



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS

Trabajo de tesis realizado como requisito para optar al título de
DOCTORA EN CIENCIAS VETERINARIAS

**ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENÓMICO DE LA EDAD
DE MADUREZ SEXUAL DE MACHOS BOVINOS**

Autora: Méd. Vet. Julieta Josefina de Iraola

Director: Dr. Guillermo Giovambattista

Codirector: Méd. Vet. Andrés Baldo

Lugares de Trabajo:

Instituto de Genética Veterinaria (FCV-UNLP-CONICET).

Cátedra de Producción Bovina (FCV-UNLP).

Miembros del Jurado:

Dr. Luzbel de la Sota

Ing. Agr. M Sc. Lilia M. Melucci

Dr. Humberto Tríbulo

2023

*A mi papá, mi mamá y mi hermana,
mis ejemplos y grandes maestros.*

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de La Plata, por brindarme la mejor educación permitiéndome cumplir el sueño de ser Médica Veterinaria y luego me becó para iniciar mis estudios de doctorado. Orgullosamente egresada y docente de la UNLP.

Al CONICET por el financiamiento recibido a través de la beca que me permitió completar mis estudios doctorales.

A mi director, el Dr. Guillermo Giovambattista, por abrirme las puertas del Instituto de Genética y formarme en esta área, por acompañarme hasta el final y no dejar que bajara los brazos.

A mi co-director, el Prof. Andrés Baldo, por permitirme formar parte de la Cátedra de Bovinos durante el desarrollo de mi beca doctoral, enseñarme sobre producción y acompañarme en este proceso.

A los jurados de esta tesis quienes, con sus correcciones y aportes desde el seminario hasta el informe final, han enriquecido este trabajo.

Al Dr. Martín Bonamy quien fue un pilar fundamental desde mis inicios, mi coequiper en cada uno de los muestreos y quien me acompañó hasta el final.

A la Dra. María Elena Fernández, por ser junto con Martín mis “asesores académicos” quienes estuvieron firmes estos meses en cada reunión de avance.

Al Dr. Alberto Prando por transmitirme su pasión por los toros e invitarme a realizar el doctorado en la Cátedra de Bovinos.

Al Prof. Roberto Vaca por enseñarme a trabajar en el campo, por cada viaje y por sus enseñanzas de vida.

A los “cariñosos de bovinos”: Mari, Enrique, Fede, Nico, Martín, Adri, Lisa, María Elena y Martina, un grupo humano excelente que estuvo siempre al pie del cañón.

Un verdadero equipo del que me llevo los mejores recuerdos y anécdotas.

A los estudiantes, hoy colegas, que colaboraron en el trabajo de campo y laboratorio, tarea que sin ellos hubiese sido imposible.

A Lorena Migliorisi, por su dedicación y paciencia durante la pasantía. Por enseñarme desinteresadamente a evaluar los reproductores en el laboratorio.

Al grupo del IGEVET, especialmente a Nadia, Gisela y Mónica quienes me enseñaron y me acompañaron en el laboratorio de genética molecular.

A los propietarios, encargados y personal de campo de los establecimientos que permitieron el desarrollo de los muestreos.

A la Dra. Cristina Alonso quien me permitió ingresar en la docencia y me mostró a la facultad como mi segunda casa, quién confió en mí y me acompañó en el momento más difícil de mi vida e hizo de Anatomía mi lugar en la facultad.

Al Dr. Gustavo Zuccolilli y a la Dra. Vanina Cambiaggi quienes siguieron apostando en mí como docente, me recibieron con cariño cuando las cosas se pusieron grises, me alentaron a seguir mis sueños y me volvieron a recibir, mi agradecimiento será eterno.

A mis compañeros de la Cátedra de Anatomía que me llenaron de palabras de aliento y me cubrieron cuando fue necesario.

A mis amigos de la vida, a los de siempre y a los nuevos porque han estado acompañando, sin importar los kilómetros de distancia.

A mi familia por soportarme como soy y entenderme como nadie. Por enseñarme que puedo con todo, que me puedo caer mil veces, pero siempre me tengo que levantar. Cada logro es por y para ustedes.

LISTADO DE PUBLICACIONES RELATIVAS AL PRESENTE TRABAJO DE TESIS

Bonamy, M; de Iraola, JJ; Baldo, A; Prando, A; Giovambattista, G; Munilla, S. (2018) Early rather than late scrotal circumference measurements better reflects female precocity in beef cattle. *Livestock Science*. *Livestock Science*, 218, 9–84.

de Iraola, J; Bonamy, M; Caballero, BN; Fernández Echeverría, MJ; González Rocco, S; Baldo, A. (2018) Estudio descriptivo de los eventos pubertad y madurez sexual en toros recriados bajo condiciones pastoriles. VIII Jornadas de Jóvenes Investigadores. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 6 al 8 de junio de 2018. Libro de resúmenes, p. 47-48.

de Iraola, J; Bonamy, M; Pofcher, E; Sorarrain, N; Balbi, M; Giovambattista, G; Baldo, A; Prando, AJ. (2017) Efecto del servicio sobre el desarrollo testicular, la calidad seminal y el crecimiento de toros en pastoreo. 40° Congreso Argentino de Producción Animal. Córdoba, Argentina, 6 al 9 de noviembre de 2017. *Revista Argentina de Producción Animal*, 37 (1), 37.

Prando, AJ; de Iraola, JJ; Bonamy, M; de la Sota, RL; Baldo, A (2016) Determinación de la edad de pubertad en toros Angus recriados en sistemas pastoriles de la Argentina. *Revista Taurus*, 18 (69), 19 – 24.

de Iraola, J; Bonamy, M; Pofcher, E; Sorarrain, N; Balbi, M.; Giovambattista, G.; Baldo, A.; Prando, AJ (2016) Efecto del servicio en parámetros de crecimiento y desarrollo de toros Angus en un sistema pastoril. Segunda Jornada de Divulgación Científica del Instituto de Investigaciones en

Genética Veterinaria (IGEVET) "Fernando Noel Dulout". La Plata, Argentina, 19 de diciembre de 2016.

de Iraola, J; Bonamy, M; Prando, AJ (2016) Descripción de parámetros seminales y de desarrollo corporal en toros Angus. VI Jornada de Jóvenes Investigadores. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina, 10 al 12 de junio de 2016. InVet, 18 (1), 150.

de Iraola, J; Bonamy, M; Prando, AJ; Giovambattista G; Baldo; A. (2015) Caracterización del desarrollo sexual de toros Angus criados en condiciones pastoriles en Argentina. XXIV Congreso de la Asociación Latinoamericana de Producción Animal. Puerto Varas, Chile, 9 al 13 de noviembre de 2015. Libro de resúmenes, p.944.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

LISTADO DE ABREVIATURAS	IX
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	4
CAPÍTULO I.....	9
DETERMINACIÓN DE LA EDAD A LA MADUREZ SEXUAL Y CARACTERIZACIÓN DEL EVENTO MEDIANTE PARÁMETROS FENOTÍPICOS	9
INTRODUCCIÓN	9
1.1 Desarrollo reproductivo	9
<i>1.1.1 Pubertad</i>	9
<i>1.1.2 Madurez sexual</i>	10
1.2 Crecimiento, desarrollo y nutrición.....	14
1.3 Evaluación reproductiva de toros jóvenes.....	15
1.4 Objetivos	16
1.5 Hipótesis.....	17
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
2.1 Material animal	17
2.2 Diseño experimental.....	19
2.3 Determinación de las etapas de desarrollo sexual.....	19
2.4 Metodologías utilizadas	20
<i>2.4.1 Determinación de la calidad espermática</i>	20
<i>2.4.2 Mediciones de caracteres morfológicos</i>	22
2.5 Análisis estadístico.....	22

2.6 Diseño de un esquema diagnóstico para la determinación de la madurez sexual a campo.	23
RESULTADOS	24
3.1 Descripción de los eventos pubertad y madurez sexual.....	24
3.2 Diseño de un esquema diagnóstico para la determinación de la madurez sexual a campo.	33
DISCUSIÓN	36
CONCLUSIONES	40
CAPÍTULO II	42
ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS CON CARACTERES FENOTÍPICOS RELACIONADOS CON LA MADUREZ SEXUAL EN TOROS ANGUS.	42
INTRODUCCIÓN	42
1.1 Búsqueda y selección de genes candidatos	42
1.2 Objetivo.....	49
1.3 Hipótesis.....	49
MATERIALES Y MÉTODOS.....	49
2.1 Material animal y datos fenotípicos	49
2.2 Extracción de sangre, pelo y ADN.....	50
2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipificación.....	51
2.3.1 Genotipificación del polimorfismo <i>IGF1-SnaBI</i>	51
2.3.2 Genotipificación del polimorfismo en <i>PRM1</i> y <i>SERPINA7</i>	54
2.4 Análisis estadísticos	56
2.4.1 Medidas de variabilidad genética	56
2.4.2 Análisis de asociación entre SNPs y el momento de arribo a la madurez sexual	57
RESULTADOS	59

3.1 Medidas de variabilidad genética.....	59
3.2 Riesgo de madurez asociado a polimorfismos en genes candidatos	62
DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....	66
CAPÍTULO III.....	70
EFFECTO DEL SERVICIO PRECOZ EN EL CRECIMIENTO CORPORAL, DESARROLLO TESTICULAR Y CALIDAD SEMINAL DE TOROS ANGUS.	70
INTRODUCCIÓN	70
1.1 Uso de categorías jóvenes en el servicio natural.....	70
1.2 El servicio natural a campo y sus implicancias.....	72
1.3 Objetivo.....	74
1.4 Hipótesis.....	74
MATERIALES Y MÉTODOS	74
2.1 Material animal	74
2.2 Diseño experimental.....	75
2.3 Metodologías utilizadas	76
2.3.1 <i>Determinación de la calidad espermática</i>	76
2.3.2 <i>Medición de caracteres morfológicos</i>	77
2.4 Análisis estadístico.....	77
RESULTADOS	77
DISCUSIÓN	82
CONCLUSIÓN.....	87
CONCLUSIONES GENERALES	89
BIBLIOGRAFÍA	91

LISTADO DE ABREVIATURAS

ADAL	Aumento diario de alzada
ADCE	Aumento diario de circunferencia escrotal
ADP	Aumento diario de peso
ADP8	Aumento diario de espesor de grasa subcutánea
ALZ	Alzada a la grupa
CE	Circunferencia escrotal
CNA	Censo Nacional Agropecuario
CONC	Concentración espermática
FSH	Hormona folículo estimulante
GC	Grupo control
GNRH	Hormona liberadora de gonadotrofina
GS	Grupo en servicio
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
HHG	Eje hipotálamo-hipófisis-gonadal
HWE	Equilibrio de Hardy-Weinberg
IGF1	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 1
IGF2	Factor de crecimiento similar a insulina tipo 2
INCH	Escuela M.C. y M.L. Inchausti

INDEC	Instituto Nacional de Estadística y Censos
IPCVA	Instituto de Promoción de la Carne Vacuna
LE	Rodeo del establecimiento “La Emma”
LH	Hormona luteinizante
LHR	Receptores de LH
LV1	Rodeo del establecimiento “La Victoria”, año 2014
LV2	Rodeo del establecimiento “La Victoria”, año 2015
MAF	Frecuencia del alelo menos frecuente
MI	Motilidad individual
NOR	Porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales
P	Peso corporal
P8	Espesor de grasa subcutánea
PRM1	Protamina 1
PRM2	Protamina 2
PRMs	Protaminas
QTL	Locus de caracteres cuantitativos
SNPs	Polimorfismos de Nucleótidos Simples
TBG	Globulina transportadora de tiroxina
VI	Porcentaje de espermatozoides vivos

ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENÓMICO DE LA EDAD DE MADUREZ SEXUAL DE MACHOS BOVINOS

PALABRAS CLAVES: MADUREZ SEXUAL, PRECOCIDAD, TOROS,
MARCADORES GENÉTICOS, SERVICIO PRECOZ.

RESUMEN

Los toros de 15 meses resultan una alternativa efectiva para reducir los costos de cría. Conocer sus características reproductivas y su evolución a lo largo del tiempo permite hacer un uso racional de esta herramienta. Los objetivos de esta tesis fueron: a) describir el evento madurez sexual (MS); b) establecer un esquema diagnóstico que permita detectar de forma fácil y económica a los toros maduros sexualmente; c) estudiar la asociación entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos relacionados con la MS; d) evaluar el efecto del servicio en toros jóvenes. Se trabajó con toros Angus, a partir de los 10 meses de edad, pertenecientes a establecimientos de la provincia de Buenos Aires. Se evaluó la calidad seminal y se registró: peso (P), alzada y circunferencia escrotal (CE). Los animales que tuvieron una concentración espermática de 50 mill/ml con un 10% de motilidad, fueron clasificados como púberes. Para ser considerados maduros debían presentar al menos un 30 % de motilidad y un 70 % de espermatozoides morfológicamente normales. Se determinaron los genotipos para SNPs seleccionados en los genes PRM1, SERPINA7 e IGF1. Finalmente, se evaluó el efecto del servicio precoz sobre el crecimiento, desarrollo testicular y calidad seminal de un grupo de toros de 15 meses que fueron enviados a servicio, contrastándolo con un grupo de

contemporáneos que permanecieron en recría, en un ambiente similar. Se concluye que en estas condiciones los toros alcanzan la MS alrededor de los 16,5 meses de edad, que el P y la CE son buenos predictores del momento de presentación de la MS y que el servicio precoz parece no afectar la aptitud reproductiva futura de los toros.

PHENOTYPICAL AND GENOMIC STUDY OF THE SEXUAL MATURITY AGE IN BULLS

KEY WORDS: SEXUAL MATURITY, PRECOCITY, YEARLING BULLS, GENETIC MARKERS, EARLY MATING.

ABSTRACT

The 15-month-old bulls are an effective alternative to reduce breeding costs. Knowing its reproductive characteristics and its evolution over time allows rational use of this tool. The objectives of this thesis were: a) to describe the sexual maturity (MS) event; b) to establish a diagnostic scheme that allows an easy and economical detection of sexually mature bulls; c) to study the association between genetic markers and phenotypic characters related to MS and d) to evaluate the effect of the service on young bulls. Angus bulls located in the province of Buenos Aires were evaluated from 10 months of age. Seminal quality was evaluated, and weight (P), height and scrotal circumference (CE) were measured. The animals that had a sperm concentration of 50 mill/ml with 10 % of motility were classified as pubertal. To be considered mature, they must present at least 30 % of motility and 70 % of morphologically normal sperm. Animals were genotyped for the selected SNPs in the genes PRM1, SERPINA7, IGF1. Finally, the effect of early service on growth, testicular development and seminal quality of a group of 15-month-old bulls that were sent for service was evaluated, contrasting it with a control group. It is concluded that under these conditions the bulls reach SM around 16,5 months of age, that P and CE are good predictors of the moment of SM presentation and that early service does not seem to affect the future reproductive fitness of bulls.

INTRODUCCIÓN GENERAL

La cría bovina representa el primer eslabón de la cadena agroalimentaria, y uno de los pilares fundamentales de la economía argentina. Se caracteriza por ser extensiva, con un bajo grado de adopción de tecnologías, siendo las tecnologías de procesos las más aplicadas en este tipo de producción (Viglizzo, 2014). El desarrollo de esta actividad ha sufrido a lo largo de la historia altibajos a causa de diversos factores, tales como inclemencias climáticas, el desplazamiento de la ganadería por la expansión de la frontera agrícola y las diversas políticas agropecuarias que afectaron de alguna manera a este sector. A nivel cultural, la producción y el consumo de carne en nuestro país resultan de gran importancia. Esto lleva a centrar la atención en maximizar la eficiencia del sistema productivo, y en este sentido es la reproducción el factor de mayor importancia en los sistemas de cría bovina (Trenkle y Willham, 1977). Si profundizamos en este aspecto, debemos remarcar que los machos son los responsables en mayor magnitud de los resultados obtenidos, tanto a nivel reproductivo como genético. Teniendo en cuenta que el servicio natural es el más difundido y practicado en nuestro país, ya que cerca de un 88 % de los vientres son manejados bajo esta modalidad (Censo Nacional Agropecuario, 2018), la categoría toros es un grupo clave a controlar dentro de los costos de producción. Cabe destacar que los productores eligen sus toros pensando no solo en lograr aumentos en los kilogramos de terneros destetados por año, sino también como una herramienta en el mejoramiento genético de su rodeo, ya que son los machos quienes transmiten los caracteres seleccionados más rápidamente.

Los toros comienzan a dar servicio, en la mayoría de los establecimientos, con 2 años de edad, aunque existen productores que comienzan a utilizar toros de 15 meses. El uso de animales jóvenes tiene beneficios en dos aspectos, por un lado, permite acortar el intervalo generacional, aumentando así el progreso genético del rodeo, y por el otro reduce los costos del sistema ya que, al reducir los costos de recría para los cabañeros, le permite al productor acceder a animales a un menor precio, teniendo la posibilidad de comprar toros con un alto mérito genético, sin afectar la economía de la empresa.

La precocidad sexual de los animales seleccionados como reposición es clave para contar con toros maduros al momento del servicio. La madurez sexual está definida como el momento en el cual un toro puede ser utilizado por primera vez para la reproducción y producir resultados que sean considerados satisfactorios para la industria, ya sea utilizándolo en servicio natural o como productor de semen para inseminación artificial (Brito y col., 2004). Objetivamente, se considera a un toro como maduro en el momento que logra un eyaculado con una motilidad individual mayor o igual al 30% y un mínimo de 70% de espermatozoides morfológicamente normales (Brito y col., 2012). La posibilidad de predecir precozmente el momento en que los animales alcancen este estatus es de gran importancia a la hora de elegir a aquellos animales que serán utilizados como reposición y futuros reproductores del rodeo (Albuquerque y Baldi, 2011).

En los últimos tiempos se ha puesto en valor el uso de marcadores genéticos, como una herramienta muy útil en la predicción del mérito genético para características que son difíciles de medir, ya sea porque tienen una baja heredabilidad, porque son costosas de evaluar o porque se valoran cuando el animal

alcanza una talla adulta e incluso *post mortem*. Algunas de dichas características son: el consumo residual de alimentos, la eficiencia reproductiva, la resistencia a enfermedades y la composición de la canal. De esto se desprende, que al ser la madurez sexual una característica que sólo puede evaluarse en una fase avanzada del desarrollo de los toros, la aplicación de esta tecnología puede permitir la identificación precoz de los animales que presenten este evento a temprana edad y así reducir los costos de cría.

Existen pocos trabajos realizados en bovinos que describan mutaciones o marcadores genéticos asociados a la madurez sexual. Algunos de los trabajos que marcan precedente en este tema han identificado marcadores del tipo de los Polimorfismos de Nucleótidos Simples (SNPs) en los cromosomas 14 y X, utilizando estudio de asociación del genoma completo (GWAS), en toros de raza Brahman, asociados con pubertad y fertilidad. Dichos eventos fueron definidos mediante circunferencia escrotal (CE) y porcentaje de espermatozoides normales respectivamente (Fortes y col., 2012). Estudios realizados por Lirón y col. (2012) reportaron la existencia de asociación del SNP IGF1-SnaBI con la edad a la CE de 28 cm, parámetro propuesto como indicador de pubertad en machos de raza Angus.

Actualmente, se desconoce la edad a la que los toros arriban a la madurez sexual en los rodeos argentinos, así como tampoco se sabe cuáles son las características morfométricas que debe tener un animal para alcanzar dicho estatus. Esto genera un área de vacancia en el conocimiento, tanto en el sector científico y académico como a nivel productivo, siendo esta información de gran relevancia práctica.

Por todo lo expuesto anteriormente, poco se conoce en el área de la genética de la reproducción en bovinos criados bajo condiciones pastoriles propias de Argentina, por lo cual se estima que su estudio generará un gran impacto en el conocimiento de esta área.

El presente trabajo de tesis está dividido en tres capítulos. El primero tiene como objetivos describir el evento madurez sexual en toros Angus manejados bajo condiciones de sistemas pastoriles de la pampa húmeda argentina, y establecer un esquema diagnóstico para ser llevado a cabo en condiciones de campo que permita detectar de forma fácil y económica a los toros maduros sexualmente. En el segundo, se propone estudiar la asociación entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos relacionados con la madurez en el macho bovino. El objetivo del capítulo final es evaluar el efecto del servicio en toros jóvenes de la raza Angus, durante su primera temporada de servicio sobre parámetros de desarrollo testicular, calidad seminal y crecimiento.

Para abordar estos objetivos se trabajó durante los años 2014, 2015 y 2016 con toros de la raza Angus, a partir de los 10 meses de edad. Los individuos bajo estudio pertenecían a establecimientos ganaderos ubicados en la zona de cría más relevante para la provincia de Buenos Aires, y de las más importantes de la Argentina, donde se encuentra alrededor del 50 % de los vientres de la provincia: la Cuenca del Salado y Depresión de Laprida. Se mantuvieron bajo las condiciones habituales de recría en esta zona durante todo el ensayo. Se realizaron muestreos seriados cada 28 - 30 días, en los que se extrajo semen y se evaluó su calidad, al mismo tiempo se registró: peso individual, alzada a la cadera y circunferencia escrotal. Por otro lado, se tomó una muestra de sangre y pelo que luego fueron

utilizadas para extraer el ADN, a partir del cual se genotipificaron los animales en busca de los marcadores genéticos seleccionados en los genes candidatos.

Finalmente se realizó el análisis estadístico a partir de los datos recabados, se determinó la edad de madurez sexual, se analizaron las variables fenotípicas relacionadas a dicho evento y se buscó la asociación entre los caracteres indicadores de madurez sexual en toros y los marcadores genéticos seleccionados.

Como cierre del trabajo de tesis, en el capítulo 3, se desarrolló un aspecto de gran relevancia en la aplicación del conocimiento construido hasta el momento. Se evaluó el efecto del servicio precoz sobre el crecimiento, desarrollo testicular y calidad seminal de un grupo de toros de 15 meses de edad que fueron enviados a servicio natural, contrastándolo contra un grupo de animales contemporáneos que permanecieron en recría, en condiciones ambientales similares.

CAPÍTULO I

DETERMINACIÓN DE LA EDAD A LA MADUREZ SEXUAL Y CARACTERIZACIÓN DEL EVENTO MEDIANTE PARÁMETROS FENOTÍPICOS

INTRODUCCIÓN

1.1 Desarrollo reproductivo

1.1.1 Pubertad

La pubertad es una de las etapas del desarrollo sexual del individuo caracterizada por importantes cambios a nivel físico y comportamental. Es durante este periodo que el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG) se vuelve completamente funcional y de esta manera, coordina los procesos fisiológicos necesarios para que el animal logre iniciar su vida reproductiva. Externamente podemos evidenciar marcadas diferencias entre los machos y las hembras bovinas una vez alcanzada la pubertad, gracias al desarrollo de los caracteres sexuales secundarios que se manifiestan a causa de la expresión diferencial de hormonas entre ambos sexos. A nivel comportamental se observa un aumento en el deseo sexual, conocido como libido en el caso de los machos y las manifestaciones externas de celo y la conformación de grupos sexualmente activos en el caso de las hembras.

Existen diversas maneras de definir a un toro como púber, Wolf y colaboradores (1965) establecieron como punto de referencia el momento en el cual

un toro presenta en su eyaculado un 10 % de motilidad progresiva y una concentración mínima de 50 millones de espermatozoides por mililitro. Otro de los parámetros propuestos ha sido la circunferencia escrotal (CE), tomando como valor de corte el momento en el cual un toro alcanza los $27,9 \pm 0,2$ cm, independientemente de la raza y el peso vivo (Lunstra y col., 1978). Teniendo en cuenta los cambios producidos en esta etapa, otros autores han propuesto como indicadores de pubertad la capacidad de exteriorizar el pene de su vaina prepucial, el aumento en la concentración sérica de testosterona, como así también, la sola presencia de espermatozoides en la luz de los túbulos seminíferos, en la cola del epidídimo o de al menos una gameta en el eyaculado (Backer y col., 1955; Abdel-Raouf, 1960; Foote, 1969; Igboeli y Rakha, 1971; Cardoso, 1977; França, 1987; Backer y col., 1988).

1.1.2 Madurez sexual

La madurez sexual se define como el momento en el cual un toro puede ser utilizado por primera vez para la reproducción, obteniendo resultados que puedan ser considerados satisfactorios para la industria, ya sea utilizándolo en el servicio natural o como productor de semen para inseminación artificial (Brito y col., 2004). Este evento se encuentra íntimamente ligado a la pubertad, pudiendo considerarse como el momento cúlmine de dicho proceso, donde se logra una estabilidad en la calidad espermática con valores semejantes a los de un toro adulto. La madurez sexual puede ser diagnosticada, de manera objetiva, evaluando las características seminales del animal y para ello se han propuesto diferentes criterios. En un estudio

realizado en Canadá, se evaluó la proporción de toros con espermograma maduro entre los 11 y los 15 meses de edad, utilizando como valores umbrales una concentración de 400 millones de espermatozoides por mililitro, un mínimo de 60 % de espermatozoides con motilidad progresiva y al menos un 70 % de espermatozoides morfológicamente normales (Arteaga y col., 2001). Otro criterio para determinar la madurez sexual es el empleado por la Asociación de Profesionales Bovinos del Oeste Canadiense (WCABP), que deja de lado la concentración e incluye a la motilidad en masa microscópica junto con la motilidad progresiva del 60 % y el 70 % de espermatozoides morfológicamente normales (Barth y Waldner, 2002). Estudios posteriores, en concordancia con los parámetros establecidos por la Sociedad de Teriogenología (SFT; Koziol y Armstrong, 2018), definen la madurez sexual como el momento en el que el toro produce un eyaculado con al menos un 30 % con motilidad individual progresiva y un mínimo de 70 % de espermatozoides morfológicamente normales (Kennedy y col., 2002; Brito y col., 2012). En Australia, los estándares establecidos por los Veterinarios del Ganado Australiano (ACV), consideran que la motilidad individual progresiva del 30 % puede ser aceptada en aquellos toros que sean utilizados en monta natural (Norman, 2021). Este valor de corte inferior al utilizado habitualmente para evaluar la motilidad espermática resulta aplicable a las condiciones de extracción y evaluación seminal a campo, donde este parámetro puede verse afectado fácilmente por las adversidades del medio ambiente. Se ha visto en estudios realizados bajo estrictas condiciones de laboratorio, que solo un bajo porcentaje de los animales que presentaban un 70 % de espermatozoides morfológicamente normales tenían a su vez una motilidad inferior al 60 % (Barth y Waldner, 2002). Cabe destacar que

el valor de espermatozoides morfológicamente normales se mantiene constante en las diferentes definiciones de madurez propuestas. A su vez, dicho valor ha sido relacionado directamente de manera positiva con el porcentaje de terneros logrados al finalizar el servicio (Holroyd y col., 2002). En la tabla 1 se detallan y comparan los criterios utilizados para definir la madurez sexual en bovinos.

Tabla 1. Comparación entre diferentes criterios utilizados para definir la madurez sexual en bovinos, propuestos por Arteaga y col. (2001), la Asociación de Profesionales Bovinos del Oeste Canadiense (WCABP) y la Sociedad de Teriogenología (SFT)

	Arteaga y col. (2001)	WCABP	SFT
Motilidad individual	60 %	60 %	30 %
Espermatozoides morfológicamente normales	70 %	70 %	70 %
Concentración espermática	400 x 10 ⁶ /ml	-	-

Como se ha mencionado previamente, la madurez sexual se encuentra íntimamente relacionada con la pubertad. Un estudio pionero, que incluyó animales de diferentes razas y sus cruza -Hereford, Angus, Hereford x Angus, Red Poll y Pardo Suizo- mostró que fueron necesarios alrededor de 112 días luego de arribar la pubertad, para lograr características seminales comparables con las de un adulto (Lunstra y Echternkamp, 1982). En concordancia con este hallazgo, un trabajo posterior con toros de raza Nelore, mostró un intervalo de 110 días entre la pubertad y la madurez sexual, tanto en animales precoces como tardíos en su desarrollo reproductivo (Brito y col., 2004). Por el contrario, un estudio realizado sobre 22 bovinos cruza Angus x Charolais y 17 ejemplares de la raza Angus, se observó un

intervalo entre la pubertad y la madurez mucho menor, de aproximadamente 50 días (Brito y col., 2012).

La edad a la que alcanzan la madurez sexual los bovinos varía según diversos factores, entre ellos podemos mencionar: la raza, siendo las taurinas más precoces en comparación con las cebuinas; la nutrición, teniendo una fuerte influencia durante la etapa previa al destete; el clima, que afecta no solo la calidad y cantidad de los recursos forrajeros, sino que también en condiciones extremas puede resultar un agente estresor. Teniendo en cuenta estas variables, la bibliografía muestra información diversa a la hora de determinar el momento y las características fenotípicas que acompañan al evento madurez sexual. Se ha documentado una edad de madurez sexual promedio para las razas taurinas productoras de carne de 16 meses, acompañada por una CE de 35,9 cm (Barth, 1999). Años más tarde, con el objetivo de detectar mejoras genéticas en los rodeos de carne y que redunden en animales más precoces, investigadores canadienses analizaron la proporción de animales maduros entre los 11 y los 15 meses de edad perteneciente a las razas Angus, Simmental, Charolais y Limousin. A pesar del tiempo transcurrido y de la selección ejercida, la mayor proporción de animales maduros (61 %) presentaron una edad de 15 meses, con una CE promedio de 35,3 cm. (Arteaga y col., 2001). Trabajos posteriores realizados sobre la raza Angus y su cruce con Charolais han mostrado una edad de madurez sexual cercana a los 12 meses de edad, bajo diferentes planos nutricionales (Barth y col., 2008; Brito y col., 2012).

1.2 Crecimiento, desarrollo y nutrición

Es bien conocida la estrecha relación entre el crecimiento corporal y el desarrollo reproductivo. Los efectos de la nutrición sobre el eje HHG repercuten directamente sobre los tiempos en los que se dan los eventos de pubertad y madurez sexual, como así también en el grado de desarrollo corporal (Coulter y Kozub, 1984; Makarechian y col., 1985; Barth y col., 2008; Brito y col., 2012).

Teniendo en cuenta el ambiente hormonal y las características de crecimiento es posible dividir el desarrollo posnatal de los bovinos en tres periodos: infantil, prepuberal y puberal. El primero, considerado desde el nacimiento a las 8 semanas de vida, se caracteriza por bajos niveles de gonadotrofinas (LH y FSH) en sangre y un lento crecimiento testicular. Durante el segundo periodo, que va desde la semana 8 a la 20 de vida, se produce el pico temprano de gonadotrofinas que desencadena un leve aumento de la testosterona secretada a nivel testicular. Si bien el crecimiento gonadal en esta etapa aun es lento, la diferenciación a nivel del parénquima testicular permite una maduración celular que modifica la secreción de andrógenos. Es importante tener presente que es el pico de LH uno de los mayores eventos relacionados con la precocidad a nivel reproductivo, siendo fácilmente alterado a causa del plano nutricional al que se enfrenten los animales, restricciones alimentarias durante este periodo repercuten negativamente en el desarrollo sexual de los toros. En relación a la nutrición, estas dos primeras etapas se encuentran fundamentalmente afectadas por la alimentación al pie de la madre, ya que en los sistemas de cría el destete ocurre alrededor de las 20-28 semanas de vida, en planteos organizados con servicio estacionado y restringido en el tiempo. Por último, el periodo puberal se caracteriza por un aumento rápido del tamaño

testicular y un marcado incremento de la espermatogénesis, bajos niveles de gonadotrofinas y elevados niveles de testosterona, leptina, insulina, hormonas de crecimiento e IGF-1, estos últimos asociados de manera positiva con el desarrollo corporal general y testicular (Brito y col., 2007; Rawlings y col., 2008; Bollwein y col., 2017; Byrne y col., 2017).

1.3 Evaluación reproductiva de toros jóvenes

La evaluación de los reproductores es una práctica que tiene como fin aumentar las probabilidades de obtener mejores resultados a nivel productivo. Idealmente los toros deben ser evaluados de forma integral cada año, especialmente al trabajar con toros jóvenes, esta valoración debe implementarse con el objetivo de asegurar que cada reproductor ha alcanzado la madurez sexual y se encuentra en plena capacidad para la reproducción. Según los datos obtenidos a partir del Censo Nacional Agropecuario del año 2018 (CNA, INDEC), el 21 % de las unidades productivas de ganado bovino de Argentina realiza un control de fertilidad en los toros; al analizar la provincia de Buenos Aires, este valor asciende al 43 %.

Existen diferentes posturas acerca de la necesidad de implementar evaluaciones reproductivas integrales en toros. Las diferencias de criterios en los estándares a evaluar y la ausencia de un esquema que homogenice los criterios a analizar a nivel nacional, hacen de esta práctica una actividad individual que depende de las condiciones propuestas por cada veterinario, lo que en definitiva dificulta la comparación entre los diferentes ejemplares. Estas evaluaciones pueden limitarse a un diagnóstico de enfermedades venéreas, incluir una exploración clínica, considerar aspectos relacionados a la calidad seminal y/o a su capacidad de

monta y libido. Se ha visto que, en una población de toros no evaluados a través de un examen andrológico completo, se puede encontrar entre un 20 y un 40 % de toros subfértiles, pero muy pocos ejemplares completamente infértiles (Kastelic y Wolfe, 2007). Por su parte, otros autores aseguran que entre un 15 y un 20% de los toros que pasan de manera satisfactoria un examen andrológico sin evaluación espermática, en realidad poseen mala calidad seminal, pudiendo ser subfértiles e incluso infértiles (Barth, 1999). Así mismo, se ha comprobado un aumento del 5 % en el porcentaje de preñez en rodeos que han sido servidos por toros que contaban con una evaluación reproductiva satisfactoria, y a su vez que dicha diferencia no era compensada al aumentar el número de toros con calidad seminal desconocida (Wiltbank y Parish, 1986). En contraposición, Acuña y colaboradores (2001) encontraron que no sería necesario un espermograma en toros de rodeo general, ya que el porcentaje de toros con semen de mala calidad es bajo, comprobando a su vez que el porcentaje de preñez alcanzado con toros probados con calidad seminal satisfactoria era similar a la de los toros no evaluados.

En este escenario, contar con un protocolo estandarizado que permita un fácil y correcto diagnóstico de la madurez sexual en toros, sería de gran utilidad para ser utilizado de manera general en los rodeos de cría de Argentina.

1.4 Objetivos

El objetivo general de este ensayo fue caracterizar fenotípicamente a toros de raza Angus pertenecientes a tres establecimientos de la provincia de Buenos Aires (Argentina), durante su desarrollo reproductivo hasta arribar la madurez

sexual. El objetivo particular fue establecer un esquema diagnóstico para ser llevado a cabo en condiciones de campo que permita detectar de forma fácil y económica a los toros maduros sexualmente.

1.5 Hipótesis

Existe variabilidad en la edad a la madurez sexual y caracteres asociados en toros Angus de la provincia de Buenos Aires.

El peso y la circunferencia escrotal son buenos predictores del estado de madurez sexual en machos bovinos.

MATERIALES Y MÉTODOS

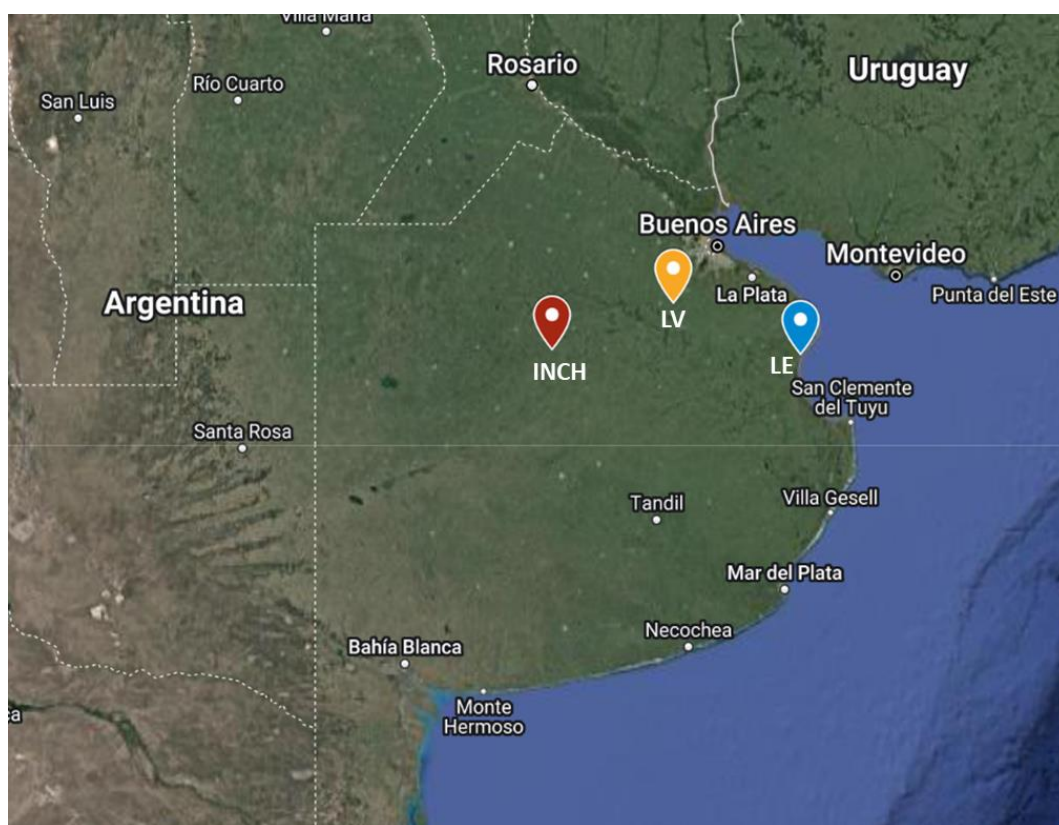
2.1 Material animal

Para el desarrollo de esta tesis se trabajó en tres establecimientos ganaderos de la provincia de Buenos Aires, Argentina, productores de ganado bovino de la raza Angus (Figura 1). Los animales utilizados fueron destetados con un promedio de edad de $235 \pm 22,8$ días y recriados bajo condiciones pastoriles. Los rodeos se caracterizaron por ser homogéneos en su edad y conformados por animales de biotipo moderado, con un peso promedio al nacer de $29 \pm 5,4$ kg.

En el año 2014 se comenzó con una prueba piloto en la unidad productiva perteneciente a la Escuela M.C. y M.L. Inchausti (INCH) de la Universidad Nacional de La Plata (25 de mayo, Buenos Aires, Argentina, $35^{\circ}38'31.5''\text{S}$ - $60^{\circ}28'26.9''\text{O}$). En este establecimiento se trabajó con 66 toros destetados en el año

2014, nacidos entre julio y septiembre de 2013, sin registro exacto de su fecha de nacimiento. Durante este año se incluyó el establecimiento “La Victoria” (Lobos, Buenos Aires, Argentina, 35°10'38"S - 58°57'11"O), donde se trabajó con 50 toros (LV1) con una edad promedio al inicio del muestreo de $444 \pm 25,9$ días, mientras que en el año 2015 se evaluaron otros 55 animales (LV2) con una edad promedio de 323 ± 20 días. Por su parte, el establecimiento “La Emma” (LE) (Punta Indio, Buenos Aires, Argentina, 35°41'18.3"S - 57°21'49.5"O) colaboró con 100 ejemplares de $334 \pm 26,6$ días de edad al inicio del muestreo, durante el año 2015.

Figura 1. Ubicación geográfica de los tres establecimientos evaluados. “Inchausti” (INCH), “La Victoria” (LV) y “La Emma” (LE).



Todos los procedimientos realizados sobre los animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio

(CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Cód. 44-1-14 T).

2.2 Diseño experimental

El ensayo se desarrolló en dos periodos consecutivos. Durante el mes de octubre del año 2014 se comenzó la prueba piloto en INCH, donde se puso a punto el procedimiento de muestreo. En los meses de noviembre y diciembre del 2014 y febrero de 2015 se trabajó en INCH y en LV1. El segundo periodo abarcó desde julio de 2015 hasta marzo del 2016, y se trabajó sobre los animales de LE y LV2. En ambos periodos se realizaron muestreos mensuales, donde se recolectó semen y se determinó su calidad, como así también se tomaron mediciones de diferentes parámetros morfométricos: circunferencia escrotal (CE), alzada (ALZ) y peso (P).

2.3 Determinación de las etapas de desarrollo sexual

La madurez sexual fue definida como el momento en el cual un toro presentó en su eyaculado un mínimo de 30 % de espermatozoides con motilidad progresiva y rectilínea y no menos del 70 % de espermatozoides morfológicamente normales; la elección de este criterio fue en base a las condiciones del manejo a campo (Brito y col., 2012). La etapa previa, en cuanto al desarrollo sexual se refiere, es conocida como pubertad y, como se explicó anteriormente, existen diversas maneras de definir a un individuo como púber. En este ensayo se utilizó la definición propuesta por Wolf y col. (1965). Los animales fueron clasificados en tres categorías según su calidad seminal: maduros, púberes e infantiles; este último grupo integrado por

aquellos individuos que no alcanzaron las condiciones mínimas para ser considerados púberes.

2.4 Metodologías utilizadas

2.4.1 Determinación de la calidad espermática

En cada muestreo se colectó semen mediante electroeyaculación. Dicha técnica de recolección es de elección en caso de trabajar con animales jóvenes que no cuentan con el entrenamiento necesario para la extracción con vagina artificial.

Previo a cada electroeyaculación se realizó una palpación de glándulas anexas vía rectal donde se verificó su tamaño, consistencia y la presencia de dolor al tacto, a la vez se comenzó la estimulación manual para desencadenar el reflejo de erección. Para este ensayo se utilizó un electroeyaculador SireMaster® (Original, Ultra Electronics ICE, Manhattan, EE. UU.) con curva manual de electroestimulación. Durante los primeros cuatro meses se utilizó una sonda transrectal para bovinos adaptada de menor tamaño (5 cm de diámetro y 30 cm de largo), con tres electrodos en su cara ventral. En los meses posteriores, en los que los animales ya tenían un mayor tamaño corporal, se reemplazó por una sonda de medidas estándar (6,3 cm de diámetro y 35 cm de largo).

La calidad seminal se determinó mediante los siguientes parámetros:

- *Motilidad individual (MI) y vigor:* se estimó mediante el método visual utilizando un microscopio óptico, al que se le acopló una platina térmica donde se colocaron portaobjetos previamente atemperados a 37°C. Sobre estos se colocó una muestra de 10 µl de semen fresco y un cubreobjetos

atemperado. En caso de muestras concentradas, previamente se realizó una dilución con Citrato de Sodio al 2,9 % para una correcta visualización. Se determinó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva y rectilínea utilizando 400 aumentos. Simultáneamente se determinó el vigor, asignándole un valor a cada muestra, cuya escala va del 0 al 5, mediante la cual se caracteriza la calidad y velocidad del movimiento (Rutter y Russo, 2006).

- *Concentración (CONC)*: se estableció la cantidad de espermatozoides expresada en millones por mililitro mediante el uso de una cámara hemocitométrica de Neubauer (Boeco®, Alemania).
- *Vitalidad*: como indicador de vitalidad espermática se aplicó la tinción supravital de eosina-nigrosina en un paso, la que tiene como objetivo evaluar la integridad de la membrana celular. Se estableció el porcentaje de espermatozoides vivos (VI) a partir de una muestra de semen puro. La lectura de los frotis obtenidos se realizó mediante microscopía óptica en un lapso no mayor a 12 horas post colecta bajo 400 aumentos. A partir de 200 células contadas el resultado se expresó en porcentaje, teniendo en cuenta que las células coloreadas correspondían a espermatozoides muertos mientras que los que permanecían sin colorear se encontraban viables al momento de la tinción.
- *Morfología espermática*: para determinar el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) se realizó una tinción diferencial rápida (Tinción 15, Biopur®). A partir de una muestra de semen puro colocada en un portaobjetos atemperado se realizó un extendido fino, se dejó secar sobre

platina térmica, y luego se coloreó tal como indica el fabricante. La lectura de los preparados se realizó bajo microscopio óptico con lente de inmersión a 1000 aumentos. Se contaron 200 células y se las clasificó según su morfología para establecer el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

2.4.2 Mediciones de caracteres morfológicos

Desarrollo testicular:

- *Circunferencia escrotal (CE)*: una vez descendidos por completo ambos testículos en el escroto se midió su contorno utilizando un escrotímetro comercial metálico colocado en el ecuador escrotal.

Crecimiento y desarrollo corporal:

- *Alzada (ALZ)*: se determinó la distancia entre la región de la grupa y el suelo. Para ello se utilizó una regla graduada de madera con tope horizontal.
- *Peso (P)*: se registró el peso individual, a través de una balanza mecánica fija ubicada a la salida del cepo.

2.5 Análisis estadístico

Descripción de los eventos pubertad y madurez sexual

Se evaluaron las medidas de resumen para la edad, peso, alzada y circunferencia escrotal a la pubertad y madurez sexual. Para estas variables se evaluó el efecto rodeo/año mediante análisis de varianza y comparación de medias de mínimos cuadros mediante la prueba de Tukey.

La evolución de las variables de crecimiento en el tiempo fue evaluada mediante inspección gráfica, con el objetivo de determinar la importancia del efecto rodeo/año, para ello se confeccionaron gráficos ajustando polinomios locales utilizando el método *loess* en la función *smooth* de la librería *ggplot2* en R.

Se agruparon los animales según la edad en meses de los animales evaluados, y se compararon la edad, peso, alzada y circunferencia escrotal entre animales maduros y no maduros entre los 13 y 22 meses de edad, para ello se ajustó un análisis de varianza para cada uno de los meses, considerando el efecto madurez, definida como maduro – no maduro, el efecto rodeo año y la interacción entre estos como efectos fijos y el error del individuo como efecto aleatorio. Las interacciones entre efectos fijos fueron descartadas en caso de no resultar significativas al test de razón de verosimilitudes. Los contrastes entre efectos fijos fueron evaluados utilizando el método de tukey. Con el mismo abordaje metodológico se evaluó el cambio en las variables evaluadas entre la pubertad y la madurez sexual. Estos análisis fueron efectuados utilizando la función *lm* y la función *Anova* de la librería *car* en el software R, las comparaciones de medias para los efectos fijos fue realizada utilizando la función *lsmeans* de la librería *emmeans*.

Por último, se evaluaron las correlaciones de Pearson entre la edades, pesos, alzada y circunferencia escrotal para cada una de las mediciones, en cada uno de los rodeos. Estas correlaciones fueron obtenidas utilizando la función *ggpairs* de la librería *GGally*.

2.6 Diseño de un esquema diagnóstico para la determinación de la madurez sexual a campo.

Para este análisis se trabajó con la totalidad de los animales descriptos anteriormente, pertenecientes a los tres establecimientos durante ambos periodos. Se evaluaron 271 toros entre los 11 y 18 meses de edad.

A intervalos de 30 días se midió P, CE y se evaluó la MI y NOR como indicadores de calidad seminal, obteniéndose un total de 990 observaciones. Los toros se clasificaron según su calidad seminal en maduros, aquellos animales que contaron en su eyaculado con un mínimo de 30 % de MI y 70 % NOR, mientras que los que no alcanzaron estos valores se consideraron no maduros. Los valores de CE y P se evaluaron como indicadores de madurez sexual mediante un análisis de curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) en las que se presenta la sensibilidad en función de los falsos positivos (complementario de la especificidad) para distintos puntos de corte (Cerdeira y Cifuentes, 2012). El mismo análisis se realizó con los datos de MI y NOR con el fin de determinar qué parámetro de calidad seminal es el más adecuado para clasificar a los animales en maduros y no maduros. Para ello se utilizó el paquete estadístico STATA 11 (StataCorp. 2009. Stata Statistical Software: Release 11. College Station, TX: StataCorp LP.)

RESULTADOS

3.1 Descripción de los eventos pubertad y madurez sexual

La edad, la CE, la alzada y el peso promedio al que fueron detectados los toros como púberes se resume en la tabla 2. Los datos se expresan discriminados según establecimiento y año de muestreo, ya que presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. En relación con la edad de arribo a la pubertad podemos observar que los animales muestreados en 2015 (LV2 y LE)

presentan en promedio una menor edad en comparación con los animales de LV1 ($P<0,05$). Por otra parte, los indicadores de crecimientos y desarrollo corporal (CE, ALZ y P) mostraron diferencias en los tres grupos.

Tabla 2. Edad, circunferencia escrotal (CE), peso (P) y alzada (ALZ) a la pubertad por establecimiento y año.

	EDAD (d)	CE (cm)	ALZ (cm)	P (kg)
LV1	463 $\pm$ 35,1 a	35,3 $\pm$ 1,9 a	115 $\pm$ 2,4 a	338 $\pm$ 32,7 a
LV2	377 $\pm$ 48,6 b	29,7 $\pm$ 2,8 b	108 $\pm$ 4,1 b	204 $\pm$ 39,9 b
LE	376 $\pm$ 41,9 b	31 $\pm$ 2,4 c	111 $\pm$ 4,1 c	250 $\pm$ 32,2 c

Nota: Datos expresados como media $\pm$ DS.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre establecimientos ($P<0,05$).

La edad, el peso, la alzada y la CE promedio a la que fueron detectados los toros como maduros se resume en la tabla 3. La edad promedio a la que fueron hallados como maduros no mostró diferencias significativas entre los grupos, encontrándose alrededor de los 16,5 meses de edad (508,55 $\pm$ 54,9 días). Sin embargo, tanto la CE como la ALZ de los animales muestreados en 2014 (LV1) mostraron diferencias significativas con respecto a los estudiados durante 2015 (LV2 y LE), siendo estos últimos quienes presentaron menor desarrollo. Por otro lado, el peso mostró diferencias significativas entre los tres grupos.

Tabla 3. Edad, circunferencia escrotal (CE), peso (P) y alzada (ALZ) a la madurez por establecimiento y año.

	EDAD (d)	CE (cm)	ALZ (cm)	P (kg)
LV1	510 $\pm$ 41,0 a	37 $\pm$ 2,3 a	118 $\pm$ 4,5 a	372 $\pm$ 36,3 a
LV2	508 $\pm$ 44,3 a	34,6 $\pm$ 2,2 b	114 $\pm$ 3,7 b	301 $\pm$ 36,2 b
LE	507 $\pm$ 71,6 a	34 $\pm$ 2,2 b	115 $\pm$ 4,0 b	339 $\pm$ 50,7 c

Nota: Datos expresados como media $\pm$ DS.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre establecimientos ($P<0,05$).

Al analizar los cambios ocurridos entre la pubertad y la madurez se observó un intervalo de tiempo similar entre LV2 y LE, siendo en promedio de $134 \pm 62,4$ días, mientras que para LV1 dicho periodo fue de $75 \pm 24,1$ días. Por su parte, el aumento de la CE y el peso durante los eventos pubertad y madurez mostraron un comportamiento similar, con diferencias significativas entre los grupos estudiados en el 2015, quienes presentaron un mayor crecimiento acorde con el mayor intervalo temporal, con respecto al grupo evaluado en 2014; en cambio, la alzada no mostró diferencias entre los tres grupos (Tabla 4).

Tabla 4. Diferencias en la edad, la circunferencia escrotal (CE), el peso (P) y la alzada (ALZ) entre el arribo a la pubertad y a la madurez por establecimiento y año.

	EDAD (d)	CE (cm)	ALZ (cm)	P (kg)
LV1	$75 \pm 24,1$ a	$2,0 \pm 1,2$ a	$3,8 \pm 4,5$ a	$55,8 \pm 3,6$ a
LV2	$138 \pm 52,2$ b	$4,8 \pm 2,4$ b	$6,3 \pm 3,7$ a	$98,8 \pm 30,1$ b
LE	$130 \pm 69,7$ b	$3,1 \pm 1,8$ b	$4,7 \pm 3,8$ a	$86,5 \pm 47,5$ b

Nota: Datos expresados como media $\pm$ DS.

Letras diferentes indican diferencias significativas entre establecimientos ($P < 0,05$).

Teniendo en cuenta los animales que durante el ensayo alcanzaron la madurez sexual, se evaluó el porcentaje de toros maduros entre los 13 y los 22 meses de edad, según el establecimiento, considerando sus características de crecimiento y desarrollo asociadas. En el grupo LV1 el 86 % de los animales evaluados logró un espermiograma compatible con la madurez sexual durante el ensayo (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de toros maduros entre los 13 y los 18 meses de edad y sus medias de circunferencia escrotal (CE), peso (P) y alzada (ALZ). Establecimiento La Victoria 2014.

LV1-MAD	13	14	15	16	17	18
% (N)	2 (1)	4 (2)	8 (4)	26 (13)	14 (7)	32 (16)
%acu (N acu)		6 (3)	14 (7)	40 (20)	54 (27)	86 (43)
CE (cm)	35,0	37,7 $\pm$ 3,1	36,5 $\pm$ 2,2	36,1 $\pm$ 1,7	36,2 $\pm$ 3,4	38,2 $\pm$ 1,8
P (kg)	292	382 $\pm$ 89,8	320 $\pm$ 12,0	360 $\pm$ 17,7	370 $\pm$ 17,0	397 $\pm$ 27,3
ALZ (cm)	115	112 $\pm$ 4,1	114 $\pm$ 3,2	115 $\pm$ 3,3	115 $\pm$ 4,4	115 $\pm$ 2,2

Nota: Datos expresados como media $\pm$ DS.

Para el grupo LV2 se registró un 78,2 % de animales maduros al finalizar el ensayo, alrededor de la mitad de los toros maduros alcanzaron dicho estatus entre los 14 y los 17 meses de edad (Tabla 6).

Tabla 6. Porcentaje de toros maduros entre los 14 y los 19 meses de edad y sus medias de circunferencia escrotal (CE), peso (P) y alzada (ALZ). Establecimiento La Victoria 2015.

LV2-MAD	14	15	16	17	18	19
% (N)	3,6 (2)	18,2 (10)	9,1 (5)	20 (11)	18,2 (10)	9,1 (5)
%acu (N acu)		21,8 (12)	30,9 (17)	50,9 (28)	69,1 (38)	78,2 (43)
CE (cm)	32,2 $\pm$ 3,1	33,9 $\pm$ 1,8	33,2 $\pm$ 2,4	34,9 $\pm$ 1,9	35,4 $\pm$ 2,0	35,7 $\pm$ 2,8
P (kg)	269 $\pm$ 68,6	278 $\pm$ 26,4	272 $\pm$ 16,2	312 $\pm$ 29,7	327 $\pm$ 28,3	308 $\pm$ 41,8
ALZ (cm)	111 $\pm$ 3,5	114 $\pm$ 3,9	112 $\pm$ 4,3	114 $\pm$ 3,3	116 $\pm$ 3,5	113 $\pm$ 1,2

Nota: Datos expresados como media $\pm$ DS.

Los animales de LE mostraron una mayor dispersión en el momento en el que alcanzaron la madurez sexual. Entre los 13 y los 22 meses se registraron animales con espermiograma maduro, logrando al final del ensayo un 72 % de toros con esta condición. Las edades en las que se presentaron mayor cantidad de animales maduros fueron entre los 16 y los 18 meses (Tabla 7).

Tabla 7. Porcentaje de toros maduros entre los 13 y los 22 meses de edad y sus medias de circunferencia escrotal (CE), peso (P) y alzada (ALZ). Establecimiento La Emma.

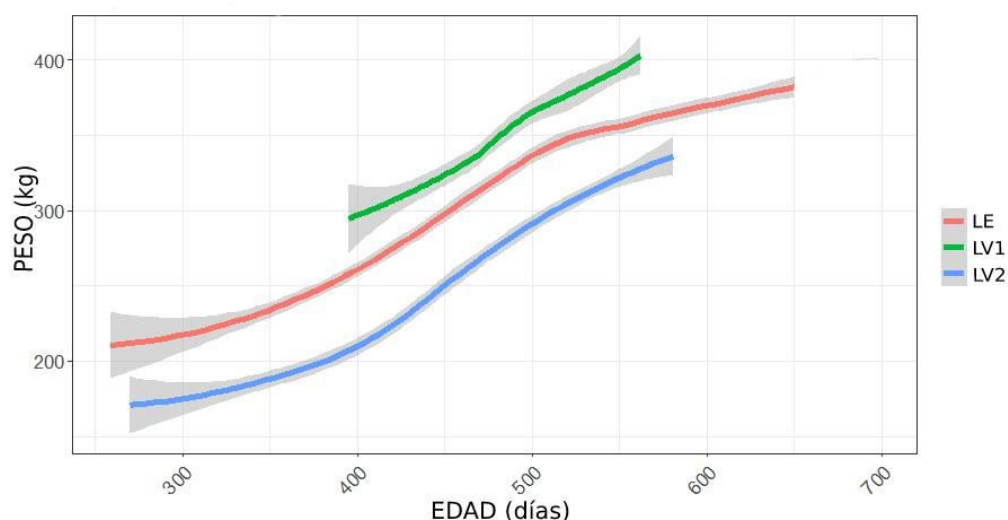
LE-MAD	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
% (N)	2 (2)	9 (9)	6 (6)	10 (10)	19 (19)	13 (13)	4 (4)	5 (5)	1 (1)	3 (3)
%acu (N acu)		11 (11)	17 (17)	27 (27)	46 (46)	59 (59)	63 (63)	68 (68)	69 (69)	72 (72)
CE (cm)	28,5 ± 1,4	34,4 ± 1,0	34,0 ± 2,1	34,8 ± 1,4	32,8 ± 1,2	32,2 ± 2,5	35,1 ± 3,9	33,3 ± 3,3	34,7	35,5 ± 1,8
P (kg)	255 ± 28,3	297 ± 22,7	309 ± 23,5	337 ± 21,9	335 ± 51,5	331 ± 35,7	391 ± 35,4	360 ± 54,3	370	394 ± 12,8
ALZ (cm)	113 ± 4,2	112 ± 4,1	114 ± 3,2	115 ± 3,3	115 ± 4,4	115 ± 2,2	118 ± 1,9	116 ± 3,6	119	119 ± 2,6

Nota: Datos expresados como media ± DS.

Tomando como momento de corte el inicio del servicio estacionado en la zona de los establecimientos en estudio, se dividió a los animales en un grupo precoz y otro tardío para la presentación de los eventos pubertad y madurez. Los animales considerados precoces fueron todos aquellos que presentaron el evento pubertad o madurez sexual antes del mes de noviembre, mientras que aquellos que lo hicieron posteriormente se los catalogó como tardíos. Considerando los tres grupos (LV1, LV2, LE), el 81 % de los animales fueron precoces para el evento pubertad, mientras que sólo un 5,8 % alcanzó la madurez sexual de manera temprana. Al comparar el grupo precoz con el grupo tardío para el evento pubertad en el mes de noviembre, teniendo en cuenta la edad, sus parámetros desarrollo testicular (CE), de crecimiento y desarrollo corporal (P, ALZ), no se han observado diferencias significativas entre ambos grupos, al comprar entre los rodeos (LV1, LV2 y LE) se mantiene las diferencias. Al evaluar la calidad seminal se observó un efecto del rodeo, siendo los animales de LV2 quienes mostraron una mayor MI, y solo en este grupo se vio diferencia significativa entre los precoces y los tardíos para dicho parámetro. En cuanto a la concentración, las diferencias encontradas fueron entre los precoces y los tardíos de los tres grupos. Finalmente, NOR no mostró diferencias entre precoces (38,3 %) y tardíos (45,3 %) ni tampoco entre rodeos. No se realizaron comparaciones entre precoces y tardíos para el evento madurez debido a la gran diferencia de individuos en estas categorías.

Al evaluar el crecimiento y desarrollo a lo largo del ensayo, se observa que LV1 presentó los animales con P más elevado, luego se ubicaron los de LE y por último encontramos a LV2 (Figura 2).

Figura 2. Evolución del peso en función de la edad por establecimiento y año. “La Victoria” año 2014 (LV1), “La Victoria” año 2015 (LV2) y “La Emma” año 2015 (LE).



Para determinar el aumento diario de peso (ADP) durante el muestreo, se consideraron los cambios ocurridos entre noviembre y marzo, teniendo en cuenta que durante estos meses los tres grupos fueron evaluados. Se registró para LV1 un ADP de $0,764 \pm 0,17$ kg/día, en LV2 $0,852 \pm 0,151$ kg/día y en LE $0,630 \pm 0,197$ kg/día.

En cuanto al crecimiento al pie de la madre, fue posible comparar el ADP de LV1 y LV2, ya que dicho establecimiento contaba con el registro del peso al nacer, peso al destete y fecha exacta del destete. Para LV1 el ADP predestete fue de $0,767 \pm 0,168$ kg/día y en LV2 $0,707 \pm 0,095$ kg/día, mostrando diferencias significativas entre ambos grupos.

En figura 3 se muestra la evolución de la CE a lo largo del ensayo, donde se puede observar que al igual que el P, el grupo LV1 muestra una mayor CE, luego le sigue LE y por último LV2, hasta alrededor de los 500 días, donde estos dos últimos invierten su posición.

Figura 3. Evolución de la circunferencia escrotal (CE) en función de la edad por establecimiento y año. “La Victoria” año 2014 (LV1), “La Victoria” año 2015 (LV2) y “La Emma” año 2015 (LE).

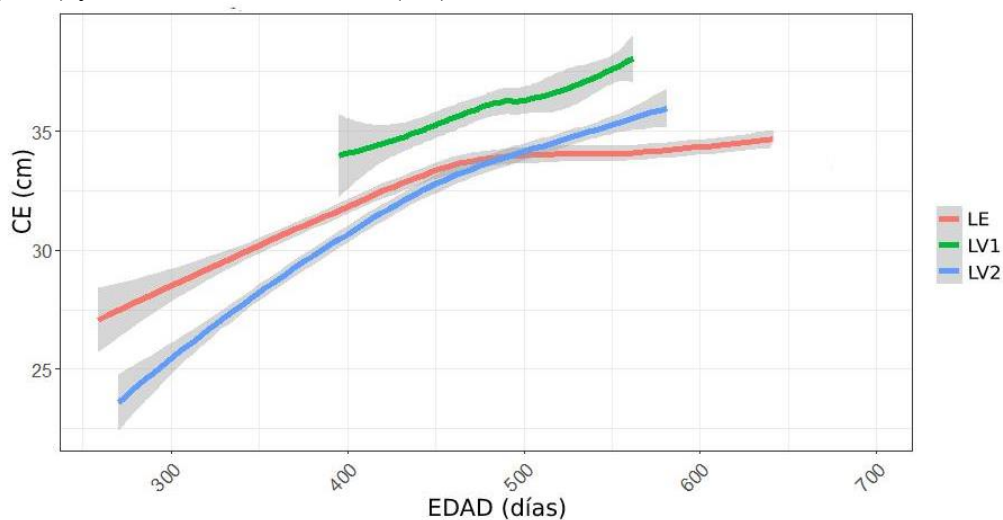
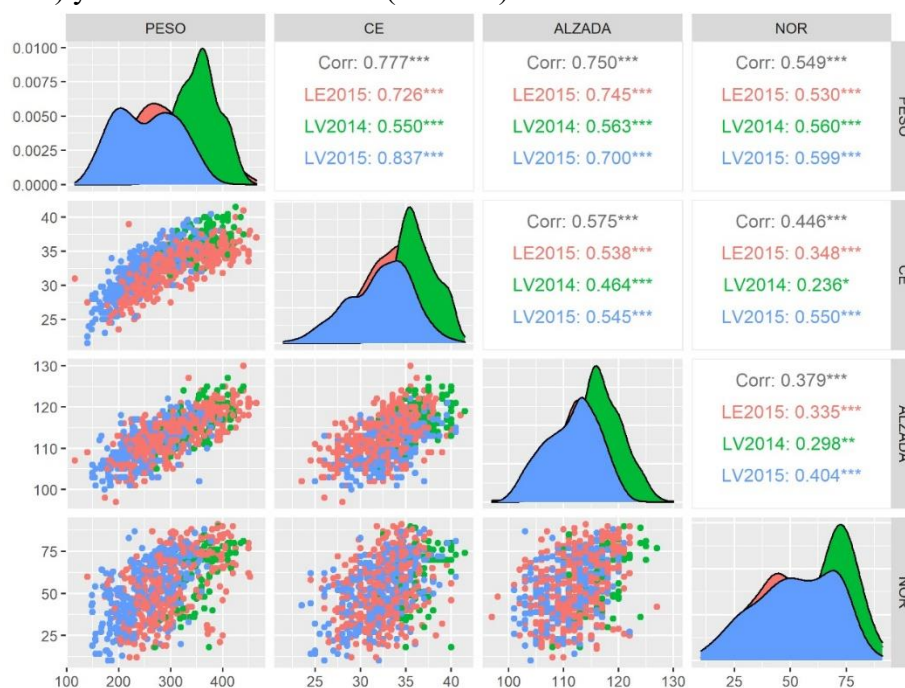


Figura 4. Correlaciones entre peso, circunferencia escrotal (CE), alzada y porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) por establecimiento y año. “La Victoria” año 2014 (LV2014), “La Victoria” año 2015 (LV2015) y “La Emma” año 2015 (LE2015).



Nota: *** Indica correlación estadística altamente significativa ($P < 0,001$)

** Indica correlación estadística muy significativa ($P < 0,01$).

* Indica correlación estadística significativa ($P < 0,05$).

Las correlaciones realizadas entre CE, ALZ, P y NOR para los tres grupos (LV1, LV2 y LE) han sido positivas y significativas estadísticamente, mostrando de manera esperable, que son variables asociadas (Figura 4).

3.2 Diseño de un esquema diagnóstico para la determinación de la madurez sexual a campo.

Como se observa en la tabla 8 los parámetros evaluados presentan áreas bajo la curva mayores a 0,75, mostrando que son buenos indicadores de madurez sexual. Los valores de corte establecidos para CE y P fueron escogidos por su elevada sensibilidad, aunque esto redunde en una baja especificidad; por lo que si seleccionamos animales con un peso ≥ 280 kg un 8,59 % de los toros serán clasificados como no maduros, habiendo logrado la madurez sexual. Mientras que, si lo hacemos por su CE con un valor de corte de 32 cm, esta probabilidad es de 4,8 %. Al ser valores de corte relativamente bajos, es de esperar que cerca del 50 % de animales sean considerados maduros, no habiendo alcanzado esta condición (falsos positivos).

Tabla 8. Valores de corte, clasificación correcta, área bajo la curva, sensibilidad y especificidad de peso (P), circunferencia escrotal (CE), porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) y motilidad espermática individual progresiva (MI).

	Valor de corte	Clasificación correcta (%)	Área bajo la curva	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)
P	280 kg	70,12	0,8523	91,41	61,05
CE	32 cm	58,83	0,8006	95,19	43,34
NOR	70 %	98,79	0,9910	99,62	98,49
MI	60 %	73,92	0,7725	33,33	88,61

Figura 5. Curva ROC para la variable circunferencia escrotal como predictor de la madurez sexual en toros.

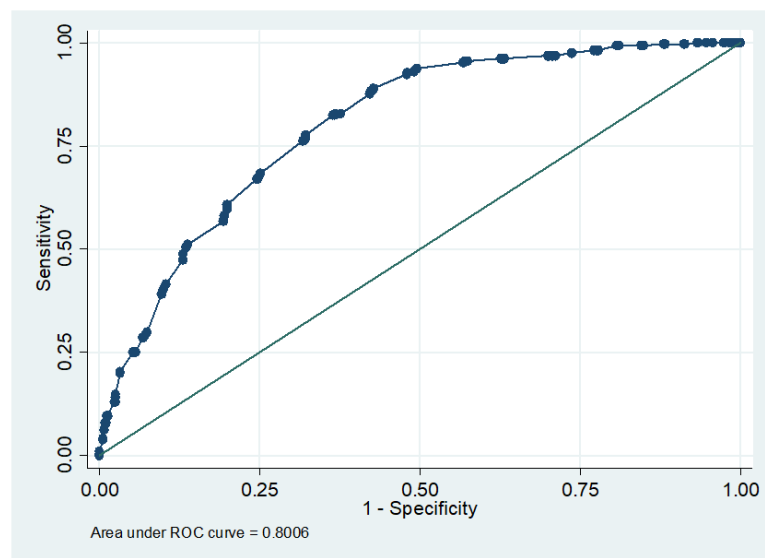
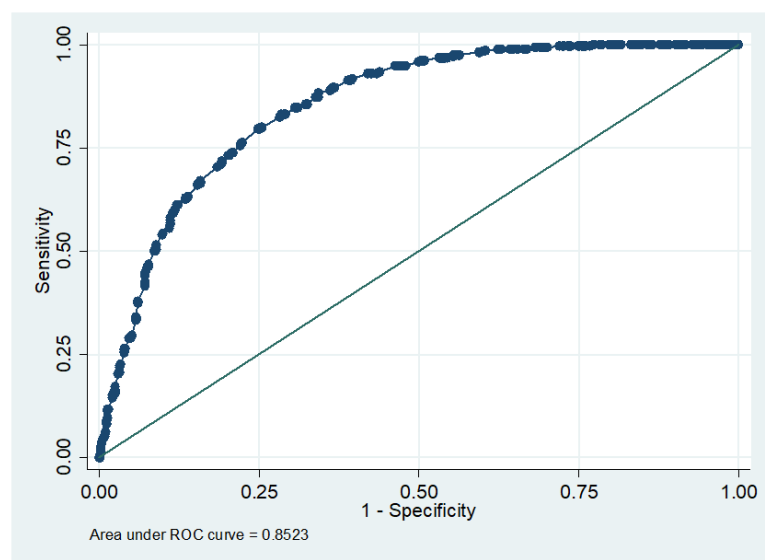


Figura 6. Curva ROC para la variable peso como predictor de la madurez sexual en toros.



La MI por sí sola no constituye un indicador sensible de la madurez sexual, NOR en cambio caracteriza a los animales de manera muy sensible y específica,

permitiendo definir la madurez solo por este parámetro, prescindiendo de la motilidad que es más lábil en condiciones de campo.

Figura 7. Curva ROC para la variable motilidad individual como predictor de la madurez sexual en toros.

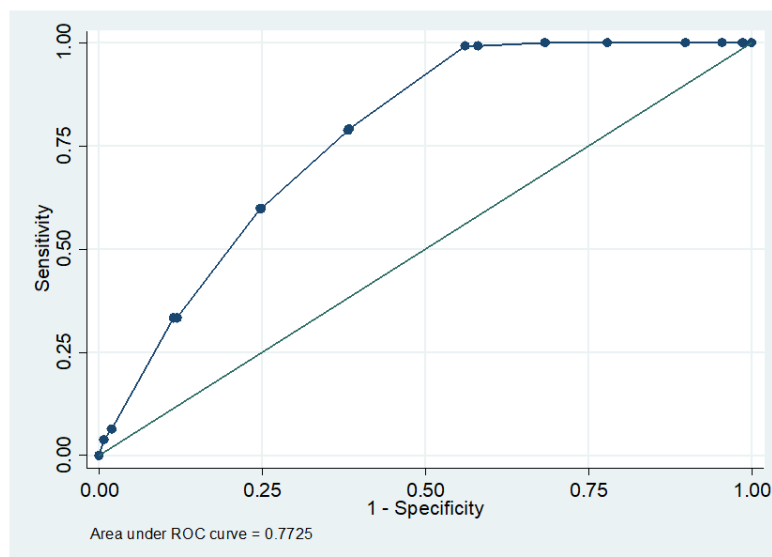
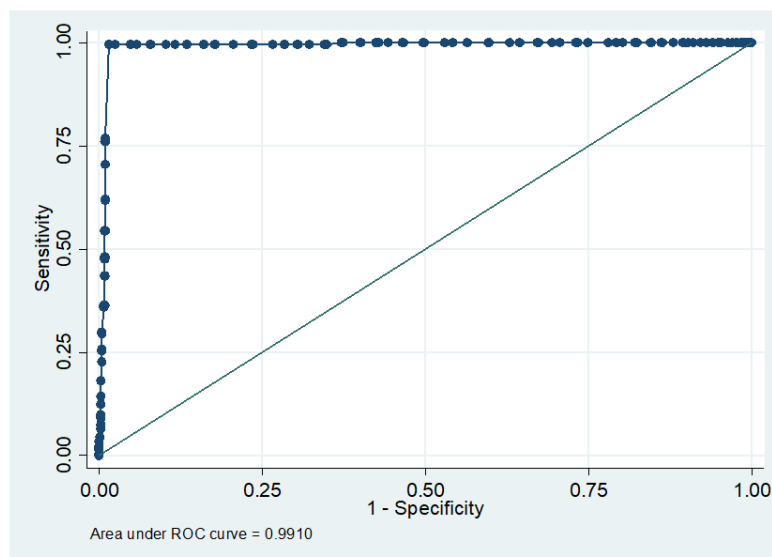


Figura 8. Curva ROC para la variable porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales como predictor de la madurez sexual en toros.



Con el fin de disminuir el error en la asignación de animales no maduros dentro del grupo maduros, se determinó la efectividad de la combinación de dos

pruebas en serie, donde se aplique primero la selección por P y CE y luego se realice la determinación de NOR. La sensibilidad de las mediciones en paralelo de CE y P fue de 99,6 %, mientras que su especificidad solo alcanzó el 26,5 %. Al evaluar el esquema completo, iniciando con las mediciones en paralelo de CE y P y una posterior selección por NOR a los individuos que pasaron dicha prueba, se obtiene una reducción de los falsos positivos, y por lo tanto un aumento de la especificidad (98,9 %), con una sensibilidad global del 99,2 %.

DISCUSIÓN

La edad de pubertad hallada en el presente estudio fue mayor con respecto a la encontrada por Prando (2015) en animales pertenecientes a establecimientos de la provincia de Buenos Aires, como así también a la informada por otros autores en diferentes razas británicas (Wolf y col., 1965; Lunstra y col., 1978; Barth y col., 2008; Brito y col., 2012). Particularmente teniendo en cuenta la coincidencia a nivel geográfico, como así también la raza y el sistema de producción en el que se encontraban los animales experimentales de la tesis de Prando (2015) y los del presente estudio, es posible atribuir la menor edad a la pubertad de aquellos animales, a que se encontraban bajo un objetivo de producción enfocado en la precocidad sexual con más de 10 años de selección por dicha característica, a su vez no es posible descartar factores nutricionales y otros de carácter ambiental que hayan ocasionado las diferencias mencionadas. Sin embargo, la CE al momento de la pubertad, con valores promedios de 29,7 y 31 cm en dos de los grupos evaluados, se asemeja a la reportada por otros autores (Wolf y col., 1965; Lunstra y col., 1978; Brito y col., 2012; Prando, 2015). La diferencia notable tanto en el P y la CE de los

animales de LV1 con respecto a los de LV2 y LE a la pubertad puede verse asociada a la mayor edad al momento de presentar dicho evento en este grupo de animales.

La edad de madurez en los animales de este trabajo se encuentra dentro del rango informado por otros autores para razas taurinas, siendo este entre los 13 y los 16 meses de edad (Freneau y col., 1991; Guimarães y col., 2011). La media de edad hallada en este caso se ubica cercana a los 16,5 meses de edad, resultando animales más tardíos en presentar el evento madurez en comparación con lo reportado por otros autores (Barth y col., 2008) quienes hallaron una edad de madurez entre los 12 y los 13 meses de edad en toros bajo diferentes planos nutricionales predestete y posdestete; por su parte Brito y col. (2012) reportaron una edad de madurez promedio cercana a los 12 meses, acompañada de ganancias diarias de peso entre 1 a 1,6 kg/día durante el posdestete, valores que duplican los encontrados en este ensayo.

Con relación a la CE a la madurez, los valores encontrados fueron coincidentes con los reportados para toros maduros a los 16 meses de edad (Barth, 1999). A su vez, en todos los casos, los valores de CE promedio para toros maduros desde los 15 hasta los 22 meses se encontraron por encima del valor mínimo requerido para ser clasificados como toros potencialmente satisfactorios en una evaluación reproductiva (Alexander, 2008).

El intervalo entre la pubertad y la madurez hallado en LE y LV2 ha sido similar al reportado por otros autores, alrededor de 134 días (Lunstra y Echternkamp, 1982; Brito y col., 2004), mientras que el menor tiempo transcurrido en LV1 es comparable al informado por Brito y col. en 2012. Una de las posibles

causas de la rápida transición entre ambos eventos en LV1, puede estar dada por la censura que se produce al comenzar el muestreo más tardíamente en comparación con los realizados en el 2015.

Analizando la dispersión de animales maduros según la edad, se observó una distribución que va de los 11 a los 22 meses. Tomando los 15 meses de edad, el porcentaje de toros clasificados como maduros en LV1 (14 %), LE (17 %) y LV2 (21,8 %), resultó en todos los casos un valor inferior al reportado por Arteaga y col. (2001) quien encontró un 20 % de maduros a los 11 meses de edad y un 61 % a los 15 meses; mientras que un estudio similar realizado en Suecia en las razas Charolais, Hereford y Simmental, encontró un 48 % de toros maduros entre los 11 y los 13 meses de edad, utilizando como criterio para su asignación al grupo maduros un espermiograma con <15 % anormalidades de cabeza y con <15 % de gota citoplasmática proximal (Persson y Söderquist, 2005). Años más tarde, Menon y col., (2011) informaron un 79 % de animales con espermiograma maduro entre los 11 y los 13 meses de edad y un 78,6 % entre los 13 y los 18 meses de edad, en toros de razas Angus, Simmental, Charolais, Limousin, Gelbvieh y Hereford, en Alberta, Canadá. Al analizar la totalidad de animales detectados como maduros en este trabajo, se observa un valor de 72 % acumulado a los 22 meses, mientras que Barth y Waldner (2002) reportaron un 62,7 % en animales entre los 12 y los 24 meses.

Para la elaboración del esquema diagnóstico de toros maduros se utilizaron los datos de las mediciones recabadas en INCH, donde no se contaba con la fecha exacta de nacimiento, esto permitió aumentar el número de mediciones utilizadas y de esta manera darle mayor potencia al análisis. Si bien en otros trabajos se ha

utilizado la edad como predictor (Brito y col., 2012), considerando que es un dato que usualmente no está disponible en los establecimientos ganaderos de rodeo general, el esquema propuesto puede ser aplicable sin necesidad de contar con dicha información obteniendo buenos resultados en cuanto a su sensibilidad y especificidad.

En referencia a los valores de corte postulados para la CE como predictor de madurez sexual, Brito y col. (2012) proponen, al igual que en el presente trabajo un valor de 32 cm, obteniendo una sensibilidad de 84,3 % y una especificidad de 78,7 %, los cuales difieren notablemente a los encontrados en este ensayo, sobre todo en cuanto a la especificidad, que resultó del 43,3 %, razón por la cual fue necesario combinar esta medición con otra determinación que logre una mayor precisión al momento de categorizar los individuos como maduros y no maduros. En relación con el valor de corte propuesto para el P ha sido notablemente superior (550 kg) al seleccionado en este estudio, esto puede estar dado por la utilización de animales Angus y cruza Angus x Charolais, con un *frame score* mayor a los toros Angus evaluados en este trabajo. Un trabajo australiano, realizado en toros Holstein y Jersey entre los 6 y 18 meses de edad, señala que utilizando un valor de CE ≥ 27 cm y un P ≥ 349 kg, el 98 % de los toros Holstein presentaban un 70 % de NOR; mientras que en el caso de los toros Jersey los valores de corte utilizados fueron para la CE ≥ 29 cm y un P de 259 kg, obteniendo así un 88 % de animales con 70 % NOR (Waite y col., 2019). Los valores de CE utilizados en este esquema diagnóstico son inferiores a los propuestos para toros Angus, lo que es esperable teniendo en cuenta que los toros Holstein poseen una CE inferior a los Angus hasta los 3 años de edad (Coulter y col., 1975)

Como punto importante para tener en cuenta al analizar el esquema de diagnóstico propuesto, es que la implementación de la prueba tamiz, con una selección inicial por CE y P permite disminuir los costos y así masificar la evaluación de aptitud reproductiva para toros jóvenes antes de ser enviados a servicio natural. De esta manera, el estudio de la calidad seminal se reduce al grupo de animales que han pasado esta primera prueba. Otra ventaja del esquema planteado es que la evaluación de la calidad seminal puede limitarse a la determinación de la morfología espermática que, aunque no logre una valoración completa del semen, ha sido comprobado que la determinación del 70 % de NOR se encuentra directamente relacionada con el número de terneros logrados en el servicio (Holroyd y col., 2002). A su vez, la evaluación de la morfología espermática a partir de frotis previamente fijados y coloreados puede realizarse en condiciones de campo sin sufrir alteraciones, mientras que la determinación de la MI suele verse afectada con mayor facilidad cuando se realiza en condiciones subóptimas (Barth y Waldner, 2002). Adicionalmente, estudios previos han demostrado que la presencia de toros con 70 % de NOR en su eyaculado rara vez presentan una MI inferior al 60 %, cuando se guardan las condiciones de laboratorio para la toma de la muestra (Wiltbank, 1982; Chenoweth y col., 1993).

CONCLUSIONES

A partir de este trabajo se evidencia que poco se ha estudiado hasta el momento acerca del evento madurez sexual en toros de raza Angus y que son escasas las investigaciones que brindan información acerca de la edad de presentación y de los parámetros morfométricos que caracterizan dicho evento. En

particular, este trabajo resulta una contribución al conocimiento en esta área, puntualmente para el evento madurez sexual y el proceso de transición entre pubertad y madurez en toros recriados bajo condiciones pastoriles en establecimientos de la provincia de Buenos Aires, sobre quienes no se contaba información al respecto.

Los toros del presente trabajo han mostrado una edad a la madurez constante, con un promedio de $508,55 \pm 54,9$ días, independientemente del momento en el cual arribaron a la pubertad, de esta manera los intervalos entre pubertad y madurez observados fueron variables.

Entre el 72 % y el 86 % de los toros de 11 a 22 meses de edad fueron clasificados como maduros.

Finalmente, es posible decir que el peso y la circunferencia escrotal son predictores muy sensibles que pueden ser utilizados de forma combinada para diagnosticar animales maduros, con un aumento en la especificidad de la prueba al realizar una evaluación de la calidad seminal limitada a la determinación de porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales con un valor de corte del 70 %. Logrando de esta forma, diagnosticar animales maduros con una especificidad del 98,9 % y una sensibilidad del 99,2 %.

CAPÍTULO II

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS EN GENES CANDIDATOS CON CARACTERES FENOTÍPICOS RELACIONADOS CON LA MADUREZ SEXUAL EN TOROS ANGUS.

INTRODUCCIÓN

1.1 Búsqueda y selección de genes candidatos

Los caracteres de interés reproductivo, tales como la fertilidad y la precocidad sexual, tienen una herencia cuantitativa, por lo que están determinados por un gran número de genes, cada uno de los cuales aporta en diferente magnitud a la varianza total. Como se explicó en el Capítulo I, la madurez sexual es un proceso que involucra múltiples cambios a nivel endocrino, físico, comportamental y reproductivo. A pesar de la importancia que presentan los caracteres reproductivos en los sistemas de producción bovina, y particularmente el momento en el que los machos alcanzan su madurez sexual y las características morfométricas que acompañan a dicho evento, son escasas las investigaciones que han reportado asociaciones genéticas con estas variables.

Con el fin de identificar polimorfismos que validen la relación biológica de ciertos genes con caracteres relacionados a la madurez sexual se realizó una búsqueda bibliográfica de genes candidatos que estuvieran involucrados en las rutas metabólicas relevantes en el proceso de maduración sexual, como así también en los caracteres que definen a la madurez en los machos bovinos.

En el proceso de búsqueda de genes con posible influencia en la madurez sexual de los toros, surge inmediatamente la necesidad de ahondar en el estudio de aquellos que se encuentran biológicamente relacionados a este evento, como aquellos que codifican hormonas reproductivas y los involucrados en el desarrollo testicular, la espermatogénesis y la calidad seminal. A su vez, existen procesos que afectan en mayor o menor medida a los eventos reproductivos, tales como el crecimiento y desarrollo, que también son regulados por múltiples genes. Por este motivo, la regulación génica de la madurez sexual está gobernada por decenas a cientos de genes que ejercen su efecto tanto de forma directa en el desarrollo sexual como indirecto, participando en la expresión otros caracteres relacionados.

Si bien los genes que se encuentran directamente involucrados sobre los mecanismos fisiológicos de la reproducción son en un principio el foco del estudio, puede haber modificaciones en genes que no estén directamente relacionados, pero que ya sea por la cualidad poligénica de dichos caracteres o a la localización de los polimorfismos dentro del cromosoma, terminen afectando a la expresión y por consiguiente produzcan un efecto sobre el fenotipo. Esto hace que la asociación de escasos polimorfismos de nucleótidos simple (SNPs) en genes candidatos (o cercanos a ellos) con caracteres de interés productivo, se vuelva en ocasiones una tarea difícil.

Basado en los hallazgos bibliográficos y en la experiencia del grupo de trabajo que acompañó el desarrollo de esta tesis, se hizo foco en el gen del factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (Lirón y col., 2012; Rogberg Muñoz y col., 2013; Prando, 2015; Bonamy, 2018). La familia de los factores de crecimiento similar a insulina está formada por pequeños polipéptidos de cadena simple que

proveen señales esenciales para el control del crecimiento, el metabolismo y las funciones reproductivas e incluye al factor de crecimiento similar a insulina tipo 1 (IGF1) y tipo 2 (IGF2), sus receptores y proteínas ligadoras (Kanzaki y Pessin, 2001; Boura-Halfon y Zick, 2009). Aunque la capacidad reproductiva es regulada por el eje Hipotálamo-Hipófisis-Gónada (Roth y Amory, 2011), la actividad de los factores gonadales a nivel local, tales como la insulina y los factores semejantes a insulina, modulan el desempeño reproductivo. Por ejemplo, se ha visto que ratones que carecen de IGF1 son enanos e infértiles y presentan una reducción mayor al 80 % tanto en la espermatogénesis como en los niveles séricos de testosterona (Baker y col., 1996). La producción local de IGFs parece ser la mayor señal intratesticular que controla el número de células de Sertoli, el tamaño testicular y la producción espermática en mamíferos (Griffeth y col., 2014). Así mismo, IGF1 ha sido identificado como una señal que regula la función reproductiva, con una posible relación con el crecimiento corporal, particularmente durante la pubertad (Daftary y Gore, 2005). Este factor tiene acción directa sobre las neuronas GNRH, e influye en el crecimiento testicular, determinando el desarrollo de los túbulos seminíferos y las células de Leydig. Además, se encontró una correlación positiva entre la concentración sérica de IGF1, los niveles séricos de LH y la concentración testicular de receptores de LH en terneros (Bagu y col., 2010). En consecuencia, IGF1 puede ser considerado un gen candidato para la regulación del crecimiento testicular en terneros durante el período prepuberal. En este sentido, varios trabajos han reportado la asociación de este gen con diversos parámetros indicadores del desarrollo sexual. Por ejemplo, la concentración sérica de IGF1 ha sido correlacionada genéticamente con la circunferencia escrotal y con la motilidad

espermática en toros adultos, así como con la edad al primer parto y la tasa de partos en hembras (Yilmaz y col., 2004). Años más tarde, Lirón y col., (2012) reportaron la primera evidencia de marcadores asociados con la edad a la pubertad en machos bovinos tomando como población de referencia bovinos Angus de establecimientos ganaderos de Argentina. Puntualmente, hallaron una asociación significativa entre el SNP IGF1-SnaBI y la edad a los 28 cm de circunferencia escrotal (CE) ($P < 0,05$), tomada como indicador de edad de inicio de la pubertad en dicha raza. El genotipo CC mostró un promedio de edad a los 28 cm de CE de 7 y 11 días mayor que los genotipos CT ($P=0,037$) y TT ($P=0,012$), respectivamente. Cabe destacar que un estudio previo realizado con el mismo SNP demostró la influencia de IGF1-SnaBI en la expresión génica de IGF1 y los niveles sanguíneos de IGF1 en el ganado bovino, comprobándose de esta manera su función (Maj y col., 2008).

Por otro lado, se realizó una búsqueda bibliográfica sobre los genes candidatos relacionados a características seminales, particularmente sobre aquellos con influencia en la morfología de la cabeza espermática. Sobre la base de esta información, se seleccionó para el presente trabajo de tesis al gen de protamina 1 (PRM1). Los espermatozoides de mamíferos poseen cantidades diminutas de citoplasma que alberga un núcleo con cromatina hipercondensada, que contiene arginina y proteínas de unión al ADN específicas de la línea germinal masculina denominadas protaminas (PRMs; Ward, 2010). Durante la remodelación de la cromatina espermática en el testículo, las histonas del núcleo se reemplazan primero por sus variantes específicas del testículo, que son suplantadas transitoriamente por las proteínas de transición 1 y 2, las cuales finalmente son reemplazadas por las PRMs (Gill-Sharma y col., 2011). Las PRMs juegan un rol fundamental en la

condensación de la cromatina espermática, habiéndose identificado dos tipos: protamina 1 (PRM1) y protamina 2 (PRM2). La PRM1 está presente en todos los vertebrados, mientras que la PRM2 sólo se encuentra en algunas especies de mamíferos, incluidos los humanos, los ratones (Oliva y Dixon, 1991; Yoshii y col., 2005; Balhorn, 2007) y recientemente identificada en bovinos (Hamilton y col., 2019).

Tanto el estrés oxidativo como los defectos en el empaquetamiento de la cromatina son factores causantes de daño del ADN espermático, contribuyendo a la infertilidad en machos (Sakkas y col., 2002). Además del daño del ADN, se han reportado niveles reducidos de transcritos de PRM1 en espermatozoides en toros con baja fertilidad (Feugang y col., 2010). Varios estudios en ratones (Evenson y Jost, 1993; Kishikawa y col., 1999) y en toros (Ballachey y col., 1986; Karabinus y col., 1997; Ostermeir y col., 2001) han demostrado la relación entre la estructura de la cromatina, el daño del ADN y las anomalías en la morfología espermática. Dogan y col. (2015) concluyeron, a partir de su trabajo realizado sobre muestras de semen bovino criopreservadas, que la cantidad y localización de PRM1 estaban asociadas con defectos en la estructura de la cromatina espermática, coincidiendo con una fertilidad reducida. Estos hallazgos son altamente significativos ya que muestran fenotipos moleculares y morfológicos de espermatozoides de mamíferos que influyen en la fertilidad. Por su parte, Kipper y col. (2017) demostraron una clara relación entre la compactación de la cromatina y la morfología de la cabeza espermática. En su trabajo, los toros jóvenes presentaron mayor área en las cabezas de sus espermatozoides comparado con aquellos provenientes de adultos y toros

seniles, atribuyendo esto a una posible deficiencia en los índices de protaminación, lo que causaría una disminución en la compactación de la cromatina.

En un estudio realizado por Gázquez y col. (2008) se examinaron las mutaciones de PRM1 en una cohorte de hombres que presentaban teratozoospermia y encontraron que el marcador rs2301365 (c._190C> A) se asoció con una morfología alterada de la cabeza espermática y una relación PRM1/PRM2 anormal. En concordancia, Tüttelmann y col. (2010) demostraron que cinco SNPs (rs35262993, rs35576928, rs737008, rs1646022 y rs2070923) ubicados en los genes PRM1 y PRM2 estaban asociados con teratozoospermia o una leve oligozoospermia en una población caucásica. Un estudio realizado sobre toros de la raza Frieswal (Holstein x Sahiwal) mostró una mayor expresión de ARNm de PRM1 en el grupo de toros con buena calidad seminal, indicando así el papel putativo del gen (Ganguly y col., 2013). Esto indica que, así como la PRM1 tiene sus efectos en la calidad del semen, las variantes de este gen podrían estar relacionadas con los parámetros indicadores de la madurez sexual, particularmente con el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales.

Finalmente, se seleccionó el gen candidato SERPINA7 (*Serpin Family A Member 7*), que codifica para una globulina transportadora de tiroxina (TBG) y está localizado en la posición 53 MB del cromosoma X. TBG es una glicoproteína hepática de 54 kDa, siendo la principal proteína transportadora de hormonas tiroideas en el suero. Además de transportar triyodotironina (T3) y tetrayodotironina (T4), existe la posibilidad de regular la disponibilidad de hormonas tiroideas en los tejidos a través de la escisión proteolítica de TBG (Schussler, 2000). Las hormonas tiroideas desempeñan un papel fundamental en la

regulación del crecimiento, desarrollo, diferenciación y metabolismo de prácticamente todos los tejidos (Silva, 1995). A su vez influyen en la esteroidogénesis y la espermatogénesis, y existen pruebas que relacionan la variación del gen de la TBG con el desarrollo testicular en verracos (Nonneman y col., 2005; Wagner y col., 2008, 2009). Asimismo, se han reportado QTLs que contienen al gen TBG y que se encuentran asociados al tamaño testicular y al nivel plasmático de FSH en porcinos (Cepica y col., 2001; McCoard y col., 2002). Otro estudio realizado en esta especie reveló que el polimorfismo C678A (His226Asn) del gen SERPINA7 se asociaba significativamente con el número total de espermatozoides por eyaculado y el volumen de semen de 110 verracos maduros (Dongren y col., 2006).

Por otro lado, en un estudio de asociación con caracteres indicadores de fertilidad en toros jóvenes de la raza Brahman, se encontró que los SNPs más significativos para el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) estaban localizados en el cromosoma X, ubicados en diferentes regiones: a 4 Mb, entre 40 y 55 Mb o a 97 Mb. Notablemente, dos posibles genes candidatos en esta región con función ligada al sistema endocrino son el inhibidor de la peptidasa de serpina, clado A (alfa-1 antiproteinasa antitripsina), miembro 7 (SERPINA7) y el receptor de andrógenos. El gen de SERPINA7 se encuentra dentro de la región genómica asociada con NOR, parámetro por excelencia para determinar el momento en el que un toro alcanza su madurez sexual (Fortes y col., 2012)

1.2 Objetivo

Estudiar la asociación entre marcadores genéticos en genes candidatos y caracteres fenotípicos relacionados con la madurez en toros Angus, criados bajo condiciones pastoriles en la provincia de Buenos Aires, Argentina.

1.3 Hipótesis

a) Una parte de la variabilidad fenotípica de la madurez sexual es explicada por diferencias genéticas entre los individuos.

b) Los polimorfismos de nucleótido simple en los genes candidatos estudiados están asociados al momento de arribo a la madurez sexual, medido a través de las variables morfométricas que la definen, en toros de la raza Angus de Argentina.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material animal y datos fenotípicos

Para el desarrollo de esta etapa del trabajo se utilizaron datos fenotípicos y muestras bovinas correspondientes a los establecimientos LV1 (n=50), LV2 (n=55) y LE (n=100) descriptos en el Capítulo 1. De estos animales se seleccionaron aquellos que contaban con la información fenotípica completa. Por lo tanto, para este estudio se trabajó con la información proveniente de 165 animales. Los datos fenotípicos utilizados fueron los obtenidos a partir de las mediciones de peso, alzada, circunferencia escrotal y edad a la madurez sexual, definidas en el Capítulo 1.

2.2 Extracción de sangre, pelo y ADN

Las muestras de sangre periférica se obtuvieron por punción de los vasos coccígeos, y se colectaron en tubos de 5 ml con anticoagulante EDTA (0,5 %). Posteriormente se transportaron refrigeradas hasta el laboratorio y se conservaron a -80°C. El ADN genómico se extrajo a partir de muestras de sangre utilizando el kit Wizard Genomic (Promega, Madison, WI, USA) según las instrucciones del proveedor. A modo de respaldo, se tomó de cada animal una muestra de pelo proveniente de la cola, de al menos 20 pelos con bulbo piloso. En los casos en los cuales la muestra de sangre no pudo ser procesada (n=17), se utilizó el pelo como fuente de material genético. La extracción de ADN a partir del bulbo pilosos se realizó utilizando la técnica de hidróxido de Sodio. Se cortaron y colocaron seis bulbos pilosos en un tubo de 200 µl, luego se agregó 50 µl de NaOH 0,2 M y se calentó a 95 °C durante 10 minutos en termociclador. Inmediatamente después, la solución sobrenadante se trasvasó a un nuevo tubo y se neutralizó con 50 µl de una solución HCl 0,2 M - TRIS 0,1 M. Luego se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm y finalmente se trasvasó el sobrenadante a un tubo limpio. Las muestras de ADN obtenidas se guardaron en freezer a -20°C para su posterior genotipificación.

La cuantificación del ADN obtenido se llevó a cabo mediante espectrofotometría ultravioleta con un espectrofotómetro NanoVue® Plus (GE Healthcare, USA), a una longitud de onda de 260 nm. La pureza de la muestra se midió a través de la relación de la absorbancia a 260 nm y 280 nm. El valor considerado óptimo para esta relación fue entre 1,8 y 2. Además, la integridad del ADN se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa 1 % 0,5 TBE.

2.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y genotipificación.

En función de la información recabada durante la búsqueda bibliográfica se seleccionaron tres SNPs, pertenecientes a tres genes candidatos. En la tabla 2.1 se listan los SNPs seleccionados y sus características. Para genotipar estos polimorfismos se utilizaron dos métodos de genotipificación: pirosecuenciación y PCR alelo-específica. En todos los casos, se utilizó en primer lugar la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Mullis y Faloona, 1987) para amplificar secuencias específicas de los genes seleccionados. El tamaño del fragmento amplificado estuvo determinado por la ubicación de los cebadores, los cuales fueron diseñados a partir de las secuencias reportadas en Genbank (National Institute of Health, USA; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) por medio del programa DNAMAN v. 4.15 (LynnonBiosof© 1994-1999, Quebec, Canadá).

Tabla 2.1. Polimorfismos evaluados, su ubicación en el genoma bovino y sus variantes alélicas.

Gen	SNP	Cromosoma	Posición *	Alelos
IGF1	rs109763947	BTA 5	66605011	T/C
Sperm Protamine P1 (PRM1)	rs38375765	BTA 25	9970598	G/A
SERPINA 7	rs381660502	BTX	53599793	C/G

Nota: (*) Las posiciones se corresponden con la versión del genoma bovino UMD 3.1

2.3.1 Genotipificación del polimorfismo IGF1-SnaBI

Para la amplificación de la región promotora del gen IGF1 se utilizaron los cebadores reportados por Lirón y col. (2012) y que se muestran en la tabla 2.2. La

reacción de PCR se realizó en un volumen total de 30 µl conteniendo 20 mM de Tris-HCl (pH 8,4), 50 mM de KCl, 2,5 mM de MgCl₂, 100 mM de cada dNTP, 0,5 U de polimerasa Taq (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,4 mM de cada cebador y 25-50 ng de ADN. El programa de amplificación consistió en 45 ciclos de 45 segundos de desnaturalización inicial a 94°C, 45 ciclos de 45 segundos de hibridación a 60°C y 45 segundos de polimerización a 72°C, seguido por 7 minutos de extensión final a 72°C.

Tabla 2.2. Secuencias de los cebadores y temperaturas de hibridación utilizados para la genotipificación del SNP de IGF1-SnaBI mediante la técnica de pirosecuenciación.

SNP	Cebador	Secuencia del cebador	T° hibridación
IGF1-SnaBI	IGF1-prom-F	5'-CCAGCGCTGTCTTCCATTCTA-3'	60 °C
	IGF1-prom-R (Biotinilado)	5'-TGATTAACCTTCTACCGGGCG-3'	
	IGF1-prom-seq	5'-ATTGCTCGCCCATCCTC-3'	

Los productos amplificados por PCR fueron evaluados en geles de poliacrilamida al 6 % en solución buffer TBE 1X (0,089 M Tris; 0,089 M Ácido Bórico; 0,002 M EDTA). Las corridas electroforéticas se llevaron a cabo con 2 µl de amplificado y 1 µl de colorante (0,25 % de Azul de Bromofenol, 0,25 % Xilenocianol FF, 30 % glicerol en agua). Las muestras se corrieron a 170 voltios durante 30 minutos. El ADN se tiñó con bromuro de etidio 1 µg/ml durante 10-15 minutos y luego se visualizaron las bandas en transiluminador con luz UV a 310 nm para corroborar la presencia de los fragmentos amplificados.

Una vez obtenido el producto de amplificación se determinó el genotipo de los individuos mediante pirosecuenciación (Ronaghi, 2001). Esta técnica se basa en la detección de la formación de pirofosfato inorgánico (PPi) como resultado de la incorporación de los dNTPs durante la polimerización del ADN. El PPi forma parte

de una cascada de reacciones que comienza con la incorporación de un dNTP por la polimerasa (fragmento de Klenow de la Polimerasa I de *E. coli*), durante la cual se libera como producto. Luego de la incorporación de un dNTP, la enzima ATP sulfurilasa (proveniente de *Saccharomyces cerevisiae*) genera adenosinatrifosfato (ATP) a partir de adenosina-5'-fosfosulfato (APS) y del PPi liberado. El ATP formado provee la energía necesaria para la oxidación de luciferina a oxiluciferina por acción de la enzima luciferasa (de *Photinus pyralis*), con la consecuente generación de luz. Por cada adición de un dNTP en el proceso de la polimerización del ADN, se produce una molécula de PPi y consecuentemente la emisión de luz en forma proporcional. La intensidad de la luz emitida es detectada por el equipo y presentada en forma de picos en un pirograma. Como la identidad de cada dNTP incorporado se conoce por respetar un orden de inyección, la secuencia molde puede ser determinada fácilmente registrando los picos de luz durante la reacción. Los dNTPs no incorporados y el exceso de ATP son degradados por la enzima apirasa, y de esta manera el equipo queda preparado para el próximo paso. Para llevar a cabo la pirosecuenciación se utiliza un cebador interno diseñado especialmente de forma tal que su extremo 3' hibride una a tres bases antes de la posición polimórfica a analizar, y cada combinación alélica (homocigota o heterocigota) generará un patrón de picos específico comparado con las otras dos variantes, lo que permite distinguir claramente los distintos genotipos en el pirograma obtenido. La pirosecuenciación requiere una única hebra de ADN en el tubo de reacción, que será la cadena secuenciada. Esto requiere una etapa de purificación previa del producto amplificado de doble cadena, que se logra biotinilando uno de los cebadores utilizados durante la amplificación por PCR. La

cadena de ADN que resulta biotinilada puede ser luego separada de su complementaria no biotinilada mediante el uso de perlas de sefarosa unidas a estreptavidina. La estreptavidina es una proteína de unión a biotina, por lo que, durante el proceso de purificación donde las perlas magnéticas se sedimentan, el ADN doble cadena biotinilado permanece unido a las perlas, mientras los componentes restantes de la reacción de PCR son removidos mediante un lavado. Posteriormente, se desnaturaliza el ADN utilizando un álcali. De esta manera, la cadena simple no biotinilada es eliminada mediante un lavado posterior, obteniéndose solo la cadena biotinilada unida a las perlas. Esta forma de purificar el molde provee información de alta calidad y bajas señales de fondo.

2.3.2 Genotipificación del polimorfismo en PRM1 y SERPINA7

Para la genotipificación de los SNPs de los genes PRM1 y SERPINA7 (SERP) se utilizó la técnica de PCR alelo-específica, basada en la utilización de cebadores alelo-específicos diseñados con un cambio de una base en el sitio correspondiente según la variante alélica del SNP en estudio. Esto permite que únicamente se unan, y consecuentemente sean amplificados, aquellas secuencias complementarias. De esta manera, en la propia reacción de PCR, se amplifican solo los fragmentos que presentan complementariedad con el cebador forward utilizado, es decir que por cada muestra problema a genotipificar se deben realizar dos PCR, utilizando en cada oportunidad el cebador correspondiente (Gaudet y col., 2009).

Para estos polimorfismos se diseñaron los cebadores utilizando el programa Primer 3 (Untergasser y col., 2012). La reacción de PCR se realizó siguiendo las indicaciones descriptas anteriormente y el programa de amplificación utilizado en

ambos casos consistió en 1 ciclo de 5 minutos a 94°C, 30 ciclos de 30 segundos de a 94°C, 30 ciclos de 45 segundos de hibridación a 60,5°C (PRM1) y a 61,5°C (SERP) y 30 segundos de polimerización a 72°C, seguido por 10 minutos de extensión final a 72°C (Tabla 2.3).

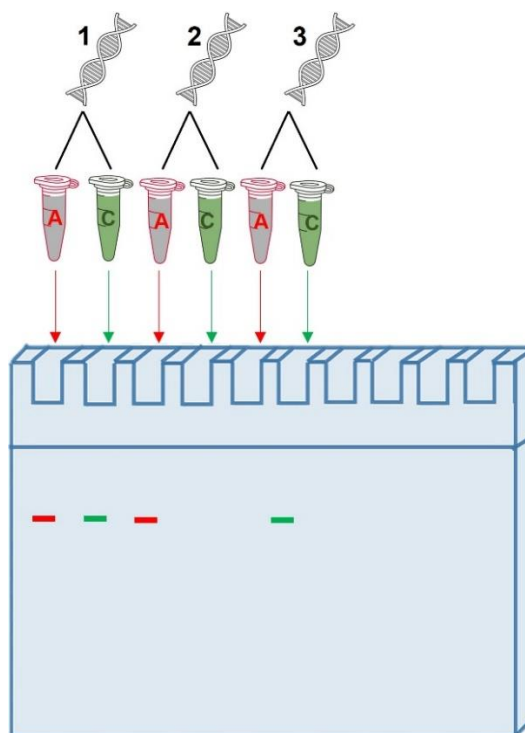
Tabla 2.3. Secuencias de los cebadores y temperaturas de hibridación utilizados para la genotipificación de los SNPs de PRM1 y SERPINA7 (SERP) mediante la técnica de PCR-Alelo específica.

SNP	Cebador	Secuencia del cebador	T° hibridación
PRM1	Alelo G-F	5'- GAGGCGACG GCACTCGTAAG-3'	60,5 °C
	Alelo A-F	5'- GAGGCGACG GCACTCGTAAA-3'	
	Reverse	5'- CTCAGGAGAAGGCCAGTTG -3'	
SERP	Alelo C-F	5'- GTCCACCCCTCTCTGTGGCC -3'	61,5 °C
	Alelo G-F	5'- GTCCACCCCTCTCTGTGGCG -3'	
	Reverse	5'- ACACATTGTTAATCAGTGGTACTCCAA- 3'	

Los fragmentos amplificados fueron evaluados en geles de poliacrilamida.

Para la interpretación de las corridas electroforéticas se utilizó el esquema descrito en la figura 2.1.

Figura 2.1. Amplificación alelo-específica. Se muestra la corrida electroforética de tres muestras de ADN (1,2,3), amplificadas con cebadores alelo específicos (A y C). Se observa que la muestra 1 amplificó con ambos cebadores (heterocigota A/C), la muestra 2 solo amplificó con el cebador A (homocigota A/A) y la muestra 3 solo amplificó con el cebador C (homocigota C/C).



2.4 Análisis estadísticos

2.4.1 Medidas de variabilidad genética

Para el análisis de la variabilidad genética se utilizaron los programas estadísticos GenePop v. 4.0 (Rousset, 2008) y ARLEQUIN v. 3.5 (Excoffier y col., 2007). Con estos programas se calcularon las frecuencias génicas de los SNPs y la diversidad genética de los marcadores, mediante los índices de heterocigosidad esperada (h_e). El equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) mediante el índice de fijación F_{is} (Wright, 1965) se utilizó para evaluar si los marcadores analizados presentaban segregación independiente, calculándose para cada marcador en cada rodeo y en la población completa mediante el software Arlequín 3.5.

2.4.2 Análisis de asociación entre SNPs y el momento de arribo a la madurez sexual

La relación entre las distintas variantes de los polimorfismos evaluados y el momento de arribo a la madurez se analizó mediante modelos de supervivencia. Para ello se ajustó en primer lugar un análisis de Kaplan-Meier, estimando una función de supervivencia $\hat{S}(t)$ de la función real de supervivencia $S(t)$. Esta última es la probabilidad de que un toro alcance la madurez sexual después de un tiempo t . Para estimar esta función se ajustó el siguiente modelo:

$$\hat{S}(t) = \prod_{j:t_j \leq t} \left(1 - \frac{d_j}{n_j}\right) \quad \text{para } t_1 \leq t \leq t_k,$$

mediante el procedimiento LIFETEST de SAS 9.4, donde a cada tiempo t_j hay n_j toros no maduros (en riesgo de alcanzar la madurez) y d_j que arriba a la madurez en ese tiempo t_j

La comparación entre las funciones de supervivencia de los distintos genotipos se realizó mediante un análisis de chi cuadrado de los estadísticos log-rank y wilcoxon. El estadístico log-rank para el i -ésimo genotipo puede escribirse como:

$$\log - rank = \sum_{j=1}^r (d_{ij} - e_{ij})$$

donde d_{ij} es el número de eventos para el i -ésimo genotipo al tiempo j y e_{ij} es el número esperado de eventos para ese grupo al tiempo j , definido como:

$$e_{ij} = \frac{n_{ij}d_j}{n_j}$$

donde n_j es el total de casos en riesgo, toros no maduros en este caso, justo antes del tiempo j , n_{ij} es el número de individuos en riesgo para el i -ésimo genotipo antes del tiempo j y d_j es el número de toros maduros al tiempo j .

Por su parte el estadístico de wilcoxon se calcula como:

$$wilcoxon = \sum_{j=1}^r n_j (d_{ij} - e_{ij})$$

Posteriormente, se ajustó un modelo de riesgos proporcionales de COX con el procedimiento PHREG en SAS 9.4 agregando el peso y la circunferencia escrotal como variables explicatorias tiempo dependiente, evaluando además la estratificación por rodeos, bajo el siguiente modelo:

$$h_{ij}(t) = h_{i0}(t) e^{\beta_1 X_{ij} + \beta_2 X_{ij}(t) + \beta_3 X_{ij}(t)}$$

Donde $h_{ij}(t)$ es la función de riesgo del j-ésimo individuo en el i-ésimo rodeo al tiempo t; $h_{i0}(t)$ es la función de riesgo basal para el i-ésimo rodeo al tiempo t; β_1 es el vector de parámetros regresores correspondientes al genotipo; X_{ij} es el vector de genotipos para el j-ésimo individuo en el i-ésimo rodeo, el segundo término del exponente corresponde al efecto del peso en el tiempo t, mientras que el tercer componente modela el efecto de la circunferencia escrotal al tiempo t en el riesgo de madurez sexual.

Dado que al finalizar el periodo de muestreo una parte de los toros no había alcanzado la madurez sexual, se ajustaron dos modelos de regresión de Cox adicionales con el fin de determinar el riesgo de pérdida de información en la censura de datos. En el primero de estos todos aquellos toros que no habían alcanzado la madurez sexual previamente fueron registrados como maduros al último muestreo, mientras que en un segundo escenario los mismos toros fueron registrados como detectados maduros un día más tarde que el toro más tardío del grupo. Este enfoque permite definir si la información perdida por la censura de información puede determinar cambios importantes en las conclusiones de los análisis previos, en caso de que el sentido de los estimadores se invierta, o bien que

algunos estimadores adquirieran mucha relevancia, siendo que no la tenían en los análisis previos.

Se evaluó para todos los modelos ajustados la correlación entre los residuos de Schoenfeld y el tiempo, para chequear la proporcionalidad del riesgo entre los genotipos a lo largo del tiempo, como supuesto del modelo de análisis.

Al no se detectarse cambios importantes en los modelos de sensibilidad, ni tampoco una relación entre los residuales del modelo y el tiempo, los modelos se consideraron como válidos.

RESULTADOS

3.1 Medidas de variabilidad genética

Para estudiar los polimorfismos seleccionados a nivel poblacional y determinar su asociación con el momento de arribo a la madurez, se realizó la genotipificación de los grupos en estudio (LV1, LV2 y LE) mediante las técnicas de pirosecuenciación y amplificación alelo-específica. Los resultados obtenidos mostraron que en el caso del SNP IGF1-SnaBI (rs13452733) localizado en el gen IGF1 y genotipificado mediante pirosecuenciación se detectaron los tres genotipos posibles (T/T, T/C y C/C; Figura 2.2). Por otra parte, la genotipificación por PCR alelo-específica mostró que las poblaciones evaluadas presentaban los tres genotipos (A/A, A/G y G/G) para el SNP rs38375765 ubicado en el gen PRM1 (Figura 2.3), así como los dos genotipos hemicigóticos (C y G) para el marcador rs381660502 del gen SERPINA7.

Figura 2.2. Pirogramas obtenidos como resultado de la genotipificación de SNP IGF1-SnaBI por la técnica de Pirosecuenciación. Se evidencia la presencia de los tres genotipos posibles: T/T, T/C y C/C

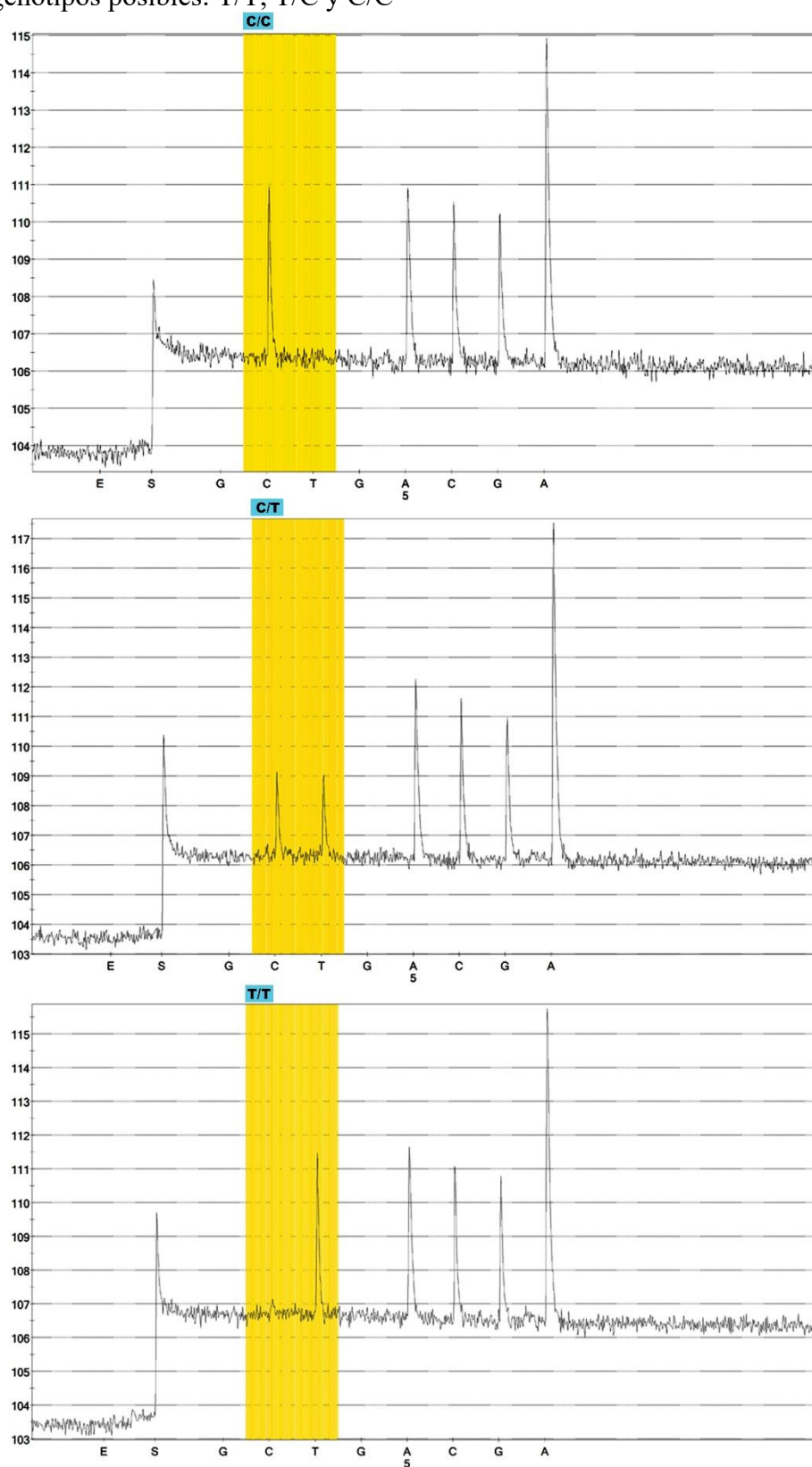
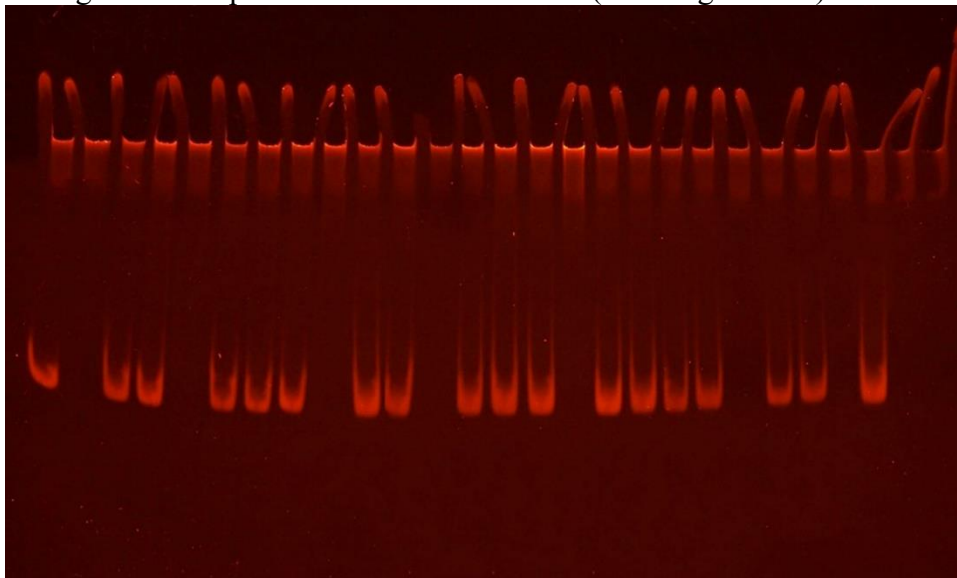


Figura 2.3. Genotipificación del SNP PRM1 por la técnica de PCR alelo-específica. Se evidencia la presencia de los tres genotipos posibles. De izquierda a derecha se observa en los dos primeros pocillos la muestra 1 con su genotipo A/A, los dos pocillos siguientes muestra bandas para los dos alelos (heterocigota A/G) y en los dos siguientes amplificó solamente el alelo G (homocigota G/G).



El siguiente paso consistió en estimar las frecuencias génicas y genotípicas, la h_e y HWE para cada uno de los SNPs en cada rodeo y para la población total. Los resultados se muestran en las tablas 2.4 y 2.5. La frecuencia del alelo menos frecuente (MAF) fue de 0,441, 0,283 y 0,093 para IGF1-SnaBI, PRM1 y SERPINA7 respectivamente, en la población total, mientras que los valores de heterocigosidad observada (h_o) fueron de 0,433 y 0,453 para los marcadores ubicados en los genes IGF1 y PRM1, respectivamente. Mediante el test de HWE se demostró que los marcadores no presentan desviaciones significativas de las proporciones teóricas del equilibrio ($P > 0,05$) a excepción de PRM1 en el rodeo LV ($P = 0,037$). Tanto la presencia de diversidad genética como el estado de equilibrio de Hardy-Weinberg son requisitos necesarios para realizar, por ejemplo, estudios de asociación, por lo que los resultados obtenidos para los marcadores estudiados hicieron posible su utilización en el análisis de asociación genética posterior.

Tabla 2.4. Frecuencias génicas para los marcadores en IGF1-SnaBI, PRM1 y SERPINA7 (SERP).

Rodeo	N	IGF1-SnaBI		PRM1		SERP7	
		C	T	A	G	C	G
LE	66	0,389	0,611	0,234	0,766	0,910	0,090
LV	99	0,475	0,525	0,314	0,686	0,905	0,095
Global	165	0,441	0,559	0,283	0,717	0,907	0,093

* N: Número de individuos

Tabla 2.5. Equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para los dos marcadores IGF1-SnaBI y PRM1.

Rodeo	IGF1-SnaBI			PRM1		
	Ho	He	HWE	Ho	He	HWE
LE	0,479	0,397	0,192	0,362	0,344	0,730
LV	0,501	0,424	0,157	0,433	0,526	0,037
Total	0,433	0,495	0,034	0,453	0,407	0,174

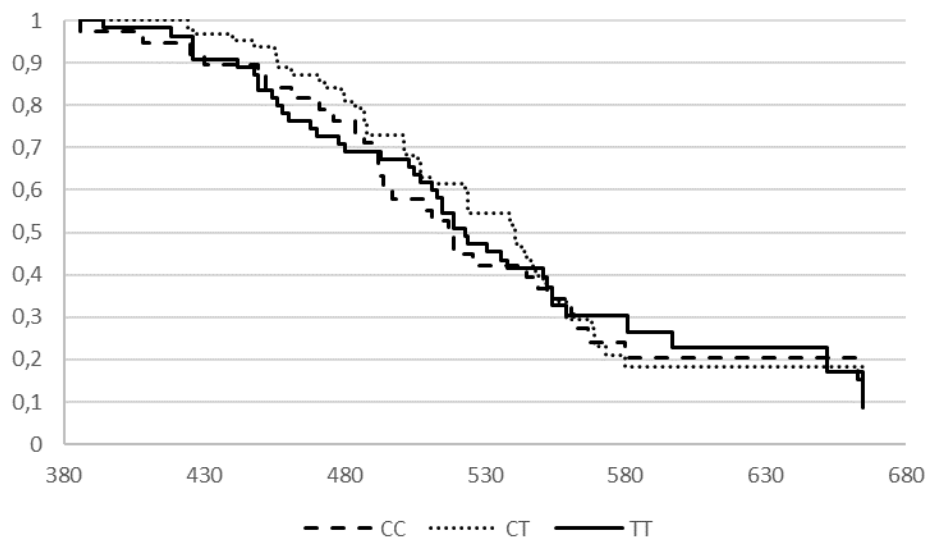
* Ho: heterocigosidad observada; He: heterocigosidad esperada; HWE: p-value del equilibrio de Hardy-Weinberg

3.2 Riesgo de madurez asociado a polimorfismos en genes candidatos

El análisis de Kaplan-Meier para los tres SNPs evaluados no mostró diferencias significativas entre los diferentes genotipos, es decir que no se evidenció un mayor riesgo de presentar el evento madurez sexual asociado a un genotipo determinado, tanto en el análisis global como en análisis por rodeo ($P > 0,05$).

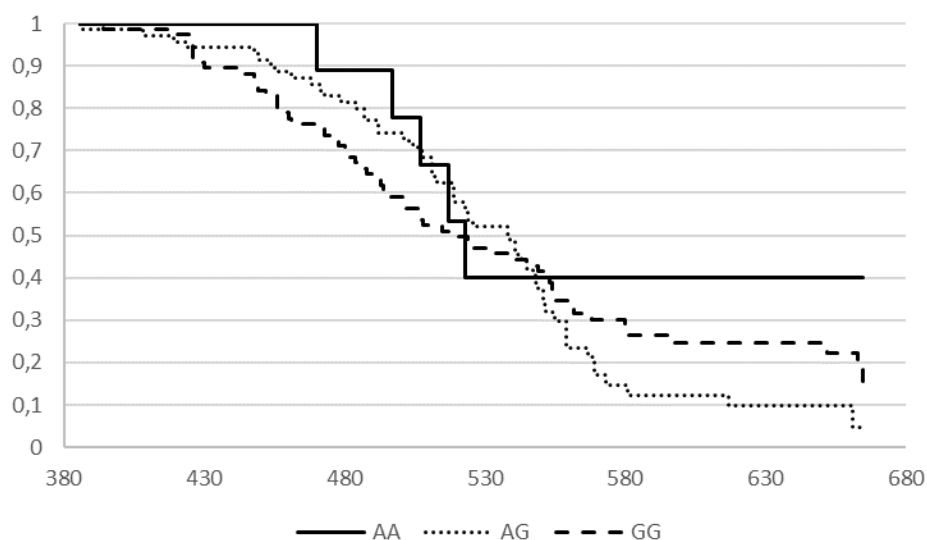
En el caso del SNP IGF1-SnaBI la mediana de supervivencia al evento madurez sexual o su complemento, la probabilidad de madurez sexual, se sitúa a los 518 días para el genotipo CC, a los 541 días para el heterocigota CT y a los 523 para TT, (Log-Rank: $P = 0,942$ y Wilcoxon: $P = 0,651$; Figura 2.4).

Figura 2.4. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los distintos genotipos del SNP IGF1-SnaBI.



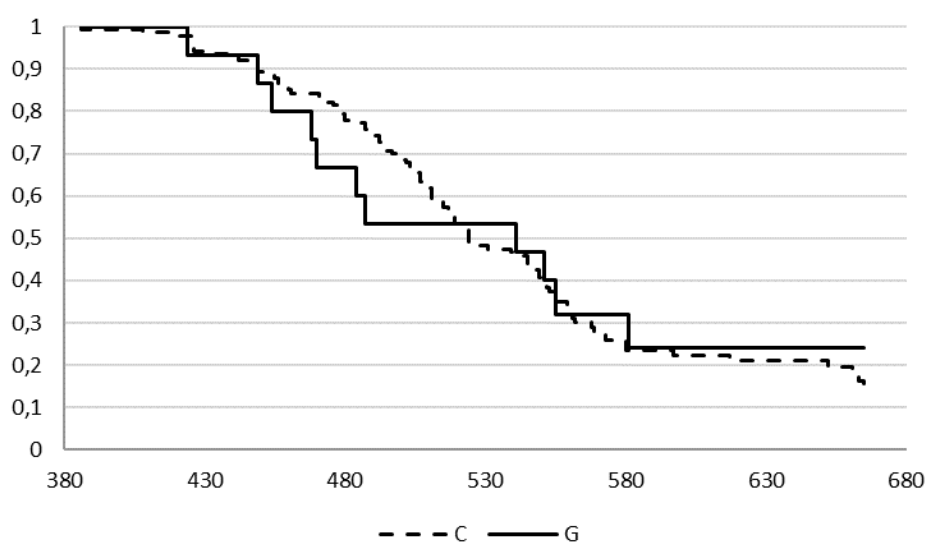
Al analizar el marcador de PRM1 encontramos que la mediana de la probabilidad de madurez sexual se ubica a los 523 días para el genotipo AA, a los 539 días para AG y a los 519 para GG (Log-Rank: $P=0,446$ y Wilcoxon: $P=0,631$; Figura 2.5).

Figura 2.5. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los distintos genotipos del SNP de PRM1.



El análisis de supervivencia realizado para los distintos genotipos del SNP SERPINA7, mostró que la mediana de ocurrencia del evento madurez sexual para el genotipo C se ubica a los 524 días, mientras que para el genotipo G lo hace a los 541 días (Log-Rank: $P=0,880$ y Wilcoxon: $P=0,684$; Figura 2.6).

Figura 2.6. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para los distintos genotipos del SNP SERPINA7.



El análisis del modelo de riesgos proporcionales de COX para el marcador IGF1-SnaBI mostró que no existe un mayor riesgo relativo asociado a un genotipo específico. Sin embargo, el riesgo de madurez aumenta 2 puntos porcentuales por cada unidad de cambio de peso (Tabla 2.6). Al no considerar el rodeo como factor de estratificación, los genotipos continúan sin efecto, el riesgo relativo de madurez asociado al cambio de peso disminuye su magnitud, y aumenta el riesgo a la madurez asociado al aumento de CE. En este caso el riesgo de madurez aumenta 0,8 puntos porcentuales por cada unidad de cambio de peso y la CE aumenta el riesgo de madurez 15,5 puntos porcentuales por cada unidad de cambio de CE.

Tabla 2.6. Estimadores de riesgo asociados al polimorfismo en IGF1-SnaBI, el peso y la circunferencia escrotal (CE), considerando al rodeo como un factor de estratificación.

Variables	Estimador	E.S.	Riesgo relativo	IC 95 %	P Valor
IGF1- CT	0,16257	0,284	1,177	0,674 – 2,054	0,5674
IGF1-TT	0,27333	0,296	1,314	0,735 – 2,351	0,3569
Peso	0,02006	0,003	1,020	1,013 – 1,028	<0,0001
CE	0,08302	0,062	1,087	0,962 – 1,228	0,1831

Nota: El genotipo CC se estableció como nivel basal (riesgo relativo =1)

El modelo de riesgos proporcionales de COX para el marcador del PRM1 no mostró diferencias significativas en el riesgo relativo de madurez para ninguno de los genotipos. Considerando el rodeo como un factor de estratificación se observó un efecto del peso altamente significativo, ocasionando un aumento del riesgo de madurez de 1,7 puntos porcentuales por cada aumento en una unidad de peso (Tabla 2.7). Al no considerar el rodeo como factor de estratificación se observa, al igual que con el marcador IGF1-SnaBI, una reducción de la significancia para el efecto del peso sobre la madurez sexual y un efecto de similar proporción para la CE, ambos con valores de P significativos ($P \leq 0,05$).

Tabla 2.7. Estimadores de riesgo asociados al polimorfismo en PRM1, el peso y la circunferencia escrotal (CE), considerando al rodeo como un factor de estratificación.

Variables	Estimador	E.S.	Riesgo relativo	IC 95 %	P Valor
PRM1- AG	0,05467	0,590	1,056	0,332 – 3,361	0,9262
PRM1-GG	0,08254	0,585	1,086	0,345 – 3,419	0,8878
Peso	0,01727	0,003	1,017	1,010 – 1,029	<0,0001
CE	0,08453	0,063	1,088	0,960 – 1,235	0,1854

Nota: El genotipo AA se estableció como nivel basal (riesgo relativo =1)

Finalmente, cuando se realizó el mismo análisis para el marcador de SERPINA7, los resultados encontrados fueron similares, no mostró diferencias significativas en el riesgo de madurez según el genotipo y al considerar el rodeo, el efecto del peso nuevamente se manifestó con un aumento del riesgo de madurez de 2 puntos porcentuales por cada unidad de cambio de peso (Tabla 2.8). Los resultados de este análisis sin considerar al rodeo como factor de estratificación muestran, además del efecto del peso, un incremento del riesgo de madurez de 13,9 puntos porcentuales por cada unidad de cambio de CE ($P=0,0281$).

Tabla 2.8. Estimadores de riesgo asociados al polimorfismo en SERPINA7 (SERP), el peso y la circunferencia escrotal (CE), considerando al rodeo como un factor de estratificación.

Variables	Estimador	E.S.	Riesgo relativo	IC 95 %	P Valor
SERP- G	0,30003	0,397	1,350	0,619 – 2,944	0,4506
Peso	0,02003	0,003	1,020	1,013 – 1,028	<0,0001
CE	0,07231	0,060	1,075	0,956 – 1,209	0,2288

Nota: El genotipo C se estableció como nivel basal (riesgo relativo =1)

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Como se describió inicialmente, la maduración sexual involucra diversos procesos biológicos, los cuales se encuentran regulados por múltiples genes. Al revisar la bibliografía, se evidencia la existencia de escasos reportes que asocien parámetros relacionados a la madurez sexual de machos bovinos con marcadores genéticos. En este sentido, la elección de los genes candidatos seleccionados en el presente trabajo se basó en la función biológica y su implicancia en la expresión de caracteres que permitieran definir la madurez sexual, como la calidad seminal y

específicamente el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales, como así también en aquellos genes involucrados en los procesos de crecimiento y desarrollo, tanto a nivel corporal como en el aspecto reproductivo.

Es importante resaltar que los polimorfismos seleccionados mostraron una variabilidad adecuada en la población evaluada para realizar los análisis estadísticos posteriores. Evaluando las frecuencias alélicas encontradas en IGF1-SnaBI en este estudio, podemos decir que son similares a aquellas informadas por otros autores, quienes trabajaron con poblaciones de toros Angus de la provincia de Buenos Aires (Lirón y col., 2012; Rogberg Muñoz y col., 2013), como así también a las frecuencias reportadas por Ge y col. (2001) quienes utilizaron en su estudio dos poblaciones de Angus divergentes. Para el caso del SNP de SERPINA7 los trabajos publicados fueron realizados en toros Brahman y en una raza compuesta tropical (Fortes y col., 2012; Fortes y col., 2013), en los cuales se reportaron varios polimorfismos en la región del gen SERPINA7. En la población bajo estudio del presente trabajo de tesis, el SNP de SERPINA7 fue el que mostró menor variabilidad ($MAF = 0,09$), esta baja frecuencia alélica puede ser responsable de la ausencia de asociación estadística, más aún considerando el tamaño de la muestra. En relación a las variantes del gen PRM1, ha sido ampliamente descrito en humanos (Iguchi y col., 2006; Aoki y col., 2006; Gázquez y col., 2008; Tüttelmann y col. 2010); en bovinos se han descriptos polimorfismos de este gen en poblaciones de toros de razas puras *Bos Taurus*, *Bos Indicus* y sus cruza (Yathish y col., 2018)

El estudio de asociación entre los SNPs y el momento de arribo a la madurez sexual se realizó mediante un análisis de supervivencia. Estos análisis permiten cuantificar el riesgo de ocurrencia de un evento determinado, madurez sexual en

este caso, a lo largo del tiempo, evaluando el efecto de variables asociadas al evento en cuestión. Esta metodología permitió evaluar el riesgo de ocurrencia de la madurez sexual asociado a los diferentes genotipos de los SNPs previamente mencionados. Se incluyó además el efecto del peso como covariable. Además, estos estudios resultan de utilidad a la hora de analizar variables que, por su forma de medición, producen una pérdida de información a causa de la censura que se produce en el intervalo entre los muestreos realizados, como así también al momento de finalizar la toma de datos (Rebasa, 2005).

Los resultados de este análisis no han mostrado una asociación entre el genotipo y el riesgo de presentar el evento madurez sexual para ninguno de los marcadores evaluados. Estos resultados contrastan con las evidencias reportadas para IGF1-SnaBI, asociado con la edad a la pubertad en toros Angus definida por su CE a los 28 cm (Lirón y col., 2012) y, el aumento de riesgo de pubertad en hembras Angus asociado al genotipo TT de este marcador (Bonamy, 2018).

En el análisis de riesgos proporcionales se incluyó además del genotipo, el efecto del peso y de la CE. En todos los casos se observó un efecto importante del peso, mientras que los genotipos no mostraron diferencias en el riesgo de madurez. Estos resultados apoyan lo encontrado en el análisis de supervivencia, y acompañan los resultados expuestos en el capítulo I del presente trabajo de tesis, donde se hallaron diferencias para los distintos niveles de rodeo-año en los animales estudiados, posiblemente debidas a diferencias en la alimentación. En todos los casos el estado nutricional podría ser considerado subóptimo afectando el potencial de desarrollo y la expresión de las posibles diferencias genéticas. Cabe recordar que la expresión de los genes está fuertemente condicionada por los aspectos

nutricionales individuales (Dawson, 2006; Fortes y col., 2016; English y col., 2018a; Kenny y Byrne, 2018; Coen y col., 2021).

La ausencia de asociación estadística entre los polimorfismos evaluados y la presentación temprana de la madurez sexual podría explicarse por un lado porque la madurez está regulada por múltiples genes y por el otro, a que la nutrición condiciona fuertemente el desarrollo reproductivo. En este sentido, se puede concluir que el peso afecta de forma considerable el momento de ocurrencia de la madurez sexual y que en la población estudiada en el presente trabajo de tesis los marcadores genéticos seleccionados no han tenido una asociación con dicho evento reproductivo. Futuros estudios con animales bajo diferentes planos nutricionales pueden ser de utilidad para un análisis más profundo acerca del efecto de la nutrición en la expresión temprana de la madurez sexual, teniendo en cuenta los diferentes genotipos. Por otra parte, considerando que, desde el momento del diseño de este trabajo de tesis hasta la fecha se ha masificado la utilización de tecnologías de análisis de genoma completo, volviéndose herramientas más accesibles, es posible utilizar en próximos ensayos este tipo de metodologías que abarcan múltiples marcadores en un mayor número de animales, logrando un enfoque más global y mayor potencia en los análisis.

CAPÍTULO III

EFFECTO DEL SERVICIO PRECOZ EN EL CRECIMIENTO CORPORAL, DESARROLLO TESTICULAR Y CALIDAD SEMINAL DE TOROS ANGUS.

INTRODUCCIÓN

1.1 Uso de categorías jóvenes en el servicio natural

Las categorías de reproductores jóvenes en los rodeos de cría están representadas por los machos y las hembras que, habiendo alcanzado sus habilidades reproductivas, son utilizados en la temporada de servicio del mismo año en el que fueron destetados. Son animales que rondan los 15 meses de edad y que, al encontrarse aun en etapa de crecimiento, requieren un manejo particular. El objetivo general de aplicación de esta estrategia reside en disminuir los costos del sistema, manteniendo un buen desempeño reproductivo (Carrillo, 1997). En el caso de las hembras, el uso temprano de vaquillonas en servicio permite liberar campo destinado a la recría, otorgándoselo a los vientres que aportan una mayor productividad para el sistema. En cuanto a la categoría toros, al ser comprados a los 15 meses su costo es menor, permitiendo de esta forma obtener un ejemplar con mayor mérito genético a un menor valor (Kassari y col., 1996). Tanto en machos como en hembras, el inicio temprano del uso de los reproductores permite aumentar el número de terneros obtenidos en su vida productiva, lo que conlleva una reducción del costo de inversión por unidad de producto.

En Argentina, el uso de categorías jóvenes no se encuentra masificado, aunque al comparar entre machos y hembras, son estas últimas las que muestran una mayor inclusión dentro de los esquemas productivos, especialmente los ubicados en la región pampeana (Campero, 1998). Este escenario se contrapone con lo que sucede en otras partes del mundo, donde el uso de toros jóvenes está incorporado en gran parte de los sistemas de cría, como sucede en EE. UU. (Kassari y col., 1996).

Cabe destacar que los animales jóvenes pertenecen a categorías con altas demandas a nivel nutricional por lo que es necesario contar con una estructura forrajera de buena calidad a lo largo del año, como así también un buen manejo general del sistema. Esta realidad usualmente impide que se aplique esta estrategia reproductiva de manera masiva, aún considerando sus beneficios. Existe una vasta evidencia que permite asegurar que los toros de 15 meses, utilizados en su primera temporada de servicio y en una correcta proporción (1 toro cada 25 hembras), poseen una aptitud reproductiva comparable con la de los animales de mayor edad. En un estudio canadiense con información recabada durante 10 años se utilizaron para el servicio natural toros en su primer año y luego a los 2 años de edad. Al comparar los porcentajes de preñez obtenidos en los dos momentos de evaluación, no se encontraron diferencias, lo que comprueba que los toros jóvenes en su primera temporada de servicio pueden tener un desempeño tan eficiente como el de los adultos (Farid y col., 1987), reafirmando lo expuesto por otros autores (Carter y Cox, 1973; Tomky y col., 1979). Años más tarde, Makarechian y Arthur (1993), en concordancia con estos hallazgos, comprobaron que la edad de la hembra era un factor más importante que la edad del toro para determinar la fertilidad del rodeo.

En este estudio, la fertilidad fue evaluada a través del porcentaje de preñez y el de parición comparando toros de un año y de dos años, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

1.2 El servicio natural a campo y sus implicancias

En planteos de cría organizados, el momento destinado a la reproducción se encuentra estacionado en una época del año, donde existe la mejor oferta forrajera capaz de satisfacer las necesidades nutricionales del rodeo, y restringido en el tiempo, permitiendo de esta forma limitar el momento de parición y fijar un momento de destete, con los beneficios que trae este ordenamiento del sistema en términos sanitarios, nutricionales y de manejo. En la provincia de Buenos Aires, se suelen implementar temporadas de servicio de 90 días de duración, en los meses de octubre, noviembre, diciembre y enero, variando el mes de inicio según el recurso forrajero disponible en el campo y su momento de mayor producción (Carrillo, 1997).

El servicio es un momento crítico para los toros, especialmente bajo las condiciones de cría extensiva de Argentina, ya que los animales modifican su conducta y se elevan las demandas nutricionales. Durante el servicio, los toros pueden perder alrededor de un 10-20 % de su peso y es necesario que lo recuperen antes de la próxima temporada reproductiva (Geary y col., 2021). Específicamente durante las tres primeras semanas del servicio, en rodeos donde hay una correcta ciclicidad de las hembras, la intensa actividad puede ocasionar un descenso de peso del 5 % para los machos que se encuentran cubriendo los celos que se acumulan en

estas primeras semanas (Raadsma y col., 1983). Para obtener los beneficios del uso precoz de los toros es muy importante garantizar un nivel nutricional adecuado durante la recría y una vez finalizada la temporada de servicio, los machos deben ser cuidados y manejados de forma diferencial como se acostumbra a hacer con las vaquillonas de 15 meses.

Otro motivo por el cual el uso de toros de 15 meses no está instalado en los sistemas de cría en Argentina, es que muchos productores temen dañar al reproductor al ponerlo en actividad de forma temprana, tanto en su desempeño reproductivo como en su desarrollo corporal. Corah y col. (1979) probaron toros de un año obteniendo buenos resultados de preñez y al evaluar los mismos animales en su segundo año de servicio, los valores de preñez reportados fueron igualmente satisfactorios. Estos resultados refutan la suposición de que el uso intenso de toros jóvenes tiene un impacto negativo sobre la fertilidad futura. En otro estudio, se evaluaron toros cruza (*Bos taurus*) de 12 a 13 meses de edad. Los animales fueron llevados a servicio y una vez finalizado se realizó una serie de mediciones, las que se compararon con aquellas tomadas previo al inicio del servicio y se observó que el largo testicular era significativamente menor, mientras que la CE y la alzada eran mayores. En cuanto al peso y los parámetros seminales no se encontraron diferencias entre las mediciones (Boyd y col., 1989). Por su parte, Ellis y col. (2005) compararon un grupo de toros en servicio natural durante 63 días y un grupo que se mantuvo sin servicio. Los primeros mostraron un descenso de peso, de condición corporal y de CE, mientras que los que permanecieron fuera del servicio lograron aumentar dichos parámetros.

1.3 Objetivo

El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del servicio en toros jóvenes de la raza Angus, durante su primera temporada de servicio sobre parámetros de desarrollo testicular, calidad seminal y crecimiento.

1.4 Hipótesis

El servicio precoz no provoca alteraciones en el crecimiento y desarrollo de los toros que afecten su aptitud reproductiva futura.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material animal

Para el desarrollo de este ensayo se trabajó en el establecimiento ganadero “La Emma” ubicado en el partido de Punta Indio, Buenos Aires, Argentina, (35°41'18.3"S - 57°21'49.5"O). Se trabajó con 100 machos bovinos de la raza Angus nacidos entre el 19 de julio y el 19 de octubre del 2014. Los animales fueron destetados con un promedio de edad de $235 \pm 22,8$ días y recriados bajo condiciones pastoriles. Al inicio del ensayo contaban con una edad promedio de $421 \pm 26,7$ días.

Todos los procedimientos realizados sobre los animales fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL), de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (Cód. 44-1-14 T).

2.2 Diseño experimental

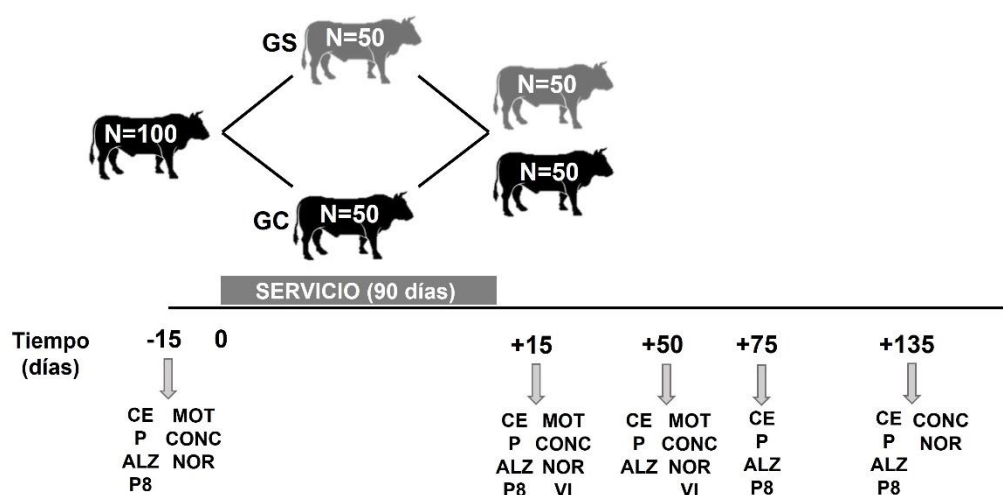
El ensayo se desarrolló entre octubre de 2015 y junio de 2016. Al inicio del muestreo, se realizó la primera medición a todos los animales previo al inicio de la temporada de servicio natural, que en este establecimiento se realiza en los meses de noviembre, diciembre y enero. Los animales fueron divididos en dos grupos de 50 ejemplares cada uno, a través de un muestreo aleatorio simple sin reemplazo, quedando conformado un grupo control (GC) y un grupo servicio (GS). La asignación aleatoria a cada grupo y la homogeneidad fue verificada mediante un análisis de varianza, donde se compararon las variables a estudiar y se confirmó que no existían diferencias significativas entre los individuos de ambos grupos ($P > 0,05$).

Los animales pertenecientes al GS fueron enviados a servicio natural colectivo, utilizados a razón de un toro cada 25 vacas. Los animales del GC continuaron con su recría, en un lote dentro del mismo establecimiento con similares características ambientales, edáficas y forrajeras a la del GS. Al finalizar el servicio natural los animales fueron reunidos nuevamente y manejados como un mismo rodeo.

La toma de datos se realizó en cinco oportunidades. La primera medición se realizó 15 días previos al inicio del servicio. Una vez finalizado el servicio se midió a los 15, 50, 75 y 135 días. Las mediciones incluyeron evaluación de la calidad seminal, específicamente se valoró la motilidad individual (MI), la concentración espermática (CONC), el porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) y el porcentaje de espermatozoides vivos (VI), y características de crecimiento y desarrollo: peso (P), alzada (ALZ), circunferencia escrotal (CE) y

espesor de grasa subcutánea (P8). Las mediciones realizadas en cada momento se resumen en la figura 1.

Figura 3.1. Esquema del diseño experimental y mediciones realizadas.



Nota: Se considera tiempo 0 al inicio del servicio. Grupo servicio (GS) y grupo control (GC). Mediciones de circunferencia escrotal (CE), peso (P), alzada (ALZ) y espesor de grasa subcutánea (P8), motilidad individual (MI), concentración (CONC), porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR) y porcentaje de espermatozoides vivos (VI).

2.3 Metodologías utilizadas

2.3.1 Determinación de la calidad espermática

La extracción de semen y la valoración de los parámetros evaluados para determinar la calidad seminal (MI, CONC, NOR y VI) se realizó siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.1 del capítulo I.

2.3.2 Medición de caracteres morfológicos

Las mediciones de CE, P y ALZ se realizaron siguiendo la metodología descrita en el apartado 2.4.2 del capítulo I. Para la determinación del P8 se utilizó la técnica de ultrasonografía, para ello se utilizó un transductor lineal de 7,5 MHz acoplado a un ecógrafo en modo B (Aquila® Vet Pro, Esaote SpA, Genova, Italia). La técnica consiste en colocar el transductor en la región glútea del animal en una posición intermedia entre la tuberosidad coxal y la tuberosidad isquiática, la imagen se captura en el momento en que se encuentra en el centro de la pantalla la intersección de los músculos gluteobíceps y glúteo medio. Una vez tomada la imagen, se procede a la medición de la distancia entre la fascia glútea y la piel del animal, determinándose de este modo el espesor de grasa expresado en milímetros.

2.4 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se utilizó un modelo lineal mixto que incluyó como efectos fijos el tratamiento, el momento de evaluación y su interacción, considerando como efecto aleatorio al animal. Se analizaron los contrastes de las medias de los mínimos cuadrados entre tratamiento para cada uno de los momentos utilizando la prueba de Tukey. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando paquetes en Rstudio.

RESULTADOS

Al inicio del ensayo, en la medición previa al comienzo del servicio, el GS estaba integrado por un 81 % de toros púberes, 17 % de infantiles y un 2 % de

maduros, mientras que el GC quedó conformado por un 89 % de toros púberes, 7 % de infantiles y un 4 % de maduros (clasificación basada en los criterios expuestos en el apartado 2.3 del capítulo I). En este momento se corroboró la ausencia de diferencias estadísticas ($P > 0,05$) en los diferentes parámetros evaluados entre GS y GC. Los valores promedio de edad, características seminales y físicas para cada grupo y para el total de los animales en estudio a los 15 días previos al comienzo de la temporada reproductiva se resumen en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Edad, circunferencia escrotal (CE), peso (P), alzada (ALZ), espesor de grasa subcutánea (P8), motilidad individual (MI), concentración espermática (CONC), porcentaje de espermatozoides normales (NOR) y porcentaje de espermatozoides vivos (VI) al inicio del ensayo.

	EDA D (d)	CE (cm)	P (kg)	ALZ (cm)	P8 (mm)	MI (%)	CONC (mill/ml)	NOR (%)	VI (%)
GS	424,8 ± 4,5	32,6 ± 0,3	281,1 ± 5,1	110,6 ± 0,5	2,8 ± 0,08	32,6 ± 2,6	525,9 ± 65,1	46,4 ± 2,3	81,0 ± 1,6
GC	416,8 ± 3,5	32,4 ± 0,3	278,1 ± 4,9	110,1 ± 0,5	2,8 ± 0,08	31,0 ± 2,5	490,2 ± 62,3	44,1 ± 2,2	79,3 ± 1,5
Total	420,5 ± 2,8	32,5 ± 0,3	279,3 ± 5,0	110,3 ± 0,5	2,8 ± 0,08	31,7 ± 2,6	538,5 ± 64,3	45,1 ± 2,2	80,2 ± 1,5

Nota: Grupo control (GC) y grupo servicio (GS). Datos expresados como media de los mínimos cuadrados ± ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$).

Para la valoración del efecto del servicio sobre el GS, se compararon los parámetros medidos inicialmente, en ambos grupos. Las mediciones del postservicio inmediato (momento +15) mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0,05$) para todos los indicadores físicos (CE, P, ALZ, P8) entre GS y GC, viéndose afectados de forma negativa los animales del GS, quienes tuvieron menor crecimiento y desarrollo. Los animales del GC fueron 50 kg más

pesados, con una CE superior en 1,6 cm, una alzada 2 cm mayor y un P8 superior en 0,6 mm. Tanto a los 50 como a los 75 días postservicio se puede observar que se mantuvieron dichas diferencias, a excepción del P8 que, por inconvenientes operativos, no pudo ser registrado a los 50 días pero que mostró diferencias significativas a los 75, al igual que los otros parámetros. Por último, a los 135 días de finalizado el servicio se constataron diferencias solo en P y en ALZ, mientras se observó una recuperación de los valores de CE y P8 en el GS (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Características físicas postservicio. Circunferencia escrotal (CE), peso (P), alzada (ALZ), espesor de grasa subcutánea (P8). Los tiempos se expresan en días (d) transcurridos una vez finalizado el servicio.

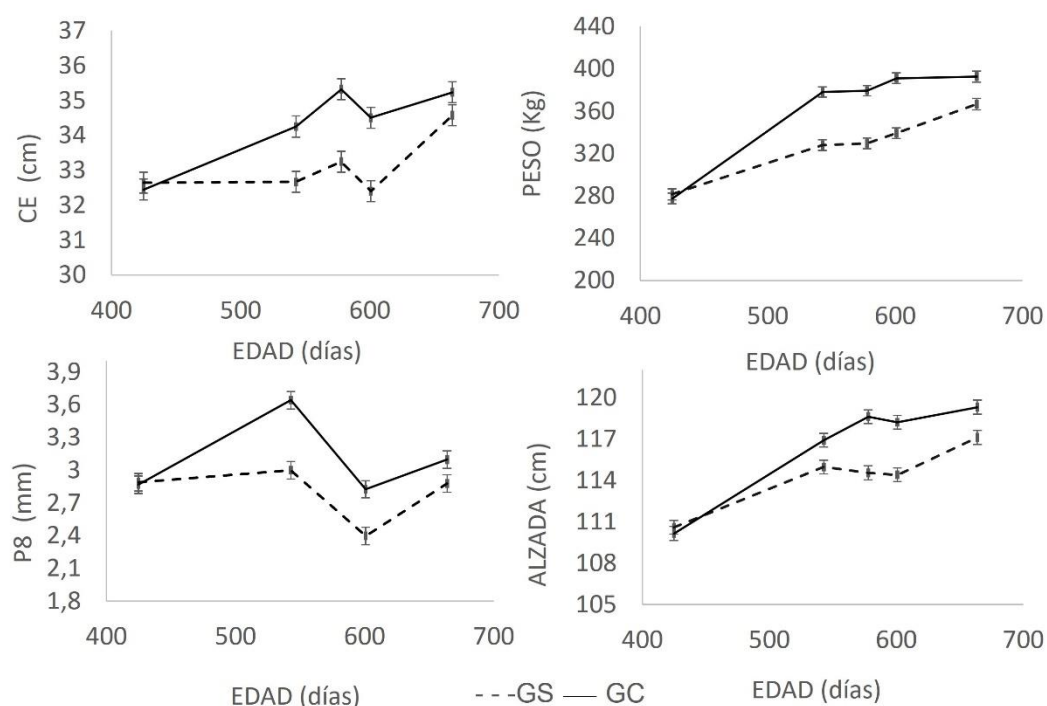
	CE (cm)	P (kg)	ALZ (cm)	P8 (mm)
+15 d				
GS	32,6 ± 0,3 a	327,8 ± 5,1 a	114,9 ± 0,5 a	3,0 ± 0,08 a
GC	34,2 ± 0,3 b	378,0 ± 4,9 b	116,7 ± 0,5 b	3,6 ± 0,08 b
+50 d				
GS	33,2 ± 0,3 a	329,4 ± 5,1 a	114,5 ± 0,5 a	-
GC	35,3 ± 0,3 b	379,3 ± 5,0 b	118,6 ± 0,5 b	-
+75 d				
GS	32,4 ± 0,3 a	339,2 ± 5,0 a	114,4 ± 0,5 a	2,4 ± 0,08 a
GC	34,5 ± 0,3 b	391,1 ± 5,0 b	118,2 ± 0,5 b	2,8 ± 0,08 b
+135 d				
GS	34,5 ± 0,3	366,6 ± 5,3 a	117,1 ± 0,5 a	2,8 ± 0,08
GC	35,2 ± 0,3	393,7 ± 5,3 b	119,2 ± 0,5 b	3,1 ± 0,08

Nota: Grupo control (GC) y grupo servicio (GS). Datos expresados como media de los mínimos cuadrados ± ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$).

Al comparar las mediciones preservicio con las obtenidas en el postservicio inmediato, se observa que los animales del GS no mostraron variación en el promedio de su CE, aunque al desglosar la composición de este grupo se observa que el 55 % de los toros tuvieron un descenso en su CE, el 40 % aumentó y solo el

5 % se mantuvo igual; el P aumentó 46 kg, representando un incremento del 16 % y el crecimiento en ALZ fue de 4,2 cm (3,8 %). Por su parte, el GC aumentó en promedio su CE en 1,8 cm, correspondiéndose con una variación porcentual de 5,5 puntos. En este caso un 93 % de los toros tuvieron un incremento en su CE, el 5 % disminuyó y solo el 2 % se mantuvo igual. Al analizar el P se observa un aumento promedio de 101 kg (36 %), mientras que la ALZ se acrecentó en 6,9 cm, representando un incremento del 6,2 %.

Figura 3.2. Evolución de la circunferencia escrotal (CE), peso, espesor de grasa subcutánea a la cadera (P8) y alzada para el grupo en servicio (GS) y grupo control (GC).



Los valores de aumento diario de P (ADP), de CE (ADCE), de P8 (ADP8) y de ALZ (ADAL) durante la época de servicio, es decir, el periodo comprendido entre la medición preservicio y la medición postservicio inmediata (+15 días) y para

el periodo postservicio evaluado desde el momento +15 hasta la última medición (+135 días), tanto para GC como para GS se resumen en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Aumento diario de peso (ADP), de circunferencia escrotal (ADCE), de grasa subcutánea (ADP8) y de alzada (ADAL) para las etapas de servicio y postservicio.

	ADP (kg/d)	ADCE (cm/d)	ADP8 (mm/d)	ADAL (cm/d)
Servicio				
GS	0,386 ± 0,235	-0,001 ± 0,018	0,002 ± 0,008	0,035 ± 0,033
GC	0,846 ± 0,279	0,015 ± 0,016	0,008 ± 0,009	0,055 ± 0,034
Postservicio				
GS	0,316 ± 0,138	0,016 ± 0,012	-0,001 ± 0,008	0,019 ± 0,018
GC	0,097 ± 0,171	0,007 ± 0,009	-0,006 ± 0,007	0,021 ± 0,023

Nota: Grupo control (GC) y grupo servicio (GS). Datos expresados como media ± DS.

*Servicio: valores obtenidos entre la medición preservicio y la medición post servicio inmediata (+15 días).

**Postservicio: valores obtenidos entre la medición postservicio inmediata (+15 días) y la última medición tomada de cada parámetro (+135 días).

Al comparar las características seminales de GS y GC durante el postservicio, se observan diferencias significativas tanto para NOR como para VI, siendo menores en el GS; los valores de MI y CONC no parecen verse afectados en el postservicio inmediato. A los 50 días CONC mostró diferencias significativas ($P=0,03$) entre los dos grupos al igual que VI ($P=0,0078$), encontrándose los valores medios dentro de los parámetros satisfactorios de calidad seminal. A los 135 días los grupos no muestran diferencias para la CONC, en este momento no pudo evaluarse MI ni VI por inconvenientes operativos (Tabla 3.4).

Tabla 3.4. Características seminales postservicio. Motilidad individual (MI), concentración (CONC), porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales (NOR), porcentaje de espermatozoides vivos (VI). Los tiempos se expresan en días (d) transcurridos una vez finalizado el servicio.

	MI (%)	CONC (mill/ml)	NOR (%)	VI (%)
+15 d				
GS	38,1 ± 2,5	772,7 ± 61,6	63,5 ± 2,2 a	79,6 ± 1,5 a
GC	42,8 ± 2,5	728,6 ± 61,6	72,2 ± 2,2 b	87,3 ± 1,5 b
+50 d				
GS	35,2 ± 3,3	502,8 ± 80,7 a	60,9 ± 2,8	83,1 ± 2,1 a
GC	38,9 ± 4,7	806,5 ± 115,7 b	67,1 ± 4,1	73,2 ± 3,0 b
+135 d				
GS	-	918,8 ± 119,9	70,7 ± 4,2	-
GC	-	853,1 ± 156,7	70,8 ± 5,5	-

Nota: Grupo control (GC) y grupo servicio (GS). Datos expresados como media de los mínimos cuadrados ± ES. Letras diferentes indican diferencias significativas entre grupos ($P < 0,05$).

Una vez finalizado el servicio, la clasificación de los animales según sus características seminales quedó conformada de la siguiente manera: el GS estaba integrado por un 49 % de toros púberes, 40 % de maduros y un 11 % de infantiles, mientras que el GC quedó conformado por un 75 % de toros maduros, 21 % de púberes y un 4 % de infantiles.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que el servicio produjo diferencias en el crecimiento corporal y desarrollo testicular de los toros con respecto al grupo control, como así también se vieron afectados algunos parámetros indicadores de calidad seminal. Tanto la calidad seminal como los valores de CE lograron compensarse durante los meses postservicio.

Al analizar la CE, se observa que un 55 % de los animales del GS tuvieron una disminución de este parámetro durante el servicio, lo que produjo diferencias significativas entre los animales del GS y GC en la primera medición postservicio. En promedio no se observa una variación de la CE en el GS, quienes mantuvieron su CE, mientras que el GC mostró un aumento porcentual de 5,5 puntos de CE durante el servicio. Estos datos difieren de aquellos informados por Ellis y col. (2005), quienes encontraron que durante una temporada de servicio de 63 días los toros perdieron 4,58 % de su CE y los animales del grupo control aumentaron 2,49 %.

Una vez finalizado el servicio, los animales comenzaron a ganar CE (GS= 0,016 cm/día y GC= 0,007 cm/día), pero al compararlo con otros estudios, el ritmo de crecimiento mostrado resulta inferior. Un ensayo realizado en dos establecimientos de la provincia de Buenos Aires mostró un crecimiento a los 18 meses de edad de la CE diferente según el rodeo, con valores promedio de 0,024 cm/día y 0,013 cm/día; en este caso los valores de ADP eran similares, alrededor de los 500 gr/día (Agliao y col., 2008). Estos valores se asemejan a los previamente encontrados en toros Angus entre los 15 y los 21 meses de edad (0,03 – 0,01 cm/día; Peralta, 1999). Es lógico pensar que, en las condiciones de este ensayo, los cambios en la CE durante el servicio pueden estar causados, en parte, por el estrés que produce una nutrición por debajo de los requerimientos; cabe recordar que en este momento la alimentación debe permitir un correcto crecimiento y a la vez cubrir las demandas aumentadas a causa de una mayor actividad física, propia del servicio (Ellis y col., 2005; Barth y col., 2008). A causa del bajo ritmo de crecimiento de la CE, los grupos lograron equipararse recién a los

135 días postservicio, coincidiendo con el momento en el que el P8 también logra hacerse semejante entre los grupos. Existen varios reportes que asocian la CE con el peso corporal, la condición corporal y el grado de engrasamiento, atribuyendo las variaciones en la CE al depósito y remoción de grasa a nivel escrotal (Barth y col., 1995; Barth y col., 2002). En toros de 15 meses se ha visto que el espesor del escroto no se ve aumentado a expensas de un mayor tejido conectivo y/o adiposo en animales alimentados con dietas altamente energéticas (Coulter y col., 1987). En las condiciones de este ensayo, las variaciones de CE no pueden ser atribuidas al efecto de la grasa a nivel escrotal ya que los niveles de P8, P y ADP muestran claramente que los animales no se encontraban engrasados al inicio del servicio. En este sentido, es válido pensar que esta coincidencia en el momento en el que tanto la CE como P8 se equipararon entre los grupos pueda estar dada por un mejor ambiente hormonal a causa de la recomposición de las reservas corporales. Toelle y Robinson (1985), al analizar el crecimiento testicular durante sus diferentes etapas, afirmaron que, a partir de los 365 días de edad, las variaciones en el tamaño testicular son causadas en mayor medida por variaciones a nivel hormonal y no tanto a causa de cambios en el peso. Barth (2012) afirma que los toros tienden a perder una cantidad considerable de P en la temporada de reproducción y pueden continuar perdiendo P en los campos naturales que entran en latencia a fines del verano y principios otoño. Se puede esperar que los toros que pierden P pierdan aproximadamente 2 cm de CE entre principios de primavera y otoño. La disminución de la CE puede estar acompañada de una disminución en la calidad seminal. Estos cambios fisiológicos son impulsados por cambios en hormonas metabólicas y a su vez gonadotróficas que resultan en una reducción de la

proliferación de células germinales en los testículos. Un número reducido de células germinales por célula de Sertoli da como resultado una disminución de la masa testicular.

Los animales de este ensayo mostraron un aumento tanto en P como en ALZ durante el servicio, valores esperables teniendo en cuenta que el intervalo entre mediciones fue de 120 días en una etapa de la vida del animal donde aún se encuentra en crecimiento. Esto se contrapone a lo reportado en un estudio donde se trabajó con toros carniceros cruza británica, de 13 a 14 meses de edad. Allí los toros que estuvieron en servicio durante 63 días perdieron 77 kg de peso y su condición corporal descendió de 6 a 4,5 putos (escala de 1 a 9); mientras que los animales que permanecieron fuera del servicio lograron aumentar 27 kg y mantuvieron su condición corporal en 6 puntos (Ellis y col., 2005). En el presente trabajo, si bien hubo un aumento en el P, el crecimiento del GS fue menor en comparación con el GC, viéndose reflejado en las diferencias encontradas en el postservicio inmediato, poniéndose de manifiesto que el servicio retrasó el crecimiento en estos toros. A su vez, se observa que las ganancias diarias registradas luego del servicio fueron bajas para ambos grupos (GS: 0,316 kg/día; GC: 0,097 kg/día), teniendo en cuenta los valores hallados en toros Angus a los 18 meses en establecimientos ganaderos de la provincia de Buenos Aires, los cuales se encontraban entre 0,424 y 0,500 kg/día (Agliaño y col., 2008). En la etapa postservicio de este ensayo, se evidencia una clara tendencia de crecimiento compensatorio en el GS, que durante el periodo de tiempo evaluado no logró equipararse con el GC. Por su parte, el ADAL fue similar entre ambos tratamientos, lo cual podría indicar una deficiente alimentación para lograr un ritmo de crecimiento corporal pleno. Es probable que los valores de P y

ALZ que se observaron en este ensayo hayan sido influenciados negativamente por carencias nutricionales.

En relación con el depósito de grasa subcutánea como indicador del grado de reservas corporales, se observa que los valores de P8 encontrados durante el pre y postservicio se ubican por debajo de aquellos informados por otros autores. Agliano y col. (2008) encontraron en toros de 18 meses en pastoreo con una leve suplementación, un valor promedio de P8 de 3,5 mm, con un ADP de 500gr/día. Este valor de P8 es semejante al encontrado en el GC en la medición inmediatamente posterior a finalizado el servicio. En las mediciones subsiguientes se observa una disminución de P8 para ambos grupos, acompañada de un descenso en los valores de ADP. En otro estudio se hallaron valores de P8 de 4,19 mm, medido por ultrasonografía, en toros Angus con una edad promedio de 465 días (Reverter y col., 2000). En un ensayo realizado sobre toros de un año, con el objetivo de evaluar los datos ecográficos como predictores de la composición corporal, encontraron que con un ADP de 1,5 kg/d, el valor de P8 fue de 8,9 a 9,2 mm (Baker y col., 2006).

En cuanto a los parámetros de calidad seminal, se observa que sólo NOR y VI mostraron ser diferentes entre GS y GC en el postservicio inmediato. Este hecho podría resultar preocupante, ya que la morfología espermática ha sido asociada de forma positiva con el número de terneros logrados por toro en una temporada de servicio (Holroyd y col., 2002). Afortunadamente, estas diferencias fueron equiparadas en la medición realizada al día 50 postservicio, aunque en el caso de NOR se produjo a expensas de una leve reducción en promedio de ambos grupos, encontrándose en un rango de valores cercano al satisfactorio. Cabe destacar que,

en ambos grupos, hubo una mejora en los parámetros de calidad seminal, poniendo de manifiesto que estos animales aún se encontraban en un proceso de maduración sexual durante la temporada de servicio. Ellis y col. (2005) encontraron una marcada reducción del número de toros con un resultado satisfactorio en su evaluación andrológica postservicio, causada principalmente por un incremento en las anormalidades espermáticas, las que se vieron significativamente asociadas a diversas lesiones ocurridas durante el servicio. Por su parte, Boyd y col. (1989) no encontraron diferencias en los valores seminales en animales expuestos a servicio, entre las mediciones realizadas luego de 100 días, aunque estos resultados no son comparables a los de este ensayo, ya que compara los valores obtenidos del mismo grupo de animales previo al servicio con aquellos encontrados en la medición realizada al finalizar el mismo.

CONCLUSIÓN

En las condiciones de este estudio se concluye que el servicio natural a campo tiene un efecto en el corto plazo tanto en el crecimiento y desarrollo como en algunos parámetros de calidad seminal de los toros de 15 meses en su primera temporada de servicio. Sin embargo, la capacidad reproductiva futura de estos animales no se vería afectada, debido a que compensarían favorablemente tanto el desarrollo testicular como la calidad seminal durante el postservicio. Así mismo, se destaca que la calidad seminal de los animales al finalizar la temporada reproductiva se encontró dentro de parámetros satisfactorios. Esto permite destacar que, el uso de toros jóvenes resulta una herramienta de gran utilidad, que permite maximizar el

uso de cada reproductor, sin afectar su habilidad reproductiva en sus próximas temporadas de servicio.

CONCLUSIONES GENERALES

A lo largo de esta tesis se ha caracterizado, desde diferentes aspectos, el evento madurez sexual en toros de raza Angus. Un factor que relaciona los resultados de los tres capítulos desarrollados es la influencia del estado nutricional sobre la precocidad en la presentación de este evento, las características físicas que lo acompañan, la posibilidad de expresión de su potencial genético como así también la capacidad de recuperación frente a un evento estresante como puede ser el servicio precoz.

En el primer capítulo del presente trabajo de tesis se constató una edad promedio de arribo a la madurez sexual cercana a los 16,5 meses, con intervalo entre el momento de arribo a la pubertad y a la madurez variable entre los establecimientos evaluados. Por otra parte, fue posible establecer valores de corte tanto en el peso como en la CE que permitieran realizar una prueba tamiz dentro de un esquema diagnóstico capaz de identificar a los toros maduros con una alta sensibilidad y especificidad, utilizando finalmente la determinación de NOR como prueba definitiva dentro de los animales preseleccionados. De esta manera, es posible dar mayor difusión y aplicación a un esquema que permite seleccionar toros de forma objetiva considerando su estatus reproductivo.

En cuanto al estudio de asociación realizado entre los polimorfismos evaluados y el momento de presentación del evento madurez sexual, abordado en el segundo capítulo, no se observaron efectos significativos del genotipo de ninguno de los genes evaluados (IGF1-SnaBI, PRM1, SERPINA7). Por el contrario, fue el peso quién se asoció a un mayor riesgo de presentación temprana de la madurez

sexual en los animales evaluados, produciendo un aumento del riesgo de alrededor de 2 puntos porcentuales por cada unidad de cambio en el valor del peso.

Finalmente, en el tercer capítulo se evaluó el efecto del servicio sobre un grupo de toros Angus de 15 meses, concluyendo que este evento produce diferencias en el crecimiento entre los grupos expuestos al servicio y los no expuestos. Analizando el ritmo de ganancia diaria de peso y de deposición de grasa subcutánea, se evidencia un bajo nivel nutricional, lo que explica gran parte de las diferencias encontradas tanto en alzada como en peso, las cuales se mantuvieron hasta finalizar el muestreo. Por su parte, la calidad seminal mostró diferencias entre los grupos, pero no resultan ser perjudiciales para la categorización dentro de los estándares de calidad, así mismo, estas diferencias fueron compensadas en el transcurso del postservicio. Comparando los parámetros seminales dentro de cada grupo y a lo largo del tiempo, se evidencia una clara mejora, la que puede ser atribuida al proceso de maduración que experimentan los animales de esa edad.

BIBLIOGRAFÍA

1. Abdel-Raouf M. The postnatal development of reproductive organs in bulls with special reference to puberty (Including growth of hypophysis and adrenals). *Acta Endocrinology*. 1960; 49: 11.
2. Acuña CM, De Dominicis OH, Narbaitz M, De Apellániz A, Cabodevila J, Callejas S, Cisale, H. Evaluación de toros en rodeos de cría: ¿es necesario el examen de semen? *Taurus*. 2001; 9: 16-20.
3. Agliano S, Campero CM, Mezzadra CA, Fernández M, Sciotti AE, Cantón G. Evaluación del desarrollo corporal, pélvico y testicular en toros Aberdeen Angus en dos establecimientos de cría. *Veterinaria argentina*. 2008; 25: 1-18
4. Albuquerque L, Baldi F. Seleção para precocidade sexual de zebuínos: situação atual e perspectivas. VII Simpósio de Produção de Gado de Corte. Ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil, 2011; 299-324.
5. Alexander JH. Bull breeding soundness evaluation: A practitioner's perspective. *Theriogenology*, 2008; 70: 469–472.
6. Aoki VW, Christensen GL, Atkins JF, Carrell DT. Identification of novel polymorphisms in the nuclear protein genes and their relationship with human sperm protamine deficiency and severe male infertility. *Fertil Steril*. 2006; 86: 1416-22.
7. Arteaga A, Baracaldo M, Barth A. The proportion of beef bulls in western Canada with mature spermograms at 11 to 15 months of age. *Can. Vet. J.* 2001; 42: 783-787.
8. Bagu ET, Davies K L, Epp T, Arteaga A, Barrett DM, Duggavathi, R, Barth A, Rawlings NC. The Effect of Parity of the Dam on Sexual Maturation, Serum Concentrations of Metabolic Hormones and the Response to Luteinizing Hormone Releasing Hormone in Bull Calves. *Reprod Domest Anim*. 2010; 45: 803-810.
9. Baker FN, Vandemark NL, Salisbury GW. The effect of frequency of ejaculation on the semen production, seminal characteristics, and libido of bulls during the first post-puberal year. *Journal of Dairy Science*. 1955; 38: 1000-1005.

10. Baker JF, Stewart TS, Long CR, Cartwright TC. Multiple regression and principal components analysis of puberty and growth in cattle. *Journal of Animal Science*. 1988; 66:2167- 2158.
11. Baker J, Hardy MP, Zhou J, Bondy C, Lupu F, Bellve AR, Efstratiadis A: Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol*. 1996; 10:903–918.
13. Baker MJ, Tedeschi LO, Fox DG, Henning WR, Ketchen DJ. Using ultrasound measurements to predict body composition of yearling bulls, *Journal of Animal Science*, 2006; 8: 2666–2672.
14. Balhorn, R. The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol*. 2007; 8(9): 1-8.
15. Ballachey BE, Miller HL, Jost LK, Evenson DP. Flow cytometry evaluation of testicular and sperm cells obtained from bulls implanted with zeranol. *J Anim Sci*. 1986; 63: 995–1004.
16. Barth AD, Oko RJ. *Abnormal Morphology of Bovine Spermatozoa*. Ames: Iowa State University Press; 1989.
17. Barth AD, Bowman PA, Gabriel AB, Mapletoft RJ. Effect of narrow sperm head shape on fertility in cattle. *Can Vet J*. 1992; 33: 31–39.
18. Barth AD, Cates WF, Harland RJ. The effect of amount of body fat and loss of fat on breeding soundness classification of beef bulls. *Can Vet J*. 1995;36: 758-764
19. Barth AD. La filosofía de la evaluación de toros: ¿Es importante tomar una muestra de semen? En: *Resúmenes 3er. Simposio Internacional de Reproducción Animal* organizado por el Instituto de Reproducción Animal de Córdoba (IRAC). 1999; 1-7
20. Barth AD, Waldner CL. Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. *Can Vet J*. 2002; 43: 274-284.
21. Barth AD, Brito LFC, Kastelic JP. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*. 2008; 70: 485-494.

22. Barth AD. Managing bull development to optimize fertility. Proceedings, Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Infection. 2012; 17: 121-126
23. Barth AD. Bull breeding soundness. 3rd edition. Saskatchewan: Western Canadian Association of Bovine Practitioners. 2013.
24. Bollwein H, Janett F, Kaske M. Effects of nutrition on sexual development of bulls. Animal Reproduction. 2017; 14: 607–613.
25. Bonamy M. Estudio cuantitativo y molecular de la edad de arribo a la pubertad en la hembra bovina. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2018.
26. Boura-Halfon S, Zick Y. Phosphorylation of IRS proteins, insulin action, and insulin resistance. Am J Physiol Endocrinol Metab. 2009, 296: E581–E591.
27. Bourdon RM, Brinks JS. Scrotal circumference in yearling hereford bulls: adjustment factors, heritabilities and genetic, environmental and phenotypic relationships with growth traits. J. Anim. Sci. 1986; 62: 958-967
28. Bourgon SL, Diel de Amorim M, Chenier T, Sargolzaei M, Miller SP, Martell JE, Montanholi YR. Relationships of nutritional plane and feed efficiency with sexual development and fertility related measures in young beef bulls. Anim Reprod Sci. 2018; 198: 99-111.
29. Boyd GW, Lunstra DD, Corah LR. Serving capacity of crossbred yearling beef bulls. I. Single-sire mating behavior and fertility during average and heavy mating loads at pasture. J Anim Sci. 1989;6 7: 60-71.
30. Brito L, Silva A, Unanian M, Dode M, Barbosa R, Kastelic J. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. Theriogenology. 2004; 62: 1198-1217.
31. Brito L, Barth A, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr., Mir PS, Kastelic JP. Circulating metabolic hormones during the peripubertal period and their association with testicular development in bulls. Reprod Dom Anim. 2007; 42: 502-508.
32. Brito L, Barth A, Wilde R, Kastelic J. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. Theriogenology. 2012; 77: 1398-1405.
33. Brookes AJ. Review: The essence of SNPs. Gene. 1999; 234: 177-186.

34. Butler ML, Bormann JM, Weaber RL, Grieger DM, Rolf MM. Selection for bull fertility: a review. *Transl Anim Sci.* 2019; 4: 423-441.
35. Byrne CJ, Fair S, English AM., Urh, C, Sauerwein H, Crowe M A, Lonergan P, Kenny DA. Effect of breed, plane of nutrition and age on growth, scrotal development, metabolite concentrations and on systemic gonadotropin and testosterone concentrations following a GnRH challenge in young dairy bulls. *Theriogenology.* 2017; 96: 58–68.
36. Campero CM. Servicio con toros jóvenes en el rodeo de cría. *Veterinaria Argentina.* 1998; 15: 272-285.
37. Cardoso F M. Desenvolvimento dos órgãos genitais masculinos de zebu (*Bos indicus*) da raça Nelore, do período fetal aos 36 meses de idade. 1977: 113. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária - UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
38. Carrillo J. Manejo de un rodeo de cría. 2da. Edición. Balcarce, Argentina, Ed. Centro Regional Buenos Aires Sur-INTA, 1997; 1-507
39. Carter AH, Cox EH. Observations on yearling mating of beef cattle. *Proc NZ Soc Anim Prod.* 1973; 33: 94-112.
40. Censo Nacional Agropecuario 2018: resultados definitivos / 1a ed. - Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Instituto Nacional de Estadística y Censos - INDEC, 2021. [Online] https://www.indec.gob.ar/ftp/cuadros/economia/cna2018_resultados_definitivos.pdf
41. Cepica S, Rohrer GA, Knoll A, Masopust M, Malek O. Linkage mapping of four genes (OTC, SERPINA7, SLC25A5, and FMR1) on porcine chromosome X. *Anim Genet* 2001; 32: 106–109.
42. Cerda J, Cifuentes L. Uso de curvas ROC en investigación clínica. Aspectos teórico-prácticos. *Rev Chil Infect.* 2012; 29 : 138-141.
43. Chenoweth PJ, Hopkins FM., Spitzer JC, Larsen RE. Guidelines for using the bull breeding soundness evaluation form. *Theriogenology handbook.* 1993; 10: 1-5.
44. Chenoweth PJ. Selección y manejo de toros. XXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 1997.

45. Chenoweth PJ. Evaluation of natural service bulls--the "other" BSE. *Vet J.* 2004; 168: 211-212.
46. Christmas RA, Spire MF, Sargeant JM, Tucker SK, Moser DW. Genetic relationships among breeding soundness traits in yearling bulls, Kansas Agricultural Experiment Station Research Reports. 2001; 0: 1-3
47. Coen SP, Keogh K, Byrne CJ, Lonergan P, Fair S, Crowe MA, Kenny DA. Effect of plane of nutrition during the first 12 weeks of life on growth, metabolic and reproductive hormone concentrations, and testicular relative mRNA abundance in preweaned Holstein Friesian bull calves. *J Anim Sci.* 2021; 99:1-12
48. Corah L, Kiracofe G, McKee, M, Schalles RR. Evaluating the breeding potential of yearling bulls. Conference: Cattlemen's Day, 1979, Kansas State University, Manhattan, KS, March 3. 1979: 22-24.
49. Coulter GH, Larson LL, Foote RH. Effect of age on testicular growth and consistency of Holstein and Angus bulls. *J Anim Sci.* 1975; 41: 1383-9.
50. Coulter GH, Foote RH. Relationship of body weight to testicular size and consistency in growing holstein bulls. *J. Anim. Sc.* 1977; 44: 1076-1079.
51. Coulter GH, Kozub GC. Testicular development, epididymal sperm reserves and seminal quality in two-year-old Hereford and Angus bulls: effects of two levels of dietary energy. *Journal of Animal Science.* 1984: 432-440.
52. Coulter GH, Carruthers TD, Amann RP, Kozub GC. Testicular development, daily sperm production and epididymal sperm reserves in 15-mo-old Angus and Hereford bulls: effects of bull strain plus dietary energy. *J Anim Sci.* 1987; 64: 254-260.
53. Daftary SS, Gore AC. IGF-1 in the brain as a regulator of reproductive neuroendocrine function. *Exp Biol Med.* 2005; 230: 292-306.
54. Dawson KA. Nutrigenomics: feeding the genes for improved fertility. *Anim Reprod Sci.* 2006; 96: 312-22.
55. Dekkers JC. Commercial application of marker -and gene- assisted selection in livestock: strategies and lessons. *J Anim Sci.* 2004; 82: 313-328.

56. Dogan S, Vargovic P, Oliveira R, Belser LE, Kaya A, Moura A, Sutovsky P Parrish J, Topper E, Memili E. Sperm protamine-status correlates to the fertility of breeding bulls. *Biology of reproduction*. 2015; 92: 1-9.
57. Dongren R, Jun R, Yuyun X, Junwu M, Yanbo W, Yuanmei G, Lusheng H. Mutatuiou in the porcine SERPINA7 gene and its association with boar fertility. *Progress in Natural Science*. 2006; 16: 1111–1114.
58. Ellis RW, Rupp GP, Chenoweth PJ, Cundiff LV, Lunstra DD. Fertility of yearling beef bulls during mating. *Theriogenology*. 2005; 64: 657-78.
59. English AM, Byrne CJ, Cormican, P, Waters SM, Fair S, Kenny DA. Effect of early calf-hood nutrition on the transcriptional regulation of the hypothalamic-pituitary-testicular axis in Holstein-Friesian bull calves. *Scientific reports*. 2018a; 8: 1-10.
60. English AM, Kenny DA, Byrne CJ, Sauerwein H, Urh C, Crowe MA, Staub C, Waters SM, Fair S. Role of early life nutrition on regulating the hypothalamic–anterior pituitary–testicular axis of the bull. *Reproduction*. 2018b; 156: 283-297.
61. Evenson DP, Jost LK. Hydroxyurea exposure alters mouse testicular kinetics and sperm chromatin structure. *Cell Proliferation*. 1993; 26: 147–159.
62. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*. 2007; 1: 47-50.
63. Farid A, Makarechian M, Price MA, Berg RT. Repeatability of reproductive performance of beef bulls as yearlings and two-year-olds at pasture. *Anim Reprod Sci*. 1987; 14: 21-29.
64. Fernández ME, Lirón JP, Prando A, Rogberg Muñoz A, Peral García P, Baldo A, Giovambattista G. Evidence of association of a BTA20 region peaked in ISL1 with puberty in Angus bulls. *Livestock Science*. 2014; 167: 9–18.
65. Feugang JM, Rodriguez-Osorio N, Kaya A, Wang H, Page G, Ostermeier GC, Topper EK, Memili E. Transcriptome analysis of bull spermatozoa: implications for male fertility. *Reprod Biomed Online*. 2010; 21:312–324.

66. Foote R.H. Physiological aspect of artificial insemination. In: Foote RH., Cupps P. (Eds.) Reproduction in domestic animals. 2.ed. New York: Academy Press. 1969; 313-353
67. Fortes MR, Reverter A, Hawken RJ, Bolormaa S, Lehnert SA. Candidate Genes Associated with testicular development, sperm quality, and hormone levels of Inhibin, Luteinizing Hormone, and Insulin-Like Growth Factor 1 in Brahman Bulls. *Biology of Reproduction*. 2012; 87: 1-8.
68. Fortes MR, Deatley KL, Lehnert SA, Burns BM, Reverter A, Hawken RJ, BoeHansen G, Moore SS, Thomas MG. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to highdensity chips and beyond. *Anim Reprod Sci*. 2013; 141: 1-19.
69. Fortes MR, Nguyen LT, Porto Neto LR, Reverter A, Moore SS, Lehnert SA, Thomas MG. Polymorphisms and genes associated with puberty in heifers. *Theriogenology*. 2016; 86: 333-9.
70. Fortes MR, Porto Neto LR, Satake N, Nguyen LT, Freitas AC, Melo TP, Scaletz DCB, Hayes B, Raidan FSS, Reverter A, Boe-Hansen GB. X chromosome variants are associated with male fertility traits in two bovine populations. *Genet Sel Evol*. 2020; 12 52: 1-13.
71. França L R. Desenvolvimento testicular de suínos da raça Piau, do nascimento aos 12 meses de idade. 1987: 79. Dissertação (Mestrado em Morfologia) - Instituto de Ciências Biológicas - UFMG, Belo Horizonte, Brasil
72. Freneau G E. Desenvolvimento reprodutivo de tourinhos Holandeses-PB e mestiços F1 Holandês x Gir desde os seis até os 21 meses de idade (Puberdade e pós puberdade). 1991:194 Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Escola de Veterinária - UFMG, Belo Horizonte, Brasil.
73. Ganguly I, Gaur GK, Kumar S, Mandal DK, Kumar M, Singh U, Kumar S, Sharma A. Differential expression of protamine 1 and 2 genes in mature spermatozoa of normal and motility impaired semen producing crossbred Frieswal (HF×Sahiwal) bulls. *Res Vet Sci*. 2013;94: 256-62.
74. Gaudet M, Fara AG, Beritognolo I., Sabatti M. Allele-Specific PCR in SNP Genotyping. In: Komar, A. (eds) Single Nucleotide Polymorphisms. *Methods in Molecular Biology™*. Humana Press, Totowa, NJ. 2009; 578.

75. Gázquez C, Oriola J, de Mateo S, Vidal Taboada JM, Ballescà JL, Oliva R. A common protamine 1 promoter polymorphism (-190 C->A) correlates with abnormal sperm morphology and increased protamine P1/P2 ratio in infertile patients. *J Androl*. 2008; 29: 540-548.
76. Ge W, Davis ME, Hines HC, Irvin KM, Simmen RC. Association of a genetic marker with blood serum insulin-like growth factor-I concentration and growth traits in Angus cattle. *Journal of Animal Science*. 2001; 79: 1757-1762.
77. Geary TW, Dahlen CR, Zezeski AL. 254 Effects of Nutrition on Bull Fertility. *Journal of Animal Science*. 2021; 99: 136-136.
78. Gill-Sharma MK, Choudhuri J, D'Souza S. Sperm chromatin protamination: an endocrine perspective. *Protein Pept Lett* 2011; 18:786–801.
79. Griffeth, RJ, Bianda V, Nef S. The emerging role of insulin-like growth factors in testis development and function. *Basic and clinical andrology*. 2014; 24: 1-10.
80. Guidelines for using the Bull Breeding Soundness Evaluation Form. In: *Theriogenology Handbook*. Society for Theriogenology; 1993; p. B-10.
81. Guimarães JD, Facioni Guimarães SE, Siqueira JB, Oliveira Pinho R, Pereira Eler J, Bento J, Ferraz S, Silva MR, Borges JC. *Revista Brasileira de Zootecnia* Seleção e manejo reprodutivo de touros zebu. 2011; 40: 379–388.
82. Hamilton TRS, Simões R, Mendes CM, Goissis MD, Nakajima E, Martins EAL, Visintin JA, Assumpção MEOA. Detection of protamine 2 in bovine spermatozoa and testicles. *Andrology*. 2019; 7: 373-381.
83. Heaton MP, Harhay GP, Bennett GL, Stone RT, Grosse WM, Casas E, Keele JW, Smith TPL, Chitko-McKown CG, Laegreid WW. Selection and use of SNP markers for animal identification and paternity analysis in U.S. beef cattle. *Mammalian Genome*. 2002; 13: 272–281.
84. Hirschhorn JN, Daly MJ. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nat Rev Genet*. 2005; 6: 95-108.
85. Holroyd RG, Doogan VJ, De Faveri J, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Vankan DM, Fitzpatrick LA, Jayawardhana GA, Miller RG. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Animal Reproduction Science*. 2002; 71: 67-79.

86. Igboeli G, Rakha A M. Gonadal and extragonadal sperm reserves of indigenous central African bulls. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1971; 25:107-109.
87. Iguchi N, Yang S, Lamb DJ, Hecht NB. An SNP in protamine 1: a possible genetic cause of male infertility? *J Med Genet*. 2006; 43: 382-4.
88. Kanzaki M, Pessin JE. Signal integration and the specificity of insulin action. *Cell Biochem Biophys*. 2001, 35:191–209.
89. Karabinus DS, Vogler CJ, Saacke RG, Evenson DP. Chromatin structural changes in sperm after scrotal insulation of holstein bulls. *J Androl*. 1997; 18: 549–549.
90. Kassari TH, Wikse SE, Jones R. Use of yearling bulls in beef cattle operations. Part I. Economic analysis and fertility assessment. *Compend Contin Educ Pract Vet*. 1996; 18: 1244-1253.
91. Kastelic JP, Wolfe DF. Evaluación de la aptitud reproductiva potencial del toro. XXXV Jornadas Uruguayas de Buiatría. 2007.
92. Kastelic JP. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology*. 2014; 81: 18–23.
93. Kennedy SP, Spitze J C, Hopkins FM, Higdon HL, Bridges W C. Breeding soundness evaluations of 3648 yearling beef bulls using the 1993 Society for Theriogenology guidelines. *Theriogenology*. 2002; 58: 947–961.
94. Kenny DA, Byrne CJ. Review: The effect of nutrition on timing of pubertal onset and subsequent fertility in the bull. *Animal*. 2018; 12: 36-44.
95. Kipper BH, Trevizan JT, Carreira JT, Carvalho IR, Mingoti GZ, Beletti ME, Perri SHV, Franciscato DA, Pierucci, JC, Koivisto MB. Sperm morphometry and chromatin condensation in Nelore bulls of different ages and their effects on IVF. *Theriogenology*. 2017; 87: 154–160.
96. Kishikawa H, Tateno H, Yanagimachi R. Chromosome analysis of BALB/c mouse spermatozoa with normal and abnormal head morphology. *Biol Reprod*. 1999; 61: 809–812.
97. Koziol J, Armstrong C. Society for Theriogenology Manual for Breeding Soundness Examination of Bulls, 2e. Pike Road, AL: Society for Theriogenology. 2018

98. Krassas GE, Papadopoulou F, Tziomalos K, Zeginiadou T, Pontikides K. Hypothyroidism has an adverse effect on human spermatogenesis: A prospective, controlled study. *Thyroid*. 2008; 18: 1255-1259.
99. Lirón JP, Prando AJ, Fernández ME, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Goszczynski DE, Posik DM, Peral-García P, Baldo A, Giovambattista G. Association between GNRHR, LHR and IGF1 polymorphisms and timing of puberty in male Angus cattle. *BMC Genetics*. 2012; 13: 1-6.
100. Lunstra DD, Ford JJ, Echternkamp SE. Puberty in beef bulls: hormone concentrations, growth, testicular development, sperm production and sexual aggressiveness in bulls of different breeds. *J Anim. Sci*. 1978; 46: 1054-1062.
101. Lunstra DD, Echternkamp SE. Puberty in beef bulls: acrosome morphology and semen quality in bulls of different breeds. *J Anim. Sci*. 1982; 55: 638-648.
102. Lunstra DD, Boyd GW, Corah LR. Effects of natural mating stimuli on serum luteinizing hormone, testosterone and estradiol-17 beta in yearling beef bulls. *J Anim Sci*. 1989; 67: 3277-3288.
103. Lyons RE, Loan NT, Dierens L, Fortes MR, Kelly M, McWilliam SS, Li Y, Bunch RJ, Harrison BE, Barendse W, Lehnert SA, Moore SS. Evidence for positive selection of taurine genes within a QTL region on chromosome X associated with testicular size in Australian Brahman cattle. *BMC Genet*. 2014; 15: 1-10.
104. Maj A, Snochowski M, Siadkowska E, Rowinska B, Lisowski P, Robakowska-Hyzorek D, Oprzadek J, Grochowska R, Kochman K, Zwierzchowski L. Polymorphism in genes of growth hormone receptor (GHR) and insulin-like growth factor-1 (IGF1) and its association with both the IGF1 expression in liver and its level in blood in Polish Holstein-Friesian cattle. *Neuroendocrinol Lett*. 2008; 29: 981–989
105. Makarechian M, Farid A, Berg RT. Relationships between growth parameters and scrotal circumference in young beef bulls. *Theriogenology*. 1984; 22: 667–674.

- 106.Makarechian M, Farid A, and Berg R T. Scrotal circumference, semen characteristics, growth parameters and their relationships in young beef bulls. Canadian Journal of Animal Science. 1985; 65: 789-798.
- 107.Makarechian M, Arthur PF. A comparison of natural service fertility of yearling and two-year-old Bulls on pasture. Theriogenology 1993; 39: 835-845.
- 108.McCoard SA, Fahrenkrug SC, Alexander LJ, Freking BA, Rohrer GA, Wise TH, Ford JJ. An integrated comparative map of the porcine X chromosome. Anim Genet 2002; 33: 178–185.
- 109.Menon AG, Barkema HW, Wilde R, Kastelic JP, Thundathil JC. Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. Can J Vet Res. 2011; 75:241-247
- 110.Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. Genetics. 2001; 157: 1819–1829
- 111.Mullis K, Faloona F. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzimol. 1987; 155: 335-350.
- 112.Nonneman D, Rohrer GA, Wise TH, Lunstra DD, Ford JJ. A variant of porcine thyroxine-binding globulin has reduced affinity for thyroxine and is associated with testis size. Biology of reproduction. 2005; 72: 214-220.
- 113.Norman ST. Breeding Soundness Evaluation: Comparative Review of Different Standards. Bovine Reproduction. 2021; 79-97.
- 114.Oliva R, Dixon GH. Vertebrate protamine genes and the histone-to-protamine replacement reaction. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 1991; 40: 25–94.
- 115.Ostermeier GC, Sargeant GA, Yandell BS, Evenson DP, Parrish JJ. Relationship of bull fertility to sperm nuclear shape. J Androl. 2001; 22: 595–603.
- 116.Pardede BP, Agil M, Karja NWK, Sumantri C, Supriatna I, Purwantara B. *PRMI* Gene Expression and Its Protein Abundance in Frozen-Thawed Spermatozoa as Potential Fertility Markers in Breeding Bulls. Veterinary Sciences. 2022; 9: 111.
- 117.Parkinson TJ. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. Vet J. 2004; 168: 215-29.

- 118.Peralta EM. Evolución de la altura a la grupa, peso corporal, circunferencia escrotal y hallazgos clínicos en toros en desarrollo de una cabaña Aberdeen Angus. Monografía del XI Curso de Residencia Interna en Salud Animal. INTA Balcarce. 1999.
- 119.Persson Y, Söderquist L. The Proportion of Beef Bulls in Sweden with Mature Spermograms at 11–13 months of Age. *Reproduction in Domestic Animals*, 2005; 40: 131–135.
- 120.Prando AJ. Estudio de asociación entre marcadores genéticos y precocidad sexual en el macho bovino. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 2015.
- 121.Raadsma HW, Edey TN, Bindon BM, Piper LR. Behaviour and mating performance of paddock-mated beef bulls. *Animal reproduction science*. 1983; 6: 153-165.
- 122.Rawlings N, Evans ACO, Chandolia RK, Bagu ET. Sexual maturation in the bull *Reprod Dom Anim*. 2008; 43: 295-301.
- 123.Rebasa P. Conceptos básicos del análisis de supervivencia. *Cir Esp*. 2005; 78: 222-230
- 124.Reverter A, Johnston DJ, Graser HU, Wolcott ML, Upton WH. Genetic analyses of live-animal ultrasound and abattoir carcass traits in Australian Angus and Hereford cattle. *J Anim Sci*. 2000; 78: 1786-95.
- 125.Rogberg Muñoz A, Cantet RJ, Fernández ME, Lirón JP, Prando A, Birchmeier AN, Giovambattista G. Longitudinal analysis of the effects of IGF1-SnaBI genotypes on the growth curve of Angus bull calves. *Livestock Science*. 2013; 154: 55-59.
- 126.Ronaghi M. Pyrosequencing Sheds Light on DNA Sequencing. *Genome Res* 2001; 11: 3-11.
- 127.Roth MY, Amory JK. Pharmacologic development of male hormonal contraceptive agents. *Clin Pharmacol Ther*. 2011, 89:133–136.
- 128.Rousset F. GENEPOP '007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 2008; 8: 103-106.

- 129.Rutter B, Russo A. Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro. 2006; Ed. Agrovet. 2ª ed.: 1-270.
- 130.Sakkas D, Moffatt O, Manicardi GC, Mariethoz E, Tarozzi N, Bizzaro D. Nature of DNA damage in ejaculated human spermatozoa and the possible involvement of apoptosis. *Biol Reprod.* 2002; 66:1061–1067.
- 131.Schrag N, Larson, RL. Yearling Bull Breeding Soundness Examination. *Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice.* 2016; 32: 465–478.
- 132.Schussler GC. The thyroxine-binding proteins. *Thyroid* 2000; 10:141–149.
- 133.Selvaraju S, Parthipan S, Somashekar L, Binsila BK, Kolte AP, Arangasamy A, Ravindra JP, Krawetz SA. Current status of sperm functional genomics and its diagnostic potential of fertility in bovine (*Bos taurus*). *Syst Biol Reprod Med.* 2018; 64: 484-501.
- 134.Silva JE. Thyroid hormone control of thermogenesis and energy balance. *Thyroid* 1995; 5:481–492.
- 135.Toelle VD, Robison OW. Estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *J. Anim. Sci.* 1985; 60: 89-99
- 136.Tomky DF, Sullins JL, Chenoweth PJ, Pexton JE. Breeding soundness and fertility of beef bulls breeding estrus synchronized females. *Proc West Sect Am Soc Anim Sci.* 1979; 30: 211-214.
- 137.Trenkle A y Willham RL. Beef production efficiency. *Science.* 1977; 198: 1009-1015.
- 138.Tüttelmann F, Křenková P, Römer S, Nestorovic AR, Ljubic M, Štambergová A, MacEk M, MacEk M, Nieschlag E, Gromoll J, Simoni M. A common haplotype of protamine 1 and 2 genes is associated with higher sperm counts. *International Journal of Andrology.* 2010; 33: 240–248.
- 139.Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P, Röpke A. Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE.* 2011; 6: 19426.

140. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, Rozen SG. Primer3- new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* 2012; 40: e115.
141. USDA. 2022. Livestock and poultry: World markets and Trade. [Online] https://apps.fas.usda.gov/psdonline/circulars/livestock_poultry.pdf
142. Viglizzo EF. Sistemas ganaderos y tecnología: Estado actual y prospectiva (Capítulo 2). En: Manejo de la Cría Vacuna en la Región Pampeana. Editorial Hemisferio Sur, Buenos Aires, 2014, p 19-37.
143. Vignal A, Milan D, Sancristobal M, Eggen A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. *Genetics Selection Evolution.* 2002; 34: 275-305.
144. Wagner M, Magagin S, Maia AL. The role of thyroid hormone on testicular development and function. *J Endocrinol.* 2008; 199:351–365.
145. Wagner MS, Wajner SM, Maia AL. Is there a role for thyroid hormone on spermatogenesis? *Microscopy Research and Technique.* 2009; 72: 796–808.
146. Waite RK, Dwyer CJ, Beggs DS, Mansell PD, Stevenson MA, Pyman MF. Scrotal circumference, bodyweight and semen characteristics in growing dairy-breed natural-service bulls in Tasmania, Australia. *N Z Vet J.* 2019; 67: 109-116.
147. Ward WS. Function of sperm chromatin structural elements in fertilization and development. *Mol Hum Reprod.* 2010; 16:30–36.
148. Wiltbank JN. Evaluation of bulls for potential fertility. *Proc Annu Meet Soc Theriogenol, Milwaukee.* 1982; 141-154.
149. Wiltbank JN, Parish NR. Pregnancy rate in cows and heifers bred to bulls selected for semen quality. *Theriogenology* 1986; 25(6): 779–83.
150. Wolf FR, Almquist JO, Hale EB. Prepuberal behavior and puberal characteristics of beef bulls on high nutrient allowance. *J Anim. Sci.* 1965; 24, 761-765.
151. Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution.* 1965; 19: 395-420.

152. Yathish HM., Kumar S, Chaudhary R, Mishra C, Sivakumar A, Kumar A, Mitra A. Nucleotide variability of protamine genes influencing bull sperm motility variables. *Animal reproduction science*. 2018; 193: 126-139.
153. Yilmaz A, Davis ME, Simmen, RCM. Estimation of (co)variance components for reproductive traits in Angus beef cattle divergently selected for blood serum IGF-I concentration. *J Anim Sci*. 2004; 82, 2285-2292.
154. Yoshii T, Kuji N, Komatsu S, Iwahashi K, Tanaka Y, Yoshida H, Wada A, Yoshimura Y. Fine resolution of human sperm nucleoproteins by two-dimensional electrophoresis. *Mol. Hum. Reprod*. 2005; 11: 677–681.