinhas Bia, Marina, Gabi e Alice, por me apoiarem, estarem ao meu lado em todos os momentos e me ensinarem a cada dia o significado da palavra FAMÍLIA.

À Tia Marina, pelo exemplo de vida e amor incondicional.

Aos amigos da reprodução, Felipe, Fernando, Gilson, Lucas, Anibal, Ticiano, Jorge, Pablo, Paulo, Cíntia, Carol da Noruega, João Lucas, Zé Neto, Armando e Bruno, pela convivência e amizade nestes quatro anos.

Ao professor Roberto Maurício Carvalho Guedes, pela compreensão e atenção nos assuntos referentes à pós-graduação.

Às meninas da Pós-Graduação em Ciência Animal, sempre com a maior boa vontade para resolver qualquer problema que aparecesse.

Ao Dário Dias, pela amizade e convívio nas APIC's, aulas práticas e na escola, sempre disposto a dar uma mão.

Aos demais funcionários da Escola de Veterinária da UFMG, pela colaboração e pelo convívio.

Aos amigos e colegas de curso, Fernando "Baby", Betina, Helber, Daniel Otoni, Telma, Harashiro, Patrícia, Carol, Pedro "tio Chico", Amanda, Moisés, Marina, Ronaldo, Rebeca, Clara, Laura e Carlos pela amizade e convivência.

A todos que, direta e indiretamente, contribuíram para a elaboração desta tese.



---

## BIOGRAFIA

---

GUILHERME SILVA MOURA, filho de Antônio da Mota Moura e Magda Fonseca e Silva Moura, nasceu em Belo Horizonte, Minas Gerais, em 20 de julho de 1980.

Em dezembro de 1998, finalizou o 2º Grau em Belo Horizonte, Minas Gerais, e em agosto de 1999, ingressou na Universidade Federal de Minas Gerais, no curso de Medicina Veterinária, colando grau em 14 de janeiro de 2005.

Em abril de 2005, ingressou no *International Farm Fellows Program* da University of Florida, concluindo o programa em abril de 2006.

Em outubro de 2006, iniciou o Programa de Pós-Graduação do Departamento de Zootecnia da UFV, em nível de Mestrado, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal, obtendo o título de Mestre em Zootecnia em 30 de julho de 2008.

Em março de 2009, iniciou o Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Escola de Veterinária da UFMG, em nível de Doutorado, concentrando seus estudos na área de Reprodução Animal, submetendo-se à defesa de tese em 25 de abril de 2013.

---

## SUMÁRIO

---

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>HIPÓTESES</b> .....	<b>17</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
<b>Aspectos clínico-andrológicos</b> .....	<b>18</b>
Seleção dos animais .....	18
Identificação e Anamnese .....	18
Exame clínico geral.....	19
Exame do sistema genital.....	19
Espermograma .....	19
Classificação Andrológica por Pontos (CAP) .....	20
Patologias mais comuns do sistema reprodutor de touros .....	21
<b>Aspectos genéticos</b> .....	<b>23</b>
Genes candidatos.....	23
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>24</b>
<b>ARTIGO 1</b> .....	<b>28</b>
<b>PERFIL CLÍNICO-ANDROLÓGICO E ANÁLISE COMPARATIVA DO SÊMEN ENTRE TOUROS NORMAIS E COM HIPOPLASIA TESTICULAR NA RAÇA GIR LEITEIRO</b> .....	<b>28</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>28</b>
<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>29</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>29</b>
<b>Das propriedades</b> .....	<b>29</b>

Dos animais .....	30
Exame Andrológico .....	31
Classificação dos Touros Quanto à Aptidão Reprodutiva Baseada no espermiograma. ....	31
Classificação dos Touros Quanto à Aptidão Reprodutiva Baseada na CAP .....	32
Estatística .....	32
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>44</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>44</b>
<b>CAPÍTULO 3.....</b>	<b>47</b>
<b>ARTIGO 2.....</b>	<b>47</b>
<b>VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DO TSPY ENTRE TOUROS NORMAIS E COM HIPOPLASIA TESTICULAR NA RAÇA GIR LEITEIRO..</b>	
<b>RESUMO.....</b>	<b>47</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>48</b>
Amostra .....	48
Extração do DNA .....	49
PCR em tempo real .....	49
Quantificação relativa de DNA amplificado .....	49
Determinação do número de cópias.....	50
Análises estatísticas .....	50
<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>50</b>

<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>52</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>52</b>
<b>CAPÍTULO 4.....</b>	<b>54</b>
<b>ARTIGO 3.....</b>	<b>54</b>
<b>IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES PARA INFERTILIDADE EM TOUROS DA RAÇA GIR LEITEIROPOR MEIO DE ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO EM ESCALA GENÔMICA (GWAS) .....</b>	<b>54</b>
<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>55</b>
<b>MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>55</b>
<b>Estatística .....</b>	<b>56</b>
<b>GWAS.....</b>	<b>56</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICE 1.....</b>	<b>66</b>

---

---

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 1**

---

Tabela 1	Tabela 1 - CAP- Classificação Andrológica por Pontos, para touros <i>Bos taurus indicuse Bos taurus taurus</i>	21
----------	--	----

---

**LISTA DE TABELAS****CAPÍTULO 2**

---

Tabela 1	Classificação dos touros quanto à aptidão reprodutiva	31
Tabela 2	CAP- Classificação Andrológica por Pontos, para touros <i>Bos taurus indicus</i> e <i>Bos taurus taurus</i>	32
Tabela 3	Médiados pesos e idades (meses) dos 311 touros Gir Leiteiro em função do tipo de suplementação fornecida pela fazenda de origem, no estado de Minas Gerais	33
Tabela 4	Percentual médio de gota citoplasmática proximal em 277 tourinhos da raça Gir Leiteiro, classificados como clinicamente normais, imaturos sexualmente e com maturidade sexual retardada em função da faixa etária.	33
Tabela 5	Frequência de distúrbios andrológicos detectados em 112 touros Gir Leiteiro, de um total de 311 avaliados, originários de dois grupos de fazendas (CS ou SS), em Minas Gerais	35
Tabela 6	Prevalência da hipoplasia testicular em 18 touros Gir Leiteiro de 23 a 60 meses de idade, oriundos de seis fazendas, de Minas Gerais, quanto ao(s) testículo(s) afetado(s)	36
Tabela 7	Níveis de expressividade clínica-testicular e de qualidade de sêmen em touros da raça Gir Leiteiro, entre 23 e 60 meses, com hipoplasia testicular, oriundos de seis rebanhos, do Estado de Minas Gerais.	37
Tabela 8	Médias de peso corporal, circunferência escrotal (CE), biometrias testiculares de touros Gir Leiteiro clinicamente normais (n = 168) e com hipoplasia testicular (n= 18).	39
Tabela 9	Médias de peso e biometria testicular de touros Gir Leiteiro CS normais clinicamente (n=105) e com diagnóstico de hipoplasia testicular (n=10)	40
Tabela 10	Médias de peso e biometria testicular de touros Gir Leiteiro SS normais clinicamente (n=63) e com diagnóstico de hipoplasia testicular (n=8)	41
Tabela 11	Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros Gir Leiteiro clinicamente normais e com diagnóstico de hipoplasia testicular	42

Tabela 12	“Classificação Andrológica por Pontos” (CAP), em dois grupos de animais clinicamente normais, um com suplementação nutricional e outro sem suplementação nutricional	44
-----------	--	----

---

**LISTA DE TABELAS**  
**CAPÍTULO 3**

---

Tabela 1	Média do número de cópias do TSPY em touros da raça Gir Leiteiro normais clinicamente ou com hipoplasia testicular	50
----------	--	----

---

**LISTA DE TABELAS**  
**CAPÍTULO 4**

---

Tabela 1	Marcadores que apresentaram correlação significativa em GWAS, par-a-par	57
----------	---	----

---

---

**LISTA DE FIGURAS****Capítulo 2**

---

Figura 1	Animais oriundos da fazenda 4, pertencentes ao grupo com suplementação nutricional	30
Figura 2	Animais oriundos da fazenda 6, pertencentes ao grupo sem suplementação nutricional	30
Figura 3	Distribuição da porcentagem de defeitos espermáticos maiores, defeitos espermáticos totais e gota citoplasmática proximal em função da faixa etária 2 (18 a 23 meses) de 60 tourinhos da raça Gir Leiteiro	34
Figura 4	Animais 1, 2 e 3 apresentam hipoplasia testicular com graus de assimetria diferentes; Animal 4 é clinicamente normal.	38
Figura 5	Quadro espermático de quatro animais com hipoplasia testicular; 1 = animal com oligospermia e espermatozóides apresentando defeitos na peça intermediária e com <i>pouch formation</i> ; 2 = animal com oligospermia e espermatozóides apresentando gota citoplasmática proximal; 3 = espermatozóides apresentando contorno anormal, gota citoplasmática distal e cabeça piriforme; 4 = concentração espermática normal e espermatozóides com cabeça piriforme, gota citoplasmática proximal e contorno anormal.	43
Figura 6	Quadro espermático de quatro animais clinicamente normais.	43

---

**LISTA DE FIGURAS****Capítulo 4**

---

Figura 1	Manhattan plots de valores de P para as variáveis de fertilização (A) largura do testículo direito (B). cauda espermática dobrada ( $p < \log^{-5}$ )	61
----------	---	----

---

---

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

Aw	Clima Tipo Tropical com Estação Seca
BSE	Breeding Soundness Evaluation
CAP	Classificação Andrológica por Pontos
CE	Circunferência Escrotal
CONC	Concentração Espermática
CS	Rebanho com Suplementação Nutricional
CT	Comprimento Testicular
Cwa	Clima Tipo Subtropical Úmido
DM	Defeito Espermático Maior
Dm	Defeito Espermático Menor
DT	Defeito Espermático Total
EPM	Erro Padrão da Média
GCD	Gota Citoplasmática Distal
GCP	Gota Citoplasmática Proximal
HT	Hipoplasia Testicular
LT	Largura Testicular
MOT	Motilidade Espermática Progressiva
NAP	Proteínas nucleoácidas
PB	Proteína bruta
PI	Defeito na Peça Intermediária
PV	Peso Vivo
SET	Proteína SET
SNPs	Single-nucleotide Polymorphism
SRY	Gene Determinante Sexual do Cromossoma Y
SS	Rebanho sem Suplementação Nutricional
TD	Testículo Direito
TE	Testículo Esquerdo
TSPY	Testis-specific Protein Y-coded
TURB	Turbilhonamento Espermático ou Motilidade Espermática de Massa
VIG	Vigor Espermático
VL	Valor Limiar
VOL	Volume Testicular
Yp	Braço Curto do Cromossoma Y
Yq	Braço Longo do Cromossoma Y

---



## RESUMO

A raça Gir Leiteiro tem sido alvo de grande interesse em razão de sua adaptação às condições climáticas do Brasil e à produção leiteira altamente expressiva, mas com relatos de dificuldades reprodutivas. Objetivou-se neste estudo caracterizar a frequência de animais com hipoplasia testicular (HT), a correlação entre o número de cópias do gene *testis-specific protein Y-coded* (TSPY) entre touros normais (N) e com HT, e identificar genes candidatos para subfertilidade com bases em estudo de associação em escala genômica (GWAS) em touros Gir Leiteiro. 311 touros, de seis fazendas de Minas Gerais (com e sem suplementação nutricional), foram submetidos a exame andrológico. Idade, peso corporal (PC), circunferência escrotal, biometria testicular, análises físicas e morfológicas do sêmen foram comparados. As variáveis qualitativas foram analisadas pelo teste Mann-Whitney e as quantitativas pelo t de Student ( $P < 0,05$ ). Foram selecionados 12 animais com HT e 12 N para as análises de número de cópias do TSPY. A quantidade destas foi estabelecida por PCR em tempo real e comparadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). Para GWAS foram genotipados 60 indivíduos (30 N e 30 afetados). Estes indivíduos foram genotipados com a plataforma Affymetrix Axion Genome-wide Bos 1 array, 648k. O fenótipo utilizado no mapeamento foi o resíduo dos efeitos de idade, suplementação, data da coleta e pai. Os resultados foram filtrados para exclusão de SNPs com resultados de baixa qualidade ou com MAF menor do que 0,03 e considerados significativos quando  $-\log_{10}(\text{valor } P) \geq 5$ . Foi observado que a HT ocorreu em 5,79% de touros. Observou-se ainda, exceto PC, que os parâmetros estudados, registraram diferença ( $P < 0,05$ ) entre touros N e com HT. Para o número de cópias do TSPY houve diferença ( $P < 0,05$ ) entre touros N (164,6) e HT (172,5). Houve associações com a subfertilidade e genes nos cromossomas BTA11, BTA16 e BTAX. Conclui-se que há touros HT em rebanhos independente da nutrição. O número de cópias do TSPY foi maior em animais HT do que N. E há associação entre genes localizados nos cromossomas BTA11, BTA16 e BTAX e a subfertilidade no Gir Leiteiro.

Palavras Chave: andrologia, fertilidade, GWAS, Hipoplasia testicular, TSPY, zebu.

### Abstract

*The Dairy Gyr breed has been the subject of great interest because of its adaptation to climatic conditions in Brazil and the highly expressive milk production, but with reproductive difficulties reported. This study aimed to characterize the frequency of animals with testicular hypoplasia (TH), the correlation between the number of copies of the testis-specific gene protein Y-coded (TSPY) between normal bulls (N) and TH, and to identify candidate genes for sub-fertility with bases in genome wide association study (GWAS) in Dairy Gyr bulls. 311 bulls from six farms in Minas Gerais (with and without nutritional supplementation), underwent soundness examination. Age, body weight (BW), scrotal biometry, physical and morphological semen analyzes were compared. Qualitative variables were analyzed by Mann-Whitney test and quantitative by Student t-test ( $P < 0.05$ ). 12 animals with TH and 12 N were selected for the analysis of copy number of TSPY. The amount of these was established by real time PCR and compared by Student t-test ( $P < 0.05$ ). GWAS for 60 individuals (30 affected and 30 N) were genotyped. These individuals were genotyped with the Affymetrix platform Axion Genome-wide Bos 1 array, 648k. The phenotype mapping is used in the residue of the effects of age, supplementation, date of collection and sire. The results were filtered to exclude SNPs with low quality results MAF or less than 0.03 and considered significant when  $-\log_{10}(P \text{ value}) \geq 5$ . It was observed that the TH occurred in 5.79% of bulls. It was also observed in the parameters studied recorded difference ( $P < 0.05$ ) between bulls N and HT, except BW. The number of copies of TSPY was different ( $P < 0.05$ ) between N (164.6) and TH (172.5) bulls. There were associations with sub-fertility and genes on chromosomes BTA11, BTA16 and BTAX. It was conclude that there were TH bulls in herds that independent of nutrition. The number of copies of TSPY TH animals was higher than N ones. And there were associations between genes located on chromosomes BTA11, BTA16 and BTAX and sub-fertility in Dairy Gyr.*

*Key words: andrology, fertility, GWAS, testicular hypoplasia, TSPY, zebu.*

# CAPÍTULO 1

## INTRODUÇÃO

A raça Gir Leiteiro tem sido alvo de grande interesse devido a sua adaptação às condições climáticas do Brasil e à produção leiteira altamente expressiva. Entretanto, a eficiência reprodutiva é importante para um adequado desempenho econômico. Assim, quando falhas reprodutivas são detectadas nos touros, estes devem ser eliminados. Nas situações em que o fenótipo é evidente, o diagnóstico é fácil e os animais são rapidamente excluídos. Ao contrário, a detecção tardia da subfertilidade acarreta prejuízos.

As falhas reprodutivas podem estar relacionadas a vários fatores: genético, congênito ou adquirido (BICUDO et al., 2007). Em touros, as principais causas dessas falhas são degeneração e hipoplasia testiculares, criptorquidismo, espermatogênese imperfeita e deficiência neuroendócrina (VALE FILHO et al., 1998).

A hipoplasia testicular é um defeito congênito em que há falha no desenvolvimento do epitélio seminífero e é considerada uma das principais causas das falhas reprodutivas em touros (NASCIMENTO e SANTOS, 2011). Tendo como principal definição como uma alteração de caráter hereditário causada pela expressão de um gene recessivo autossômico de penetrância incompleta, que interfere na espermatogênese (ERIKSSON, 1934, citado por SETTERGREE e McENTEE, 1992).

Porém, com o avanço dos recursos genético-moleculares, estudos demonstraram que alterações de alguns genes em regiões do cromossoma Y têm afetado a fertilidade de indivíduos machos em várias espécies (LARDONE et al., 2007; POONGOTHAI et al., 2009; HAMILTON et al., 2009; SVACINOVA et al., 2011), suspeita-se que estas alterações podem também estar relacionadas à manifestação de hipoplasia gonadal em touros da raça Gir Leiteiro, interferindo na fertilidade dos mesmos.

O gene *testis-specific protein Y-coded* (TSPY) é um gene multicópia, e foi identificado como um gene do braço curto do cromossoma Y (Yp) em humanos com um padrão de expressão testicular específico. Em bovinos, HAMILTON et al. (2009) demonstraram que o gene TSPY também está localizado no Yp. A variação de cópias TSPY está relacionada com cânceres masculinos e problemas reprodutivos no homem (VIJAYAKUMAR et al., 2006; VODICKA et al., 2007). Apesar de haver estudos mostrando a variação no número de cópias deste gene no bovino (JAKUBICZKA et al., 1993; HAMILTON et al., 2009), ainda não foram estimadas relações com a capacidade reprodutiva dos mesmos em animais zebuínos.

A pesquisa da hipoplasia testicular em bovinos por meio de marcadores genético-moleculares em associação aos métodos tradicionais, clínico-andrológicos pode gerar o desenvolvimento de haplótipos (grupos de marcadores com localização próxima em um cromossoma) em torno de genes candidatos e sua aplicação no melhoramento genético dos bovinos, caso a contribuição de algum dos genes estudados seja confirmada. Isto consistirá em uma alternativa ao descarte de animais com base apenas em avaliações clínicas e de genealogia, permitindo delinear estratégias de seleção para reduzir a frequência destes distúrbios nos rebanhos.

## HIPÓTESES

A avaliação clínico-andrológica permite a identificação de animais com hipoplasia testicular;

A alta patologia espermática, em touros com hipoplasia testicular, compromete a fertilidade;

Estudos clínico-andrológicos e de genes candidatos funcionais associados, poderão elucidar a etiologia da hipoplasia testicular;

A identificação de marcadores moleculares poderá ser usada na eliminação precoce (pré-puberal) de touros portadores de genes favoráveis para a manifestação da hipoplasia testicular

## **OBJETIVOS**

Determinar a frequência de distúrbios clínico-andrológico, principalmente da hipoplasia testicular, na raça Gir Leiteiro no Estado de Minas Gerais;

Caracterizar, pelo exame clínico-andrológico, os fenótipos de animais normais e subfértéis;

Caracterizar pela “Classificação Andrológica por Pontos” (CAP) o potencial andrológico dos animais normais dentro dos rebanhos;

Identificar marcadores moleculares (SNP’s), que permitam estabelecer um sistema de haplotipagem para o cromossoma Y na raça;

Buscar identificar a associação entre do número de cópias do gene TSPY e o diagnóstico de hipoplasia testicular;

Identificar, por meio de estudo de associação em escala genômica (GWAS), marcadores genéticos candidatos para os fenótipos: hipoplasia testicular e/ou anormalidades espermáticas na raça Gir Leiteiro.

## **Revisão de Literatura**

### **Aspectos clínico-andrológicos**

#### **Seleção dos animais**

Na seleção de reprodutores não basta considerar apenas os aspectos zootécnicos. Mas deve-se também observar a capacidade reprodutiva dos animais por meio da normalidade dos órgãos genitais, da libido e da habilidade sexual, além do desempenho quantitativo e qualitativo na

produção de espermatozoides, que sejam capazes de fecundar (FONSECA, 2000).

Uma vez que o touro é responsável por 70% ou mais do melhoramento genético de uma população (AMARAL et al., 2003; FONSECA, 2008), fica evidente a necessidade de se estabelecerem critérios de seleção para a melhoria da fertilidade, utilizando-se, não somente pressão de seleção genética para alta produção zootécnica, como também alta qualidade do sêmen dos touros.

Em razão da importância do touro para a alta eficiência reprodutiva de um sistema de produção de bovinos, um exame clínico-andrológico criterioso, assim como os testes de libido e capacidade de serviço devem ser realizados, a fim de se selecionarem animais mais aptos à reprodução, visando maximizar a eficiência reprodutiva e a obtenção de elevados índices de prenhez (acima de 80 a 85 %), nos primeiros 21 dias de estação de monta (GALLOWAY, 1989).

O exame andrológico completo deve incluir a avaliação de todos os fatores que contribuem para a função reprodutiva do touro. Assim, sendo indicada sua realização: antes da estação de monta; na ocorrência de falhas reprodutivas no rebanho; para determinação da ocorrência precoce da puberdade; nas relações de comercialização de reprodutores; e para o ingresso dos touros nas centrais de inseminação, com vistas à criopreservação de sêmen (BARBOSA, 2005).

O exame clínico-andrológico compreende três etapas: a identificação e anamnese do animal, o exame clínico geral dos órgãos genitais e o espermiograma (VALE FILHO et al., 1988; 2010; 2011; 2012; CBRA, 1998; BARBOSA, 2005).

#### **Identificação e Anamnese**

Deve ser resumida, mas necessita apresentar dados importantes no que diz respeito ao rebanho, como desempenho nas estações de monta anteriores, estado sanitário, alimentação fornecida etc. Também deve se basear nos dados do registro genealógico, quando houver, e, em

não havendo, obter-se o máximo de informações possíveis, como procedência, idade, paternidade, com ocorrências relevantes sobre os animais e também o rebanho (CBRA, 1998; VALE FILHO et al., 2012).

### **Exame clínico geral**

Devem ser avaliados no animal os sistemas respiratório, circulatório, digestivo e locomotor (com atenção especial para os aprumos). Outro ponto importante é o peso e o escore corporal do animal avaliado. Assim, sendo que o animal avaliado deve estar com peso, tamanho, condição corporal e conformações adequados para raça e idade (CBRA, 1998; VALE FILHO et al., 2012).

### **Exame do sistema genital**

As atividades descritas a seguir (VALE FILHO e PINTO, 1988; VALE FILHO et al., 1988; 2010; 2011; 2012; CBRA, 1998; BARBOSA, 2005) visam a avaliação do sistema genital do touro.

Os órgãos genitais externos são examinados por inspeção e palpação, já os internos por palpação retal ou ultrassonografia transretal. Verificam-se a presença dos mesmos, as dimensões, a simetria, a consistência e a mobilidade dos componentes do sistema reprodutivo.

Cordões espermáticos: devem ser verificadas as condições de distensão, inexistência de cistos ou de formações varicocélicas, encurtamento, processos inflamatórios, processos irritativos etc;

Escroto: devem ser verificadas a espessura e integridade da pele, presença de lesões irritativas, temperatura, presença de ectoparasitas (carrapatos e bernes), abscessos, aderências etc;

Testículos: devem ser observados e considerados com relação à sua simetria e proporcionalidade ao peso corporal e idade do animal. Depois tracionados e examinados quanto à consistência e elasticidade, que são avaliadas individualmente em um escore de 1 a 5. Avaliar a mobilidade dos testículos dentro do escroto, sua posição, temperatura, sensibilidade

e biometria (circunferência escrotal, comprimento e largura testicular).

Epidídimos: as três porções (cabeça, corpo e cauda) de ambos os epidídimos devem ser examinadas por palpação e verificadas suas proporções relativas aos respectivos testículos. Na cabeça, devem ser verificados o volume, a sensibilidade, a presença ou não de granulomas e processos inflamatórios etc. Atenção especial deve ser dada às caudas do epidídimo, com relação ao seu delineamento, simetria e consistência. Seu volume pronunciado e sua simetria são indícios de que a produção espermática nesse animal está adequada;

Prepúcio: o tamanho e a forma do prepúcio merecem atenção especial para alterações mais complexas (dependendo da raça), onde o prepúcio excessivamente grande é indesejável. A cicatriz umbilical também deve ser avaliada uma vez que em caso de onfaloflebetes graves na idade jovem, podem causar distúrbios na exposição do pênis na idade adulta. Na avaliação do óstio prepucial externo, este deve permitir a livre passagem do pênis e sua mucosa não deve estar exposta;

Pênis: deve ser verificado o deslizamento dentro do prepúcio ou a existência de alguma alteração como bífido, infantil, torções, fraturas, papilomas, persistência do freio da glândula etc;

Órgãos genitais internos: devem ser avaliadas as ampolas dos canais deferentes e as glândulas vesiculares, quanto ao tamanho, simetria, forma, lobulação e sensibilidade. Ao toque das glândulas vesiculares geralmente ocorre a exposição do pênis, já o toque das ampolas dos canais deferentes ocorre retração do testículo correspondente, que poderá ser seguida de ejaculação, após persistência de massagem.

### **Espermograma**

O espermograma deve corresponder aos exames clínico-andrológicos anteriores, tanto nas características físicas quanto nas morfológicas do sêmen.

As características físicas devem ser avaliadas logo após a colheita de sêmen (por vagina artificial, eletro-ejaculação ou massagem das ampolas dos ductos deferentes), fornecendo parâmetros quanto a sua qualidade, comparando-os aos padrões de normalidade da espécie (VALE FILHO e PINTO, 1988; VALE FILHO et al., 1988; 2010; 2011; 2012; CBRA, 1998; BARBOSA, 2005)..

Quanto aos aspectos físicos do sêmen, devem ser avaliados o turbilhonamento (ou motilidade espermática de massa), a motilidade espermática progressiva retilínea, vigor e a concentração espermática, os quais são avaliados por meio da microscopia. O turbilhonamento deve ser avaliado por meio de gota de sêmen sobre uma lâmina (sem lamínula) em aumento de 100 vezes a 37°C, verificando-se o movimento de massa na borda da gota. Como resultado de uma concentração elevada associada à motilidade e vigor elevados, sendo avaliado numa escala de zero a cinco. Já a motilidade espermática progressiva e o vigor espermático são observados em gota sob lamínula em um aumento de 100 a 400 vezes a 37°C. A motilidade espermática progressiva é avaliada como o percentual de espermatozoides progressivamente móveis, e o vigor representa a intensidade dessa movimentação sendo avaliado numa escala de zero a cinco. A concentração espermática é estimada utilizando-se a “Câmara de Neubauer”, podendo-se utilizar a diluição de 1:200, 1:100 ou 1:50 em solução de formol-salino-tamponado. O número de espermatozoides contados na câmara é multiplicado pela constante referente à diluição utilizada, obtendo-se, assim, a estimativa da concentração espermática, expressa em milhões de espermatozoides por mL ( $\times 10^6$  spz/mL) (CBRA, 1998; VALE FILHO et al., 2012).

As características morfológicas devem ser avaliadas por meio da preparação úmida, que consiste na turvação de 0,5mL de formol-salino, com algumas gotas de sêmen. Esta solução

turvada é utilizada para a montagem em lâmina e lamínula, justapostas o suficiente para a formação de apenas uma camada de células, que deve ser avaliada em microscopia de contraste de fase em um aumento de 1.000 vezes, com auxílio de óleo de imersão. Na avaliação, podem ser identificados defeitos na forma e estrutura do espermatozóide, divididos em maiores (defeitos de acrossoma, gota citoplasmática proximal, “pouch formation”, pseudo-gota, defeitos de peça intermediária e cauda fortemente enrolada ou dobrada, subdesenvolvidos, cabeça isolada patológica, delgado na base, piriforme pequeno anormal, contorno anormal e formas teratológicas) e menores (acrossoma desprendido, gota citoplasmática distal, cauda dobrada com gota citoplasmática distal anexa, cauda enrolada, cabeça isolada normal, cabeça delgada, pequena normal, gigante, curta, larga e com inserções abaxial, retro-abaxial ou oblíqua) (BLUM, 1973; BARTH e OKO, 1989).

#### **Classificação Andrológica por Pontos (CAP)**

VALE FILHO (1988; 1989) adaptou o método de classificação de reprodutores taurinos, o *Breeding Soundness Evaluation* (BSE) para o touro zebuíno, apesar de atender também aos touros de raças européias, denominando-o “Classificação Andrológica por Pontos” (CAP). A principal diferença entre ambos é a exigência, na proposta da CAP, de que somente touros clinicamente normais sejam submetidos à avaliação, não sendo aceitos touros questionáveis (Tabela 1.1).

A CAP pode ser utilizada tanto para touros destinados a doadores de sêmen, quanto em touros usados em monta natural nas propriedades rurais, desde que sejam antes aprovados por índices andrológicos e zootécnicos satisfatórios (VALE FILHO et al., 1989, 2001; 2010; 2011;2012).

Tabela 1 - CAP- Classificação Andrológica por Pontos, para touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

	(Excelente)	(Bom)	(Regular)	(Fraco)
Motilidade espermática				
Vigor (1-5)	Vigor 5	Vigor 4-5	Vigor 4	Vigor 3 (0-3)
Progressiva (%)	Acima de 70	60-70	50-60	Abaixo 50
<b>Total de Pontos</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
Morfologia espermática				
Defeitos maiores (%)	Abaixo de 10	10-19	20-29	Acima de 29
Total de defeitos (%)	Abaixo de 25	26-39	40-59	Acima de 59
<b>Total de Pontos</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
Circunferência escrotal				
Idade (meses)**				
<i>Bos taurus indicus</i>		<i>Bos taurus taurus</i>		
<b>12-17</b>	<b>06-08</b>	Acima de 26 cm	24 – 26 cm	Abaixo 24 cm
<b>18-23</b>	<b>09-11</b>	Acima de 30 cm	27 – 30 cm	Abaixo 27 cm
<b>24-30</b>	<b>12-14</b>	Acima de 34 cm	30 – 34 cm	Abaixo 30 cm
<b>31-40</b>	<b>15-20</b>	Acima de 36 cm	31 – 36 cm	Abaixo 31 cm
<b>41-60</b>	<b>21-30</b>	Acima de 38 cm	32 – 38 cm	Abaixo 32 cm
<b>&gt;60</b>	<b>&gt;30</b>	Acima de 39 cm	34 – 39 cm	Abaixo 34 cm
<b>Total de Pontos</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

\*\* Proposta por VALE FILHO (1989a); VALE FILHO et al., 2010; 2011.

Três elementos são considerados na CAP: a circunferência escrotal (CE), podendo atingir a pontuação máxima de 40 pontos; os aspectos morfológicos do sêmen, também podendo atingir a pontuação máxima de 40 pontos; e os aspectos físicos do sêmen, podendo atingir a pontuação máxima de 20 pontos. No somatório, um animal excepcional pode atingir até 100 pontos. Animais com CAP <60 não devem ser utilizados como reprodutores, uma vez que mesmo sendo clinicamente normais, são andrologicamente fracos (Tabela 1.1) conforme propostos por VALE FILHO (1988; 1989; 2010).

#### Patologias mais comuns do sistema reprodutor de touros

Uma vez que os touros não atingem os parâmetros considerados normais, segundo o CBRA (1998), estes são considerados portadores de algum distúrbio reprodutivo, possuindo alguma alteração do trato genital, sejam por causa genética, ambiental, infecciosa ou traumática, que podem levar à subfertilidade, infertilidade ou esterilidade.

Touros subférteis podem ter a capacidade de gerar descendentes, o que é indesejável caso essa subfertilidade seja de origem genética, uma vez que este problema pode ser transmitido à sua progênie. Assim, quando identificados, estes animais devem ser eliminados do plantel (VALE FILHO et al., 1979, 2001).

#### Hipoplasia testicular

A hipoplasia testicular foi descrita extensivamente em animais da raça “Swedish Highland” por LANGERLÖF (1934; 1938; 1951, citados por SETTERGREEN E MCENTEE, 1998) e ERIKSSON (1943, citado por SETTERGREEN E MCENTEE, 1998). KODAGALI et al. (1968; 1971) descreveram este distúrbio também na raça Gir na Índia. Já VALE FILHO et al (1979; 1986) e VALE FILHO e PINTO (1988) demonstram a mesma anomalia em animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, “standard pedigree” e “high pedigree” em rebanhos comerciais ou quando oferecidos como doadores de sêmen em Centrais de Inseminação Artificial no Brasil.

Desde o primeiro relato da hipoplasia testicular em bovinos, este distúrbio tem sido descrito por vários pesquisadores com frequência entre 5 e 15% em várias raças bovinas tanto *Bos taurus* (LAGERLÖF, 1934; HAQ, 1948; KNUDSEN, 1961a; 1961b; VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO E PINTO, 1988; SETTERGREEN E MCENTEE, 1998), quanto em *Bos taurus indicus*, aqui incluídos os animais da raça Gir Leiteiro (KODAGALI et al., 1968; 1971; VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO E PINTO, 1988).

ERIKSSON (1943, citados por SETTERGREEN E MCENTEE, 1998), em uma análise genética, desenvolveu a hipótese mais aceita para bovinos sobre hipoplasia testicular até hoje, onde esta é uma alteração de caráter hereditário causada pela dupla homozigose recessiva expressa de genes recessivos autossômicos de penetrância incompleta, que interfere na espermatogênese. Entretanto, à época não havia ferramentas para avaliar eficientemente a segregação. Além disto, não se conhecia herança mitocondrial e ligada ao cromossoma Y, antecipação, impressão genômica, entre outros mecanismos e fenômenos genéticos relevantes. Efeitos fundamentais como heterogeneidade de locus ou alélica não existiam, assim como métodos de análise de segregação complexa.

Sob o ponto de vista anatomopatológico a hipoplasia testicular pode ser parcial, quando parte dos túbulos seminíferos está afetada, ou total, quando todos os túbulos seminíferos estão afetados e resultam em ausência de espermatogênese no testículo acometido. No ejaculado pode-se encontrar concentração e patologias espermáticas variadas podendo ser detectada azoospermia dependendo do grau de acometimento dos testículos (NASCIMENTO E SANTOS, 2011; BICUDO, 2007).

Os animais podem apresentar hipoplasia uni ou bilateral, parcial ou total. Animais com hipoplasia unilateral parcial ou total, ou bilateral parcial, são capazes de fecundar, porém com baixa eficiência em relação a um animal normal. Podem ainda, possuir libido e habilidade reprodutiva, dificultando sua identificação em um rebanho. Para o diagnóstico é necessário realizar a biometria testicular em animais

púberes, sendo o testículo esquerdo afetado com maior frequência (ROBERTS, 1986; VALE FILHO e PINTO, 1988; McENTEE, 1990; LADDS, 1993; STEFFEN, 1997). Segundo vários autores, a hipoplasia testicular bilateral total é a de mais fácil diagnóstico pelo fato dos testículos se apresentarem pequenos e sem espermatozoides no ejaculado (STEFFEN, 1997; BICUDO, 2007; OLIVEIRA, 2011).

Histologicamente, os túbulos seminíferos apresentam-se diminuídos, com eficiência baixa da espermatogênese, membrana basal espessada, às vezes mielinizada, com células de Sertoli, e espermatogônias, podendo muitas vezes apresentar-se sem atividade mitótica (NASCIMENTO E SANTOS, 2011).

Animais com hipoplasia testicular apresentam perfil seminal com baixa concentração espermática, baixa motilidade e alta patologia espermática (VALE FILHO et al., 2010), podendo haver casos de azoospermia. (STEFFEN, 1997; BICUDO, 2007; OLIVEIRA et al., 2011; NASCIMENTO E SANTOS, 2011).

### **Outros distúrbios reprodutivos**

A degeneração testicular constitui a principal causa de redução de fertilidade nos machos (NASCIMENTO e SANTOS, 2011), sendo mais comum nos bovinos em animais taurinos do que zebuínos (VALE FILHO et al., 1979). Quando criados nas regiões tropicais constitui-se de uma alteração adquirida uni ou bilateral, permanente ou temporária dependendo da severidade, tipo e tempo de exposição do insulto (SETCHELL, 1998).

As principais causas da degeneração testicular são distúrbios de saúde quando acompanhados de febre, toxemia ou infecção local, como também alterações que elevem a temperatura testicular. Além disso, fatores autoimunes, obstruções da cabeça do epidídimo, agentes químicos, físicos e fatores hormonais também predis põem a degeneração testicular (NASCIMENTO e SANTOS, 2011).

Animais com degeneração testicular apresentam o perfil seminal com baixa concentração, baixa

motilidade e alta patologia espermática. Isto em razão de um prejuízo na eficiência da gametogênese (VALE FILHO et al., 2010, 2011). Porém, esses animais já possuíram sêmen normal (alta concentração, alta motilidade e baixa patologia).

Outro distúrbio encontrado em touros é a espermiogênese imperfeita, que consiste na presença de “knobbed sperm” no ejaculado como principal ou mesmo único defeito significativo e com uma frequência constante (GARCIA, 1971). O “knobbed sperm” trata-se de uma área hipercromática ou de espessamento excêntrico na extremidade do espermatozóide afetado; outro distúrbio é observado quando vesículas ou inclusões membranosas ficam envoltas no interior da matriz acrossomática (BARTH e OKO, 1989), comprometendo, assim, a fertilidade.

A exemplo da hipoplasia testicular, outro distúrbio de caráter genético é o criptorquidismo, caracterizado pela ausência de um ou ambos os testículos no escroto em razão da interrupção durante o trajeto normal de migração do testículo da cavidade abdominal para o escroto (NASCIMENTO E SANTOS, 2011).

Segundo NASCIMENTO E SANTOS (2011), a descida anormal do testículo para o escroto está diretamente ligada ao desenvolvimento do gubernáculo, podendo ser causada por três mecanismos: 1) ausência do desenvolvimento do gubernáculo; 2) desenvolvimento anormal do gubernáculo; 3) crescimento excessivo e ausência ou retardo na regressão do gubernáculo.

O testículo criptórquio é afuncional do ponto de vista espermatogênico, sendo assim, animais com criptorquidia bilateral são estéreis em razão da supressão térmica da espermatogênese. Animais com criptorquidia unilateral são subférteis e quando detectados devem ser eliminados do rebanho, por ser uma anomalia hereditária (VALE FILHO et al., 1979; NASCIMENTO E SANTOS, 2011).

Fora dos testículos, os epidídimos são responsáveis pelo transporte, maturação e armazenamento dos espermatozóides

(KRAUSE, 1993), sendo assim, alterações que venham a afetar tais funções podem levar à infertilidade, juntos ou separadamente (BICUDO, 2007).

As disfunções do epidídimo podem ser classificadas quanto ao local onde elas ocorrem, podendo ser disfunções da cabeça, da cauda ou de ambos, simultaneamente.

Na disfunção da cabeça do epidídimo, mesmo se os ductos eferentes estiverem morfológicamente aparentemente normais, estes não oferecem condições para maturação espermática, observando-se elevado número de espermatozóides com gota citoplasmática proximal (GCP) no ejaculado e um quadro caracterizado por alta concentração espermática, baixa motilidade e alta patologia espermática, podendo haver também um quadro de grande número de peças intermediárias fortemente dobradas ou enroladas, geralmente com GCP anexas, podendo haver fraturas totais ou parciais, quando existem lisossomos presentes nas mesmas (VALE FILHO, 1975; VALE FILHO et al., 1977; 1979; 2011; BICUDO, 2007).

Na disfunção da cauda do epidídimo, há desníveis de sódio e potássio e aparecimento de elevado número de espermatozóides com cauda dobrada (10-90%), geralmente envolvendo gota citoplasmática distal (GCD) no ejaculado, com quadro espermático podendo haver alta concentração espermática, baixa motilidade e alta patologia espermática, com alta porcentagem de caudas dobradas sem fraturas, com presença de GCD (VALE FILHO et al., 1979; BICUDO et al., 2007; NASCIMENTO e SANTOS, 2011).

### **Aspectos genéticos**

#### **Genes candidatos**

##### *Testis-Specific Protein Y-Encoded (TSPY)*

O gene testis-specific protein Y-encoded (TSPY) é um gene multicópia e foi mapeado no braço curto do cromossoma Y (Yp) em seres humanos



com padrão de expressão testículo específico (ARNEMANN et al., 1987; ZHANG et al., 1992). HAMILTON et al. (2009) demonstraram que em bovinos o TSPY também está localizado no Yp, o que corrobora os achados de VOGEL et al. (1997), porém neste último trabalho foi encontrado um tênue sinal deste gene no braço longo do cromossoma Y (Yq).

A principal transcrição prototípica do gene TSPY, denominada TSPY-S, é expressa somente nos testículos, e esta proteína foi encontrada principalmente em espermatogônias e, esporadicamente, em espermatócitos primários (SCHNIEDERS et al., 1996). Tal proteína pertence a uma superfamília, que inclui SET e NAP, as quais estão relacionadas à ativação de fatores de replicação (SCHNIEDERS et al., 1996), fazendo supor que o TSPY esteja diretamente relacionado, no macho, com a espermatogênese, apesar de sua função exata ainda não estar elucidada (SCHNIEDERS et al., 1996; KIDO E LAU, 2005).

Estudos demonstram que a variação de cópias do TSPY está relacionada aos cânceres masculinos e problemas reprodutivos. Por exemplo, no homem, a diminuição do número de cópias está relacionado ao câncer de próstata e os números de cópias elevados estão associados à infertilidade masculina (VIJAYAKUMAR et al, 2006;. VODICKA et al, 2007). GIACHINI et al. (2009) observaram que a redução de cópias estavam associadas aos parâmetros espermáticos anormais. Já SVACINOVA et al. (2011) não observaram correlação entre o número de cópias com fertilidade em seres humanos.

Nos homens, a variação do número de cópias normal do gene TSPY é estimada em 20-60 (SCHEMPP et al., 1995). Estima-se que machos da espécie bovina tenham entre 50 e 200 cópias (JAKUBICZKA et al., 1993; MANZ et al., 1993). Tal achado foi confirmado por HAMILTON et al. (2009) que demonstraram que o número de cópias de TSPY é altamente variável entre os touros (45-204), e que a maioria das 14 raças bovinas estudadas têm, em média, um número de cópias TSPY similar (94 cópias; 88-100), com exceção do Pardo-Suíço, que obteve a maior média (161 cópias; 133-

195) e o “Western Fjord Cattle”, que apresentou a menor média (63 cópias; 45-86).

Esta variação entre indivíduos pode estar relacionada à recombinação homóloga não alélica (NAHR) (SKALETSKY et al., 2003; LIN et al., 2005; REPPING et al., 2006; JOBLING et al., 2007).

HAMILTON et al. (2009) sugerem que o elevado número de cópias de TSPY em bovinos, comparado ao de outras espécies, está relacionado à necessidade de produção da proteína TSPY no desenvolvimento masculino das células germinativas ou então pode ser um mecanismo de defesa contra o declínio da Região Macho Específica do Cromossoma Y (MSY).

Apesar de haver estudos que mostram variação no número de cópias deste gene no bovino (JAKUBICZKA et al., 1993; MANZ et al., 1993; VOGEL et al., 1997; HAMILTON et al., 2009), ainda não foram estimadas correlações entre o número de cópias do TSPY com a capacidade reprodutiva de animais de raças zebuínas.

## BIBLIOGRAFIA

AMARAL, T. B.; CORREA, E. S.; COSTA, F. P. Aspectos econômicos do uso de touros melhoradores em um sistema de produção de gado de corte. In: 40ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, 2003, Santa Maria. *Anais...* SBZ 2003, 5p.

ARNEMANN, J.; EPPLER, J. T.; COOKE, H. J. et al. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids. Res.*, v.15, p-8713-8724. 1987

BARBOSA, R. T.; MACHADO, R.; BERGAMASCHI, J. A. C. M. *A Importância do Exame Andrológico em Bovinos*. Circular técnica nº41 EMBRAPA, São Carlos – SP, EMBRAPA, 2005, 13p.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989. 285p.

- BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. *Biológico*, v.69, n.2, p.43-48, 2007.
- BISHOP, M.D. KAPPES, S. M.; KEELE, J. W. et al. A Genetic Linkage Map for Cattle. *Genetics* v.136, p.619-639, 1994.
- BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. *Nor. Veterinaemed.*, v. 25, n.77/8, p.383-91, 1973.
- CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. – Belo Horizonte, 1998, 49 p.
- ERIKSSON, K. *Hereditary forms of sterility in cattle*. Biological and Genetical Investigations. Lund, Hakan Olsson Boktryckeri, 1943, 155p.
- FONSECA, V. O. O touro no contexto da eficiência reprodutiva do rebanho. *Informe Agropecuário*, v. 21, p. 48-63, 2000.
- FONSECA, V. O. O touro no contexto da fertilidade da reprodução, In: SIMCORTE Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 6,2008, Viçosa, *Anais... Viçosa*, RBZ, p. 383-390.
- GALLOWAY, D.B. Factors affecting fertility in bulls, *Rev. Bras. Reprod. Anim.* v.1, p.27-46, 1989.
- GARCIA, O. S. *Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros*. 1971. 61 p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- GIACHINI, C.; NUTI, F.; TURNER, D. J. et al. *TSPY1* Copy Number Variation Influences Spermatogenesis and Shows Differences among Y Lineages. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* v. 94, n.10, p.4016–4022, 2009.
- HAMILTON, C. K.; FAVETTA, L. A.; DI MEO, G. P. et al. Copy Number Variation of Testis-Specific Protein, Y-Encoded (TSPY) in 14 Different Breeds of Cattle (*Bos taurus*). *Sex. Dev.*, v.3, p-205–213, 2009.
- HAQ, I. Causes of sterility in bulls in Southern England. *Brit. Vet. J.* v.105, p. 71-88, 1949.
- JAKUBICZKA, S.; SCHNIEDERS, F.; SCHMIDTKE, J. A bovine homologue of the human TSPY gene. *Genomics* v.17, p-732–735, 1993.
- JOBLING, M. A.; LO, I. C.; TURNER, D. J. et al: Structural variation on the short arm of the human Y chromosome: recurrent multigene deletions encompassing Amelogenin Y. *Hum. Mol. Genet.* v.16, p-307–316, 2007.
- KIDO, T.; LAU, Y. F. A Cre gene directed by a human TSPY promoter is specific for germ cells and neurons. *Genesis*, v.42, p- 263–275, 2005.
- KNUDSEN, O. Testicular hypoplasia with multipolar spindle formation in the spermatocytes of bull. *Acta Vet. Scand.*, v.2, p. 199-209, 1961a.
- KUDSEN, O. Sticky chromosomes as a cause of testicular hypoplasia in bulls. *Acta Vet. Scand.*, v.2, p. 1-14, 1961b.
- KODAGALI, S. B. e KERUR, V. K. Gonadal hypoplasia in Gir cattle. *Indian Vet. J.*, v.45, p. 114-118, 1968.
- KODAGALI, T. N.; VAISHNAV, T. N.; HERANJAL, D. D. et al. Studies on histopathologic changes in testis associated with hypoplasia in Gir cattle. *Indian J. Anim. Sci.* v.41, n.2, p. 92-95, 1971.
- KRAUSE, D. Sistema reprodutor masculino. In: DIRKSEN, G. GRUNDER, H., STOBER, M. (Eds.). *Rosenberger-exame clínico dos bovinos*, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1993, p.242-262.
- LADDS, P. W. The male genital system. In: JUUB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993, v. 3, p. 485-512.
- LAGERLÖF, N. *Morphologische untersuchungen über veränderungen im spermabild und in der hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilität (Morphological investigations on changes in*

*semen and testes of low fertile or sterile bulls*).1934. Tese (doutorado), Almqvist e Wilksell, Uppsala.

LAGERLÖF, N. Infertility in male domestic animals. XII International Veterinary Congress. 2008,Zürich.*Proceedings...* Zürich, v. 1, p. 24-45, 1938.

LAGERLÖF, N. Hereditary forms of sterility in Swedish cattle breeds. *Fertil. Steril.*,v.2, p. 230-242, 1951.

LARDONE, M. C.; PARODI, D.A.; VALDEVENITO, R.et al. Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.*, V.13, n.10 p- 705–712, 2007.

LIN, Y. W.; THI, D. A.; KUO, P. L. et al: Polymorphisms associated with the DAZ genes on the human Y chromosome. *Genomics*,v.86, p-431–438, 2005.

MANZ, E.; SCHNIEDERS, F.; BRECHLIN, A. M.et al. TSPY -related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics*, v.17, p-726–731, 1993.

MCENTEE, K. *Reproductive pathology of domestic animals*. 1990, London: Academic Press,401p.

NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011. 133p.

OLIVEIRA, L. Z.; DO CARMO, A. S.; LIMA, V. F. M. H. et al. Alta incidência de hipoplasia testicular em touros BRANGUS-IBAGÉ no Estado do Mato Grosso do Sul: relato de caso. *ARS Vet.*, Jaboticabal, SP, v.27, n.1, 051-055, 2011.

POONGOTHAI, J.; GOPENATH, T. S.; MANONAYAKI, S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.*, v.50, n.4, p. 336-347, 2009.

REPPING, S.; VAN DAALEN, S. K. M.; BROWN, L. G.; et al: High mutation rates have driven extensive structural polymorphism among human Y chromosomes. *Nat. Genet.*,v.38, p-463–467, 2006.

ROBERTS, J.S. *Veterinary obstetric and genital diseases (Theriogenology)*.1986 Ann Arbor; Edwards Brothers, 981p.

SCHEMPP, W.; BINKELE, A.; ARNEMANN, J.et al. Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chromosome Res.*, v.3, n.4: p- 227-34. 1995.

SCHNIEDERS, F.; DORK, T.; ARNEMANN, J.et al. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum. Mol. Genet.*,v.5, p-1801–1807, 1996.

SETCHELL, B. P. The parkes lecture heat and the testis. *J. Reprod. Fertil.*, v.114, p.179-194, 1998.

SETTERGREN, I. e MCENTEE, K. Germ cell weakness as a cause of testicular hypoplasia in bulls. *Acta Vet. Scand.*,v.33, p. 273-282.

SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; et al: The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*.v.423, p- 825–837, 2003.

STEFFEN, D. Genetic causes of bull infertility. *Vet. Clin. N. AM- Food A*, v.13, p.243-254, 1997.

SVACINOVA, V.; VODICKA, R.; VRTEL,R.et al. Sequence recombination in exon 1 of the TSPY gene in men with impaired fertility. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech. Repub.*, v.155, n.3, p-287–298. 2011.

VALE FILHO, V. R. *Disfunção de epidídimo em touros Bos taurus e Bos indicus, criados no Brasil*.1975. 82p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

- VALE FILHO, V. R.; MAGALE, F.; GARCIA, O. S. Incidência elevada de defeitos da bainha mitocondrial do espermatozóide e baixa eficiência reprodutiva, em touros da raça GIR. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.1, n.2, p.31-39, 1977.
- VALE FILHO, V. R.; PINTO, P. A.; FONSECA, J. et al. *Patologia do sêmen: Diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil – de um estudo de 1088 touros.* São Paulo: Dow Química, 1979. p. 4.
- VALE FILHO, V. R.; PINHEIRO, L. E. L.; BASRUR, P. K. Reproduction in zebu cattle. In: MORROW, D. A. *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small e Large Animals*, 2a.ed, Philadelphia, W.B. Saunders company, 1986, p.437-443.
- VALE FILHO, V. R. Desenvolvimento testicular em touros: aspectos clínicos. In: CONGRESSO BRASILEIRO REPRODUÇÃO ANIMAL, 7, 1988, Belo Horizonte. *Anais...* Belo Horizonte: CBRA, v.1, p.418-438. 1988.
- VALE FILHO, V. R.; PINTO, E. H. Testicular hypoplasia in Bos indicus and Bos taurus bulls, raised in Brasil. In: International Congresso n Animal Reproduction and Artificial Insemination, 11, 1988. *Proceedings...* Dublin, Ireland, 1988. p. 387.
- VALE FILHO, V. R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989. *Palestras...* Belo Horizonte: CBRA, 1989. p.94-118
- VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros jovens e erados: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Cad. Tecn. Vet. Zoo*, nº35, p.81-87, 2001.
- VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; AZEVEDO, N. A., Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In: SIMCORTE Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 7, 2010, Viçosa, *Anais...* Viçosa, RBZ, p. 363-412.
- VALE FILHO, V. R.; VALLE, G. R.; NASCIMENTO, E. F. patologia espermática. In: NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. (Org). *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011. p. 129-149.
- VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; SILVA, M. A. et al. Novos métodos de avaliação andrológica e do potencial reprodutivo de touros. In: V Simpósio Nacional sobre Produção e Gerenciamento da Pecuária de Corte, 5, 2012, Belo horizonte, *Anais...* Belo Horizonte, FEPMVZ, p.179-239.
- VIJAYAKUMAR, S.; HALL, DC.; REVELES, X. T. et al. Detection of recurrent copy number loss at Yp11.2 involving TSPY gene cluster in prostate cancer using arraybased comparative genomic hybridization. *Cancer Res.*, v.66, p-4055–4063, 2006.
- VODICKA, R.; VRTEL, R.; DUSEK, L. et al. TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod. Biomed. Online* v.14, p- 579–587, 2007.
- VOGEL, T.; BORGMANN, S.; DECHEND, F. et al. Conserved Y-chromosomal location of TSPY in Bovidae. *Chromosome Res.*, v. 5; p-182–185, 1997.
- ZHANG, J. S.; YANG-FENG, T. L.; MULLER, U. et al. Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum. Mol. Genet.*, v.1, p-717–726, 1992.

## CAPÍTULO 2

### Artigo 1

#### **Perfil clínico-andrológico e análise comparativa do sêmen entre touros normais e com hipoplasia testicular na raça Gir Leiteiro**

#### **Resumo**

A raça Gir Leiteiro tem sido alvo de grande interesse em razão de sua adaptação às condições climáticas do Brasil e de sua expressiva produção leiteira, mas as vezes com relatos de dificuldades reprodutivas. Este estudo teve como objetivos caracterizar a frequência de animais com hipoplasia testicular, bem como verificar as características clínico-andrológicas em touros Gir Leiteiro. O experimento foi realizado em seis propriedades distribuídas no estado de Minas Gerais, sendo estas divididas em dois grupos com ou sem suplementação nutricional. De 311 touros Gir Leiteiro submetidos à avaliação andrológica, em 240 cronologicamente adultos (2-5 anos), 168 apresentaram-se clinicamente normais, enquanto 18 foram diagnosticados com hipoplasia testicular, com sêmen de baixa qualidade (subfêrteis). A idade, o peso corporal (PC), a circunferência escrotal e a biometria testicular dos animais, além de análises físicas e morfológicas do sêmen foram comparadas. Tourinhos com idades de 14 a 22 meses, com imaturidade sexual, maturidade sexual retardada, além de outros distúrbios andrológicos foram excluídos. Foi utilizado o software SPSS, as variáveis qualitativas foram comparadas pelo teste Mann-Whitney e quantitativas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). A hipoplasia testicular ocorreu em 18 (5,79%) de touros adultos com distúrbios reprodutivos e constituiu-se no distúrbio mais detectado. Exceto para PC, as demais variáveis estudadas, diferenciaram ( $P < 0,05$ ) entre touros normais e com hipoplasia testicular, evidenciando a baixa condição fecundante de touros com hipoplasia testicular. Conclui-se que touros com hipoplasia testicular estão presentes nos rebanhos estudados com e sem suplementação nutricional, apresentam reduzida fertilidade e não devem ser recomendados para reprodução.

Palavras chave: andrologia, exame andrológico, fertilidade, zebu.

#### **Abstract**

*The Dairy Gir breed has been the subject of great interest because of their adaptation to climatic conditions in Brazil and its expressive milk production, but sometimes with reproductive difficulties reported. This study aimed to characterize the frequency of animals with testicular hypoplasia and verifying clinical andrological characteristics in Dairy Gir bulls. The experiment was conducted in six properties distributed in the state of Minas Gerais, which are divided into two groups with or without nutritional supplementation. 311 Dairy Gir bulls underwent breeding soundness evaluation in 240 adults chronologically (2-5 years), 168 had to be clinically normal, while 18 were diagnosed with testicular hypoplasia with low semen quality (sub-fertile). Age, body weight (BW), scrotal biometry of animals in addition to physical and morphological semen analyzes were compared. Bulls aged 14-22 months with sexual immaturity, delayed sexual maturity, and other andrological disorders were excluded. SPSS software was used, qualitative variables were compared by Mann-Whitney test and the quantitative by Student t-test ( $P < 0.05$ ). Testicular hypoplasia was seen in 18 adult bulls (5.79 %) with reproductive disorders and constituted the disorder most frequently detected. The parameters studied recorded difference ( $P < 0.05$ ) between normal and testicular hypoplasia bulls, except BW, showing the condition of low fertile bulls with testicular hypoplasia. It is concluded that bulls with testicular hypoplasia were present in the herds with and without nutritional supplementation, had reduced fertility and should not be recommended for reproduction.*

*Key words: andrology, soundness examination, fertility, zebu.*

## Introdução

No processo de seleção da raça Gir Leiteiro, a produção de leite tem sido o principal foco. Entretanto, a eficiência reprodutiva é importante para que o sistema de produção apresente adequado desempenho econômico. Assim, quando falhas reprodutivas são detectadas nos touros, estes devem ser eliminados. Nas situações em que o diagnóstico pode ser feito pelo fenótipo, estes são rapidamente excluídos. Por outro lado, a detecção tardia da subfertilidade acarreta prejuízos.

A hipoplasia testicular, um defeito congênito caracterizado pela falha no desenvolvimento do epitélio seminífero, é considerada uma importante causa da falha reprodutiva em touros (NASCIMENTO e SANTOS, 2011).

Desde a década de 30, com ao relato da hipoplasia testicular em bovinos feito por LANGERLËF (1934, citado por SETTERGREEN e McENTEE, 1998), este distúrbio tem sido descrito por diversos autores demonstrando uma frequência de 5 a 15%, tanto em *Bos taurus taurus* (HAQ, 1948; KNUDSEN, 1961a; 1961b; VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO e PINTO, 1988; SETTERGREEN e McENTEE, 1998) quanto nos *Bos taurus indicus*, inclusive na raça Gir (KODAGALI et al., 1968; 1971; VALE FILHO et al., 1979; VALE FILHO e PINTO, 1988).

Objetivou-se com este trabalho comparar os aspectos clínico-andrológicos e de qualidade de sêmen de touros normais e com hipoplasia testicular, em seis rebanhos Gir Leiteiro referência no estado de Minas Gerais.

## Material e Métodos

O presente experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, na reunião do dia 23/11/2011, sendo protocolado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – EV/UFMG com o nº de protocolo 227/11.

## Das propriedades

O estudo foi desenvolvido em coletas realizadas em seis fazendas particulares, distribuídas no Estado de Minas Gerais: Fazendas 1, 2 e 5 localizam-se na região central do Estado. O clima da região central é do tipo subtropical úmido (classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa), temperatura anual média de 22,1°C e precipitação média de 1.442,0 mm (BRASIL, 1992). Os animais foram mantidos a pasto recebendo suplementação nutricional (CS), composta de ração concentrada contendo 14% de proteína bruta (PB), na estação chuvosa do ano. Na estação seca do ano, os animais foram alimentados com silagem de milho ou cana-de-açúcar, mais suplementação concentrada contendo 14% PB. A média da produção de leite anual por matriz foi 6.000 kg.

A fazenda 3 localiza-se na região Norte do Estado que apresenta clima tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Aw), temperatura anual média de 24,5°C e precipitação anual média de 876 mm (BRASIL, 1992). Os animais foram mantidos a pasto com suplementação nutricional concentrada contendo 14% PB, na estação chuvosa do ano. Na estação seca do ano, os animais receberam silagem de milho mais suplementação concentrada contendo 14% PB. A média de produção de leite anual por matriz foi 5.500 kg.

A fazenda 4 localiza-se na região Centro-Oeste do Estado que apresenta clima subtropical úmido (Classificação climática de Köppen-Geiger: Cwa), temperatura anual média de 20,7°C e precipitação anual média de 1.426,3 mm (BRASIL, 1992). Os animais foram mantidos a pasto com suplementação nutricional concentrada contendo 14% PB, na estação chuvosa do ano. Na estação seca do ano, os animais foram alimentados com silagem de milho mais suplementação concentrada contendo 14% PB. A média de produção de leite anual por matriz foi 5.500 kg.

A fazenda 6 localiza-se na região Norte do Estado que apresenta clima tropical com estação seca (Classificação climática de Köppen-Geiger: Aw), temperatura anual média de 24,4°C e precipitação anual média de 916 mm (BRASIL, 1992). Os animais foram mantidos a pasto (SS) o ano todo com fornecimento de sal mineral *ad libitum*. A

média de produção de leite anual das matrizes foi 2.500 kg.

As fazendas foram agrupadas quanto ao tipo de suplementação, formando assim, dois grupos: animais com suplementação nutricional (CS = 218), constituído pelas fazendas de 1 a 5, e animais sem suplementação nutricional (SS = 93), constituído pela fazenda 6.

### Dos animais

Dos 311 touros Gir Leiteiro (Figuras 1 e 2) submetidos à avaliação andrológica (2009-2012),

resultante de seleções prévias ao desmame e ao sobre ano com eliminação daqueles com problemas fenotípicos facilmente detectáveis, 240 se apresentaram cronologicamente adultos (23-60 meses).

Destes, 168 apresentaram-se clinicamente normais, enquanto 18 foram diagnosticados com hipoplasia testicular, com sêmen de baixa qualidade, apresentando-se subfêrteis, e o restante dos animais adultos (n=54) apresentava outros distúrbios espermáticos como imaturidade sexual, maturidades sexual retardada, criptoquidismo, espermiogênese imperfeita, degeneração testicular e disfunções da cabeça e da cauda do epidídimo.

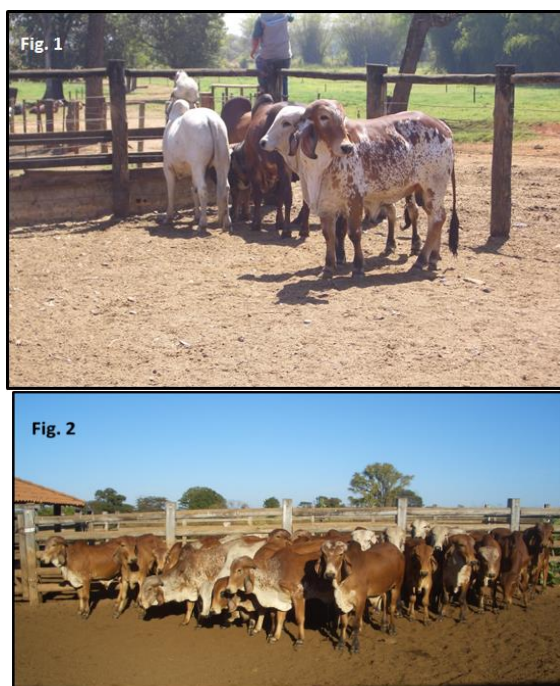


Figura 1: Animais oriundos da fazenda 4, pertencentes ao grupo com suplementação nutricional;  
Figura 2: Animais oriundos da fazenda 6, pertencentes ao grupo sem suplementação nutricional.

Para cada animal foram anotados: o nome, o número de registro, a data de nascimento, o nome do pai, o nome da mãe, bem como o peso vivo (PV) e as biometrias dos testículos no momento da realização das coletas de sêmen. O peso foi mensurado individualmente em balança mecânica tipo tronco. o perímetro escrotal (CE) foi mensurado com fita milimétrica no seu local de maior diâmetro, envolvendo gônadas e pele escrotal. O comprimento (CT) e a largura (LT)

dos testículos foram mensurados individualmente com a utilização de um paquímetro.

Pela biometria foi estabelecidos o volume testicular utilizando-se a fórmula proposta por FIELDS et al. (1979) e UNANIAN et al. (2000):  $VOL = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$ , onde r = raio calculado utilizando a largura (LT/2), h = comprimento testicular, e  $\pi = 3,14$ .



Para estabelecer a idade em que os animais atingiram a maturidade, estes (n=277, classificados como normais, imaturos ou com maturidade sexual retardada) foram divididos de acordo com a faixa etária, sendo distribuídos em cinco grupos: G1 = 12 a 17 meses; G2 = 18 a 23 meses, G3 = 24 a 30 meses, G4 = 31 a 40 meses, e G5 = 41 a 60 meses.

### Exame Andrológico

A CE foi mensurado com fita milimétrica no seu local de maior diâmetro, envolvendo gônadas e pele escrotal. O comprimento (CT) e a largura (LT) dos testículos foram mensurados individualmente com a utilização de um paquímetro.

Pela biometria foi estabelecido o volume testicular por meio da fórmula proposta por FIELDS et al. (1979) e UNANIAN et al. (2000):  $VOL = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$ , em que r = raio calculado utilizando a largura (LT/2), h = comprimento testicular, e  $\pi = 3,14$ .

As colheitas das amostras de sêmen foram realizadas em todos os animais (n=311) por meio de eletro-ejaculação, em tubos cônicos graduados. No momento da colheita, uma gota do sêmen era posicionada em lâmina para avaliação do turbilhonamento espermático (0-5), outra gota foi posicionada em lâmina sob lamínula para a avaliação da motilidade espermática progressiva (MOT - % de espermatozoides móveis) e do vigor espermático (0-5) em microscopia ótica com aumento de 100 x. Uma alíquota de 20µL da amostra de sêmen foi diluída em 1000µL de uma solução do formol-salino a 1% para posterior avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer. Outra alíquota de sêmen foi utilizada para avaliação da morfologia espermática (percentual de defeitos espermáticos maiores (DM), menores (dm) e totais (DT) e de espermatozoides normais) (CBRA, 1998) em preparação úmida para microscopia de contraste de fases (BARTH E OKO, 1989). Tais amostras foram analisadas no Laboratório “Multi-Usuário”, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

### Classificação dos Touros Quanto à Aptidão Reprodutiva Baseada no espermograma.

Os animais foram classificados quanto à aptidão reprodutiva baseada na análise do espermograma de acordo com a Tabela 1.

Tabela1 - Classificação dos touros quanto à aptidão reprodutiva

Classificação	Característica*	Fonte
Normal	MOT ≥ 60%; DM < 15%; DT < 30%	BLOM, 1973; GARCIA et al., 1987; VALE FILHO et al., 1989b
Imaturo	MOT < 60%; DM > 15%; DT > 30%; Qualquer DM individualmente > 5%; Idade < 24 meses	CBRA 1998; GARCIA et al., 1987; VALE FILHO et al., 1979
Maturidade sexual retardada	MOT < 60%; DM > 15%; DT > 30%; Qualquer DM individual > 5%; Idade > 24 meses	GARCIA et al., 1987; VALE FILHO et al., 1979
Hipoplasia testicular	Assimetria testicular; Baixa concentração; Baixa MOT; Alta patologia espermática; Azoospermia; Idade > 24 meses	BICUDO et al., 2007; NASCIMENTO E SANTOS, 2011; STEFFEN, 1997; VALE FILHO et al., 1986; 2010
Degeneração testicular	Baixa concentração; Baixa MOT; Alta patologia espermática; Já se apresentou normal anteriormente	BICUDO et al., 2007; VALE FILHO et al., 2010
Criptorquidia	Ausência de um ou ambos os testículos na bolsa escrotal	NASCIMENTO E SANTOS, 2011;
Disfunção da cabeça do epidídimo	Alta concentração; Baixa MOT; Alta porcentagem de GCP; Alta porcentagem de PI fraturadas	BICUDO et al., 2007; VALE FILHO, 1975; VALE FILHO et al., 1977;1979; 2011;
Disfunção da cauda do epidídimo	Alta concentração; Baixa MOT; Alta porcentagem de GCD; Sem PI fraturadas	BICUDO et al., 2007; VALE FILHO, 1975; VALE FILHO et al., 1977;1979; 2011;
Espermio gênese Imperfeita	Defeitos no acrossoma; “Knobben Sperm”	GARCIA, 1971; VALE FILHO, 1979

\* MOT = motilidade espermática progressiva; DM = defeitos espermáticos maiores; DT = defeitos espermáticos totais; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal



### Classificação dos Touros Quanto à Aptidão Reprodutiva Baseada na CAP

a “Classificação Andrológica por Pontos”, (CAP; VALE FILHO, 1989; 2001), conforme Tabela 2.

Para classificar os animais normais (n = 168) quanto ao seu potencial reprodutivo foi utilizada

Tabela 2 - CAP- Classificação Andrológica por Pontos, para touros *Bos taurus indicus* e *Bos taurus taurus*

	(Excelente)	(Bom)	(Regular)	(Fraco)
Motilidade espermática				
Vigor (1-5)	Vigor 5	Vigor 4-5	Vigor 4	Vigor 3 (0-3)
Progressiva (%)	Acima de 70	60-70	50-60	Abaixo 50
<b>Total de Pontos</b>	<b>20</b>	<b>12</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
Morfologia espermática				
Defeitos maiores (%)	Abaixo de 10	10-19	20-29	Acima de 29
Total de defeitos (%)	Abaixo de 25	26-39	40-59	Acima de 59
<b>Total de Pontos</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>3</b>
Circunferência escrotal				
Idade (meses)**				
<i>Bos taurus indicus</i>				
<i>Bos taurus taurus</i>				
<b>12-17</b>	<b>06-08</b>	Acima de 26 cm	24 – 26 cm	Abaixo 24 cm
<b>18-23</b>	<b>09-11</b>	Acima de 30 cm	27 – 30 cm	Abaixo 27 cm
<b>24-30</b>	<b>12-14</b>	Acima de 34 cm	30 – 34 cm	Abaixo 30 cm
<b>31-40</b>	<b>15-20</b>	Acima de 36 cm	31 – 36 cm	Abaixo 31 cm
<b>41-60</b>	<b>21-30</b>	Acima de 38 cm	32 – 38 cm	Abaixo 32 cm
<b>&gt;60</b>	<b>&gt;30</b>	Acima de 39 cm	34 – 39 cm	Abaixo 34 cm
<b>Total de Pontos</b>	<b>40</b>	<b>25</b>	<b>10</b>	<b>10</b>

\*\* Proposta por VALE FILHO (1989a); VALE FILHO et al., 2010; 2011.

### Estatística

Em primeiro lugar realizou-se uma análise descritiva dos dados obtendo-se as porcentagens de cada distúrbio nos animais estudados.

Para a detecção da idade em que os animais atingiram a maturidade, as variáveis: defeitos espermáticos maior (DM), defeitos espermáticos totais (DT) e gota citoplasmática proximal (GCP), características principais de imaturidade sexual, foram comparadas pela análise de variância (ANOVA) e a suas médias pelo teste de Bonferroni.

Os dados dos animais clinicamente normais (n=168) e daqueles com hipoplasia testicular (n = 18) foram analisados considerando-se o grupo nutricional, conforme é descrito a seguir.

A condição grupos de tipo de suplementação em função do diagnóstico (normal ou com

hipoplasia testicular) foi avaliada pelo teste do Chi-Quadrado ( $P < 0,05$ ).

O turbilhonamento, a motilidade, o vigor espermático, os defeitos espermáticos maiores, os defeitos espermáticos totais e a CAP, por serem escores subjetivos, foram submetidos a análise não-paramétrica (SAMPAIO, 2007), e avaliados pelo teste Mann-Whitney ( $P < 0,05$ ) para comparação entre touros clinicamente normais e hipoplásicos.

As variáveis quantitativas (idade, concentração, CE, comprimento do testículo direito, largura do testículo direito, volume do testículo direito, comprimento do testículo esquerdo, largura do testículo esquerdo, volume do testículo esquerdo, diferença entre o comprimento dos testículos, diferença entre a largura dos testículos) foram avaliadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ).

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS, versão 17.0.

## Resultados e Discussão

Na Tabela 3 observa-se que os animais oriundos das propriedades onde se faz a suplementação nutricional foram mais pesados que os oriundos de propriedades que não receberam suplementação. Estes resultados corroboram os relatados por CORREA et al. (2006), que em tourinhos Tabapuã distribuídos em três manejos nutricionais, observaram que aqueles que os animais alimentados com dieta mais balanceada atingiram maior peso e apresentaram melhores parâmetros espermáticos.

Na Tabela 4 é apresentada a distribuição percentual de defeitos espermáticos maiores (DM) e totais (DT) e da presença de gota citoplasmática proximal (GCP), segundo a faixa etária dos 277 animais classificados como: normais, imaturos e com maturidade sexual retardada.

Tabela 4 – Percentual médio de gota citoplasmática proximal em 277 tourinhos da raça Gir Leiteiro, classificados como clinicamente normais, imaturos sexualmente e com maturidade sexual retardada em função da faixa etária.

Faixa Etária (meses)	N	Idade (meses)	DM ± EPM (%)	DT ± EPM (%)	GCP ± EPM (%)**
12 a 17	39	15,13 ± 0,27	42,51 ± 7,76 <sup>A</sup>	47,33 ± 0,27 <sup>A</sup>	17,92 ± 3,42 <sup>A</sup>
18 a 23	60	20,12 ± 4,17	31,70 ± 4,17 <sup>A</sup>	39,42 ± 4,22 <sup>A</sup>	14,28 ± 3,08 <sup>A</sup>
24 a 30	117	26,88 ± 0,16	14,08 ± 1,39 <sup>B</sup>	21,59 ± 1,64 <sup>B</sup>	2,62 ± 0,83 <sup>B</sup>
31 a 40	47	34,70 ± 0,48	12,25 ± 1,69 <sup>B</sup>	18,55 ± 1,77 <sup>B</sup>	1,96 ± 0,52 <sup>B</sup>
41 a 60	14	45,21 ± 1,46	11,00 ± 1,00 <sup>B</sup>	16,64 ± 1,19 <sup>B</sup>	0,57 ± 0,23 <sup>B</sup>

\*n = Número de animais em cada faixa etária; Idade = idade média dos animais; DM = percentual médio dos defeitos espermático maiores; DT = percentual médio dos defeitos espermático totais; GCP = percentual médio de gota citoplasmática proximal. EPM = erro padrão da média.

\*\* Letras maiúsculas distintas na coluna indicam média de DM, DT e GCP diferentes pelo teste de Bonferroni (p < 0,05).

Observa-se que à medida que os animais vão ficando mais velhos até a idade adulta a porcentagem de DM, DT e GCP tende a diminuir. Observa-se ainda que as médias de DM (42,51 e 31,70%), DT (47,33 e 39,42%) e GCP (16,93 e 13,29%) das faixas etárias 1 e 2, respectivamente, ainda estão elevadas, caracterizando os animais como imaturos, já que os mesmos não atingiram 24 meses de idade (CBRA, 1998), já animais das faixas etária 3, 4 e 5 já se encontrava maturo com as porcentagens de DM, DT e GCP consideradas dentro da normalidade clínica, segundo as normas do CBRA (1998).

Tabela 3- Média dos pesos e idades (meses) dos 311 touros Gir Leiteiro em função do tipo de suplementação fornecida pela fazenda de origem, no estado de Minas Gerais

Grupo de Nutrição	de	<sup>1</sup> n	Idade (meses) ± EPM	Peso (KG) ± EPM	Valor P**
Com suplementação		218	25,64 ± 0,61	458,71 ± 6,68 <sup>A*</sup>	< 0,001
Sem suplementação		93	27,06 ± 0,44	379,11 ± 6,15 <sup>B</sup>	
Total animais	de	311	26,07 ± 0,45	434,90 ± 5,44	

<sup>1</sup>n = número total de animais em cada grupo de nutrição, EPM = erro padrão da média.

\*Letras maiúsculas distintas na coluna indicam média de peso vivo diferentes pelo teste t de Student.

\*\* Valor P para o teste t de Student.

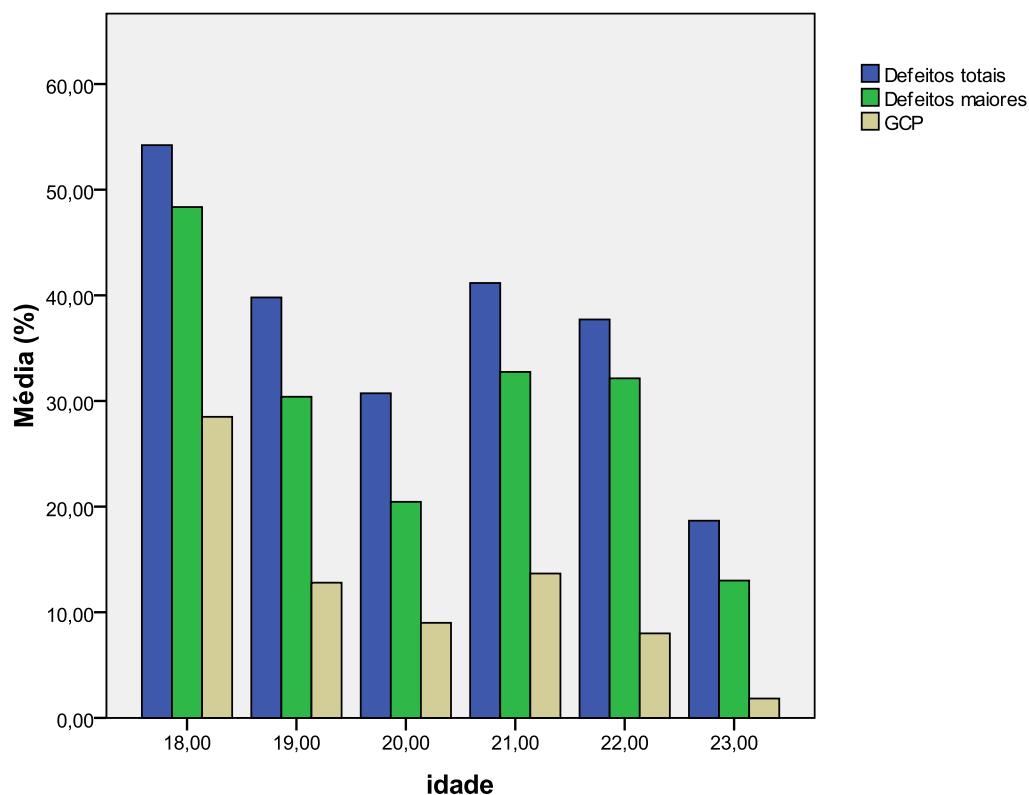


Figura 3 – Distribuição da porcentagem de defeitos espermáticos maiores, defeitos espermáticos totais e gota citoplasmática proximal em função da faixa etária 2 (18 a 23 meses) de 60 tourinhos da raça Gir Leiteiro

Na Figura 3 observa-se a distribuição da porcentagem de GCP na faixa etária 2 (18 a 23 meses), podendo-se observar que a partir dos 23 meses de idade a maioria dos animais já atingiram a maturidade, com DT, DM e GCP menores que 30, 15 e 6%, respectivamente. Estes dados são mais baixos que os para raças zebuínas, as quais podem atingir a maturidade sexual entre 30 a 36 meses em diferentes níveis nutricionais (FONSECA et al., 1989, VALE FILHO et al., 1989a), e mais tardio que os registrados por GUIMARÃES (1993), que em estudo em animais da raça Gir, observou maturidade sexual aos 20 meses. A diferença observada entre o trabalho de GUIMARÃES (1993) e o presente estudo, pode ser atribuída ao número de coletas de dados, pois GUIMARÃES (1993) acompanhou os animais dos 12 aos 24

meses, com coletas periódicas. No presente trabalho foi feita apenas uma coleta por animal.

Na Tabela 5 são apresentadas as frequências dos distúrbios andrológicos observados nos seis rebanhos Gir Leiteiro estudados, distribuídos em dois grupos CS e SS.

Quanto à hipoplasia testicular, observou-se frequência de 5,79 %, em 311 touros examinados, sendo que nos animais suplementados (n=218) a frequência foi 4,6 % e nos animais não suplementados (n=93) 8,6 %, provavelmente em vista de uma maior pressão de seleção feita nas propriedades que suplementavam seus animais. VALE FILHO et al. (1979) encontraram frequência deste distúrbio em animais de raças indianas

“standard pedigree” (n=392) e “high pedigree” (n=231) de 3,8 e 5,6 %, respectivamente. No mesmo estudo foi observado para raças zebuínas, européias, compostas e animais mestiços ½ sangue, num total de 628 animais “standard pedigree” e 344 “high pedigree”, respectivamente 6,5 e 11,48 %, com hipoplasia testicular.

Quanto à hipoplasia testicular, observou-se frequência de 5,79 %, em 311 touros examinados, sendo que nos animais suplementados (n=218) a frequência foi 4,6 % e nos animais não suplementados (n=93) 8,6 %,

provavelmente em vista de uma maior pressão de seleção feita nas propriedades que suplementavam seus animais. VALE FILHO et al. (1979) encontraram frequência deste distúrbio em animais de raças indianas “standard pedigree” (n=392) e “high pedigree” (n=231) de 3,8 e 5,6 %, respectivamente. No mesmo estudo foi observado para raças zebuínas, européias, compostas e animais mestiços ½ sangue, num total de 628 animais “standard pedigree” e 344 “high pedigree”, respectivamente 6,5 e 11,48 %, com hipoplasia testicular.

Tabela 5 – Frequência de distúrbios andrológicos detectados em 112 touros Gir Leiteiro, de um total de 311 avaliados, originários de dois grupos de fazendas (CS ou SS), em Minas Gerais

Diagnóstico	Grupo de Fazendas		
	CS (n=218) n (%)	SS (n=93) n (%)	Todas n(%)
Hipoplasia Testicular*	10 (4,6)	8 (8,6)	18 (5,79)
Suspeitos de HT	5 (2,3)	2 (2,2)	7 (2,25)
Imaturidade Sexual.	56 (25,)	6 (6,5)	62 (19,94)
Maturidade Sexual Retardada	8 (3,67)	8 (8,6)	16 (5,14)
Espermio gênese Imperfeita	1 (0,5)	1 (1,1)	2 (0,60)
Degeneração Testicular	1 (0,5)		1 (0,32)
Criptorquidismo	1 (0,5)	-	1 (0,32)
Disfunção do Epidídimo (cabeça)	3 (1,4)	-	3 (1,4)
Disfunção do Epidídimo (cauda)	2 (0,9)	-	2 (0,64)
Total	87 (39,9)	25 (26,9)	112 (36,36)

\*\*Teste Chi-Quadrado (p >0,05).

Quanto à hipoplasia testicular, observou-se frequência de 5,79 %, em 311 touros examinados, sendo que nos animais suplementados (n=218) a frequência foi 4,6 % e nos animais não suplementados (n=93) 8,6 %, provavelmente em vista de uma maior pressão de seleção feita nas propriedades que suplementavam seus animais. VALE FILHO et al. (1979) encontraram frequência deste distúrbio em animais de raças indianas “standard pedigree” (n=392) e “high pedigree” (n=231) de 3,8 e 5,6 %, respectivamente. No mesmo estudo foi observado para raças zebuínas, européias, compostas e animais mestiços ½ sangue, num total de 628 animais “standard pedigree” e 344 “high pedigree”,

respectivamente 6,5 e 11,48 %, com hipoplasia testicular.

Em outro estudo, VALE FILHO et al. (1986) observaram também em animais zebuínos “standard pedigree” (n=218) e “high pedigree” (n=213) as frequências de casos de hipoplasia testicular de 11,5 e 14,5%, respectivamente. Ainda, VALE FILHO e PINTO (1988), em 1011 touros de raças zebuínas observaram frequência de 5,34% de hipoplasia testicular, com animais da raça Gir “standard pedigree” e “high pedigree” apresentavam frequência de 7,7 e 6.9%, respectivamente. Já GOIOZO et al. (2005) em experimento com 80 touros da raça Nelore, com média de idade de 26 meses, criados no estado de Goiás, observaram 15% de

animais hipoplásicos. Comparando estes resultados com os do presente estudo e considerando que houve uma seleção prévia dentro das propriedades, dos animais entre a desmama e o sobre ano, onde aqueles com uma assimetria testicular acentuada são eliminados, constata-se que a hipoplasia testicular é um problema que está presente nos rebanhos zebuínos em uma prevalência subestimada.

Pelo teste do Chi-Quadrado (Tabela 5), não houve associação nem de grupo de fazenda, nem de grupo de idade ( $p > 0,05$ ), quando se desconsidera os animais com idade inferior a 23 meses, sobre a frequência de animais com hipoplasia testicular nos rebanhos estudados. Isto demonstra que a presença de hipoplasia testicular em um rebanho não está relacionada a fatores externos ao animal como clima, manejo, ou nutrição, sugerindo que o principal fator é de ordem genética.

Sete animais com idade inferior a 23 meses, sendo cinco no grupo de fazendas com suplementação e dois no grupo de fazendas sem suplementação, foram considerados suspeitos de hipoplasia testicular, por apresentarem assimetria testicular e parâmetros espermáticos inadequados segundo o CBRA (1998). Isto foi feito para se evitar uma possível contaminação no grupo de animais hipoplásicos, uma vez que o perfil espermático de animais imaturos e daqueles com hipoplasia se assemelhavam

(VALE FILHO et al., 1979; 1986; 2010 VALE FILHO E PINTO, 1988).

A imaturidade sexual com simetria testicular é considerada normal até 24 meses de idade. Por outro lado, a maturidade sexual retardada pode ter relação genética, de meio ambiente desfavorável ou do somatório de ambos (VALE FILHO et al., 1979; 1986). Assim a frequência observada de 5,14% (16 touros) nessa categoria é considerada alta. Maior pressão na seleção genética para maturidade sexual precoce é sugerida, ou de maior atenção no manejo nutricional.

Contrariamente, o índice de degeneração testicular registrado foi baixo, contrapondo os achados de vários estudos (NASCIMENTO e SANTOS, 2011; BICUDO, 2007; VALE FILHO et al. 1979), onde este distúrbio foi considerado a principal causa da redução de fertilidade em touros mais velhos (OLIVEIRA FILHO, 1981), que trabalharam com animais zebuínos entre 6 e 9 anos de idade.

Quanto ao testículo afetado, a hipoplasia testicular pode ser classificada como uni ou bilateral, sendo o testículo esquerdo afetado com maior frequência (VALE FILHO et al., 1988; McENTEE, 1990; LADDS, 1993; STEFFEN, 1997). Os achados neste estudo corroboramos autores citados acima, como demonstrado na Tabela 6.

Tabela 6 - Prevalência da hipoplasia testicular em 18 touros Gir Leiteiro de 23 a 60 meses de idade, oriundos de seis fazendas, de Minas Gerais, quanto ao(s) testículo(s) afetado(s)

	N.	%	CE	TD	TE
			(cm) ± EPM	(CT x LT cm ± EPM)	(CT x LT cm ± EPM)
Hipoplasia esquerda	10	55,56	31,10 ± 1,36	12,20 ± 0,47 x 7,36 ± 0,44	8,67 ± 0,79 x 5,47 ± 0,36
Hipoplasia direita	6	33,33	31,47 ± 0,77	9,94 ± 0,29 x 6,34 ± 0,50	11,26 ± 0,39 x 7,16 ± 0,44
Hipoplasia bilateral	2	11,11	27,5 ± 1,00	7,8 ± 0,20 x 5,05 ± 0,05	8,2 ± 0,2 x 4,95 ± 0,35

<sup>1</sup>N.= número total de animais afetados, % = porcentagem de animais afetados, CE = circunferência escrotal, TD = testículo direito, TE = testículo esquerdo, CT = comprimento testicular, LT = largura testicular, EPM = erro padrão da média.

Sob o ponto de vista clínico-anatomopatológico, a hipoplasia gonadal no macho pode ser dividida em leve, moderada e grave. Em casos de hipoplasia grave, os túbulos seminíferos apresentam-se com o diâmetro menor e cercados por células de Sertoli, pela lâmina basal geralmente com espermatogônias que não

mostram atividade mitótica. A membrana basal se apresenta espessada e hialinizada com aumento do tecido conjuntivo peritubular. As células de Leydig se apresentam em número aumentado comparadas às do testículo normal (NASCIMENTO e SANTOS, 2011); estes casos podem ser também classificados como *arrested*

*spermiogenesis* (LAGERLÖF, 1948 citado por SETTERGREEN E MCENTEE, 1998; VALE FILHO et al., 1979; ROBERTS, 1986). Isto pode explicar o fato de alguns animais apresentarem um quadro de azoospermia ou oligospermia grave. No presente estudo foram observados três casos de azoospermia ou oligospermia grave (16,67 %), num total de 18 animais hipoplásicos. Esses animais apresentaram diferença entre os testículos maior que 1,0 cm de comprimento e 0,5 cm de largura, além de um quadro de azoospermia no ejaculado, conforme mostrado na Tabela 7 e Figura 4.

Na hipoplasia moderada, 50% ou mais dos túbulos geralmente estão envolvidos, enquanto nos túbulos remanescentes há graus variados de atividade espermatogênica. Na maioria dos túbulos, a atividade de diferenciação ocorre somente até o estágio de espermatócitos. Além da vacuolização dos túbulos seminíferos, estão presentes também células gigantes

multinucleadas em número variável no lúmen do túbulo (McENTEE, 1990; LADDS, 1993). Esse foi o tipo de hipoplasia mais observado neste trabalho, onde 77,78% (n = 14) dos animais apresentavam hipoplasia moderada, conforme Tabela 7.

Na hipoplasia leve, somente alguns túbulos seminíferos são hipoplásicos, mas na maioria deles há atividade mitogênica além do estágio de espermatócitos, com espermatogênese ativa (NASCIMENTO e SANTOS, 2011). Embora possa haver infiltração de células inflamatórias (linfócitos), esta não é uma característica comum da hipoplasia. O diagnóstico da hipoplasia testicular leve normalmente é difícil, uma vez que os testículos estão clinicamente e macroscopicamente pouco alterados e a fertilidade do touro está praticamente normal (LADDS, 1993; STEFFEN, 1997). Somente um animal (5,55%), no presente estudo, apresentou-se com hipoplasia leve, conforme demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7 - Níveis de expressividade clínica-testicular e de qualidade de sêmen em touros da raça Gir Leiteiro, entre 23 e 60 meses, com hipoplasia testicular, oriundos de seis rebanhos, do Estado de Minas Gerais.

Hipoplasia Testicular	N.	%	Turb. (0-5)	Mot. (%)	Vig. (0-5)	Conc. x10 <sup>6</sup> /ml	DM (%)	DT (%)	Características <sup>1</sup>
Grave	3	16,67	0	0	0	0	-	-	Azoospermia Oligospermia
Moderada	14	77,78	1,92	45	3,71	285,35	29,57	37,35	Def. de cab.; G.C.P; P.I.; Def. cauda;
Leve	1	5,55	3	50	5	300,00	22	28	Sêmen quase normal

<sup>1</sup>Def. de cab. = defeito de cabeça, G.C.P. = gota citoplasmática proximal; P.I. = defeito de peça intermediária; Def. cauda = defeito de cauda; G.C.D. = gota citoplasmática distal.

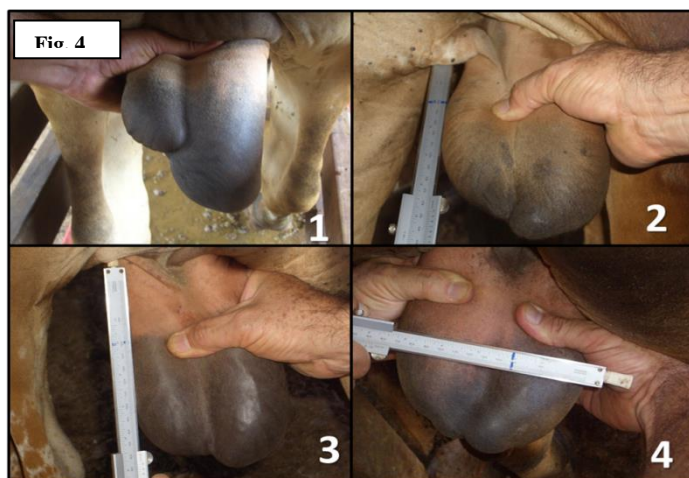


Figura 4: Animais 1, 2 e 3 apresentam hipoplasia testicular com graus de assimetria diferentes; Animal 4 é clinicamente normal.

A circunferência escrotal (CS = 34,59 cm; SS = 31,1 cm), os comprimentos testiculares direito (CS = 12,11 cm; SS = 10,33 cm), e esquerdo (CS = 11,88 cm; SS = 10,34 cm), e as larguras testiculares direita (CS = 7,36 cm; SS = 6,06 cm) e esquerda (CS = 7,28 cm; SS = 6,04 cm), dos grupos de animais diferiram ( $p < 0,05$ ). Isto pode ser explicado pelo modo de manejo adotado pelas fazendas, aqueles animais que receberam suplementação nutricional (CS), apresentaram biometrias testiculares maiores do que os não suplementados (SS) e criados em um sistema extensivo, uma vez que o peso está diretamente relacionado às medidas testiculares, o que vai de acordo com achados de CORREA (2006), o qual encontrou, em touros da raça Tabapuã jovens até 2 anos de idade, correlação positiva entre suplementação alimentar, biometrias testiculares e características físicas do sêmen.

As médias da CE observadas principalmente dos animais normais (33,68 cm; Tabela 8) foram maiores que as encontradas por SCHMIDT-HEBBEL et al. (2000) em estudo com animais na raça Gir, com idades entre 426 a 751 dias, em que a média foi 31,57 cm, o mesmo ocorrendo com as biometrias testiculares (comprimentos e larguras dos testículos direito e esquerdo, respectivamente, 10,38; 10,43; 6,91 e 6,93 cm), enquanto no presente estudo os comprimentos foram 11,51 e 11,52 cm e largura

6,26 e 6,20cm, respectivamente, para os testículos direito e esquerdo. No entanto, foram menores que os valores encontrado por VALE FILHO et al. (1979) em touros de raças zebuínas (largura dos testículos esquerdo e direito, 8,81 e 8,60 cm, respectivamente).

Também, pode-se observar na Tabela 8 que a CE dos animais com hipoplasia testicular é menor que a dos animais normais, o que pode ser explicado pelo não desenvolvimento de um ou mais componentes celulares dos túbulos seminíferos. Essa alteração ocorre em associação com diversos outros fatores, dentre os quais se destacam os distúrbios nos desenvolvimentos, genéticos e cromossômicos (LADDS, 1993; JONES et al., 2000; NASCIMENTO e SANTOS, 2011). GOIOZO et al. (2003) avaliaram o efeito da hipoplasia sobre o CE de touros da raça Nelore e concluíram que animais com hipoplasia testicular leve ou moderada não apresentaram diferença significativa na CE comparados àqueles com testículos normais, o que corrobora os achados deste estudo em animais SS ( $P > 0,05$ ; Tabela 9), porém contrário ao encontrado, com animais CS ou quando se consideram todos os animais em conjunto, desconsiderando o grupo nutricional de origem, onde houve diferença da CE ( $p < 0,05$ ; Tabelas 8 e 10) entre animais normais e hipoplásicos.

Tabela8 – Médias de peso corporal, circunferência escrotal (CE), biometrias testiculares de touros Gir Leiteiro clinicamente normais (n = 168) e com hipoplasia testicular (n= 18).

Parâmetro <sup>1</sup>	Animais		Valor-P <sup>*</sup>
	Normal (± EPM)	Hipoplasia Testicular (± EPM)	
Peso Corporal (kg)	467,64 (±7,54)	448,28 (±20,23)	> 0,05
CE (cm)	33,68 (±0,29)	30,82 (±0,83)	< 0,01
Comprimento TD(cm)	11,51 (±0,11)	10,96 (±0,46)	> 0,05
Largura TD (cm)	6,92 (±0,08)	6,76 (±0,34)	> 0,05
Volume TD (cm <sup>3</sup> )	908,2 (±28,29)	870,54 (±113,70)	> 0,05
Comprimento TE (cm)	11,52 (±0,11)	9,48 (±0,54)	< 0,001
Largura TE (cm)	6,94 (±0,08)	5,98 (±0,31)	< 0,01
Volume TE (cm <sup>3</sup> )	910,76 (±27,62)	603,12 (±85,27)	< 0,011
Diferença de Comprimento	0,24 (±0,01)	2,44 (±0,60)	< 0,001
Diferença de Largura	0,22 (±0,01)	1,36 (±0,28)	< 0,01
Diferença de Volume	53,57 (±3,88)	447,06 (±100,57)	< 0,001

<sup>1</sup>TD = testículo direito, TE = testículo, EPM = erro padrão da média

\*Valor-P para teste t de Student.

Quando se comparam comprimentos, larguras e volumes testiculares, entre animais normais e hipoplásicos, observa-se entre os animais CS (Tabela 9) diferenças entre os comprimentos, larguras e volumes testiculares esquerdos ( $p < 0,05$ ), porém o mesmo não ocorre nas biometrias direitas deste grupo e em nenhuma biometria (direita ou esquerda) do grupo de animais SS ( $P > 0,05$ , Tabela 10). Uma explicação para isto seria que quando se comparam animais sem considerar a posição do testículo hipoplásico, os resultados podem estar mascarados. Para solucionar tal problema, foram comparadas as diferenças entre comprimento, largura e volume testicular, entre os testículos assimétricos (maior e o menor), que foram diferentes ( $P < 0,05$ , Tabelas 9 e 10) entre os animais normais e os com distúrbio, tanto para CS quanto para SS. Estas diferenças entre as biometrias testiculares podem ser explicadas, pela menor área dos túbulos seminíferos, com baixa ou sem presença de

espermatogênese, membrana basal espessada, às vezes mielinizada, com células de Sertoli, e espermatogônias com baixa atividade mitótica, que normalmente são observadas no testículo hipoplásico, levando a redução no tamanho do mesmo (NASCIMENTO E SANTOS, 2011).

A concentração espermática não sofreu interferência dos grupos CS e SS ( $p > 0,05$ ), uma vez que após a separação dos animais normais e hipoplásicos, somente animais completamente maduros ou com o distúrbio foram selecionados. Entretanto os animais normais apresentaram concentração média ( $P < 0,05$ , Tabela 11) maior do que dos animais hipoplásicos (591,10 e 269,17 x 10<sup>6</sup>/ml, respectivamente). VALE FILHO et al. (1979) encontraram, em animais com hipoplasia gonadal da raça Hostein vermelho e branco, concentração maior (476 x 10<sup>6</sup>/ml) que a registrada neste estudo.



Tabela 9 – Médias de peso e biometria testicular de touros Gir Leiteiro CS normais clinicamente (n=105) e com diagnóstico de hipoplasia testicular (n=10)

Variável <sup>1</sup>	Com Suplementação			
	Diagnóstico	N	Média (±EPM)	Valor P*
Peso Corporal (kg)	Normal	105	515,63 ±0,70	> 0,05
	Hipoplástico	10	496,50 ±26,47	
CE (cm)	Normal	105	35,04 ±0,37	< 0,05
	Hipoplástico	10	31,62 ±1,31	
Comprimento TD (cm)	Normal	105	12,20 ±0,11	> 0,05
	Hipoplástico	10	11,83 ±0,42	
Largura TD (cm)	Normal	105	7,41 ±0,08	> 0,05
	Hipoplástico	10	7,59 ±0,42	
Volume TD (cm <sup>3</sup> )	Normal	105	1081,96 ±31,86	> 0,05
	Hipoplástico	10	1124,66 ±147,82	
Comprimento TE (cm)	Normal	105	12,18 ±0,11	< 0,05
	Hipoplástico	10	9,25 ±0,86	
Largura TE (cm)	Normal	105	7,43 ±0,08	< 0,05
	Hipoplástico	10	6,29 ±0,46	
Volume TE (cm <sup>3</sup> )	Normal	105	1083,94 ±31,03	< 0,05
	Hipoplástico	10	667,53 ±131,79	
Diferença de Comprimento (cm) (test. maior-menor)	Normal	105	0,23 ±0,02	< 0,05
	Hipoplástico	10	3,48 ±0,95	
Diferença de Largura (cm) (test. maior-menor)	Normal	105	0,20 ±0,02	< 0,05
	Hipoplástico	10	1,68 ±0,45	
Diferença de Volume (cm <sup>3</sup> ) (test. maior-menor)	Normal	105	57,08 ±4,71	< 0,05
	Hipoplástico	10	626,67 ±157,18	

<sup>1</sup>TD = testículo direito; TE = testículo; EPM = erro padrão da média.

\*Valor P para o teste t de Student.

Tabela 10 – Médias de peso e biometria testicular de touros Gir Leiteiro, SS, normais clinicamente (n=63) e com diagnóstico de hipoplasia testicular (n=8)

Variável <sup>1</sup>	Sem Suplementação			
	Diag.	N	Média (EPM)	Valor P*
Peso Corporal (kg)	Normal	63	387,65 ±6,95	> 0,05
	Hipoplástico	8	388,00 ±13,26	
CE (cm)	Normal	63	31,41 ±0,34	> 0,05
	Hipoplástico	8	29,83 ±0,89	
Comprimento TD (cm)	Normal	63	10,36 ±0,14	> 0,05
	Hipoplástico	8	9,88 ±0,62	
Largura TD (cm)	Normal	63	6,10 ±0,09	> 0,05
	Hipoplástico	8	5,76 ±0,32	
Volume TD (cm <sup>3</sup> )	Normal	63	618,51 ±27,29	> 0,05
	Hipoplástico	8	552,89 ±97,57	
Comprimento TE (cm)	Normal	63	10,43 ±0,13	> 0,05
	Hipoplástico	8	9,78 ±0,59	
Largura TE (cm)	Normal	63	6,12 ±0,09	> 0,05
	Hipoplástico	8	5,59 ±0,41	
Volume TE (cm <sup>3</sup> )	Normal	63	622,13 ±25,22	> 0,05
	Hipoplástico	8	522,59 ±100,76	
Diferença de Comprimento (cm) (test. maior-menor)	Normal	63	0,27 ±0,03	< 0,05
	Hipoplástico	8	1,15 ±0,263	
Diferença de Largura (cm) (test. maior-menor)	Normal	63	0,25 ±0,02	< 0,05
	Hipoplástico	8	0,95 ±0,23	
Diferença de Volume (cm <sup>3</sup> ) (test. maior-menor)	Normal	63	47,75 ±6,72	< 0,05
	Hipoplástico	8	222,55 ±51,04	

<sup>1</sup>TD = testículo direito; TE = testículo; EPM = erro padrão da média.  
\*Valor P para o teste t de Student.

Os dados da Tabela 11 mostram diferença (P < 0,05) entre os aspectos físicos (turbilhonamento, motilidade e vigor espermático) e morfológicos

(defeitos maiores e totais) de animais normais, e de animais com hipoplasia testicular.

Observa-se (Tabela 11 e Figuras 4 e 5) que o sêmen dos animais hipoplásicos apresentou pior resultado do que o de animais normais, o que corrobora os estudos anteriores (VALE FILHO et al. 1979; 1986; VALE FILHO, 1988). No estudo de VALE FILHO et al. (1979), em animais da raça Holandesa vermelho e branco com hipoplasia testicular, foram registrados turbilhonamento e motilidade espermática (1,1 e 40,2% respectivamente) semelhantes aos

encontrados nos animais com o mesmo distúrbio no presente estudo, porém com vigor espermático, defeitos maiores e defeitos totais mais elevados (4,5; 72,6% e 90%, respectivamente). Estas diferenças entre animais normais e hipoplásicos devem-se à menor área funcional do epitélio seminífero do testículo hipoplásico (NASCIMENTO e SANTOS, 2011).

Tabela 11 – Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros Gir Leiteiro clinicamente normais e com diagnóstico de hipoplasia testicular

Parâmetro	Animais		Valor-P
	Normais (N = 168)	Hipoplásicos (N= 18)	
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)	591,10 ±29,83 <sup>1</sup>	213,61 ±41,76	< 0,00*
Turbilhonamento (0-5)	3,15 ±0,16	1,94 ± 0,51	< 0,05**
Motilidade (%)	63,66 ±1,42	41,67 ±0,51	< 0,01**
Vigor (0-5)	4,55 ±0,07	3,44 ±0,48	< 0,05**
Defeitos Maiores (%)	10,80 ±0,29	27,06 ±5,00	< 0,001**
Defeitos totais (%)	17,71 ±0,50	33,67±5,56	< 0,001**

<sup>1</sup>Erro padrão da média;

\*Valor – P para teste t de Student;

\*\*Valor-P para teste de Mann-Whitney.

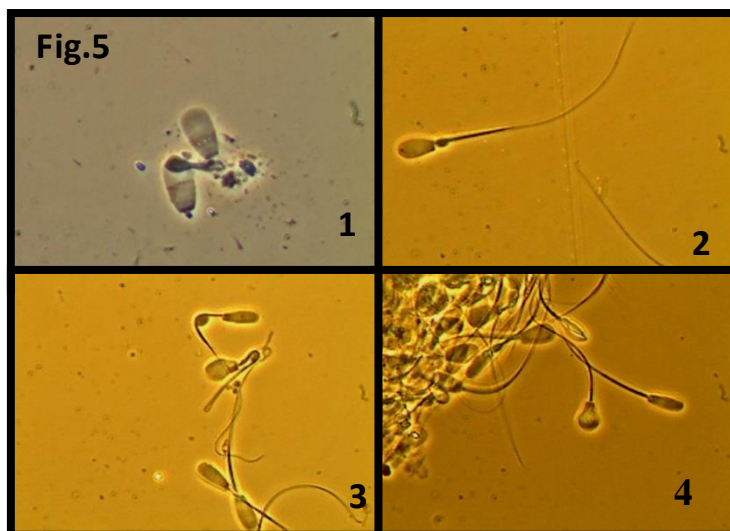


Figura 5: Quadro espermático de quatro animais com hipoplasia testicular; 1 = animal com oligospermia e espermatozoides apresentando defeitos na peça intermediária e com *pouch formation*; 2 = animal com oligospermia e espermatozoides apresentando gota citoplasmática proximal; 3 = espermatozoides apresentando contorno anormal, gota citoplasmática distal e cabeça piriforme; 4 = concentração espermática normal e espermatozoides com cabeça piriforme, gota citoplasmática proximal e contorno anormal.

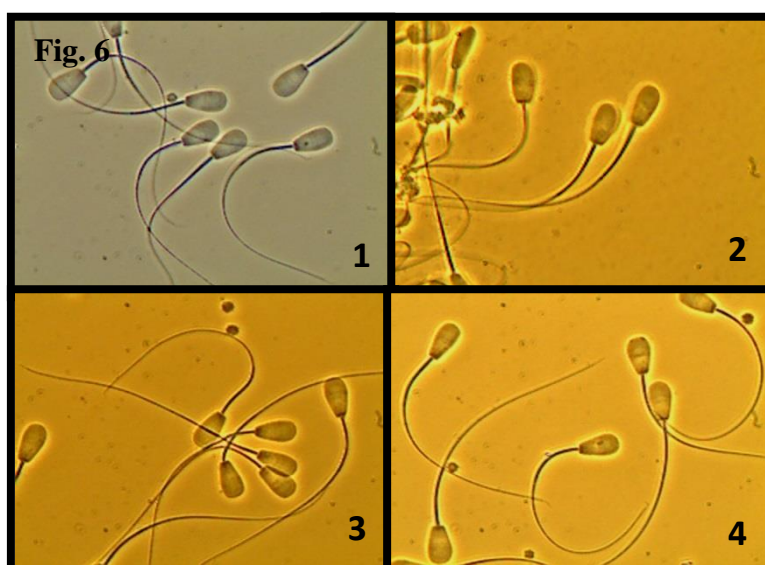


Fig. 6: Quadro espermático de quatro animais clinicamente normais.

Segundo QUIRINO (1999) e VALE FILHO et al. (2010a), a “Classificação Andrológica por Pontos” (CAP) pode ser utilizada como ferramenta para comparar fazendas quanto à pressão de seleção andrológica dos touros, considerando a capacidade de fecundação de seu sêmen e a herdabilidade da CAP ( $h^2 = 0,75$ ).

A Tabela 12 demonstra que há diferença ( $p < 0,05$ ) entre a seleção realizada pelos grupos de propriedades estudadas, evidenciando que aquelas do grupo CS apresentam um programa mais eficiente de seleção reprodutiva de animais da raça Gir Leiteiro, comparado à do grupo SS. Pode-se também observar que os animais

suplementados têm capacidade de expressar seu melhor potencial reprodutivo que animais não suplementados, o que também foi demonstrado no estudo de CORREA (2006), em um estudo com tourinhos da raça Tabapuã suplementados com três tipos de dietas, em que aqueles que receberam dieta mais completa apresentaram maior ganho de peso, e melhores características clínico-andrológicas e espermáticas ao final do período experimental.

Tabela 12 - “Classificação Andrológica por Pontos” (CAP), em dois grupos de animais clinicamente normais, um com suplementação nutricional e outro sem suplementação nutricional

Grupo de Fazenda*	Média (n)	Valor Mínimo	Valor máximo
Com suplementaçã	80,28 (13)	45	100
Sem Suplementaçã	62,96 (68)	37	100

\* Letras maiúsculas distintas na coluna indicam média da CAP diferentes pelo Teste de Mann-Whitney (p < 0,01).

## Conclusões

Animais hipoplásicos apresentaram parâmetros clínico-andrológicos inadequados para uma boa condição reprodutiva, sugerindo que tais animais são subfêrteis e não recomendados para uso em reprodução;

Os animais suplementados apresentaram melhores parâmetros clínico-andrológicos para reprodução, do que os não suplementados, nas mesmas faixas etárias, mas as diferenças entre animais clinicamente normais e hipoplásicos podem ser identificadas, independentemente do manejo nutricional.

## Bibliografia

BARTH, A. D.; OKO, R. J. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press, 1989.285p.

BICUDO, S. D.; SIQUEIRA, J. B.; MEIRA, C. Patologias do sistema reprodutor de touros. *Biológico*, v.69, n.2, p.43-48, 2007.

BRASIL. *Normas climatológicas* (1961-1990), Brasília, 84p, 1992.

BLOM, E. The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of bull spermogram. *Nor. Veterinaemed*, v. 25, n.77/8, p.383-91, 1973.

CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. – Belo Horizonte, 1998, 49 p.

CORREA, A. B.; VALE FILHO, V. R.; CORREA, G. S. S. et al. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (*Bos taurus indicus*) em diferentes manejos alimentares. *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo*.v.58, n.5, p.823-830, 2006.

FIELDS, M. J., BURNS, W. C., WARNICK, A. C. Age, season and breed effects on testicular volume and sêmen traits in young beef bulls. *J. Anim. Sci.*, v.48, p.1299-1304, 1979.

FONSECA, V. O.; COSTA E SILVA, E. V.; HERMANY, A, et al, Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com base na biometria testicular e características morfológicas do sêmen, Uma nova proposição, *Rev. Bras. Reprod. Anim*.v.1, p. 187, 1989.

GARCIA, J. M.; PINHEIRO, L. E. L.; OKUDA, H.T. Body development and semen physical and morphological characteristics of young Guzera bulls. *ARS Vet.*,v.3, n.1, p. 47-53, 1987.

GARCIA, O.S. *Aspectos físicos e morfológicos do sêmen de touros*. 1971. 61 p. Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GOIOZO, P. F. I.; LIMA, J. P.; DI SANTIS, G. W. et al. Hipoplasia testicular (discreta e moderada) e sua correlação com o perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*). *Rev. Bras. Reprod. Anim*.v. 27, n.3, p. 559 - 560, 2003.

GOIOZO, P. F. I.; Di SANTIS, G. W.; LIMA de, J. P. et al. Alterações testiculares em bovinos da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) criados no centro-oeste brasileiro. *Rev. CFMV*, v. 11, n. 34, p. 58-62, 2005.

- GUIMARÃES, J. D. *Puberdade e maturidade sexual em touros da raça Gir criados em condições semi-extensivas*. 1993, 85f., Dissertação (mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- JONES, T. C.; HUNT, R. D.; KING, N, W, *Patologia Veterinária*, 6, ed, São Paulo: Manole, 2000. 1415 p.
- HAQ, I. Causes of sterility in bulls in Southern England. *Brit. Vet. J.* v.105, p. 71-88, 1949.
- KNUDSEN, O. Testicular hypoplasia with multipolar spindle formation in the spermatocytes of bull. *Acta Vet. Scand.*,v.2, p. 199-209, 1961a.
- KODAGALI, S. B. e KERUR, V. K. Gonadal hypoplasia in Gir cattle. *Indian Vet. J.* v.45, p. 114-118, 1968.
- KODAGALI, T. N.; VAISHNAV, T. N.; HERANJAL, D. D.; KERUR, V. K. Studies on histopathologic changes in testis associated with hypoplasia in Gir cattle. *Indian J. Anim. Sci.*v.41, n.2, p. 92-95, 1971.
- KUDSEN, O. Sticky chromosomes as a cause of testicular hypoplasia in bulls. *Acta Vet. Scand.*, v.2, p. 1-14, 1961b.
- KUDSEN, O. Sticky chromosomes as a cause of testicular hypoplasia in bulls. *Acta Vet. Scand.*,v.2, p. 1-14, 1961b.
- LADDS, P. W. The male genital system. In: JUUB, K. V. F.; KENNEDY, P. C.; PALMER, N. *Pathology of domestic animals*. 4. ed. San Diego: Academic Press, 1993, v. 3, p. 485-512.
- LAGERLÖF, N. *Morphologische untersuchungen über veränderungen im spermabild und in der hoden bei bullen mit verminderter oder aufgehobener fertilität (Morphological investigations on changes in semen and testes of low fertile or sterile bulls)*.1934. Tese (doutorado), Almqvist e Wilksell, Uppsala.
- LAGERLÖF, N. Factors of sterility, In: International Congress Physiology and Pathology of Animal Reproduction and Artificial Insemination,1, 1948, Milan, *Proceedings...* Milan, 1948. p.1-8,
- MCENTEE, K. *Reproductive pathology of domestic animals*. London: Academic Press, 1990. 401p.
- NASCIMENTO, E. F.; SANTOS, R. L. *Patologia da reprodução dos animais domésticos*. 3ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2011. 133p.
- OLIVEIRA FILHO, B. D. *Calcificação testicular em bovinos abatidos em frigoríficos no Estado de Goiás*. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1981. 20 fl. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.
- QUIRINO, C. R. *Herdabilidades e correlações genéticas entre medições testiculares, características seminais e libido em touros Nelore*. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1999. 104p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.
- ROBERTS, J.S. *Veterinary obstetric and genital diseases (Theriogenology)*.1986 Ann Arbor; Edwards Brothers, 981p.
- SAMPAIO, I. B. M. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. BH, FEPMVZ, Ed. Escola de Veterinária, UFMG, 2007. 254 p.
- SCHMIDT-HEBBEL, J.; TONIOLLO G,H.; LEITE, F.G. *et al*, Características físicas e morfológicas de sêmen de touros jovens das raças Gir, Guzará, Nelore (*Bos taurus ndicus*) e Caracu (*Bos taurus taurus*). *Arq. Bras. Med. Vet. Zoo.*, v.52, p.461-467, 2000.
- SETTERGREN, I. e MCENTEE, K. Germ cell weakness as a cause of testicular hypoplasia in bulls *Acta Vet. Scand.*,v.33, p. 273-282.
- STEFFEN, D. Genetic causes of bull infertility. *Vet. Clin. N. AM- Food A*, v.13, p.243-254, 1997.
- UNANIAN, M. M.; SILVA, A. E. D. F.; McMANUS, C. et al. Características

biométricas testiculares para avaliação de touros zebuínos da raça Nelore. *Rev. Bras. Zoo.*, v. 29, p. 136-144, 2000.

VALE FILHO, V. R. *Disfunção de epidídimo em touros Bos taurus e Bos indicus, criados no Brasil*. Belo Horizonte. Universidade Federal de Minas Gerais, 1975. 82p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária). Escola de Veterinária.

VALE FILHO, V. R.; MAGALE, F.; GARCIA, O. S. Incidência elevada de defeitos da bainha mitocondrial do espermatozóide e baixa eficiência reprodutiva, em touros da raça GIR. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.1, n.2, p.31-39, 1977.

VALE FILHO, V. R.; PINTO, P. A.; FONSECA, J. et al. *Patologia do sêmen: Diagnóstico andrológico e classificação de Bos taurus e Bos indicus quanto à fertilidade para uso como reprodutores em condições de Brasil – de um estudo de 1088 touros*. São Paulo: Dow Química, 1979. p. 4.

VALE FILHO, V. R.; PINHEIRO, L. E. L.; BASRUR, P. K. Reproduction in zebu cattle. In: MORROW, D. A. *Current Therapy in Theriogenology: Diagnosis, Treatment, and Prevention of Reproductive Diseases in Small e Large Animals*, 2a. ed, Philadelphia, W.B. Saunders company, 1986, p.437-443.

VALE FILHO, V. R.; PINTO, E. H. Testicular hypoplasia in Bos indicus and Bos taurus bulls,

raised in Brasil. In: International Congresso n Animal Reproduction and Artificial Insemination, 11, 1988. *Proceedings...*Dublin, Ireland, 1988. p. 387.

VALE FILHO, V. R. Padrões de sêmen bovino para o Brasil: análise e sugestões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE REPRODUÇÃO ANIMAL, 8, 1989. *Palestras ...* Belo Horizonte: CBRA, 1989. p. 94-118

VALE FILHO, V. R.; REIS, S. R.; PEREIRA, J. C. C. et al. Maturação sexual em touros Nelore com 24 meses de idade. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.1, p.202, 1989.

VALE FILHO, V. R. Subfertilidade em touros jovens e erados: parâmetros para avaliação andrológica e conceituação geral. *Cad. Tecn. Vet. Zoo*, nº35, p.81-87, 2001.

VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; AZEVEDO, N. A., Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. In: SIMCORTE Simpósio Internacional de Produção de Gado de Corte, 7, 2010, Viçosa, *Anais...* Viçosa, RBZ, p. 363-412.

VALE FILHO, V. R.; ANDRADE, V. J.; SILVA, M. A. et al. Novos métodos de avaliação andrológica e do potencial reprodutivo de touros. In: V Simpósio Nacional sobre Produção e Gerenciamento da Pecuária de Corte, 5, 2012, Belo horizonte, *Anais...*Belo Horizonte, FEPMVZ, p.179-239.

## CAPÍTULO 3

### ARTIGO 2

## Variação do número de cópias do TSPY entre touros normais e com hipoplasia testicular na raça Gir Leiteiro

### Resumo

A subfertilidade em bovinos é um problema que pode comumente ser observado no rebanho, devendo os animais acometidos serem retirados do rebanho. Quando o diagnóstico é facilmente realizado por simples avaliações do fenótipo os animais podem ser rapidamente eliminados. A detecção tardia da subfertilidade acarreta grandes prejuízos ao sistema de produção. Diversos genes têm sido associados à subfertilidade em várias espécies, entre eles, destaca-se o gene TSPY (*testis-specific protein Y-encoded*). Este gene localiza-se no cromossoma Y e codifica uma proteína expressa na espermatogônia no início da meiose. Objetivou-se com o presente estudo verificar a associação entre o número de cópias do gene TSPY dos animais normais e dos animais com hipoplasia testicular. A amostra foi constituída de 311 touros da raça Gir Leiteiro, oriundos de seis fazendas distribuídas no estado de Minas Gerais. Foram selecionados 12 animais com hipoplasia testicular e 12 controles pareados por idade e fazenda. A detecção do número de cópias foi feita por PCR em tempo real. Os resultados foram submetidos a testes de normalidade, depois as médias dos grupos foram comparadas pelo teste t de Student ( $P < 0,05$ ). Houve diferença significativa entre o número de cópias do TSPY ( $P < 0,05$ ) entre touros normais e hipoplásicos (164,6 e 172,5, respectivamente). As dispersões foram comparadas por análise de variância ( $F=4,865$ ;  $p=0,0143$ ). Conclui-se que os touros com hipoplasia testicular apresentaram um número maior de cópias do gene TSPY comparado à animais clinicamente normais quanto a reprodução.

Palavras chaves: cromossoma Y, fertilidade, zebu

### Abstract

*The sub-fertility in cattle is a problem that can be commonly observed in the herd. The affected animals should be removed from the herd. When the diagnosis is easily made by simple evaluations of the animals phenotype can be rapidly eliminated. Late detection of sub-fertility causes great damage to the production system. Several genes have been associated with sub-fertility in several species, among which stands out the TSPY (testis-specific protein Y- encoded) gene. This gene is located on the Y chromosome and encodes a protein expressed on spermatogonia in early meiosis. This study aimed to verify the association between the number of copies of the TSPY gene of normal animals and animals with testicular hypoplasia. The sample consisted of 311 bulls in Gyr cattle, from six farms distributed in the state of Minas Gerais. 12 animals with testicular hypoplasia and 12 matched controls by age and farm were selected for analysis. The detection of the copy number was done by real time PCR. The results were submitted to tests of normality, then the means of groups were compared by Student t-test ( $P < 0.05$ ). There was significant difference between the number of copies of TSPY ( $P < 0.05$ ) between normal and hypoplastic bulls (164.6 and 172.5, respectively). The dispersions were compared by analysis of variance ( $F = 4.865$ ,  $P = 0.0143$ ). It was concluded that bulls with testicular hypoplasia had a higher number of copies of the TSPY gene compared to clinically normal animals for reproduction.*

Key words: chromosome Y, fertility, zebu.

### Introdução

A eficiência reprodutiva de touros é uma das mais importantes características para bom desempenho econômico da atividade pecuária.



No entanto, falhas reprodutivas podem ser comuns e devem ser detectadas e os animais acometidos retirados do rebanho.

Os genes do cromossoma Y estão diretamente relacionados à espermatogênese/espermiogênese (DIMEO et al., 2005) No entanto, são ainda raras as seqüências desse cromossoma, em bovinos, disponíveis nos bancos de dados ([www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); 11/04/2013).

Mutações ou deleções de genes do cromossoma Y têm sido associadas à subfertilidade em várias espécies (LARDONE et al., 2007; HAMILTON et al., 2009; POONGOTHAI et al., 2009; SVACINOVA et al., 2011). Suspeita-se que estas alterações possam também estar relacionadas à hipoplasia gonadal que em touros da raça Gir Leiteiro interfere na fertilidade.

O gene *testis-specific protein Y-encoded* (TSPY) é um gene multicópia e mapeado no braço curto do cromossoma Y (Yp) em seres humanos, apresentando um padrão de expressão testículo específico (ARNEMANN et al., 1987). Em bovinos, HAMILTON et al. (2009) demonstraram que o gene TSPY também está localizado em Yp.

A variação do número de cópias do gene TSPY tem sido relacionada à cânceres masculinos e à problemas reprodutivos no homem (VIJAYAKUMAR et al, 2006;. VODICKA et al, 2007). Há estudos que demonstram a variação no número de cópias deste gene no bovino (JAKUBICZKA et al, 1993; MANZ et al, 1993; VOGEL et al., 1997; HAMILTON et al., 2009). HAMILTON et al. (2012) descreveram uma redução da expressão do gene associada ao aumento do número de cópias desse gene em *Bos taurus taurus* (raça Holstein Canadense). Este é o primeiro estudo investigando esta variação em zebuínos e o primeiro a investigar a distribuição do número de cópias entre indivíduos normais e portadores de hipoplasia testicular e alterações espermáticas.

## Material e Métodos

### Amostra

A amostra inicial foi constituída de 311 touros da raça Gir Leiteiro, oriundos de seis fazendas distribuídas no estado de Minas Gerais, em cinco delas os animais recebiam suplementação nutricional (estação chuvosa do ano: mantidos a pasto com suplementação nutricional concentrada contendo 14% PB; estação seca do ano: os animais recebiam silagem de milho mais suplementação concentrada contendo 14% PB) e uma fazenda os animais foram mantidos a pasto durante o ano inteiro apenas com suplementação mineral.

Para cada animal foram anotados: o nome, o número de registro, a data de nascimento, o nome do pai, o nome da mãe, bem como o peso vivo (PV) e as biometrias dos testículos no momento da realização das coletas de sêmen. O peso foi mensurado individualmente em balança mecânica tipo tronco. o perímetro escrotal (CE) foi mensurado com fita milimétrica no seu local de maior diâmetro, envolvendo gônadas e pele escrotal. O comprimento (CT) e a largura (LT) dos testículos foram mensurados individualmente com a utilização de um paquímetro.

As colheitas das amostras de sêmen foram realizadas em todos os animais (n=311) por meio de eletro-ejaculação, em tubos cônicos graduados. No momento da colheita, uma gota do sêmen era posicionada em lâmina para avaliação do turbilhonamento espermático (0-5), outra gota foi posicionada em lâmina sob lamínula para a avaliação da motilidade espermática progressiva (MOT - % de espermatozóides móveis) e do vigor espermático (0-5) em microscopia ótica com aumento de 100 x. Uma alíquota de 20µL da amostra de sêmen foi diluída em 1000µL de uma solução do formol-salino a 1% para posterior avaliação da concentração espermática em câmara de Neubauer. Outra alíquota de sêmen foi utilizada para avaliação da morfologia espermática (percentual de defeitos espermáticos maiores (DM), menores (dm) e totais (DT) e de espermatozóides normais) (CBRA, 1998) em preparação úmida para

microscopia de contraste de fases (BARTH E OKO, 1989). Tais amostras foram analisadas no Laboratório “Multi-Usuário”, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG e os animais foram classificados como normais clinicamente, hipoplásicos ou com outro distúrbio reprodutivo, segundo CBRA (1998).

Foram coletados 10 mL de sangue periférico em frasco vacutainer estéril com EDTA de todos os animais do rebanho para extração de DNA. Dentre estes foram selecionados 12 animais afetados por hipoplasia testicular e alterações espermáticas e 12 controles, pareados por fazenda e idade.

### Extração do DNA

Para extração de DNA, as amostras de sangue periférico foram tratadas com proteinase K, seguida por precipitação salina (MILLER et al., 1988).

As etapas de extração de DNA e genotipagem dos marcadores foram realizadas pela equipe do Laboratório de Genética Humana e Médica do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, coordenado pela Dr<sup>a</sup> Maria Raquel Santos Carvalho.

### PCR em tempo real

A amplificação por PCR em tempo real foi desenvolvida conforme descrito por HAMILTON et al. (2009). Além do gene TSPY, foi amplificado o gene SRY, para se ter uma referência do número de cópias. As seqüências de iniciadores usadas foram: TSPY “forward” 5’ - CCCAGAATCGAACAGGATTG-3’, e TSPY “reverse” 5’ -TTGTCTCTCACGGACGAACC-3’; e SRY “forward” 5’ - CCAATTAAGCCGGTCACAGT-3’; e SRY “reverse” 5’ -CACAAGAAAGTCCAGGCTC-3’.

### Quantificação relativa de DNA amplificado

A PCR por tempo real foi feita utilizando-se o kit “Power Sybr Green” (Applied Biosystems®) e as amplificações foram feitas no termociclador modelo 7900 da Applied Biosystems. As concentrações de iniciadores utilizadas foram 20 pmol/μL e 25 pmol/ μL para os genes SRY e TSPY, respectivamente. Cerca de 10 ng/ μL de DNA foram utilizados para ambos os genes e o volume final da reação foi de cerca de 20 μL. O programa de amplificação utilizado constou das seguintes etapas: pré-incubação para a ativação da polimerase “FastStart” a 95°C por 10 minutos; seguido por 45 ciclos de amplificação de desnaturação a 95°C por 10 segundos (20°C/s), hibridização a 67°C por 10 segundos (20°C/s), e anelamento a 64°C e 60 °C por 10 segundos para SRY e TSPY, respectivamente. A curva de fusão foi gerada tomando-se medidas fluorescentes a cada 0,1° C a partir de 72° C até 95° C. Um valor limiar (VL), descrito como o número fracionado de ciclos nos quais o valor da fluorescência do alvo amplificado excede significativamente a fluorescência do fundo (LINZMEIER e GANZ, 2005, citado por HAMILTON et al., 2009) foi medido para cada amostra. As reações foram feitas em duplicatas. As análises da curva de fusão e do produto de sequenciamento da PCR foram realizadas para confirmar a especificidade da amplificação dos genes TSPY e SRY.

As curvas-padrão foram geradas a partir do DNA bovino nas seguintes diluições 15ng, 10 ng, 1ng, 0,1ng para ambos os genes.

As eficiências das reações para TSPY e SRY foram obtidas de acordo com a equação:  $E=101/slope$  (RASMUSSEN,2001) e padronizadas de forma que cada um dos genes tivesse eficiência entre 80-110% e apresentassem um pico único nas curvas de dissociação. Foram padronizadas condições, para cada um dos genes amplificados, com eficiência entre 90-110% e com um único pico nas curvas de dissociação.

Para minimizar a variação entre corridas, foi feita uma calibração na qual uma amostra, denominada calibradora, foi incluída no estudo. O número de cópias dessa amostra foi definido pela média de todos os CT’s (*cycle threshold*)

para cada gene. O resultado de cada corrida foi normalizado para o calibrador usando o método  $\Delta$ VL de acordo com a equação:

$$\text{Relação} = \frac{(E_{\text{alvo}})^{\Delta\text{VL}_{\text{alvo}} (\text{controle} - \text{amostra})}}{(E_{\text{referência}})^{\Delta\text{VL}_{\text{referência}} (\text{controle} - \text{amostra})}}, \quad (1)$$

em que E é igual à eficiência da PCR para o gene alvo (TSPY) e para o gene de referência (SRY), e  $\Delta$ VL = VL do controle (calibradora) – VL da amostra (amostras testadas) (PFAFFL, 2001).

### Determinação do número de cópias

O número de cópias do TSPY da amostra calibradora foi estimado usando o método do  $\Delta$ VL, o qual foi ajustado para a eficiência do primer de acordo com a equação:

$$\text{Número de cópias}_{\text{amostra}} = \frac{(E_{\text{referência}})^{\text{VL}_{\text{re}}}}{(E_{\text{alvo}})^{\text{VL}_{\text{alvo}}}} \quad (2)$$

Com o número de cópias da amostra calibradora estabelecida, os números de cópias das amostras em teste foram deduzidos pela seguinte equação (HAMILTON et al., 2009):

Número de cópias<sub>alvo</sub> = (número de cópias calibradora) (Relação; fórmula 1)

### Análises estatísticas

Para a comparação do número de cópias do gene TSPY entre os afetados e os controles, os números de cópias estimados foram submetidos a testes de normalidade de resíduos (Kolmogorov-Smirnov, teste Shapiro-Wil); as médias dos grupos foram comparadas pelo teste t de Student ( $p < 0,05$ ) e as dispersões por análise de variância. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando o software SPSS 17.0.

### Resultados e Discussão

Constam na Tabela 1 os resultados relativos ao número de cópias do gene TSPY em indivíduos normais e portadores de hipoplasia testicular e/ou anormalidades espermáticas. Ambos os grupos apresentaram número médio de cópias dentro da faixa de 50-200 cópias, o que corrobora estudos prévios para estimação do número de cópias do TSPY em bovinos (JAKUBICZKA ET AL., 1993; HAMILTON et al., 2009). Este número médio de cópias é maior do que o descrito em outras espécies (seres humano, grandes e pequenos primatas, caprinos e ovinos). HAMILTON et al. (2009) sugerem que o número de cópias elevado em bovinos, comparado ao das outras espécies, estaria relacionado à necessidade de produção da proteína TSPY para o desenvolvimento das células germinativas masculinas. Alternativamente, o aumento do número de cópias poderia ser parte de um mecanismo de defesa contra o declínio da região macho-específica do cromossoma Y.

Tabela 1 – Média do número de cópias do TSPY em touros da raça Gir Leiteiro normais clinicamente ou com hipoplasia testicular

Diagnóstico	N <sup>1</sup>	Média do Número de cópias do TSPY ( $\pm$ EPM)	Valor P
Normal	12	164,6 $\pm$ 1,446 <sup>B</sup>	0,0341
Hipoplasia Testicular	12	172,5 $\pm$ 3,189 <sup>A</sup>	

<sup>1</sup>N = número de amostras; EPM = erro padrão da média;

\* Letras maiúsculas distintas na coluna indicam média do número de cópias diferentes pelo teste de t de Student ( $p < 0,05$ ).

Observaram-se diferenças significativas entre o número de cópias do gene TSPY de touros normais e hipoplásicos (164,6 e 172,5, respectivamente;  $P < 0,05$ ) e entre as variâncias ( $F=4,865$ ;  $P=0,0143$ ).

HAMILTON et al. (2012), com amostra de 64 indivíduos, observaram correlação positiva entre o número de cópias do gene TSPY e a taxa de retorno ao estro e não observaram relação entre número de cópias e volume do ejaculado, contagem espermática e motilidade progressiva. A amostra estudada por estes autores, entretanto, foi composta de animais de central de coleta de sêmen, com idade entre 4,6 a 7,6. Pode-se hipotetizar, no entanto, que estes animais tiveram sêmen normal em algum momento de suas vidas, o que sugere que a dificuldade reprodutiva destes animais seja secundária. Além disto, os valores do espermiograma foram normais, segundo as normas do CBRA (1998), portanto, estes animais não apresentaram alterações reprodutivas que pudessem ser atribuídas a alterações meióticas, de acordo com o mecanismo de ação proposto para o gene TSPY. Outro aspecto relevante, foi que os autores avaliaram a taxa de não-retorno ao estro, mas não descreveram quais estratégias foram usadas para garantir que a não-prenhez fosse notificada à central de coleta de sêmen.

Resultados conflitantes também têm sido descritos em humanos, nos quais foram descritas correlações positiva, negativa e ausência de correlação (VODICKA et al., 2007; GIACHINI ET AL., 2009; NICKKHOLGH ET AL. 2010).

Apesar dos resultados conflitantes, o gene TSPY é candidato teórico para explicar distúrbios reprodutivos pelas evidências descritas a seguir:

1. A transcrição prototípica do gene TSPY, denominada TSPY-S, é expressa somente nos testículos, e a proteína foi encontrada principalmente em espermatogônias e, esporadicamente, em espermatócitos primários (SCHNIEDERS et al., 1996, VOGEL et al., 1998). Esta proteína pertence à superfamília, que inclui SET e NAP, proteínas relacionadas à ativação de fatores de replicação

(SCHNIEDERS et al., 1996). Hipotetizou-se que, no macho, o gene TSPY estivesse diretamente relacionado à espermatogênese, direcionando as espermatogônias para a meiose (VODICKA et al., 2007).

2. HAMILTON et al. (2012), em estudo realizado em bovinos da raça Holstein Canadense (*Bos taurus taurus*), observaram que a expressão da proteína TSPY está inversamente associada ao número de cópias do TSPY, o que sugere que o número de cópias possa estar negativamente atuando na expressão do gene, por meio da ruptura da sua seqüência, por levar a alterações em alguns dos seus promotores ou por ter efeitos posicionais em importantes elementos regulatórios. Entretanto, pode-se aventar uma hipótese adicional, de que o maior número de cópias esteja relacionado ao aumentada probabilidade de recombinação não homóloga, nos níveis meiótico e mitótico, levando à variação do número de cópias de genes presentes no intervalo entre as cópias do gene TSPY, em um mecanismo semelhante ao que leva a doenças genômicas (CARVALHO et al., 2010) ou ao mecanismo pelo qual, seqüências alu predispõem a mutações em humanos (HORSTHEMKE et al., 1987).

3. VODICKA et al. (2007), em um experimento com humanos observaram aumento do número de cópias do TSPY em indivíduos subfêrteis, sugeriram que esta influência negativa sobre a fertilidade seria devido à presença de cópias defectivas. Assim, apesar de o número de cópia do gene estar aumentado, a quantidade de proteína produzida poderia ser insuficiente para realizar sua função na espermatogênese. No mesmo estudo, outra hipótese proposta foi a de que o maior número de cópias do gene TSPY seria uma tentativa de compensar a diminuição da espermatogênese.

Este é um dos primeiros estudos buscando associar dificuldades reprodutivas em bovinos com número de cópias do gene TSPY e é o primeiro estudo a detectar diferença do número de cópias entre animais normais e animais portadores de hipoplasia testicular e/ou alterações espermáticas.

## Conclusões

Touros da raça Gir Leiteiro com hipoplasia testicular e/ou anormalidades espermáticas apresentaram número de cópias do gene TSPY significativamente maior, quando comparados à controles normais testados, pareados por idade e fazenda de origem (condições de manejo).

## Bibliografia

ARNEMANN, J.; EPPLIN, J. T.; COOKE, H. J. et al. A human Y-chromosomal DNA sequence expressed in testicular tissue. *Nucleic Acids. Res.* v.15, p-8713–8724. 1987.

CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. – Belo Horizonte, 1998, 49 p.

CARVALHO, C. M. B.; ZHANGA, F.; LUPSKI, J. R. Genomic disorders: A window into human gene and genome evolution. In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.*, V. 107, (1), p. 1765–1771, 2010.

DIMEO, G.P.; PERUCATTI, A.; FLORIT, S. et al. Chromosome evolution and improved cytogenetic maps in the Y chromosome in cattle, zebu, river buffalo, sheep and goat. *Chromosome Res.* v.13, p.349-355, 2005.

HAMILTON, C. K.; FAVETTA, L. A.; DI MEO, G. P. et al. Copy Number Variation of Testis-Specific Protein, Y-Encoded (TSPY) in 14 Different Breeds of Cattle (*Bos taurus*). *Sex. Dev.*, v. 3, p-205–213, 2009.

HAMILTON, C. K.; VERDUZCO-GÓMEZ, A. R.; FAVETTA, L. A. et al. Testis-Specific Protein Y-Encoded Copy Number Is Correlated to Its Expression and the Field Fertility of Canadian Holstein Bulls. *Sex. Dev.*, v. 6(5), p. 231-9. 2012.

HORSTHEMKE, B.; BEISIEGEL, U.; DUNNING, A. et al. Unequal crossing-over between two alu-repetitive DNA sequences in the low-density-lipoprotein-receptor gene. A

possible mechanism for the defect in a patient with familial hypercholesterolaemia. *Eur. J. Biochem.*, v.164, p.77-81. 1987.

JAKUBICZKA, S.; SCHNIEDERS, F.; SCHMIDTKE, J. A bovine homologue of the human TSPY gene. *Genomics*, v.17, p-732–735, 1993.

LARDONE, M. C.; PARODI, D.A.; VALDEVENTO, R. et al. Quantification of DDX3Y, RBMY1, DAZ and TSPY mRNAs in testes of patients with severe impairment of spermatogenesis. *Mol. Hum. Reprod.* V.13, n.10 p- 705–712, 2007.

LINZMEIER, R. M; GANZ, T. Human defensin gene copy number polymorphisms: comprehensive analysis of independent variation in  $\alpha$  - and  $\beta$  -defensin regions at 8p22-p23. *Genomics*, 86: 423–430 (2005).

MANZ, E.; SCHNIEDERS, F.; BRECHLIN, A. M. et al. TSPY -related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics*, v.17, p-726–731, 1993.

MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H, F. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids. Res.*, v.16, p.1215, 1988.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids. Res.*, v.29, p. 2002–2007, 2001.

POONGOTHAI, J.; GOPENATH, T. S.; MANONAYAKI, S. Genetics of human male infertility. *Singapore Med. J.*, v.50, n.4, p. 336-347, 2009.

RASMUSSEN, R.: Quantification on the LightCycler, In: Meuer S, Wittwer C, Nakagawara K (eds): *Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications*. Springer Press, Heidelberg. 2001. P. 21-34.

SCHNIEDERS, F.; DORK, T.; ARNEMANN, J. et al. Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum. Mol. Genet.*; v.5, p-1801–1807, 1996.

SVACINOVA, V.; VODICKA, R.; VRTEL, R. et al. Sequence recombination in exon 1 of the TSPY gene in men with impaired fertility. *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.*, v.155, n.3, p-287–298, 2011.

VIJAYAKUMAR, S.; HALL, DC.; REVELES, X. T. et al: Detection of recurrent copy number loss at Yp11.2 involving TSPY gene cluster in prostate cancer using arraybased comparative genomic hybridization. *Cancer Res.*, v.66, p-4055–4063, 2006.

VODICKA, R.; VRTEL, R.; DUSEK, L.; SINGH, A. R.; KRIZOVA, K.; et al: TSPY gene copy number as a potential new risk factor for male infertility. *Reprod. Biomed. Online*, v.14, p- 579–587, 2007.

VOGEL, T.; BORGMANN, S.; DECHEND, F.; HECHT, W.; SCHMIDTKE, J. Conserved Y-chromosomal location of TSPY in Bovidae. *Chromosome Res.*, v. 5; p-182–185, 1997.

[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov); 11/04/2013.

## CAPÍTULO 4

### Artigo 3

#### Identificação de marcadores para infertilidade em touros da raça Gir Leiteiro por meio de estudo de associação em escala genômica (GWAS)

##### Resumo

Falhas reprodutivas de machos bovinos afetam diretamente a produção econômica de uma propriedade, uma vez que estes são responsáveis por acasalar com várias fêmeas de um rebanho. Em estudo de associação em escala genômica (GWAS) em bovinos observa-se que várias regiões genômicas associam-se a baixa fertilidade. Objetivou-se com o presente estudo, por meio de GWAS, identificar regiões genômicas relacionadas à infertilidade e/ou subfertilidade em touros da raça Gir Leiteiro. Foram selecionados 30 animais diagnosticados com subfertilidade e 30 controles com exame físico e espermograma normais, pareados por fazenda e idade. Estes 60 animais foram genotipados com o chip *Affymetrix Axiom Genome-Wide BOS 1 Array*, composto por 648 mil SNPs. Anteriormente ao GWAS, os dados foram corrigidos para diferentes efeitos fixos. Esta análise foi realizada pelo PROC GLM do SAS<sup>®</sup> (1999). As variáveis foram avaliadas para normalidade do resíduo (Cramer-von Mises, 2013) e transformadas por arco-coseno:  $\sqrt{(y/100)}$ , quando necessário. Os dados foram submetidos à controle de qualidade para eliminar marcadores e amostras com erros de genotipagem e SNPs nos quais o alelo menos freqüente apresentasse com freqüência menor que 0,03 (MAF < 0,03) na amostra, ou seja, foram considerados não-polimórficos e, conseqüentemente, não-informativos. Todos os GWAS foram realizadas por meio do software *HelixTree SVS 7* (Golden Helix, Inc.). O método de GWAS utilizado foi a associação par-a-par. Os resultados foram considerados significativos quando  $p < \log 10^{-5}$ . Vários marcadores moleculares estão relacionados à fertilidade na raça Gir Leiteiro, sendo que os encontrados em BTA11, BTA16 e BTAX apresentaram maior associação com os parâmetros clínico-andrológicos e espermáticos. Novos estudos devem ser realizados para consolidação de haplótipos, que possam ser utilizados na seleção precoce de tourinhos nas propriedades.

Palavras Chaves: andrologia, marcadores genéticos, SNP, zebu.

##### Abstract

*Reproductive failure of male bovines affect the economic output of a farm, since they are responsible for mating with several females of a herd. In cattle genome wide association study (GWAS) is observed that several genomic regions are associated with low fertility. The present study aimed, through GWAS, to identify genomic regions related to infertility and/or sub-fertility in Gyr bulls. 30 animals diagnosed with sub-fertility and 30 controls with normal physical examination and soundness evaluation matched farm and age were selected. These 60 animals were genotyped with chip Affymetrix Axiom Genome - Wide BOS 1 Array, consisting of 648 000 SNPs. Prior to the GWAS, data were corrected for different fixed effects. This analysis was performed using PROC GLM of SAS<sup>®</sup> (1999). The variables were assessed for normality of the residue (von Mises - Cramer, 2013), and arc-cosine transformed by:  $\sqrt{(y/100)}$  when necessary. The data were subjected to quality control to eliminate samples with markers and genotyping errors and SNPs in which the less frequent allele present with frequency less than 0.03 (MAF < 0.03) in the sample, were considered non-polymorphic and therefore non-informative. All GWAS were performed using HelixTree SVS 7 software (Golden Helix, Inc.). The method used was GWAS pair-to-pair association. Results were considered significant when  $-\log p < 5$ . Several molecular markers are related to fertility in Dairy Gir breed, having been found in the BTA11, BTA16 and BTAX greater association with andrological-clinical and sperm parameters. Further studies should be conducted to consolidate haplotypes, which can be used in early selection of young bulls in the properties.*

*Key words: andrology, genetics markers, SNP, zebu.*

## Introdução

Problemas na fertilidade em bovinos vêm sendo relatados por pesquisadores, sendo o touro importante peça neste contexto. Falhas reprodutivas de machos bovinos afetam diretamente a produção de uma propriedade, uma vez que este é responsável por acasalar com várias fêmeas de um rebanho. Pesquisas demonstram evidências que a fertilidade em bovinos tem caráter genético (revisto por KHATIB et al., 2010; LI et al., 2012).

Em estudo de associação em escala genômica (Genome-Wide Association Study – GWAS) sobre fertilidade em bovinos observa-se que várias regiões genômicas associam-se à baixa fertilidade. FORTES et al. (2012) detectaram associação de regiões dos cromossomos BTA2, BTA14 e BTAX à volume testicular, qualidade espermática e níveis hormonais em tourinhos púberes da raça Brahman. Já PEÑAGARICANO et al. (2012a, 2012b) observaram associação de um conjunto SNPs nos BTA2, BTA5, BTA18, BTA25 e BTA29 com a taxa de concepção por touro na raça Holstein.

Objetivou-se por meio de estudo de associação em escala genômica em touros da raça Gir Leiteiro, identificar regiões genômicas, SNPs e haplótipos relacionados à infertilidade e/ou à subfertilidade.

## Material e métodos

A amostra inicial consistiu de 311 touros Gir-Leiteiro, que foram avaliados por critérios andrológicos. Esses animais tinham idade acima de 22 meses no dia da avaliação e que nunca estiveram em uma central de colheita de sêmen. Esse cuidado foi tomado para evitar anormalidades espermáticas secundárias. Estes animais foram selecionados de seis fazendas do estado de Minas Gerais, Brasil, onde foi capaz de avaliar todos os touros, com o objetivo de caracterizar o fenômeno na população em geral, e não apenas nos touros reprodutores. Em cinco

dessas fazendas, os animais utilizados recebiam suplementação nutricional (dieta concentrada com 14% de proteína), e na outra, eles recebiam apenas suplementação mineral. Para cada animal foi coletado informações sobre: idade, fazenda, pai, mãe, estação do ano, peso, perímetro escrotal, comprimento e largura de ambos os testículos. O animal foi definido como afetados por hipoplasia gonadal quando apresentou anomalias morfológicas, como uma diferença de pelo menos 1 cm de comprimento escrotal e pelo menos uma diferença de 0,5 cm de largura escrotal. Na análise do sêmen, as seguintes variáveis foram avaliadas, segundo CBRA (1998): turbilhamento ou motilidade dos espermatozoides de massa (0-5), motilidade progressiva (0-100%), vigor espermático (0-5), a concentração de espermatozoides (número de espermatozoides/mL); defeitos maiores; espermatozoide com contorno anormal; defeito na peça intermediária do esperma, os defeitos acrossômicos; espermatozoide com uma base delgada; espermatozoides em forma piriforme; gota citoplasmática proximal; defeitos espermáticos menores; cauda dobrada, cabeça decapitada normal e defeitos espermáticos totais. Além disso, duas variáveis adicionais foram estabelecidas utilizando a informação clínica e laboratorial: 1) O primeiro grupo (Diag) foi composto por animais com hipoplasia testicular com ou sem anormalidades no espermiograma, além dos animais que apresentaram apenas anormalidades no espermiograma. 2) O segundo grupo (Diag. 2) era composto por animais com anormalidades no esperma, apenas. Este será referido neste artigo como "anomalias no espermiograma".

De cada indivíduo, foram coletados 10 ml de sangue periférico em frasco estéril vacutainer com EDTA para extração de DNA, como descrito por Miller et al. (1988). Foram selecionados 30 animais diagnosticados como afetados e 30 controles. Os animais do grupo controle eram irmãos ou meio-irmãos dos touros afetados, e eles têm o exame físico normal e espermiograma normal. Os animais de ambos os grupos foram pareados por idade e fazenda. Estes sessenta animais foram genotipados utilizando *Axiom Genome-Wide BOS* uma matriz de *Affymetrix*. Esta ficha é



constituída por 648K SNPs, e a genotipagem foi realizada pela Affymetrix (Santa Clara, CA, EUA).

### Estatística

As análises foram realizadas na EMBRAPA-Gado de Leite, Juiz de Fora, MG.

Os fenótipos foram corrigidos para muitos efeitos fixos diferentes. Esta correção foi realizada usando SAS PROC GLM de © (1999), utilizando o modelo a seguir:

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + FAZ_j + EP_k + b(I_{ijk} - \bar{I}) + e_{ijk}$$

em que,  $Y_{ijk}$  = observação;  $\mu$  = média geral;  $R_i$  = efeito do pai  $i$ ;  $FAZ_j$  = efeito da fazenda  $j$ ;  $EP_k$  = efeito da época do ano  $k$  (seca=maio a outubro; águas = novembro a abril);  $b$  = coeficiente de regressão linear para idade;  $I_{ijk}$  = idade em meses dos animais na aferição;  $\bar{I}$  = média de idade dos touros;  $e_{ijk}$  = erro aleatório. Para as biometrias testiculares, o modelo foi semelhante, porém sem o efeito da época da aferição.

As variáveis foram avaliadas quanto à normalidade dos resíduos (Cramer-von Mises) e as variáveis cujos resíduos não apresentaram uma distribuição normal foram transformados pelo arco - cosseno:  $\sqrt{y/100}$ . Em algumas situações, os animais com azoospermia pode mostrar resultados próximos aos valores normais, e isso poderia causar alguma confusão. Isso acontece, por exemplo, com a frequência de esperma anormal, porque um animal com azoospermia apresenta zero por cento de formas anormais, que é a mesma percentagem apresentados pelos animais de controle. Portanto, para evitar esse tipo de confusão, foram definidos valores extremos para estas variáveis nesses indivíduos, que estavam fora do intervalo de dois desvios-padrão em torno da média. Este recurso foi utilizado para todas as variáveis, exceto para as variáveis Diag. e Diag. 2, que são binário.

### GWAS

Os dados foram submetidos à controle de qualidade para eliminar marcadores e amostras com possíveis erros de genotipagem e SNPs nos quais o alelo menos frequente apresentasse com frequência menor que 0,03 ( $MAF < 0,03$ ) na amostra, ou seja, foram considerados não-polimórficos e, conseqüentemente, não-informativos.

Todos os GWAS foram realizadas por meio do software HelixTree SVS 7 (Golden Helix, Inc.). O método de GWAS utilizado foi a associação par-a-par. Os resultados foram considerados significativos quando  $-\log(\text{valor } P) \geq 5$ .

### Resultado e Discussão

Na Tabela 1, são mostrados os genes localizados nas regiões para as quais detectou-se associação significativa com as diversas variáveis relacionadas com a fertilidade em zebuínos, avaliadas no estudos de associação par-a-par. Com os marcadores AX-19223523 e AX-19223529, localizados no cromossoma 11, detectou-se associação significativa com cauda espermática dobrada e defeitos espermáticos menores ( $-\log P = 5,42$ ;  $-\log P = 5,26$ , respectivamente). Ambos os marcadores encontram-se próximos (cerca de 4kb) ao gene *tubulin tyrosine ligase* (TTL). No presente estudo, SNPs próximos ao gene TTL também detectaram associação com defeitos espermáticos totais, vigor espermático, motilidade espermática progressiva, defeitos na peça intermediária, também apresentou uma correlação significativa com o gene TTL. Estas associações entretanto, apresentaram valores de  $-\log P > 3$ .

Achados semelhantes foram descritos em camundongos (LEE et al., 2013). Animais com deleção em um dos genes da família TTL-like, o TTL-5 apresentam diminuição de fertilidade. Esta diminuição na fertilidade resulta de graves defeitos na formação dos espermatozoides, como alta frequência de enrolamento de caudas e cabeças espermáticas isoladas, e, conseqüentemente, diminuição da motilidade do espermatozoide. Esses autores sugerem que estes defeitos se associem, e provavelmente

tenham como causa, a formação anormal do axonema, causada pela redução dos níveis de *polyglutamylated*  $\alpha$ -tubulina, que é um componente essencial do mesmo. Embora possa se tratar de um gene diferente, os resultados do

presente estudo corroboram o efeito de genes desta família sobre a diferenciação do espermatozóide e, particularmente, da peça intermediária.

Tabela1 – Marcadores que apresentaram correlação significativa em GWAS, par-a-par

Marcador	Crom.	Posição	Gene próximo	VARIÁVEL	-log (valor p)
AX-19223523 AX-19223529	11	45666752 45668127	TTL	Defeitos menores; Cauda dobrada	5,42 5,26
AX-1917977	11	34729272	CHAC2	Motilidade progressiva; Vigor espermático	5,66 4,99
AX-21140863	16	69872262	KCNK2	Acrossomo defeituoso	5,03
AX-24562102	X	20561719	LRRTM3	Contorno anormal sptz	5,06
AX-28265277	X	91003802	ARAF	Contorno anormal sptz;	5,28
AX-28303957 AX-28303964 AX-28304069	X	109755647	MIR2488	Comprimento TD Largura TD	6,68 5,19 5,05
AX-28361541	X	133038305	NHS	Comprimento TD Largura TD	6,68 5,05
AX-28118988	X	15519311	MST4	Contorno anormal	6,68
AX-28113641 AX-28113325	X	13449847 13297652	OCRL	Contorno anormal sptz; Comprimento TD; Largura TD	6,68 5,53 5,05

No presente estudo, o marcador AX-1917977, localizado no cromossoma 11 próximo ao gene CHAC2 (*cation transport regulator homolog 2* da *E. coli*), apresentou associação significativa ( $-\log P = 5,66$ ) com motilidade progressiva e vigor espermáticos, isto sugere que tal gene também influencia no potencial de deslocamento do espermatozóides. Além disto, detectou-se associação entre SNPs desta região com comprimento e largura do testículo direito, defeitos menores, turbilhonamento, cauda dobrada, concentração, circunferência escrotal, defeitos totais, Diag. 2, defeito na peça intermediária, cabeça isolada, Diag. ( $-\log P > 3$ ).

CHAC2 mapeado no cromossoma 2 em humanos, na banda 2p16.2. Em seu promotor, apresenta sítios de ligação para os fatores de transcrição importantes no desenvolvimento embrionário e na regulação do ciclo celular, como Nkx2-2p300FOXO3FOXO3bC/EBPalphaPOU2F1POU2F1bPOU2F1aFOXO3aPOU2F1c, entre outros (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHAC2>, 2013). Em humanos, de acordo com os dados de microarray ([biogps.org](http://biogps.org), 2013), a expressão foi detectada em diversos tecidos, incluindo ovário, útero, cervix, placenta, próstata, testículos. Os dados de RNAseq identificam o transcrito em ovário, testículos e próstata, em humanos.

A proteína CHAC2 (184 aminoácidos; 20875 Da) interage, em humanos, com as proteínas SYNE1, EED2, CRKL, ENO1, SAP18. Ainda de acordo com GENECARDS (2013), a proteína SYNE1 (*spectrin repeat containing, nuclear envelope 1*), faz parte de uma rede que liga as organelas e o citoesqueleto de actina, mantendo a organização espacial subcelular. Ainda, SYNE1 é componente dos *SUN-protein-containing multivariate complexes* ou *LINK complexes*, que oferecem sítios de ligação na face externa da membrana nuclear, ligando o nucleoesqueleto e o citoesqueleto; SYNE1 é essencial para a migração do centróssoma para a superfície celular apical, durante a ciliogênese (formação do fuso mitótico/meiótico).

CHAC2 quando interage com EED2 (*eukaryotic translation elongation factor 2*) cataliza a

translocação ribossomal durante a tradução. CHAC2 também interage com CRKL (*v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like*) codificando uma proteína quinase que contém domínios de homologia com SRC (SH2 e SH3), que ativa as vias de sinalização da RAS e da JUN quinase e induzem uma transformação dependente de RAS nos fibroblastos. CRKL sofre a ação da tirosina quinase BCR-ABL, e portanto pode ser oncogênica (REFSEQ, 2013)

Além disto, CHAC2 interage com ENO1 (enolase 1, alfa). Uma proteína produzida no cristalino. A enzima está envolvida em diversos processos como controle do crescimento, glicólise, tolerância a hipóxia e respostas alérgicas. Uma isoforma desta proteína, produzida por *splicing* alternativo, resulta em proteína capaz de ligar c-myc e que funciona como um supressor de tumor. Faz parte do sistema fibrinolítico, servindo como receptor e ativador do plasminogênio (REFSEQ, 2013).

Por fim, a proteína CHAC2 interage com a proteína Sin3a (Sin3-associated polypeptide p18; SAP18P; cell growth inhibiting protein 38). Sin3a é parte do complexo de repressão da SIN3, onde aumenta a repressão gerada por SIN3-HDAC1 (histona deacetilase 1). Além disto, faz parte da multiproteína “*exon junction complex*” (EJC) dependente de *splicing*, que se liga às junções intron-exon no mRNAs (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHAC2>).

Em conclusão, em humanos, as evidências apontam para um papel da CHAC2 no funcionamento do citoesqueleto, à migração do centróssoma durante a ciliogênese, e em diversos processos fundamentais essenciais à regulação da ação gênica. Esta proteína é portanto, um candidato posicional com potencial para agir em diversas etapas da espermiogênese e espermatogênese

O marcador AX-21140863, localizado no cromossoma 16, associou-se significativamente aos defeitos no acrossomo ( $-\log P = 5,03$ ). Outros marcadores desta região detectam associação significativa com contorno anormal, motilidade progressiva, cabeça piriforme, defeitos maiores, defeitos menores,

comprimento de testículo esquerdo, vigor espermático, circunferência escrotal, comprimento de testículo direito e cauda dobrada ( $-\log P > 3$ ).

Este marcador encontra-se dentro do gene *KCNK2* (*potassium channel, subfamily K, member 2*), Em humanos e em bovinos, *KCNK2* se expressa em todos os tecidos, incluindo útero e ovários e os diversos tipos celulares do testículo ([biogps.org](http://biogps.org), 2013). Este gene codifica uma, de um grupo de canais de potássio com dois poros, que respondem a alterações mecânicas, térmicas e de ácidos graxos. Estas proteínas são essenciais para o estabelecimento do potencial de repouso em células excitáveis e não-excitáveis (TOSTI E BONI 2004).

O gene bovino *KCNK2* (também chamado *bTREK*) acopla as reações da ligação de hormônios à membrana celular com a geração do potencial de ação. Canais *TREK* são ativados por estiramento da membrana, temperatura elevada e pH baixo, assim como por fosfatidilinositol (*PIP2*) e por ATP (revisto por Liu et al., 2007). A clivagem de *PIP2* pela fosfolipase C (*PLC*), leva à liberação de diacilglicerol (*DAG*) e inositol-trifosfato (*IP3*), leva à liberação de Ca do retículo endoplasmático; este cálcio vai ser liberado para o meio extracelular por um canal de troca iônica, onde o cálcio será trocado por sódio, em um processo que no espermatozóide, reduz a hiperpolarização da membrana, levando a um potencial de ação. Adicionalmente, Liu et al. (2013) descreveram que na supra-renal, a proteína *KCNK2* sofre inibição pela angiotensina 2 por uma via independente de *PIP2*, *PLC*, quinase C e diacilglicerol (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHAC2>, 2013).

Ao estudarem o gado Koreano, HUR et al. (2009) foram os primeiros a demonstrar a expressão destes genes nos órgãos reprodutivos destes animais, incluindo óvulo, espermatozóide e no blastocisto. Este grupo de proteínas está envolvido com uma série de funções relacionadas ao funcionamento do espermatozóide no processo de fertilização. Estas proteínas são ativadas pelos canais de membrana sensíveis à temperatura e à concentração de  $O_2$ . Portanto, podem estar

relacionadas às respostas do espermatozóide à variações de temperatura e na concentração de radicais reativos, como as que ocorrem durante o processo de maturação e fertilização e que também estarão presentes depois, no desenvolvimento inicial.

O marcador AX-28118988, localizado próximo ao gene *MST4* (*mammalian sterile 20-like 4*) no cromossoma X, posição 15.519.311, apresentou associação com o contorno anormal do espermatozóide,. Este marcador também detectou associação com defeitos espermáticos maiores, defeitos espermáticos totais e comprimento e largura do testículo direito ( $-\log P > 3$ ).

O gene *MST4* codifica uma proteína pertencente à família *serine/threonine kinase, sterile-20* (*Ste20*), e tem papel sobre proteínas quinase de ativação mitogênica (*MAPK*) sinalizadoras durante o rearranjo do citoesqueleto, a morfogênese, a apoptose, e outros eventos celulares diversos (DAN et al., 2002).LUNA et al. (2012) demonstraram, em experimento com ovinos, que a cascata do *MAPK* está envolvida com o processo de capacitação espermática, principalmente um subconjunto da família *MAPK* denominado quinases reguladoras de sinal extracelular (*ERKs*), onde sua fosforilação mostrou-se diretamente associada ao aumento do fator de crescimento epidermal (*EGF*), um dos responsáveis pela capacitação em várias espécies, o que corrobora os resultados que encontraram associação desta cascata com a capacitação espermática em outras espécies como humano, porco da Índia, camundongo e caprinos (AWDA e BUHR 2010; DE LAMIRANDE e CAGNON, 2002; CHEN et al., 2005; NIXON et al., 2010, citados por LUNA et al., 2012). Assim, também podendo estar relacionados aos problemas reprodutivos em bovinos da raça Gir Leiteira.

O marcador AX-28361541, localizado no cromossoma X, posição 133.038.305, apresentou associação com o comprimento do testículo direito ( $-\log P = 6,68$ ) e largura do testículo direito ( $-\log P = 5,05$ ). Além disto, associou-se a defeitos maiores ( $-\log P = 3,22$ ). Este marcador se localiza dentro do gene da Síndrome Nance–Horan (*NHS*), o qual tem

função essencial para desenvolvimento embrionário normal, mantendo a morfologia celular por intermédio da regulação da dinâmica do citoesqueleto de actina (BROOKS et al., 2010), papel descrito na literatura, influenciando os tecidos do cristalino, cérebro e crânio facial (NANCE et al., 1974, citado por BROOKS et al., 2010), Liao et al. (2011) descreveram dois pacientes portadores de deleção neste gene, um dos quais com criptorquidia. Estes pacientes apresentavam também deleção dos genes REPS2, NHS, SCML1, e RAI2. Desta forma, a criptorquidia pode ter sido ocasionada por um dos outros genes, na vizinhança de NHS.

Os marcadores AX-28303957, AX-28303964, AX-28304069, localizados próximo ao gene microRNA mir-2488 (MIR2488) no cromossoma X, apresentaram associação significativa com comprimento e largura do testículo direito, sugerindo que tal gene esteja diretamente ligado ao desenvolvimento testicular, principalmente nas biometrias do testículo direito, em zebuínos. MicroRNAs (miRNAs) são uma classe de genes não-codantes, cujo produto final é uma molécula de RNA funcional com cerca de 22 nucleotídeos, que desempenham papel importante na regulação dos genes-alvo, ligando-se a regiões complementares dos mRNAs por eles regulados podendo em alguns casos reprimir a sua tradução e, em outros, encaminhá-los para degradação (BARTEL, 2004; GRIFFITHS-JONES et al., 2006; GLAZOV, 2009). Alguns miRNA têm sido associados à reprodução,

como o miRNA34c, que reduz a proliferação celular e promove apoptose em etapas tardias da espermatogênese em caprinos leiteiros (LEE et al., 2013). BELLEANNÉ et al. (2012) forneceram suporte para um papel dos miRNAs no estabelecimento e manutenção de um padrão de expressão do gene ao longo do epidídimo humano e, por conseguinte, a sua contribuição para a maturação do espermatozóide e aquisição de capacidade fertilizante, fornecendo uma base para investigações sobre os mecanismos moleculares que afetam a fertilidade masculina.

No presente estudo, o marcador AX-28265277, localizado próximo do gene ARAF, no cromossoma X, na posição 91.003.802, apresentou associação ( $-\log P = 5,28$ ) com contorno anormal do espermatozóide.

O gene ARAF (*v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog*), localizado no cromossoma X, apresenta 80% de homologia ao gene *v-raf-leukemia viral oncogene 1* (RAF1) no seu domínio quinase. HUEBNER et al. (1986) especularam que o produto do gene ARAF1 possa ter atividade *serine/threoninekinase* específica. Os protooncogenes RAF codificam proteínas citoplasmáticas *serine/threoninekinase*, que desempenham papel crucial no crescimento e desenvolvimento das células e na sinalização mitogênica. O gene ARAF1 no camundongo é expresso predominantemente em tecidos urogenitais (LEE et al., 1994).

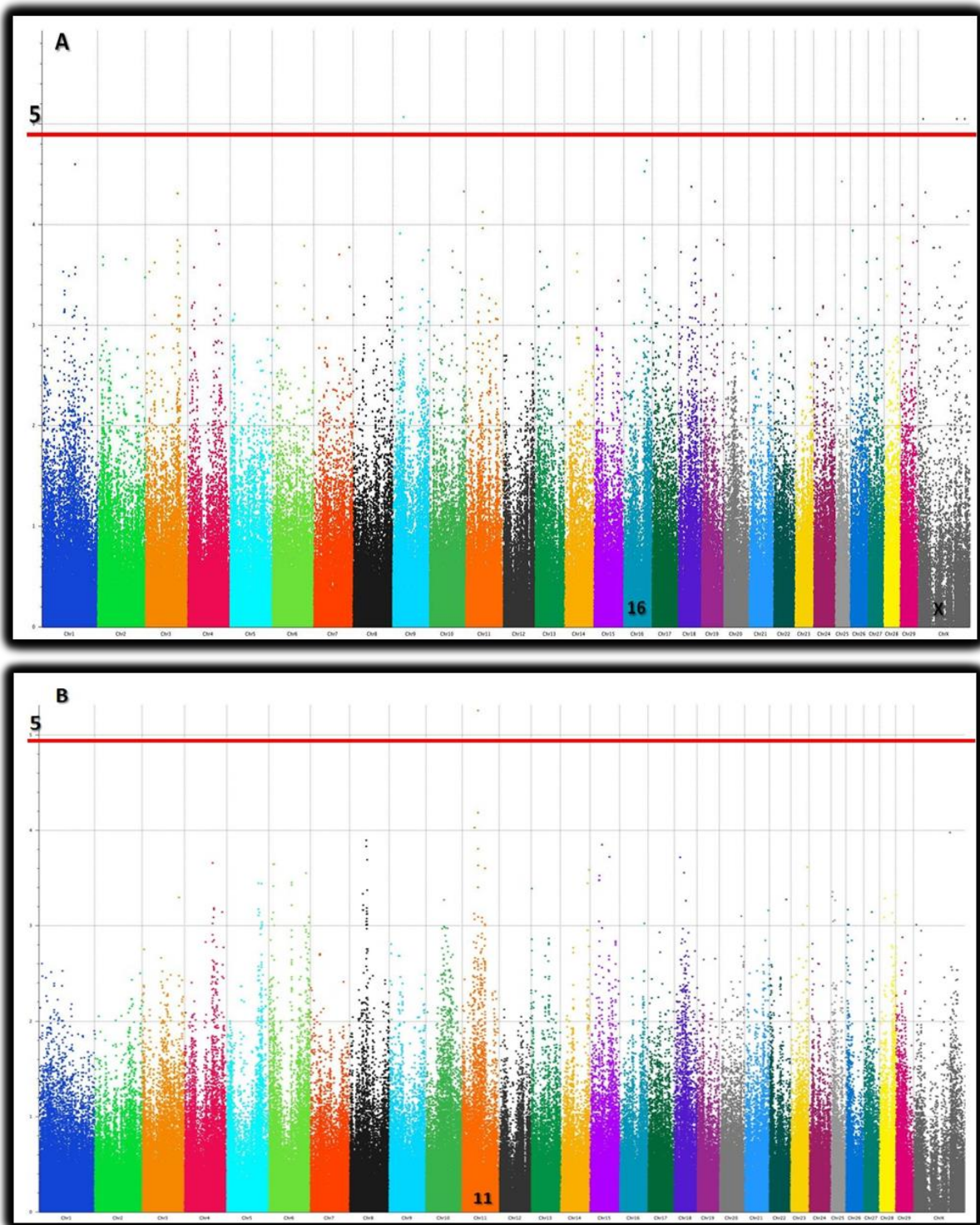


Figura 1 - Manhattan plots de valores de P para as variáveis de fertilização (A) largura do testículo direito (B). cauda espermática dobrada ( $p < 10^{-5}$ )

O gene *leucine rich repeat transmembrane neuronal 3* (LRRTM3-cromossoma 28) também associou significativamente aos parâmetros espermáticos ( $-\log P > 5$ ). Observou-se associação do SNP AX-24562102, posição 20.561.719 no cromossoma X ao contorno anormal do espermatozóide. O gene codificador de proteínas mais próximo é LRRTM3. Entretanto, a distância, neste caso é de cerca de 3 milhões de pares de bases.

Diversos SNPs no cromossoma X detectaram associação com o contorno do espermatozóide e comprimento e largura do testículo direito ( $-\log P > 5$ ). O gene mais próximo é o OCLR (óculo-cerebro-renal, Síndrome de Lowe), a cerca de 3kb de distância. Também foi detectada associação deste gene com defeitos acrossômicos ( $-\log P = 3,13$ ).

Tipicamente, estudos de associação se baseiam em amostras grandes. Isto é fundamental quando se busca associação de regiões do genoma a variáveis normais. No presente estudo, utilizou-se o GWAS para detecção de um fenótipo definitivamente alterado, ou seja, uma doença. Isto explica os valores de P tão elevados, apesar de uma amostra pequena. Três outros fatores podem ter contribuído para a eficiência da detecção das associações. Primeiro, o fato do estudo ter sido feito em uma raça específica. Como estes animais tem em sua história evolutiva recente, um gargalo (a migração para o Brasil), espera-se um pequeno número de loci associados ao fenótipo, o que acaba implicando em uma detecção de associação mais fácil. Segundo, a amostra baseada em irmãos tem menor diversidade genética e, portanto, gera menor ruído nas análises. E, por último, mas não menos importante, a arquitetura do traço sugere que o distúrbio trata-se de um efeito quase-monogênico (PEÑAGARICANO et al., 2012b). Uma limitação deste modelo é que os genes/regiões candidatos identificados no presente estudo podem não contribuir da mesma maneira para a subfertilidade em outras raças de bovinos, zebuínas ou taurinas.

Ressalta-se que este é um dos primeiros GWAS em *Bos taurus indicus* correlacionando os parâmetros clínico-andrológicos, espermáticos e diagnósticos de subfertilidade com marcadores

genéticos. Necessitando de novos estudos para criação de haplótipos, que possam ser utilizados como ferramenta de seleção de animais precocemente, retirando aqueles animais com tendências a problemas de fertilidade da seleção para touros, assim, evitando prejuízos econômicos para as propriedades.

## Conclusões

Vários marcadores moleculares estão relacionados com a fertilidade na raça Gir Leiteiro, sendo os encontrados em BTA11, BTA16 e BTAX apresentaram uma maior associação com os parâmetros clínico-andrológicos e espermáticos.

## Bibliografia

AWDA, B. J., BUHR, M. M. Extracellular signal-regulated kinases (ERKs) pathway and reactive oxygen species regulate tyrosine phosphorylation in capacitating boar spermatozoa. *Biol. Reprod.*, v.83, p.750-758, 2010.

BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, v.116, p.281-297, 2004.

BELLEANNÉ, C.; CALVO, E.; THIMON, V. et al. Role of MicroRNAs in Controlling Gene Expression in Different Segments of the Human Epididymis. *Plos ONE*, v.7 (4), e34996, 2012.

*biogps.org*, 22-04-2013

BROOKS, S. P.; COCCIA, M.; TANG, H. R. et al. The Nance-Horan syndrome protein encodes a functional WAVE homology domain (WHD) and is important for co-ordinating actin remodeling and maintaining cell morphology. *Hum. Mol. Genet.*, v.19 (12), p.2421-2432, 2010

CBRA. *Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal*. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2ª Ed. – Belo Horizonte, 1998, 49 p.



- CHEN, W. Y.; NI, Y.; PAN, Y. M. et al. GABA, progesterone and zona pellucida activation of PLA2 and regulation by MEK-ERK1/2 during acrosomal exocytosis in guinea pig spermatozoa. *FEBS Letters*, v.579, p.4692–4700. 2005
- COSTA, L. L. M.; CASTELO, T. S.; SOUZA, A. L. P. et al. Criopreservação de sêmen canino em diluente Tris adicionado de dodecil sulfato de sódio. *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, v.37 (1), p.53-58. 2013.
- DAN, I.; ONG, S.-E.; WATANABE, N. M. et al. Cloning of MASK, a novel member of the mammalian germinal centerkinase III subfamily, with apoptosis-inducing properties. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.5929-5939.2002.
- DE LAMIRANDE, E.; GAGNON, C. The extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway is involved in human sperm function and modulated by the superoxide anion. *Mol. Hum. Reprod.*, v.8, p.124–135. 2002.
- FORTES, M. R.; REVERTER, A.; HAWKEN, R. J. et al. Candidate genes associated with testicular development, sperm quality, and hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in Brahman bulls. *Biol. Reprod.*, v.87, p.58.2012.
- GLAZOV, E. A.; KONGSUWAN, K.; ASSAVALAPSAKUL, W. et al. Repertoire of Bovine miRNA and miRNA-Like Small Regulatory RNAs Expressed upon Viral Infection. *PLoS ONE*, v.4(7), p.e6349-e6349. 2009.
- GRIFFITHS-JONES, S.; GROCOCK, R. J.; DONGEN, S. V. et al. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic. Acids. Res.*, v.34, p.D140–D144. 2006
- <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=CHAC2>, 22-04-2013.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/22-04-2013>
- HUEBNER, K.; AR-RUSHDI, A.; GRIFFIN, C. A. et al. Actively transcribed genes in the raf oncogene group, located on the X chromosome in mouse and human. *P. Natl. Acad. Sci.*, v.83, p.3934-3938, 1986.
- HUR, C. G.; CHOE, C.; KIM, G. T. et al. Expression and localization of two-pore domain KC channels in bovine germ cells. *Reprod. Res.*, v.137, p.237–244. 2009.
- KHATIB, H.; MONSON, R. L.; HUANG, W. et al. Short communication: validation of *in vitro* fertility genes in a Holstein bull population. *J. Dairy Sci.*, v.93, p. 2244–2249. 2010.
- LEE, J. -E.; BECK, T. W.; BRENNSCHEIDT, U. et al. The complete sequence and promoter activity of the human A-raf-1 gene (ARAF1). *Genomics*, v.20, p.43-55, 1994.
- LEE, G. S.; HE, Y.; DOUGHERTY, E. J. et al. Disruption of *Till5/Stamp* gene (Tubulintyrosinylase-like protein5/SRC-1 and TIF2 associated modulatory protein gene) in male mice causes sperm malformation and infertility. *J. Biol. Chem.*, 2013.
- LIAO, H. M.; NIU, D.-M.; CHEN, Y. J. et al. Identification of a microdeletion at Xp22.13 in a Taiwanese family presenting with Nance-Horan syndrome. *J. Hum. Genet.* v. 56, p. 8-11, 2011.
- LI, G.; PEÑAGARICANO, F.; WEIGEL, K. A. et al. Comparative genomics between fly, mouse, and cattle identifies genes associated with sire conception rate. *J. Dairy Sci.*, v.95, p.6122–6129. 2012.
- LUNA, C.; COLÁS, C.; PÉREZ-PÉ, R. et al. A Novel Epidermal Growth Factor-Dependent Extracellular Signal-Regulated. *Biol. Reprod.* v. 87(4), art. 93, p. 1-11, 2012.
- MILLER, S. A.; DYKES, D. D.; POLESKY, H, F. A simple salting procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic. Acids. Res.*, v.16, p.1215, 1988.
- NANCE, W. E.; WARBURG, M.; BIXLER, D. et al. Congenital X-linked cataract, dental anomalies and brachymetacarpalia. *Birth Defects-Orig.*, v.10, p.285–291. 1974.
- NIXON, B.; BIELANOWICZ, A.; ANDERSON, A. L. et al. Elucidation of the signaling pathways that underpin capacitation-associated surface phosphotyrosine expression in mouse spermatozoa. *J. Cell. Physiol.*, v. 224, p. 71–83. 2010



PEÑAGARICANO, F.; WEIGEL, K. A.; KHATIB, H. Genome-wide association study identifies candidate markers for bull fertility in Holstein dairy cattle. *Anim. Genet.*, v.43, p. 65–71. 2012a.

PEÑAGARICANO, F.; WEIGEL, K. A.; ROSA, G. J. M. et al. Inferring quantitative trait

pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Front. Genet.*, v.3,art. p.3071-3077, 2012b.

TOSTI, E.; BONI, R. Electrical events during gamete maturation and fertilization in animal and humans. *Hum. Reprod. Update*, v.10, p.53–65. 2004.

**Apêndice 1**

**Espermiogramas de touros oriundos de dois grupos  
de suplementação nutricional (CS e SS)**

## **Espermiogramas dos touros diagnosticados com hipoplasia testicular**

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

HISTÓRICO: Animais	NUTRIÇÃO	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2
Com hipoplasia testicular	DATA (col)	12/3/10	20/9/10	20/9/10	20/9/10	08/8/11	08/8/11	08/8/11	01/9/11	01/9/11	03/4/12	28/3/09	28/3/09
RAÇAS: Gir-L	IDADE(m/a)	36	23	40	41	30	31	30	23	55	23	25	38
LOCAL: Minas Gerais	PESO (Kg)	600	400	580	480	500	444	456	495	630	380	320	440
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		3	1	8	9	6	2	7	4	10	5	221	226
Volume (ml)		1	2,2	3,1	3,5	4,5	5,2	4	10	7	2	6	3
Motilidade de massa (1-5)		2	5	0	3	0	5	0	0	0	4	0	3
Motilidade individual (%)		50	70	40	50	60	80	0	60	5	70	30	40
Vigor (1-5)		5	5	4	5	5	5	0	5	1	5	4	3
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		100	550	700	150	150	700	0	200	25	600	300	150
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		53	51	27	33	46	17	0	11	15	68	19	16
Delgado na base		3	5	5	3	4	4	0	4	5	5	3	2
Cabeça piriforme		16	4	4	2	3	0	0	3	3	4	3	4
Contorno anormal		7	1	2	3	2	7	0	0	4	12	1	3
Cabeça pequena anormal		2	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		3	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		2	0	0	2	0	0	0	0	0	2	0	0
Formas duplas		0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		8	14	2	2	11	2	0	2	0	6	4	1
Acrossoma defeituoso		3	11	5	2	15	0	0	0	0	10	2	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	2	1	1	0	0	0	15	0	2
Defeitos na peça intermediária		9	13	6	17	10	3	0	2	2	14	6	4
<b>Defeitos menores (%)</b>		4	4	9	15	6	7	0	16	10	7	7	4
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		2	2	0	2	2	3	0	3	3	0	0	0
Cabeça decapitada (normal)		0	0	7	6	0	1	0	5	4	1	4	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		2	2	2	7	4	3	0	8	3	6	0	2
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		32,6	33,3	32,7	32,2	36,1	28	25,9	33,8	37	24,6	31	33
<b>DIAGNÓSTICO</b>		HTD	HTD	HTE	HTE	HTE	HTD	HTE	HTE	HTE	HTE	HTD	HTE

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

HISTÓRICO: Animais	NUTRIÇÃO	2	2	2	2	2	2						
Com hipoplasia testicular	DATA (col)	22/7/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	16/3/11						
RAÇAS: Gir-L	IDADE(m/a)	30	27	24	26	25	29						
LOCAL: Minas Gerais	PESO (Kg)	395	403	380	355	390	421						
ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)		223	219	220	222	224	225						
Volume (ml)		1	10	5,5	14	4,5	2,5						
Motilidade de massa (1-5)		3	0	5	0	5	0						
Motilidade individual (%)		50	5	50	0	90	0						
Vigor (1-5)		5	1	4	0	5	0						
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		300	100	120	0	700	0						
ASPECTOS MORFOLÓGICOS													
Defeitos maiores (%)		22	64	26	0	19	0						
Delgado na base		5	0	5	0	5	0						
Cabeça piriforme		2	8	6	0	2	0						
Contorno anormal		3	13	4	0	2	0						
Cabeça pequena anormal		1	0	0	0	0	0						
Cabeça isolada anormal		0	4	0	0	0	0						
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0						
Formas duplas		0	2	0	0	0	0						
Gota citoplasmática proximal		4	14	2	0	2	0						
Acrossoma defeituoso		5	8	5	0	3	0						
Diadema ("pouch formation")		0	2	0	0	0	0						
Defeitos na peça intermediária		2	13	4	0	5	0						
Defeitos menores (%)		6	16	6	0	2	0						
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0						
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0						
Gota citoplasmática distal		0	0	4	0	0	0						
Cabeça decapitada (normal)		3	11	0	0	2	0						
Cauda dobrada (ou enrolada)		3	5	2	0	0	0						
CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):		32.4	26.5	28.5	31.5	29	26,7						
DIAGNÓSTICO		HTD	HTB	HTB	HTD	HTE	HTE						

## **Espermiogramas dos touros diagnosticados clinicamente normais**

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	12/7/09	21/7/2009	14/9/09	14/09/09	14/9/09	14/9/09	14/9/09	14/9/09	14/9/09	14/9/09	01/12/09	01/12/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	25	51	21	25	28	31	33	35	38	39	17	19
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	486	650	390	350	420	300	490	450	500	550	340	440
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN</b>													
<b>(Amostra)</b>		57	141	31	54	72	91	106	116	121	123	13	19
<b>Volume (ml)</b>		6.5	8	6	5	5.5	8	7	5	7.5	9	4.5	4
<b>Motilidade de massa (1-5)</b>		0	5	4	3	5	5	3	4	2	5	0	0
<b>Motilidade individual (%)</b>		40	70	70	70	80	80	70	80	60	80	40	50
<b>Vigor (1-5)</b>		5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	3	3
<b>Concentração (x10<sup>6</sup>/ml)</b>		230	500	800	900	950	900	850	900	800	950	420	450
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		13	9	9	13	9	18	9	11	14	9	18	12
<b>Delgado na base</b>		3	0	0	3	0	4	0	3	0	0	1	1
<b>Cabeça piriforme</b>		4	2	0	0	2	3	0	4	4	2	2	1
<b>Contorno anormal</b>		3	3	4	4	3	0	3	0	3	4	0	2
<b>Cabeça pequena anormal</b>		0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0
<b>Cabeça isolada anormal</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Subdesenvolvido</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0
<b>Formas duplas</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Gota citoplasmática proximal</b>		2	0	2	0	0	4	2	4	2	0	5	4
<b>Acrossoma defeituoso</b>		0	2	0	1	0	2	0	0	5	0	5	0
<b>Diadema ("pouch formation")</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		1	2	3	5	2	5	4	0	0	3	5	4
<b>Defeitos menores (%)</b>		15	15	12	9	3	4	20	10	3	6	8	15
<b>Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Implantação abaxial</b>		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Gota citoplasmática distal</b>		12	7	0	0	1	3	15	5	2	2	0	7
<b>Cabeça decapitada (normal)</b>		0	2	3	3	0	0	0	2	0	2	0	2
<b>Cauda dobrada (ou enrolada)</b>		3	6	9	6	2	1	5	3	1	2	8	6
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		33.7	33,8	31.5	31.2	34.2	29.5	31	30.5	31.4	35.8	29.9	30
<b>CAP</b>		52	70	100	69	100	55	76	55	61	84	75	75

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09	1/12/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	19	21	21	30	33	40	41	41	41	42	44	45
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	460	380	400	480	490	460	500	480	580	510	540	530
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>													
		20	32	33	86	107	125	130	131	132	134	136	137
	<b>Volume (ml)</b>	5.5	10	3.5	4	9	4	7	2	8	12	5	3
	<b>Motilidade de massa (1-5)</b>	5	3	5	5	3	0	5	5	5	5	5	3
	<b>Motilidade individual (%)</b>	80	70	70	70	70	30	80	60	80	80	80	50
	<b>Vigor (1-5)</b>	5	5	5	4	5	2	5	5	5	5	5	4
	<b>Concentração (x10<sup>6</sup>/ml)</b>	800	850	750	800	650	200	900	500	1000	900	850	300
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
	<b>Defeitos maiores (%)</b>	17	15	17	9	11	11	15	12	11	8	9	18
	<b>Delgado na base</b>	3	1	0	3	0	2	4	1	0	1	2	4
	<b>Cabeça piriforme</b>	0	4	0	0	2	3	3	4	4	2	2	4
	<b>Contorno anormal</b>	3	1	2	2	3	2	0	3	2	3	1	3
	<b>Cabeça pequena anormal</b>	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	<b>Cabeça isolada anormal</b>	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0
	<b>Subdesenvolvido</b>	0	0	0	2	0	0	0	2	0	0	0	0
	<b>Formas duplas</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Gota citoplasmática proximal</b>	4	2	4	0	4	2	0	0	1	0	2	0
	<b>Acrossoma defeituoso</b>	5	5	4	2	2	0	2	0	4	0	0	5
	<b>Diadema ("pouch formation")</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Defeitos na peça intermediária</b>	2	0	5	0	0	2	2	2	0	2	2	2
	<b>Defeitos menores (%)</b>	9	15	6	8	5	4	3	5	2	10	11	5
	<b>Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica</b>	0	0	0	5	5	2	0	3	2	0	3	3
	<b>Implantação abaxial</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Gota citoplasmática distal</b>	5	2	0	0	0	0	0	0	0	7	7	2
	<b>Cabeça decapitada (normal)</b>	3	0	1	0	0	0	0	0	0	3	0	0
	<b>Cauda dobrada (ou enrolada)</b>	1	13	5	3	0	2	3	2	0	0	1	0
	<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>	29.6	30.5	30.7	37.5	34.4	31.6	38.5	34.2	35	34	35	36
	<b>CAP</b>	85	85	85	100	69	52	85	61	69	84	84	59



ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais Clinicamente Normal</b>	<b>NUTRIÇÃO DATA (col)</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	60	19	29	22	24	26	33	34	37	38	40	40
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	645	400	580	450	500	550	500	360	580	560	520	510
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		142	21	77	35	43	61	108	113	119	122	126	127
Volume (ml)		4	3,5	10	2,8	3,1	2,8	3,3	5,1	5,1	3,2	4,3	3,1
Motilidade de massa (1-5)		3	5	5	5	4	5	2	5	5	5	5	5
Motilidade individual (%)		70	80	70	80	80	80	60	80	70	80	80	80
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		700	800	700	600	400	500	100	800	550	600	650	500
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		17	14	12	12	12	9	14	11	9	14	9	14
Delgado na base		4	3	1	3	3	4	2	0	2	3	3	4
Cabeça piriforme		6	4	3	1	4	0	2	5	2	3	2	3
Contorno anormal		2	0	4	4	0	3	3	4	2	2	1	2
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	0	0	2	0	5	0	2	0	1	2
Acrossoma defeituoso		2	3	2	0	0	0	2	0	1	5	0	3
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		0	2	2	4	3	2	0	2	0	1	2	0
<b>Defeitos menores (%)</b>		2	13	3	13	5	8	8	9	7	4	3	4
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	5	3	3	3	6	2	6	2	2	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
Cabeça decapitada (normal)		0	4	0	1	0	2	6	0	2	2	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	2	0	7	2	0	0	3	3	0	1	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		36,5	27,9	34,2	28,2	30,5	35,7	36,8	31	37,2	32,2	39,8	34,3
<b>CAP</b>		69	69	85	69	69	100	77	69	100	69	100	69

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	20/9/10	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	40	24	24	30	36	48	48	18	18	19	20	20
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	450	470	450	520	514	620	620	455	437	441	435	405
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		128	44	45	87	117	138	139	15	16	22	25	26
Volume (ml)		2,8	2	3	1,7	6,5	7	3,5	3	4	1	2,5	0,5
Motilidade de massa (1-5)		0	0	3	4	4	4	4	5	3	5	5	4
Motilidade individual (%)		60	80	80	70	70	60	80	70	60	70	80	60
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		100	450	850	700	700	700	800	800	350	900	1000	150
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		11	13	8	11	13	13	9	7	12	12	4	15
Delgado na base		3	0	0	0	1	1	0	0	3	1	2	0
Cabeça piriforme		0	1	0	1	2	2	3	1	3	1	1	4
Contorno anormal		3	2	3	2	3	3	4	0	0	0	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	2	0	0	0	0	2	1	1	0	1	0
Acrossoma defeituoso		5	0	1	2	2	2	0	1	0	5	0	4
Diadema ("pouch formation")		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		0	6	4	6	2	2	0	4	5	5	0	7
<b>Defeitos menores (%)</b>		7	5	1	4	11	6	3	0	11	8	3	10
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		5	0	0	3	0	0	0	0	1	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		2	2	0	0	0	4	0	0	5	3	0	3
Cabeça decapitada (normal)		0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	3	0	1	11	2	3	0	5	5	2	5
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		33,6	30,7	29,5	34,5	35,2	36,5	39	31,9	28	27,9	33,2	31,7
<b>CAP</b>		61	69	70	85	0	59	100	100	61	69	100	77

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11	08/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	20	20	20	20	21	22	22	23	24	24	24	24
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	430	433	421	426	472	415	500	525	405	473	504	480
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		27	28	29	30	34	36	37	41	50	51	52	53
Volume (ml)		1	3	2	1,5	3	3	3,5	4	2	4,5	11	6
Motilidade de massa (1-5)		5	5	1	3	4	3	1	5	5	0	0	0
Motilidade individual (%)		60	50	50	60	80	70	80	80	80	70	30	70
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	4	5	5	5	3	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		600	450	450	550	1000	450	350	700	1200	200	80	120
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		11	5	12	10	17	9	8	11	4	17	12	18
Delgado na base		0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	4	0
Cabeça piriforme		3	0	0	0	0	2	1	0	1	0	3	0
Contorno anormal		0	0	0	0	0	3	2	2	0	3	1	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	2	1	7	14	0	2	0	1	4	0	0
Acrossoma defeituoso		0	0	0	0	0	2	0	4	0	5	3	7
Diadema ("pouch formation")		0	2	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		8	1	10	3	1	1	3	3	0	4	1	11
<b>Defeitos menores (%)</b>		10	11	12	3	8	5	2	6	2	15	2	14
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	1	3	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	3	7	1	5	0	0	0	0	9	0	5
Cabeça decapitada (normal)		5	3	2	0	0	3	0	5	0	3	2	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		5	5	3	2	3	2	2	1	1	0	0	9
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		32,3	35,1	30,5	32	35,5	31,9	36,4	36,2	32	32	36,6	36,7
<b>CAP</b>		77	90	75	85	85	100	100	85	84	69	68	85

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	25	26	26	26	26	26	27	27	27	28	28	28
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	431	525	458	433	512	388	517	530	500	480	462	486
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		58	62	63	64	65	66	69	70	71	73	74	75
Volume (ml)		6	1,5	10,5	2	2	2,5	1	3	5,5	3	2,2	2,5
Motilidade de massa (1-5)		5	5	5	0	1	5	0	0	0	4	0	1
Motilidade individual (%)		60	70	80	40	60	50	80	50	50	70	60	70
Vigor (1-5)		5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		550	1100	1200	100	120	650	250	100	100	600	160	350
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		8	16	16	8	8	11	7	10	11	9	10	6
Delgado na base		0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	6	0
Cabeça piriforme		0	4	4	0	1	4	4	2	0	2	0	2
Contorno anormal		0	3	1	0	0	3	0	0	0	3	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	2	7	2	2	0	1	0	2	2	3
Acrossoma defeituoso		1	5	6	0	0	2	2	2	1	0		0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		7	4	3	1	3	0	0	5	8	2	2	1
<b>Defeitos menores (%)</b>		9	10	11	8	7	4	1	10	13	11	5	24
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	8	0	1	0	2	0	0	0	4	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		3	0	11	5	2	0	0	2	0	4	1	20
Cabeça decapitada (normal)		1	2	0	1	0	2	0	1	3	0	1	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		5	0	0	1	5	0	1	7	10	3	3	2
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		34	35,2	36,1	36,5	37,8	34,9	36,9	41	38,8	37,5	35,3	32,8
<b>CAP</b>		92	85	85	83	92	75	100	75	68	100	77	69

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	28	29	29	29	29	29	29	29	29	30	30	31
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	521	471	603	429	419	428	456	450	547	547	324	453
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		76	78	79	80	81	82	83	84	85	89	90	92
Volume (ml)		2	4,5	9	5	3	6	3,5	3	4,5	6,5	1,7	3
Motilidade de massa (1-5)		1	1	0	5	5	5	5	3	0	5	5	5
Motilidade individual (%)		50	40	10	80	70	70	90	70	30	60	70	80
Vigor (1-5)		5	4	2	5	5	5	5	5	3	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		200	150	100	1200	1000	800	1600	500	120	450	700	1300
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		9	8	11	5	4	2	8	8	9	9	2	3
Delgado na base		0	0	0	0	0	0	0	2	3	3	0	1
Cabeça piriforme		3	1	2	0	0	1	2	6	4	2	1	0
Contorno anormal		2	3	5	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		2	0	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Acrossoma defeituoso		0	0	0	0	0	0	4	0	0	2	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		0	4	4	5	0	1	2	0	2	0	1	1
<b>Defeitos menores (%)</b>		9	5	20	8	2	4	5	5	5	3	1	5
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		4	0	9	0	0	0	2	0	5	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		3	0	0	1	1	2	0	0	0	0	0	0
Cabeça decapitada (normal)		0	5	0	6	0	1	3	3	0	3	0	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		2	0	11	1	1	1	0	2	0	0	1	3
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		39,4	36,3	38	36,2	28	34,2	36	38	34	35,8	28,5	34,5
<b>CAP</b>		90	83	68	100	70	100	100	100	67	92	70	84

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	31	31	31	31	31	31	31	31	32	32	32	32
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	518	490	578	635	441	518	457	529	385	588	417	578
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104
Volume (ml)		3	1,5	1,5	3	3	6	2,5	2,5	1,5	6	4,5	2,5
Motilidade de massa (1-5)		3	5	5	0	5	0	5	5	5	0	5	5
Motilidade individual (%)		80	80	70	50	60	50	70	90	80	20	80	80
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	2	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		740	1000	1000	200	600	200	750	1300	1100	140	1400	1300
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		9	8	7	8	13	16	9	8	15	14	2	8
Delgado na base		0	1	0	0	0	4	0	0	0	5	0	0
Cabeça piriforme		2	2	3	3	1	3	1	3	0	6	0	2
Contorno anormal		1	3	2	1	0	2	0	2	0	0	0	2
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		4	0	0	0	4	3	0	1	2	0	0	0
Acrossoma defeituoso		2	2	0	2	2	4	0	0	0	0	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		0	0	2	2	6	0	7	2	13	0	2	4
<b>Defeitos menores (%)</b>		2	5	2	7	8	11	9	5	11	10	5	5
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		2	2	0	5	0	7	0	0	2	4	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	2	4	0	2	3	3	0	2	5
Cabeça decapitada (normal)		0	0	0	0	2	0	1	0	2	4	1	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	3	2	0	2	4	6	2	4	2	2	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		37,7	34,3	38,6	43,2	33,8	35,1	34,1	36,6	31,6	39,7	33	38,9
<b>CAP</b>		100	84	100	90	61	75	84	100	69	68	84	100

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	33	33	33	34	34	36	39	41	42	16	18	19
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	552	450	437	680	613	557	645	712	610	404	234	507
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		109	110	111	114	115	118	124	133	135	12	14	17
Volume (ml)		3	4	2,5	8	4,5	5	4,5	8	4	7	4	5
Motilidade de massa (1-5)		1	0	3	5	0	0	5	0	5	2	4	5
Motilidade individual (%)		50	80	60	80	50	60	80	40	70	70	70	60
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	3	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		250	200	450	1200	150	150	1200	120	550	800	650	600
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		24	4	7	9	9	8	9	8	8	19	16	15
Delgado na base		4	0	1	3	1	0	1	0	0	2	3	3
Cabeça piriforme		3	0	0	2	3	0	1	0	2	3	4	6
Contorno anormal		2	0	0	0	2	2	3	0	2	2	0	0
Cabeça pequena anormal		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		2	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	4	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		5	1	0	0	0	4	0	2	0	6	0	0
Acrossoma defeituoso		2	0	3	0	1	0	2	1	0	2	5	4
Diadema ("pouch formation")		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		4	3	1	2	2	2	2	5	2	3	0	2
<b>Defeitos menores (%)</b>		2	3	2	7	3	15	3	5	3	2	3	7
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	2	0	0	0	0	3	0	3	4
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	3	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0
Cabeça decapitada (normal)		2	0	2	0	0	8	3	1	0	2	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	0	5	2	5	0	4	0	0	0	3
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		36,7	33,1	33,3	38,5	38,5	41,6	40,6	43	37,9	32,6	33,5	33,5
<b>CAP</b>		60	84	76	100	90	92	100	83	84	85	85	77

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	3/4/12	3/4/12
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	19	23	23	23	24	26	26	33	34	41	20	20
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	477	502	459	533	495	552	548	702	733	795	390	400
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		18	38	39	40	42	59	60	105	112	129	23	24
Volume (ml)		5	6,5	7	6	5	5	5	8	5	3	2,5	4
Motilidade de massa (1-5)		0	4	5	5	1	5	5	3	5	2	0	0
Motilidade individual (%)		50	70	80	80	50	80	80	60	80	70	50	60
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		250	800	720	1500	350	1200	900	600	1500	600	200	200
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		10	11	19	9	11	12	17	15	9	12	10	18
Delgado na base		3	1	3	0	3	1	2	7	1	2	0	0
Cabeça piriforme		2	4	1	2	2	2	5	6	2	2	0	0
Contorno anormal		3	2	0	3	2	3	2	0	2	2	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	3	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	5	2	0	0	1	0	2	1	1	6
Acrossoma defeituoso		0	2	4	0	0	2	0	0	0	3	1	2
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	2
Defeitos na peça intermediária		2	2	4	2	4	3	4	2	2	2	7	8
<b>Defeitos menores (%)</b>		12	6	3	3	5	2	3	7	5	5	18	13
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	4	3	0	0	0	0	0	0	3	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		2	0	0	0	0	0	0	2	3	0	7	3
Cabeça decapitada (normal)		0	1	0	1	0	2	1	0	0	3	1	1
Cauda dobrada (ou enrolada)		10	1	0	2	5	0	2	5	2	0	11	9
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		33	37,4	29,8	35,3	34,3	37,4	36,4	39	38,7	46	25,4	23,6
<b>CAP</b>		75	85	69	100	75	85	85	77	100	85	45	47



ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	3/4/12	28/3/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	24	24	24	24	25	25	27	27	30	37	48	24
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	450	510	540	500	530	470	500	550	560	600	750	320
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		46	47	48	49	55	56	67	68	88	120	140	235
Volume (ml)		4,5	2,5	4	3	3	2	4,5	2	4	10	6	6
Motilidade de massa (1-5)		1	4	5	5	2	4	5	5	4	1	5	5
Motilidade individual (%)		70	80	80	70	70	60	80	80	80	70	80	85
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		700	600	1600	1000	600	600	1100	1500	700	350	1300	500
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		12	9	5	5	13	7	1	7	6	6	5	15
Delgado na base		0	0	0	2	0	0	1	2	1	1	1	5
Cabeça piriforme		3	3	1	0	2	3	0	0	1	0	1	2
Contorno anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		4	3	0	0	1	1	0	0	1	2	0	0
Acrossoma defeituoso		1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	4
Diadema ("pouch formation")		3		1	0	1	2	0	5	2	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		1	2	2	3	8	1	0	0	0	2	3	0
<b>Defeitos menores (%)</b>		9	2	9	6	10	12	5	3	2	7	4	13
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		3	0	4	2	4	1	1	0	0	0	0	0
Cabeça decapitada (normal)		1	1	0	1	0	4	3	2	1	1	0	9
Cauda dobrada (ou enrolada)		5	1	5	3	6	7	1	1	1	6	4	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		27,3	27,2	30,3	25,8	25,1	29,4	30	32,9	36,3	36,3	41,1	29,5
<b>CAP</b>		55	70	84	70	55	62	84	84	100	100	100	55

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	25	25	25	26	26	27	27	27	28	28	28	28
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	330	315	315	315	350	315	325	335	430	365	355	380
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		236	237	238	245	246	253	254	255	260	261	262	263
Volume (ml)		1.5	1	3	2.5	6	2	5	3	4.5	1.5	1.5	5
Motilidade de massa (1-5)		2	3	0	5	5	2	0	0	4	2	0	1
Motilidade individual (%)		60	40	30	80	85	30	20	20	60	40	30	50
Vigor (1-5)		4	4	3	5	5	2	2	3	5	2	3	4
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		480	300	250	620	600	210	180	320	520	150	250	350
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		12	16	11	8	10	14	10	10	11	11	12	12
Delgado na base		3	0	3	0	0	4	3	2	2	0	1	3
Cabeça piriforme		2	2	4	4	2	2	3	2	2	4	2	2
Contorno anormal		0	3	0	0	3	3	4	3	1	3	2	2
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	5	2	0	0	2	0	0	2	2	2	2
Acrossoma defeituoso		4	3	0	4	2	0	0	2	0	2	0	0
Diadema ("pouch formation")		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		0	3	2	0	3	3	0	1	4	0	5	3
<b>Defeitos menores (%)</b>		7	21	21	5	3	5	4	21	8	5	7	5
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	2	2	1	3	0	2	3	5	3	1	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	2	0	0	0	0	2	18	0	2	0	3
Cabeça decapitada (normal)		2	2	0	3	0	5	0	0	0	0	6	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		5	15	19	1	0	0	0	0	3	0	0	2
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		31.5	27	32	34	31	29	30	30,5	29,5	31,5	27,5	30,5
<b>CAP</b>		69	38	52	84	69	38	52	52	47	52	38	59

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09	28/3/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	28	28	28	29	29	29	29	29	29	30	38	38
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	375	335	365	430	320	345	345	345	500	370	450	455
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		264	265	266	278	280	281	282	283	286	287	289	290
Volume (ml)		5	5	3	4.5	5.5	2.5	5	6.5	2	2	8	5
Motilidade de massa (1-5)		4	4	0	5	2	3	2	2	0	0	0	4
Motilidade individual (%)		70	85	10	80	40	60	65	50	30	50	20	50
Vigor (1-5)		4	4	2	5	2	3	3	3	3	3	2	4
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		510	550	200	510	280	440	480	400	250	200	190	400
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		11	11	13	10	13	9	10	13	13	16	11	9
Delgado na base		0	0	3	0	3	1	5	0	3	2	0	0
Cabeça piriforme		2	2	2	2	5	2	2	2	1	6	0	2
Contorno anormal		3	3	2	3	2	2	3	3	3	3	2	2
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2
Subdesenvolvido		2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	2	0	0	0	0	3	2	3	2	0
Acrossoma defeituoso		3	2	0	0	2	2	0	0	0	2	2	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		1	4	3	5	1	2	0	3	2	0	5	3
<b>Defeitos menores (%)</b>		6	5	7	2	6	11	7	7	5	5	13	8
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		2	3	3	2	3	2	5	2	2	0	3	5
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	0	0	6	2	0	0	0	3	0
Cabeça decapitada (normal)		0	2	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		4	0	4	0	3	3	0	3	3	3	7	3
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		33	32	33.6	31.5	27	30	29	29,5	31	38.1	36	34.5
<b>CAP</b>		69	69	52	69	38	76	47	45	52	75	52	74

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	28/3/09	28/3/09	28/3/09	22/7/09	22/7/09	22/7/09	22/7/09	22/7/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	39	40	40	19	21	21	21	22	23	23	24	25
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	505	485	450	270	300	300	260	290	500	380	520	375
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		291	292	293	227	228	229	230	231	232	233	234	239
Volume (ml)		5	7	4	1	0.5	1.5	1	1	5	4	4	5
Motilidade de massa (1-5)		3	0	5	3	1	5	3	3	4	1	5	5
Motilidade individual (%)		60	20	90	80	60	70	60	70	60	70	70	70
Vigor (1-5)		3	4	5	5	5	5	5	5	4	4	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		450	200	500	1000	850	900	600	1200	600	250	900	700
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		11	13	9	15	14	9	14	15	13	15	19	17
Delgado na base		0	2	0	4	2	2	0	4	5	2	5	3
Cabeça piriforme		4	3	3	2	3	3	3	6	4	2	2	4
Contorno anormal		1	0	3	0	1	0	6	0	2	5	0	4
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	1	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Gota citoplasmática proximal		2	2	0	2	3	2	2	0	0	4	2	2
Acrossoma defeituoso		0	2	2	3	0	0	1	0	0	2	7	2
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		2	3	1	2	5	2	2	5	2	0	2	2
<b>Defeitos menores (%)</b>		10	2	3	10	3	4	5	11	13	3	4	5
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		5	0	2	0	0	4	0	4	2	0	2	2
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	1	2	0	0	2	4	0	0	0	3
Cabeça decapitada (normal)		5	0	0	3	3	0	3	3	0	2	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	2	0	5	0	0	0	0	11	1	2	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		36.5	33	36	28.2	30.7	31.2	28.3	31.5	30	33	29	32
<b>CAP</b>		77	52	84	69	77	100	61	85	61	85	47	69

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	25	26	26	26	26	26	27	27	25	25	25	26
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	350	412	396	380	425	399	312	378	370	460	400	392
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		240	247	248	249	250	251	256	257	241	242	243	244
Volume (ml)		4	5,3	2	4,5	3,5	4,5	5,5	4,5	5	1	2,3	0,5
Motilidade de massa (1-5)		0	5	5	5	5	5	0	5	5	0	4	0
Motilidade individual (%)		5	80	80	60	60	60	30	90	70	40	50	50
Vigor (1-5)		1	5	5	4	5	5	3	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		25	1400	1000	450	620	500	50	1200	550	100	350	150
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		13	11	9	14	16	19	15	15	9	2	12	13
Delgado na base		0	4	1	2	1	5	3	2	2	3	2	3
Cabeça piriforme		2	3	3	4	6	4	3	3	2	3	4	3
Contorno anormal		3	2	4	3	3	4	0	2	0	0	2	4
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Cabeça isolada anormal		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		2	0	0	0	0	5	2	0	0		2	0
Acrossoma defeituoso		0	0	0	0	2	0	3	2	2	2	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	3	0	0	0	3	0		1	1
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		2	2	1	2	3	1	4	2	3	2	1	2
<b>Defeitos menores (%)</b>		12	9	6	4	3	3	9	18	5	3	3	3
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		7	0	2	0	4	3	0	5	3	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	2	1	0	0	2	8	0	0	1	0
Cabeça decapitada (normal)		5	6	0	0	0	0	2	0	0	0	0	1
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	3	2	3	0	0	5	5	2	3	2	2
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		30	28,5	28	28	30	32	28	30	29,5	29,5	30,2	37,7
<b>CAP</b>		52	55	70	37	61	61	38	69	70	38	59	75

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	26	27	27	28	28	28	28	28	28	28	28	28
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	376	389	450	378	380	380	357	365	432	400	389	380
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		252	258	259	267	268	269	270	271	272	273	274	275
Volume (ml)		2,5	2	2	3	1	1,5	2	1	2,5	8	3,5	2
Motilidade de massa (1-5)		5	0	0	0	0	5	5	5	3	5	0	5
Motilidade individual (%)		60	50	40	40	60	70	80	80	80	70	40	60
Vigor (1-5)		5	5	4	4	5	5	5	5	5	5	4	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		400	100	100	100	100	400	750	900	900	600	100	200
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		12	14	13	8	12	11	9	9	12	9	10	8
Delgado na base		3	0	1	3	2	2	3	3	3	0	2	1
Cabeça piriforme		0	2	2	3	1	2	2	2	2	3	1	2
Contorno anormal		2	3	3	0	4	3	2	0	2	0	0	2
Cabeça pequena anormal		0	0	3	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	2	2	0	0	0	0	0	2	0	4	0
Acrossoma defeituoso		5	5	2	2	2	0	1	2	2	4	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	1
Defeitos na peça intermediária		0	2	0	0	3	2	1	0	0	2	0	2
<b>Defeitos menores (%)</b>		6	23	6	17	6	23	4	2	3	3	21	3
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		2	8	0	0	5	9	2	2	2	3	1	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Gota citoplasmática distal		0	15	4	6	0	0	0	0	0	0	3	0
Cabeça decapitada (normal)		4	0	0	4	1	12	0	0	0	0	10	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	2	7	0	2	2	0	1	0	5	1
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		28,6	32	31,7	29,5	32	33,4	34	30	32	30,6	30	33,5
<b>CAP</b>		47	59	52	53	61	69	84	84	69	84	52	76

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
<b>Clinicamente Normal</b>	<b>DATA (col)</b>	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11	16/3/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	28	28	29	29	29	38	28	28	29	29	29	38
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	400	378	470	400	379	480	400	378	470	400	379	480
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		276	277	279	284	285	288	276	277	279	284	285	288
Volume (ml)		0,5	1	1,5	2,5	3	7,5	0,5	1	1,5	2,5	3	7,5
Motilidade de massa (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Motilidade individual (%)		70	70	80	70	60	80	70	70	80	70	60	80
Vigor (1-5)		5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		800	600	900	600	400	800	800	600	900	600	400	800
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		11	9	15	17	10	12	11	9	15	17	10	12
Delgado na base		1	2	1	3	3	1	1	2	1	3	3	1
Cabeça piriforme		2	2	2	4	0	4	2	2	2	4	0	4
Contorno anormal		3	3	6	2	2	0	3	3	6	2	2	0
Cabeça pequena anormal		0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		2	0	0	0	0	2	2	0	0	0	0	2
Acrossoma defeituoso		1	0	5	6	2	3	1	0	5	6	2	3
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		2	2	0	2	3	2	2	2	0	2	3	2
<b>Defeitos menores (%)</b>		3	5	10	4	4	7	3	5	10	4	4	7
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	3	2	0	2	5	0	3	2	0	2	5
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça decapitada (normal)		0	0	8	1	0	0	0	0	8	1	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		3	2	0	3	2	2	3	2	0	3	2	2
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		29,3	34,2	32,1	38	31,6	36,8	29,3	34,2	32,1	38	31,6	36,8
<b>CAP</b>		55	100	69	85	61	85	55	100	69	85	61	85

**Espermiograma de touros diagnosticados com: imaturidade sexual; maturidade sexual retardada; degeneração testicular; criptorquidia; espermiogênese imperfeita; disfunção do epidídimo (cabeça e cauda); e suspeitos de hipoplasia testicular;**



ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>DATA (col)</b>	10/7/09	15/7/09	16/7/09	17/7/09	18/7/09	19/7/09	20/7/09	12/3/10	12/3/10	12/3/10	12/3/10	12/3/10
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	18	12	12	15	12	12	12	16	18	18	19	20
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	492	253	287	251	291	261	273	370	380	410	400	420
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		192	190	194	191	193	188	189	159	173	174	180	184
Volume (ml)		5.5	0	0	0	0	0	0	3	8	2,5	10,5	0,5
Motilidade de massa (1-5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motilidade individual (%)		40	0	0	0	0	0	0	30	0	20	5	60
Vigor (1-5)		5	0	0	0	0	0	0	3	0	3	3	5
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		240	0	0	0	0	0	0	150	0	130	150	200
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		89	0	0	0	0	0	0	24	0	124	53	61
Delgado na base		8	0	0	0	0	0	0	5	0	8	11	5
Cabeça piriforme		7	0	0	0	0	0	0	4	0	7	14	9
Contorno anormal		5	0	0	0	0	0	0	3	0	11	8	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	8
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	3	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		46	0	0	0	0	0	0	2	0	71	8	24
Acrossoma defeituoso		9	0	0	0	0	0	0	3	0	11	7	11
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		14	0	0	0	0	0	0	0	0	16	2	6
<b>Defeitos menores (%)</b>		8	0	0	0	0	0	0	8	0	5	2	6
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	2	4
Cabeça decapitada (normal)		6	0	0	0	0	0	0	2	0	2	0	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		2	0	0	0	0	0	0	6	0	0	0	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		32.4	20.5	23.3	20.5	23.4	22.2	20	26,7	20,5	26,5	28,7	28,4
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>DATA (col)</b>	20/9/10	20/9/10	20/9/10	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	15	15	17	12	13	14	16	18	21	14	16	16
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	380	400	380	300	290	320	340	360	354	330	345	341
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		152	153	164	143	144	145	158	171	185	146	160	161
Volume (ml)		8,0	11	3,1	7	0	2,5	2	3,5	4,5	0	1	1
Motilidade de massa (1-5)		0	0	2	0	0	0	0	2	0	0	0	0
Motilidade individual (%)		0	0	60	5	0	20	30	70	70	0	0	5
Vigor (1-5)		0	0	5	2	0	3	3	5	5	0	0	1
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		0	0	350	180	0	150	150	400	140	0	1	5
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		0	0	94	110	0	64	141	81	115	0	92	30
Delgado na base		0	0	5	2	0	0		5	6	0	0	0
Cabeça piriforme		0	0	6	5	0	8	12	6	4	0	6	2
Contorno anormal		0	0	2	12	0	6	28	2	2	0	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	5	9	0	2	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	39	17	0	15	43	14	76	0	69	15
Acrossoma defeituoso		0	0	38	18	0	12	12	2	9	0	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		0	0	4	56	0	18	36	52	14	0	17	13
<b>Defeitos menores (%)</b>		0	0	11	7	0	9	0	0	6	0	8	13
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	0	0	4	0	0	4	0	4	6
Cabeça decapitada (normal)		0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	11	7	0	3	0	0	2	0	4	7
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		24,6	28	25,8	20	24	25,1	29	29,5	29	27,7	28,9	24,7
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	17	17	17	17	17	18	18	18	18	18	19	19
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	387	295	402	349	417	384	382	358	337	346	371	356
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		165	166	167	168	169	175	176	177	178	179	181	182
Volume (ml)		0	0	3,5	2	3	2,5	1,5	3	1	3,5	2	1
Motilidade de massa (1-5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0
Motilidade individual (%)		0	0	30	5	5	20	40	5	50	70	5	20
Vigor (1-5)		0	0	3	1	1	3	3	1	2	5	1	3
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		0	0	120	5	5	100	100	5	100	450	5	120
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		0	0	63	50	68	0	67	81	38	35	102	54
Delgado na base		0	0	0	0	0	0	0	3	0	1	0	4
Cabeça piriforme		0	0	2	0	2	0	1	1	0	4	2	0
Contorno anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	0	46	39	59	0	42	75	33	24	74	36
Acrossoma defeituoso		0	0	2	0	0	0	0	0	0	3	0	1
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	20	0	1	0	0	0
Defeitos na peça intermediária		0	0	13	11	7	0	4	2	4	3	26	13
<b>Defeitos menores (%)</b>		0	0	3	33	9	0	10	3	9	19	0	18
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	1	0	0	0	0	4	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	0	11	2	0	5	2	5	6	0	8
Cabeça decapitada (normal)		0	0	0	6	1	0	2	0	1	0	0	2
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	3	16	5	0	3	1	3	9	0	8
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		24,6	23	27,6	26,2	28,5	29,3	30,8	24,7	27	32,1	26,5	27,2
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>DATA (col)</b>	8/8/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	21	15	15	15	15	15	16	16	16	16	17	17
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	497	385	397	351	416	404	428	312	379	335	416	410
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		186	147	148	149	150	151	154	155	156	157	162	163
Volume (ml)		0	6	8	4	4	4	9	5,5	4	4	4	5
Motilidade de massa (1-5)		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Motilidade individual (%)		0	50	5	30	0	0	5	5	10	30	0	30
Vigor (1-5)		0	4	2	2	0	0	2	1	2	3	0	4
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		0	200	80	100	0	0	100	25	100	100	0	150
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		0	72	121	80	0	0	146	74	138	27	0	116
Delgado na base		0	4	0	14	0	0	16	0	17	3	0	17
Cabeça piriforme		0	2	0	11	0	0	11	8	19	6	0	18
Contorno anormal		0	3	12	0	0	0	0	3	16	0	0	5
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	3	21	0	0	0	15	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	32	35	31	0	0	58	48	41	11	0	43
Acrossoma defeituoso		0	0	16	0	0	0	21	0	17	4	0	12
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		0	28	17	24	0	0	25	15	28	2	0	21
<b>Defeitos menores (%)</b>		0	9	0	10	0	0	7	4	8	6	0	9
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	5	0	0	0	0	0	0	3	3	0	4
Cabeça decapitada (normal)		0	4	0	3	0	0	3	1	0	0	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	0	7	0	0	4	3	5	3	0	5
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		33,3	28,9	29,5	29,8	28,3	24,1	29,7	26,6	29	27,8	30,2	31,5
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	2
	<b>DATA (col)</b>	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	1/9/11	3/4/12	3/4/12	22/7/09	22/7/09	22/7/09	22/7/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	18	22	15	15	15	15	18	20	20	21	21	21
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	477	512	355	410	361	404	350	400	355	340	342	288
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		170	187	195	196	197	198	172	183	294	295	296	297
Volume (ml)		2	6	2	5	4	4	2	2,5	2,5	2	2	1
Motilidade de massa (1-5)		2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
Motilidade individual (%)		60	70	0	50	0	30	30	60	60	50	50	50
Vigor (1-5)		5	5	0	4	0	3	3	5	5	5	5	4
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		500	450	0	100	0	25	100	100	1000	400	950	150
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		35	43	0	38	0	73	92	58	21	51	38	94
Delgado na base		7	0	0	4	0	4	0	0	0	0	0	0
Cabeça piriforme		8	4	0	3	0	1	0	4	2	4	2	4
Contorno anormal		1	2	0	0	0	2	0	0	4	16	5	0
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0
Subdesenvolvido		0	0	0	0	0	4	0	0	0	5	0	7
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		0	2	0	10	0	35	92	42	15	8	0	51
Acrossoma defeituoso		14	31	0	8	0	0	0	1	0	5	4	32
Diadema ("pouch formation")		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		2	4	0	13	0	27	0	10	0	13	24	0
<b>Defeitos menores (%)</b>		6	5	0	12	0	12	8	23	4	12	15	15
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		1	0	0	0	0	0	6	7	0	8	0	9
Cabeça decapitada (normal)		3	0	0	2	0	2	0	4	0	4	7	6
Cauda dobrada (ou enrolada)		2	5	0	10	0	8	2	12	4	0	8	0
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		36,1	32,2	26,1	26,2	25,7	26,2	22,9	24,9	29	29,6	30	28,2
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT	IMAT

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	<b>DATA (col)</b>	22/7/09	22/7/09	13/7/09	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	1/9/11
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	22	22	27	32	32	30	22	27	28	28	35	22
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	360	280	431	536	725	476	432	489	465	461	591	412
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		298	299	211	199	201	204	205	206	207	212	213	202
Volume (ml)		5.5	0.5	4,5	3,3	7	2,5	3,3	0	6,5	5	0	3
Motilidade de massa (1-5)		0	0	0	0	5	2	5	6,5	0	0	0	0
Motilidade individual (%)		30	50	40	60	80	70	80	0	0	70	0	20
Vigor (1-5)		4	5	5	5	5	5	5	0	0	5	0	3
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		200	230	130	100	1000	400	420	0	0	160	0	400
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		99	39	46	26	34	16	69	0	0	30	0	14
Delgado na base		0	1	17	6	0	0	1	0	0	0	0	0
Cabeça piriforme		9	4	15	7	2	7	4	0	0	2	0	3
Contorno anormal		25	17	4	2	5	8	2	0	0	0	0	4
Cabeça pequena anormal		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Cabeça isolada anormal		0	4	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Subdesenvolvido		0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Formas duplas		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática proximal		52	0	4	4	2	0	0	0	0	22	0	2
Acrossoma defeituoso		4	8	0	5	4	0	62	0	0	0	0	0
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		9	36	1	2	21	0	0	0	0	6	0	3
<b>Defeitos menores (%)</b>		3	0	4	7	9	37	2	0	0	20	0	56
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Gota citoplasmática distal		0	0	1	5	4	4	0	0	0	5	0	0
Cabeça decapitada (normal)		3	4	0	0	3	0	0	0	0	5	0	0
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	32	3	2	2	33	2	0	0	10	0	56
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		29.7	25	31	37	37,8	36,5	35,2	39,7	34,7	31,9	38,9	32,2
<b>DIAGNÓSTICO</b>		IMAT	IMAT	IMAT	DEG TEST	DISF.EP.CAB	DISF.EP.CAU	ESP.IMP.	MSR	MSR	MSR	MSR	DISF.EP.CAB

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	2
	<b>DATA (col)</b>	1/9/11	1/9/11	3/4/12	3/4/12	3/4/12	28/3/09	28/3/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09	15/12/09
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	15	26	24	26	26	31	32	26	26	26	27	25
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	416	385	430	460	430	390	380	428	390	410	480	460
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		203	208	200	209	210	306	307	301	302	303	304	308
	<b>Volume (ml)</b>	6	5,5	6	4	1,5	2,5	2	2	3	6	6	12
	<b>Motilidade de massa (1-5)</b>	1	0	0	2	2	2	2	4	3	5	0	0
	<b>Motilidade individual (%)</b>	60	40	0	60	40	60	70	50	60	80	5	0
	<b>Vigor (1-5)</b>	5	5	0	5	4	5	5	4	3	5	1	0
	<b>Concentração (x10<sup>6</sup>/ml)</b>	400	250	10	350	500	600	1000	350	130	500	100	0
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
	<b>Defeitos maiores (%)</b>	18	62	57	77	21	82	31	63	62	63	104	0
	<b>Delgado na base</b>	0	0	0	0	0	3	1	0	8	0	3	0
	<b>Cabeça piriforme</b>	0	14	0	1	0	4	2	4	16	14	4	0
	<b>Contorno anormal</b>	2	5	0	0	0	13	3	9	5	7	14	0
	<b>Cabeça pequena anormal</b>	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0	0
	<b>Cabeça isolada anormal</b>	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Subdesenvolvido</b>	3	0	0	0	0	0	4	0	0	2	2	0
	<b>Formas duplas</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	2		0	0
	<b>Gota citoplasmática proximal</b>	6	4	8	76	19	23	5	11	7	8	51	0
	<b>Acrossoma defeituoso</b>	0	12	3	0	0	31	16	20	8	17	26	0
	<b>Diadema ("pouch formation")</b>	0	0	0	0	1	0	0	0	11	4	3	0
	<b>Defeitos na peça intermediária</b>	5	23	46	0	1	4	0	21	5	11	11	0
	<b>Defeitos menores (%)</b>	31	47	43	4	12	5	4	15	3	3	9	0
	<b>Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Implantação abaxial</b>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	<b>Gota citoplasmática distal</b>	3	2	7	2	9	0	0	0	0	0	2	0
	<b>Cabeça decapitada (normal)</b>	0	4	5	0	0	5	0	6	0	3	2	0
	<b>Cauda dobrada (ou enrolada)</b>	28	41	31	2	3	0	4	9	3	0	5	0
	<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>	32,3	30,7	27,3	26,2	26,2	31,5	30,5	31	33	29	26	29
	<b>DIAGNÓSTICO</b>	DISF.EP.CAU	MSR	DISF.EP.CAB	MSR	MSR	MSR	MSR	MSR	MSR	MSR	MSR	MSR

ESPERMIOGRAMA (BLOM, E., 1973/1983).

<b>HISTÓRICO: Animais com outros distúrbios</b>	<b>NUTRIÇÃO</b>	2	2	1	1	1	1	1	1	2	2		
	<b>DATA (col)</b>	16/3/11	16/3/11	8/8/11	12/3/10	8/8/11	8/8/11	8/8/11	8/8/11	22/7/09	22/7/09		
<b>RAÇAS: Gir-L</b>	<b>IDADE(m/a)</b>	27	28	13	15	18	16	17	20	21	22		
<b>LOCAL: Minas Gerais</b>	<b>PESO (Kg)</b>	475	383	290	350	356	350	475	379	275	275		
<b>ASPECTOS FÍSICOS DO SÊMEN (Amostra)</b>		300	305	11	215	214	216	217	218	310	311		
Volume (ml)		3	3	0	2	7	7,5	3	4,5	1,2	1		
Motilidade de massa (1-5)		5	0	0	0	0	0	0	0	0	1		
Motilidade individual (%)		60	0	0	10	5	5	50	40	20	50		
Vigor (1-5)		5	0	0	3	1	1	4	4	5	5		
Concentração (x10 <sup>6</sup> /ml)		450	0	0	100	50	120	54	200	150	150		
<b>ASPECTOS MORFOLÓGICOS</b>													
<b>Defeitos maiores (%)</b>		46	0	0	76	0	0	0	38	27	25		
Delgado na base		0	0	0	0	0	0	1	0	2	5		
Cabeça piriforme		8	0	0	2	0	0	0	2	4	4		
Contorno anormal		18	0	0	12	0	0	0	0	3	1		
Cabeça pequena anormal		0	0	0	11	0	0	0	0	0	3		
Cabeça isolada anormal		3	0	0	0	0	0	0	0	3	0		
Subdesenvolvido		2	0	0	3	0	0	0	0	0	2		
Formas duplas		7	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Gota citoplasmática proximal		8	0	0	11	0	0	29	21	13	2		
Acrossoma defeituoso		0	0	0	20	0	0	0	3	2	5		
Diadema ("pouch formation")		0	0	0	9	0	0	0	0	0	0		
<b>Defeitos na peça intermediária</b>		0	0	0	8	0	0	24	12	0	3		
<b>Defeitos menores (%)</b>		8	0	0	5	0	0	30	14	5	7		
Cabeça delgada; pequena normal; gigante; curta; larga e perda da membrana acrossômica		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Implantação abaxial		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
Gota citoplasmática distal		0	0	0	0	0	0	14	8	0	4		
Cabeça decapitada (normal)		8	0	0	3	0	0	0	3	5	3		
Cauda dobrada (ou enrolada)		0	0	0	2	0	0	16	3	0	0		
<b>CIRCUNFERÊNCIA ESCROTAL (cm):</b>		28	32,5	17,6	24,5	26,7	26,8	27,4	25	26,5	26,5		
<b>CAP</b>		ESP.IMP.	MSR	CR IPT.	SUSP. HT	SUSP. HT	SUSP. HT	SUSP. HT	SUSP. HT	SUSP. HT	SUSP. HT		