



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**

*Trabajo de Tesis realizado como requisito para optar al título de*  
**DOCTOR EN CIENCIAS VETERINARIAS**

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES  
GENÉTICOS Y PRECOCIDAD SEXUAL EN EL  
MACHO BOVINO**

**Autor: Méd. Vet. Alberto José Prando**

**Director: Dr. Guillermo Giovambattista**

**Codirector: Méd. Vet. Andrés Baldo**

Miembros del Jurado:

**Dr. Luzbel de la Sota**

**Dra. Lilia M. Melucci**

**Dr. Humberto Tríbulo**

La Plata, 29 de ABRIL de 2015

*A mi hermosa familia, a mi esposa Mariana y a  
mis hijos: Agustina, Ignacio, Bautista, Francisco y Belén*

## AGRADECIMIENTOS

- A Andrés Baldo que además de codirector de mi tesis es mi amigo, quien confió plenamente en la factibilidad de llevar adelante este plan de tesis y me orientó, alentó y ayudó permanentemente a lo largo de estos años.
- A Guillermo Giovambattista, mi director de tesis que siempre me acompañó en el desarrollo y ejecución de este proyecto y con quien compartimos una gran pasión por 2 variantes de una misma genética.
- A Luzbel de la Sota, que además de ser jurado, me ayudó con infinita paciencia y dedicación en el diseño de los ensayos y en el análisis e interpretación de los datos.
- A Lilita Melucci, que siempre estuvo a disposición incondicional para consultas de genética bovina y diseños experimentales.
- A Humberto Tríbulo, porque como jurado siempre estuvo disponible a consultas.
- A Pilar Peral García que como directora del IGEVET permitió hacer los trabajos de laboratorio sin ninguna objeción.
- A Pedro Lirón que me ayudó en el desarrollo y conclusión del plan desde el lado de la genómica, aportando otra visión de la genética, pero complementaria.
- A Alicia Antonini que estuvo siempre dispuesta a explicar, sugerir y ayudarme en todo lo relativo a los análisis estadísticos.
- A todo el EQUIPO de PRODUCCIÓN BOVINA: Roberto, Martín, Nicolás, Enrique, Federico, Julieta, Emilio, Jorge, que nos sólo me ayudaron en tareas específicas, sino también me alentaron en momentos difíciles y sobre todo me “cubrieron” cuando yo no podía estar disponible para las tareas habituales del equipo.
- A Alberto Areco, propietario de la cabaña Flores Chicas y un entusiasta de la precocidad sexual, que incondicionalmente puso a disposición los animales y personal de su establecimiento para los muestreos a lo largo de 2 años.
- A Miguel Pertino (h) y Miguel Pertino (padre) propietarios de la cabaña La Trinidad, porque no tuvieron problemas en ayudarme permitiendo hacer parte de los trabajos con sus toritos.
- A Martín de Narbaitz porque además de ayudarme en los trabajos de campo, se transformó en un amigo.

*“The man must measured”*

*“El hombre debe medir”*

**Jan Bonsma**

**LISTADO DE PUBLICACIONES RELATIVAS AL PRESENTE PLAN DE TESIS**

Lirón JP, **Prando A**, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz. A, Posik DM, Baldo A, Peral-García P, Giovambattista. G. Characterization and validation of bovine Gonadotropin releasing hormonereceptor(GNRHR) polymorphisms. Res. Vet. Sci. 2010; doi:10.1016/j.rvsc.2010.09.024. Elsevier.

Lirón JP, **Prando AJ**, Fernández ME, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Goszczinsky D, 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; 13:26 doi: 10.1186/1471-2156-13-26

Fernández ME, Lirón JP, **Prando, AJ**, 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; <http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2014.05.009i>

## ÍNDICE

LISTADO DE ABREVIATURAS.....	IX
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS.....	XI
<b>RESUMEN.....</b>	<b>XIV</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>XV</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1. Los sistemas de cría extensivos en el mundo.....	1
2. Uso de categorías jóvenes.....	3
2.1. Entore precoz de vaquillonas de 15 meses.....	3
2.2. Uso de toritos de 15 meses.....	6
3. Pubertad.....	9
3.1. Fisiología de la pubertad.....	10
3.1. Hipotálamo.....	10
3.1.2. Hipófisis.....	12
3.1.3. Testículos.....	13
3.1.4. Control hormonal del desarrollo sexual.....	24
3.2. Nutrición y pubertad.....	41
3.3. Genotipo, selección genética y pubertad.....	53
<b>OBJETIVOS GENERALES.....</b>	<b>64</b>
<b>OBJETIVOS PARTICULARES.....</b>	<b>64</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>
Animales experimentales.....	65

Animales empleados en el estudio retrospectivo de los.....	65
resultados de la evaluación de pubertad en toritos Angus.	
Animales experimentales empleados para el estudio.....	66
de parámetros fenotípicos de la pubertad en sistemas pastoriles y su asociación con marcadores genéticos.	
Momento en que los animales alcanzan la pubertad.....	67
Determinación de los parámetros fenotípicos relacionados con la pubertad.....	68
Estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación. ....	68
de pubertad en toritos Angus.	
Estudios experimentales de parámetros fenotípicos .....	69
a la pubertad en sistemas pastoriles.	
Obtención de muestras, extracción de ADN y genotipificación por .....	70
pirosecuenciación para los estudios de asociación con marcadores genéticos.	
Medición de la variabilidad genética.....	76
Análisis estadísticos.....	76
Estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación .....	76
de pubertad entoritos Angus.	
Estudios experimentales de parámetros fenotípicos a la pubertad .....	77
en sistemas pastoriles.	
Asociación entre marcadores genéticos y edad de pubertad.....	79
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>81</b>
Relación entre parámetros fenotípicos de pubertad y edad a la pubertad.....	81
Antecedentes selección genética para precocidad: Efecto de la línea genética.....	88
Caracterización de la edad a la pubertad en toritos Angus criados en sistemas .....	89
pastoriles.	
Correlaciones entre edad de pubertad, perímetro escrotal al destete y peso al.....	91
destete.	
Estimación de la edad a la pubertad mediante calidad espermática.....	92
o perímetro escrotal	

Asociación entre marcadores genéticos de genes candidatos y parámetros fenotípicos de la pubertad. ....	95
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>97</b>
Relación entre parámetros fenotípicos de pubertad y edad en toritos Angus.....	97
Antecedentes de precocidad sexual en el rodeo de Flores Chicas.....	103
Caracterización de la edad a la pubertad en toritos Angus criados en sistemas.....	104
pastoriles	
Correlaciones entre edad de pubertad, perímetro escrotal al destete y ..... peso al destete.	105
Estimación de la edad a la pubertad mediante la calidad espermática..... o el perímetro escrotal.	107
Asociación entre marcadores genéticos de genes candidatos y..... parámetros fenotípicos de pubertad.	108
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>121</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>122</b>



## LISTADO DE ABREVIATURAS

- **ABP:** Androgen Bound Protein
- **BHT:** Barrera Hémato-Testicular
- **CC:** Condición Corporal
- **CON:** Concentración espermática
- **EBV:** Estimated Breeding Value
- **FSH:** Follicle Stimulate Hormone
- **GC:** Genes Candidatos
- **GH:** Growth Hormone
- **GH-R:** Receptor de GH
- **GnRH:** Gonadotropin Releasing Hormone
- **GnRHR:** Receptor de GnRH
- **h<sub>e</sub>:** Heterocigocidad esperada
- **IGF-1:** Insulin-like Growth Factor 1
- **IGF-1R:** Insulin-like Growth Factor 1 Receptor
- **IIP:** Intervalo Inicio del Experimento-Pubertad
- **LH:** Luteinizing Hormone
- **LHR:** Receptor de LH
- **Madurez Sexual:** Madurez Sexual
- **MAS:** Selección asistida por marcadores
- **MHE:** Metabolitos Hormonales Endógenos
- **MOT:** Motilidad espermática
- **MS:** Madurez Sexual
- **NPUB:** Toritos No Púberes

- **PD:** Peso al destete
- **PE:** Circunferencia Escrotal
- **PE:** Perímetro Escrotal
- **PED:** Perímetro Escrotal al destete.
- **PMOT:**% de Motilidad espermática
- **PUB:** Toritos Púberes
- **SG:** Selección Genómica
- **SNP:** Single Nucleotide Polymorphism
- **T15M:** Toritos de 15 Meses de Edad

## LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1. Servicio con toritos de 15M en rodeos de cría de diferentes regiones de EE.UU (Kassari y col. 1996).....	6
Tabla 2. Costos por toro comparando el servicio de toros de 15 meses versus toros de 2 años en la vida útil de los mismos (Adaptado de Kassari y col., 1996).....	9
Figura 1. Representación gráfica de un corte histológico transversal de un túbulo seminífero donde se observan células de Sertoli, células de Leydig y espermátidas en diversos estadios (Amann, 1983).....	22
Figura 2. Crecimiento y desarrollo de partes del aparato genital de toritos desde el nacimiento a la pubertad (Adaptado de Rawling y col., 2008).....	23
Figura 3. Patrones temporales de la concentración plasmática de las hormonas reproductivas en relación al desarrollo de toritos desde el nacimiento a la pubertad (Adaptado de Rawling y col., 2008).....	34
Tabla 3. Efecto de distintos niveles de energía en la dieta sobre la edad de arribo a la pubertad en toritos Holstein.....	47
Tabla 4. Medias de edad a la pubertad de diversas razas y cruzas descritas en la bibliografía.....	54
Figura 4. Esquema de flujo de los trabajos de campo realizados en ambas cabañas.....	69
Tabla 6. Listado de SNPs para receptor de GNRH ( <i>GNRHR</i> ) receptor de hormona luteinizante ( <i>LHR</i> ) e insulin-like growth factor 1 ( <i>IGFI</i> ) y su ubicación en genes candidatos.....	72
Figura 5. Esquema de las reacciones que tienen lugar durante el proceso de Pirosecuenciación.....	73
Tabla 7. Secuencias de Primer y temperaturas indicadas para usar en la genotipificación de SNPs mediante la técnica de pirosecuenciación.....	75
Tabla 8. Animales evaluados, cantidad de púberes (PUB) y no púberes (NPUB) con sus respectivas edades para cada año de estudio.....	81
Tabla 9. Concentración espermática ( $10^6/\text{ml}$ ) de los animales púberes (PUB), de los no púberes (NPUB) y de la población total para cada año de estudio.....	82
Tabla 10. Motilidad espermática de la población de animales púberes, no púberes y de la población total para cada año de estudio.....	83

Tabla 11. Distribución anual de toritos púberes y de toritos con motilidad espermática compatible con madurez sexual.....	84
Figura 6. Distribución por edad de toritos púberes con motilidad espermática compatible con madurez sexual.....	84
Tabla 12. Perímetro escrotal (cm) de la población, animales púberes y no púberes para cada año de estudio.....	85
Tabla 13. Distribución por edad de la población total de toritos, de púberes y de no púberes.....	85
Tabla 14. Motilidad espermática (MOT, %), concentración espermática (CON, $\times 10^6$ esp/ml) y perímetro escrotal (PE, cm) de toritos púberes, toritos no púberes y la población total en cada una de las quincenas de edad.....	86
Tabla 15. Distribución para cada quincena de los toritos no púberes (NPUB) según causa determinante por la cual no arribaron a la pubertad: motilidad espermática (MOT), concentración espermática (CON), o ambas.....	87
Tabla 16. Total de animales por quincena con motilidad (MOT) compatible con madurez sexual (MS) y su % respecto al número de toritos por quincena.....	87
Tabla 17. Ranking de líneas genéticas de toros padres en función de la edad de pubertad de sus hijos.....	88
Tabla 18. Ranking de toros padres según la edad de pubertad de sus hijos.....	89
Tabla 19. Edad, peso vivo y perímetro escrotal al inicio de la pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$ esp/ml) y la motilidad (10%), de los toritos de Flores Chicas y La Trinidad para el año 2009 (media $\pm$ DE).....	90
Tabla 20. Edad, peso vivo y perímetro escrotal al inicio de la pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$ esp/ml) y motilidad (10%), en los toritos de Flores Chicas para los años 2009 y 2010 (media $\pm$ DE).....	90
Tabla 21. Peso al destete, perímetro escrotal y edad de pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$ esp/ml) y motilidad (10%), de Flores Chicas, de La Trinidad del total para el año 2009.....	92
Tabla 22. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), porcentaje de motilidad (PMOT) peso y edad a la pubertad en toritos estimados por la definición de Wolf y col. (1965) o Lunstra y col. (1978).....	92

- Tabla 23. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), peso y edad a la pubertad estimados por la definición de Lunstra y col. (1978) en toritos precoces y tardíos.....93
- Figura 7. Análisis de supervivencia para el efecto del inicio de la pubertad en toritos precoces y tardíos utilizando como valor de corte un PE>28 cm (n=270). Mediana para los toros precoces 34 días y para los toros tardíos 125 días.....93
- Tabla 24. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), peso y edad a la pubertad estimados por la definición de Wolf y col. (1965) en toritos precoces y tardíos.....94
- Figura 8. Análisis de supervivencia para el efecto del inicio de la pubertad en toritos precoces y tardíos utilizando como valor de corte un PMOT>10% y una CON >50x10<sup>6</sup> (n=269). Mediana para los toros precoces 34 d y para los toros tardíos 125d. ....94
- Tabla 25. Edad de pubertad promedio estimada y error estándar (ES) en días, para los genotipos de los SNPs LHR-I499L y IGF1-SnaBI y del haplotipo de GNRHR; valor de P para los efectos genotípicos en el modelo aquí presentado para las 2 definiciones de edad de pubertad: 1) estimada a 28 cm de perímetro escrotal, y 2) estimada a partir de 10% de motilidad y 50 x 10<sup>6</sup> esp/ml.....96

## RESUMEN

Los toritos de 12-15 meses en sistemas de cría bajo condiciones extensivas, son tan eficientes como los toros de 2 años, su desempeño exitoso en la primera temporada de apareamientos depende de la calidad y cantidad del semen. Existe variabilidad para la edad de inicio de la pubertad, entre y dentro de razas.

Sería importante incluir en programas de selección genética a la precocidad sexual, mediante mediciones fenotípicas, evaluaciones genéticas y marcadores genéticos. Estos últimos permitirían detectar tempranamente aquellos animales sexualmente precoces y además mejorar las evaluaciones genéticas cuantitativas tradicionales.

Se establecieron los siguientes objetivos de trabajo: 1) Describir la variable fenotípica pubertad en machos bovinos en las condiciones de los sistemas pastoriles en la Argentina. 2) Estudiar la asociación entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos relacionados con la precocidad sexual en el macho bovino.

Las definiciones de pubertad consideradas en este estudio fueron: a) Cuando el eyaculado de los toritos presenta una concentración de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por mililitro y 10% de motilidad lineal (Wolf y col., 1965); b) Momento en el cual el perímetro escrotal ha alcanzado los  $27,9 \pm 0,2$  cm, independientemente de la raza y el peso vivo (Lunstra y col., 1978).

Se emplearon para un análisis retrospectivo los registros históricos de las evaluaciones anuales de precocidad sexual de 1269 toritos Angus de una cabaña. Con un segundo grupo de 286 toritos Angus, se realizaron las determinaciones experimentales para describir el aspecto fenotípico de la pubertad en sistemas de producción característicos de la Argentina y realizar los estudios de asociación con los marcadores genéticos

Se analizaron: a) Las diferencias para edad, peso vivo y perímetro escrotal estimadas al momento de la pubertad; b) las correlaciones entre edad a la pubertad, edad de la madre, peso a los 300 días y perímetro escrotal a la pubertad; c) las correlaciones entre edad a la pubertad, peso al destete y perímetro escrotal al destete y d) las diferencias en el cálculo de las edades a la pubertad establecidas acorde a las definiciones consideradas.

Para los estudios de asociación entre marcadores genéticos y caracteres de pubertad sexual, se seleccionaron 4 polimorfismos de nucleótido simple o SNPs, localizados en 3 genes candidatos: dos SNPs en GNRHR, uno en LHR y uno en IGF1. Para su genotipificación se utilizó la tecnología de pirosecuenciación. La asociación entre variables fenotípicas y genotipos fue determinada mediante un modelo lineal mixto.

Como resultado del presente trabajo de tesis se arribó a las siguientes conclusiones:

La concentración espermática no sería la principal variable limitante según la definición propuesta por Wolf y col. (1965), mientras que la motilidad espermática parecería ser la variable crítica.

Existe variabilidad entre la progenie de las distintas líneas genéticas respecto a edad y perímetro escrotal al inicio de la pubertad, lo que permite seleccionar genéticamente por precocidad sexual.

El perímetro escrotal al destete podría usarse para seleccionar por precocidad sexual debido a la existencia de una correlación fenotípica negativa edad de pubertad.

El perímetro escrotal podría usarse como un buen predictor de la pubertad en toritos criados en sistemas pastoriles. El SNP IGF1SnaBI estuvo significativamente asociado con edad a la pubertad determinada a partir de los 28 cm de perímetro escrotal.

**Palabras clave: pubertad – marcadores genéticos – toritos- precocidad sexual**

## SUMMARY

Bulls with 12-15 months of age, rear under extensive situations, are so efficient like 2 years old Bulls, their successful performance at their first breeding season depends on the semen quality and quantity. There is some variability between and within breeds at the arrive of puberty.

It could be important to include in genetic selection programs the sexual precocity, using phenotypic measurements, genetic evaluations and genetic markers. The latter could permit detection of animals who has early sexual development and also improve traditional and quantitative genetic evaluations.

The main goals of this work were: 1) to define the phenotypic variability puberty in bulls under extensive situations in Argentina. 2) to define the association between genetic markers and phenotypic characters and sexual precocity in bulls.

Puberty definitions consider in this work were: a) when the bull ejaculate presents a concentration of  $50 \times 10^6$  sperms/ml and 10% of linear motility (Wolf y col., 1965); b) time when scrotal perimeter rise  $27,9 \pm 0,2$  cm, without contemplating breed and animal weight. (Lunstra y col., 1978).

Data from 1269 bulls from a single herd were used to make a retrospective analysis. With 286 bulls from a second group, experimental determinations were made to describe phenotypic aspect of puberty under the Argentinian livestock production systems and stimulated relationship with genetic markers.

There were analyzed: a) age, live weight and scrotal perimeter differences stimulated at puberty age; b) correlations between age at puberty, mothers age, body weight at 300 days and scrotal perimeter at puberty; c) correlations between puberty age, weaning weight and scrotal perimeter at weaning time and d) differences during age at puberty calculate established by considered definitions.

To study the association between genetic markers and sexual puberty characters, 4 single nucleotide polymorphisms or SNPs were selected, located in 3 candidate genes: two SNPs in GNRHR, one in LHR and one in IGF1. For their genotyping pyrosequencing technology was used. The association between phenotypic variations and genotypics was determined by a linear mix model.

As result of the present thesis work we got the following conclusions:

Spermatic concentration would not be the main limitation as Wolf y col. (1965) proposed; instead spermatic motility seems to be the critical variable.

There is variability between progeny of the different genetic breeds respect age and scrotal perimeter at the beginning of puberty, that can be used to chose genetically by sexual precocity.

Scrotal perimeter at weaning time could be used to select animals by sexual precocity because there is a negative phenotypic correlation between at puberty age.

Scrotal perimeter could also be used as a good predictor tool of puberty in bulls reared on grazing systems. The IGF1SnBI SNP was significantly associated to age of puberty determined from 28 cm of scrotal perimeter.

**Key words: puberty – genetics markers- calf bulls-sexual precocity**

## INTRODUCCIÓN

### 1. Los sistemas de cría extensivos en el mundo

La rentabilidad de la actividad cría es directamente dependiente de la productividad, basada en la cantidad de animales destetados anualmente. De esto surge, la necesidad de lograr la mayor cantidad de terneros, por vaca y por año. Para cumplir con esta meta es necesario contar con la máxima fertilidad, capacidad de dejar descendencia del rodeo (Robert, 1979), y la mayor supervivencia de terneros (Kealey, 2004). La fertilidad claramente es la llave de la productividad de los sistemas de cría extensivos (Glaze, 2011; Johnston, 2011; Kealey, y col., 2006; Makarechian y Arthur 1993; Sheepers y col., 2010). Esta importancia relativa frente a otros parámetros se visualiza claramente en la proporción que indica que la fertilidad es 5 veces más importante que el crecimiento y 10 veces más que la calidad de carcasa (Trenkle y Wilham 1977; Palasz y col., 1994).

De esto se desprende que siendo la cría un sistema de poca eficiencia biológica, pero necesaria por ser el inicio de la cadena productiva de la carne bovina, que la forma de mejorarla es mediante aquellos ítems que potencien a la fertilidad a su máxima expresión, sea a través de la nutrición, genética, manejo reproductivo, sanidad, etc.

En todos los países con cría extensiva, la tendencia es ir hacia un marcado estacionamiento de la época de servicios. La meta es no superar un periodo de duración mayor a 90 días, existiendo en EE.UU propuestas de sólo 60 días (Carrillo, 1998; Rovira, 2000). La época del entore constituye el punto crítico más importante de la actividad cría, porque de ella derivarán los tiempos de parición, destete, diagnóstico de preñez, ventas, etc.; y naturalmente, la productividad y rentabilidad del sistema (Carrillo, 1998). Al ser estricta la duración del periodo reproductivo, están claramente delimitadas las



oportunidades que cada vientre tendrá de preñarse, si se tiene en cuenta que cada ciclo estral dura 21 días. Por esto, se busca lograr la mayor cantidad de preñeces posibles en los primeros 21 días de entore, para lograr una alta proporción de nacimientos en las primeras 3 semanas de parición. En función de esto, se estima una disminución en casi 23 kg en el potencial de peso al destete, por cada 21 días que se atrasa la parición (Campero, 1998). Si se logra un mayor peso de los animales de destete, los machos serán más pesados para la venta (sinónimo de más ingresos), en tanto que las terneras de reposición se podrán elegir a partir de lotes mejor desarrollados (Kealey, 2004). También, al concentrarse el mayor número de preñeces al inicio del servicio, el periodo posparto subsiguiente de los vientres será más largo garantizándose que esas hembras tengan actividad ovárica y queden preñadas nuevamente al inicio del entore inmediato. (Campero, 1998)

En aquellos sistemas con entore ya estacionado es lógico pensar que los vientres llegarán al mismo con 60-70 días post-parto y en plena lactancia, muchos de ellos en el pico de producción láctea. Debido a esto es necesario proveer buenos niveles nutricionales a partir del parto para evitar grandes pérdidas de condición corporal logrando que las hembras manifiesten actividad ovárica y retengan servicio lo antes posible una vez arrancado el mismo.

El destete, que normalmente ocurre cuando los terneros tienen entre 6 y 10 meses de edad, es otra herramienta que se utiliza para hacer más eficiente el manejo nutricional del rodeo. Esto sucede porque la interrupción de la lactancia evita que la madre pierda excesiva condición corporal, debido a la energía usada en la producción de leche, y corra el riesgo de llegar en anastro nutricional al próximo servicio (Carrillo, 1998).

## **2. Uso de categorías jóvenes**

Coincidentemente, en todos los países con ganadería extensiva, se ha buscado una mayor eficiencia en sus sistemas de cría incorporando, lo antes posible a la reproducción, a las categorías jóvenes, tanto machos como hembras. Así se ha promovido el servicio precoz de vaquillonas y el uso como reproductores de toritos jóvenes, en ambos casos a partir de una edad promedio cercana a los 15 meses. Como consecuencia de esto, la precocidad sexual se constituyó en una condición imprescindible para estos planteos productivos, haciendo que la edad de arribo a la pubertad, indicadora de dicha precocidad sexual, se transformara en una característica reproductiva relevante (Albuquerque y Baldi, 2011).

En términos generales, la pubertad es el momento en el cual un animal está capacitado para liberar gametos y demostrar un comportamiento sexual con secuencias completas. La pubertad es la consecuencia inexorable del desarrollo, maduración e interacción paulatina, del eje hipotálamo-hipofisario y las gónadas. Esto implica un aumento gradual de la actividad gonadotrófica y de las funciones de esteroidegénesis y de gametogénesis por parte de los ovarios o testículos (Hafez, 2000; Evans y Rawlings, 2009).

### **2.1. Entore precoz de vaquillonas a 15 meses de edad**

Cuando en los sistemas de cría se implementa un entore anticipado de las vaquillonas se obtienen los siguientes beneficios:

- a) Aumenta el número posible de terneros a obtener por vientre a lo largo de su vida útil (Carrillo, 1998; Soarez de Lima, 2009; Albuquerque y Baldi, 2011).
- b) El ternero extra que se obtiene por vaquillona entorada permite un giro más rápido de los capitales (Morris y col., 2000).

- c) Mejora la relación vientres productivos/animales totales del rodeo porque desaparece del sistema una categoría de recría (Carrillo, 1998; Pereyra Gomes de Freitas, 2005).
- d) Aumenta el número de los terneros logrados sobre el total de vientres del rodeo (Pereyra Gomes de Freitas, 2005).
- e) En el mismo año que las vaquillonas se destetan se pueden entorar (Carrillo, 1998). El lote de vaquillonas puede recibir servicio en la misma época de las vacas multíparas (Carrillo, 1998).
- f) Los costos sanitarios y de alimentación son menores al terminar la recría antes (Soarez de Lima, 2009).
- g) Disminuye el costo energético por unidad de producto logrado, kg de ternero al destete (Pereyra Gomes de Freitas, 2005; Albuquerque y Baldi, 2011).
- h) Se liberan potreros para las vacas multíparas. (Albuquerque y Baldi, 2011).
- i) Se acorta el intervalo generacional (Pereyra Gomes de Freitas, 2005).
- j) Aumenta el progreso genético (Pereyra Gomes de Freitas, 2005).

Para que las vaquillonas puedan quedar preñadas a los 15 meses de vida es necesario que lleguen con una actividad ovárica adecuada, con buena ciclicidad, lo cual ocurrirá si previamente alcanzaron satisfactoriamente la pubertad (Bagley, 1993; Rovira, 2000; Soarez de Lima, 2009). La misma ha sido definida para el caso de la hembra bovina cuando:

- Manifiestan su primer comportamiento de estro (Mialon, 2000; Morris y col., 2000).

- Se detecta una concentración de progesterona en plasma  $\geq 1$  ng/ml, lo cual indica que el animal tuvo su primera ovulación y por ende su arribo a la pubertad (Honaramooz y col., 1999).
- Se detecta mediante la técnica de ultrasonido el primer cuerpo lúteo en uno de los ovarios, lo cual indica funcionalidad de esos órganos (Honaramooz y col., 2006; Johnston, 2009).

Al peso vivo se lo considera un factor crucial en la determinación de la edad a la pubertad en las vaquillonas y la nutrición cumple un rol importantísimo en eso. Muchas investigaciones han estudiado la relación entre edad, peso y arribo a la pubertad en vaquillonas, concluyéndose que es necesaria la interacción de los dos para llegar a la misma. Esto en gran medida se debe a que ese peso umbral es consecuencia de una serie de eventos fisiológicos que se irán dando en la medida que crezca el animal, que entre otras cosas permita la maduración del aparato reproductor. Últimamente, se ha definido que también el nivel de tejido adiposo subcutáneo tendría influencia en la edad en la cual las vaquillonas arriban a la pubertad y que sería determinante en el índice de concepción al primer servicio. (Evans y Rawlings, 2009; Albuquerque, 2011)

Si la hembra ya es púber cuando se inicia el periodo reproductivo, se garantiza que tenga una correcta actividad ovárica, lo cual redundará en una preñez temprana. De este modo, la vaquillona preñada al inicio del entore parirá su primer ternero al comienzo de la parición, tendrá un post-parto más largo y por ende más posibilidades de quedar preñada en su segundo servicio, también en forma temprana y así sucesivamente. (Vargas y col., 1998; Soarez de Lima, 2009).

## 2.2. Uso de toritos de 15 meses

Ya a principios del siglo XX, en EE.UU se promovía el uso de toritos de 15 meses como reproductores para servicio natural en las principales áreas ganaderas. Pero por muchos años los productores de aquel país los desecharon frente a la opción de los toros de 2 años. Se argumentaba que esos toritos jóvenes no podían soportar el servicio natural en condiciones extensivas y que producían pocos terneros.

Pero a partir de la década de 1970, en EE.UU la situación comienza a revertirse a partir de investigaciones y difusión de información sobre el uso de toritos jóvenes, que paulatinamente fueron eliminando los prejuicios que tenían los ganaderos sobre ellos.

Actualmente, tanto en EE.UU como en Canadá la utilización de los toritos de 15 meses es una práctica habitual, aunque variable de acuerdo al área ganadera específica (Kassari y col., 1996) (Tabla 1).

Tabla 1. Servicio con toritos de 15M en rodeos de cría de diferentes regiones de EE.UU (Kassari y col. 1996).

Región	% de rodeos que usan toritos de 15 meses	% de vientres/total de EE.UU
Noroeste	67	10,5
Sudoeste	69,8	8,6
Central Norte	75,6	17,0
Central Sur	61,2	36,3
Nordeste	56,2	11,3
Sudeste	64,6	16,3
Total	63,3	100

Respecto al uso de toritos de 15 meses en la Argentina, se comenzaron a utilizar en la década de 1980, y si bien en la década de 1990 fue la que marcó el inicio de su empleo más extendido, esto ocurrió básicamente dentro de las razas británicas (Campero, 1998). El

empleo de toritos de 15 meses en el mercado argentino nunca ha llegado a generalizarse como en otros países, como por ejemplo EE.UU (Kassari y col., 1996).

La incorporación de los toritos de 15 meses como reproductores normalmente está en manos de empresas líderes del sector, que buscan hacer más eficiente el sistema productivo (Brito y col., 2011). La incorporación de esta categoría de reproductores jóvenes a los rodeos es avalada por trabajos de investigación. Los mismos demuestran que resultados que se obtienen al usarse en servicio toritos de 15 meses son similares a los que se alcanzan con toros de 2 años o más edad. (Farid y col., 1987; Makarechian y Arthur, 1993; Neville, 1989). El uso de toritos de 15 meses como reproductores conlleva una serie de ventajas respecto a los toros de 2 años:

- Económicas: Al analizarse la rentabilidad de los sistemas de cría todos los gastos relativos al rubro toros tienen importante influencia sobre el costo de cada kg/ternero producido/año, vientre/entorado o vientre/preñado (Rathmann, 2005). Cuando se utilizan toritos de 15 meses los costos pueden disminuir porque hay un alargamiento de la vida útil de los mismos, a partir del servicio extra que tienen respecto a los toros de 2 años y porque su precio de compra es menor (Arteaga y col., 2001; Barth y Ominsky, 2000; Barth y col., 2008; Barth, 2011; Campero, 1998; Cummins, 2005; Kassari y col., 1996; Makarechian, 1993; Tabla 2).
- Genéticas: Los toros son los responsables de incorporar el mayor bagaje de mejora genética (facilidad de partos, crecimiento, fertilidad, calidad de carcasa, etc.) en planteos comerciales que ayudan a aumentar su rentabilidad (CRC, Reporte Anual 2010-2011; Vale Filho, 2011). De hecho se calcula que el 87,5% de los genes que ingresan a un rodeo lo hacen en 3 generaciones a través de la línea paterna (Nicol,

2005). De esto se desprende, que si se usan toritos de 15 meses como reproductores, se acorta el intervalo generacional respecto de los machos de 2 años, aumentando el progreso genético y la presión de selección sobre el rodeo (Albuquerque y Baldi, 2011; Cummins, 2005; Barth y col., 2008; Barth, 2011; Brito y col., 2004; Brito y col., 2012; Marakechian y col., 1983; Farid y col., 1987; Makarechian, 1993). Además, la disponibilidad de tecnologías como la inseminación artificial y las Diferencias Esperadas de Progenie o DEPs de inicio de pubertad de las pruebas de progenie promovieron implícitamente la utilización de los toritos de 15 meses, especialmente en las cabañas (Casas y col., 2007; Lunstra y Cundiff, 2003).

Tabla 2. Costos por toro comparando el servicio de toros de 15 meses versus toros de 2 años en la vida útil de los mismos (Adaptado de Kassari y col., 1996).

Edad de los toros	Uso tradicional <sup>(a)</sup>		Uso intensivo <sup>(b)</sup>	
	2 años	15 meses	2 años	15 meses
<i>Costos anuales variables</i>				
Pasturas	110,88	110,88	110,88	110,88
Heno	112,50	112,50	112,50	112,50
Residuos de cosecha	18,00	18,00	18,00	18,00
Suplementos	16,87	16,87	16,87	16,87
Sal/Minerales	12,00	12,80	12,80	12,80
Gastos veterinarios/Sanidad	15,75	15,75	45,75	45,75
Varios	7,00	7,00	7,00	7,00
Reparaciones	23,00	23,00	23,00	23,00
Trabajo	72,00	72,00	72,00	72,00
Intereses	19,44	19,44	20,94	20,94
<i>Total costos anuales variables</i>	<i>408,24</i>	<i>408,24</i>	<i>439,74</i>	<i>439,74</i>
<i>Costos anuales fijos</i>				
Depreciación de las instalaciones	15,00	15,00	15,00	15,00
Depreciación del toro	487,50	270,00	487,50	270,00
Intereses	172,50	142,50	172,50	142,50
Pérdidas por muerte	27,00	21,00	27,00	21,00
<i>Total costos anuales fijos</i>	<i>702</i>	<i>448,5</i>	<i>702</i>	<i>448,5</i>
<i>Costo anual total por toro</i>	<i>1110,24</i>	<i>856,74</i>	<i>1141,74</i>	<i>888,24</i>
Nro temporadas de servicios	4	5	4	5
Costo total de por vida por toro	4440,96	4283,70	4566,96	4441,20
Nro total Vacas que el toro sirve en su vida útil	120	140	160	190
Costo de toro por vaca en servicio	37,00	30,00	28,54	23,37
<i>Diferencia en costo de toro por vaca en servicio</i>	<i>6,40</i>		<i>5,17</i>	

La totalidad de los valores están expresados en US\$

<sup>a</sup>Servicio tradicional: 30 vacas por toro de 2 años durante 4 servicios; 20 vacas por toro de 15 meses durante el primer año y luego 4 servicios adicionales con 30 vacas

<sup>b</sup>Servicio intensivo: 40 vacas por toro de 2 años durante 4 servicios; 30 vacas por toro de 15 meses durante el primer año y luego 4 servicios adicionales con 40 vacas

Valor de compra de los toros: US\$2100,00 para los de 15M y US\$2700,00 para los de 2 años.

### 3. Pubertad

Para lograr tener éxito y acceder a las ventajas y beneficios antes mencionados al usar toritos de 15 meses es necesario que los mismos al inicio de la temporada de apareamientos ya hubiesen alcanzado la madurez sexual. Esto implica que deberán tener



comportamiento sexual normal, adecuada morfología testicular, producción espermática satisfactoria, actividad hormonal correcta y buena conformación física. Por lo tanto, como paso previo es necesario que los toritos arriben a la pubertad a la menor edad posible (Barth y col., 2008; Chenoweth, 2011; Silva Mena, 1997).

En los toritos el momento de arribo a la pubertad se define como:

a) Cuando el eyaculado presenta una concentración de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por mililitro y 10% de motilidad lineal (Wolf y col., 1965).

b) cuando el perímetro escrotal ha alcanzado los  $27,9 \pm 0,2$  cm, independientemente de la raza y el peso vivo (Lunstra y col., 1978).

### **3.1. Fisiología de la Pubertad**

En los mamíferos el desarrollo reproductivo es controlado por la interacción entre los altos centros cerebrales, el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas (Bagu, 2006).

#### **3.1.1. Hipotálamo**

El origen embrionario es diencefálico, y anatómicamente está localizado entre el tercer ventrículo y la lámina terminal (límite interno), tálamo (límite superior) y globo pálido, cápsula interna, región subtalámica y pedúnculos cerebrales (límite posterior y lateral). El hipotálamo mediante el tracto hipotálamo-hipofisario tiene conexiones neurales con el lóbulo posterior de la hipófisis, al tiempo que se une vascularmente con el lóbulo anterior de la hipófisis. El flujo sanguíneo ingresa a la hipófisis mediante las arterias hipofisarias superior e inferior. La primera se ramifica en capilares, los cuales forman asas sobre la eminencia media y la pars nerviosa. La sangre arterial que transportan estos

capilares es volcada al sistema porta hipotálamo-hipofisario. Finalmente, la sangre vuelve al hipotálamo por intermedio del sistema venoso retrógrado, sin pasar por el corazón. Este mecanismo permite que las neurohormonas secretadas por el hipotálamo lleguen hasta la hipófisis y en sentido inverso, hay una potente retroalimentación hormonal negativa, que hace que la propia hipófisis pueda regular la actividad hipotalámica (Getty, 1982; Sánchez, 1985).

Las células secretoras del hipotálamo son dos tipos de neuronas, las parvocélulas y las magnocélulas. Las mismas se caracterizan porque tienen un axón amielínico el cual termina en contacto directo con los capilares sanguíneos. Los organoides de estas células con más desarrollo, son los típicos de una importante actividad secretoria con muchas mitocondrias, retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi. Los productos de secreción se almacenan en forma de gránulos, los cuales se desplazan desde el pericarion hacia el extremo del axón donde se van acumulando, hasta ser secretados. La excreción de las neurohormonas se hace por exocitosis hacia el torrente del capilar sanguíneo. Desde el punto de vista reproductivo las principales hormonas hipotalámicas son la GnRH, ACTH, factor inhibidor de la prolactina, vasopresina y oxitocina (Sánchez y col., 1985).

No obstante lo dicho en el párrafo anterior, por la importancia relativa de la GnRH en el desarrollo sexual de los toritos la focalización temática será en ella. La GnRH es un decapeptido, que es sintetizado y almacenado en el hipotálamo basal medio. Su función específica es estimular la secreción de LH y FSH por parte de la hipófisis. Con respecto al hipotálamo y a la GnRH, hay que destacar que forman parte del Sensor Metabólico, el cual es un enlace humoral entre los sistemas nervioso y endocrino con el que cuentan los mamíferos para garantizar la reproducción y/o la supervivencia de la especie. Por eso,

cuando llegan a dicho sensor señales periféricas a través de los metabolitos hormonales endócrinos referidas al balance energético, se disparan señales nerviosas que inducen la secreción o no de GnRH al sistema porta hipofisario, que hará que a su vez la hipófisis libere o no LH y FSH (Sánchez y col., 1985; Hafez, 2000; Brito, 2006).

### **3.1.2. Hipófisis**

Esta glándula en su desarrollo embrionario tiene dos orígenes:

a) Adenohipófisis que se desarrolla a partir de una invaginación del ectodermo a la altura de la bolsa faríngea.

b) Neurohipófisis que se desarrolla de una invaginación del canal neural (Sánchez y col., 1985).

La hipófisis se sitúa anatómicamente en la silla turca que es una depresión ósea en la base del cerebro. A la adenohipófisis llegan directamente desde el hipotálamo los vasos sanguíneos del sistema porta hipotálamo-hipofisario que transportan los factores liberadores de hormonas (factores de liberación). Al mismo tiempo, la adenohipófisis es irrigada por las arterias hipofisarias superiores que terminan en capilares que a su vez terminan en el sistema porta glandular y en contacto con axones neuronales. Por su parte la neurohipófisis está vascularizada por las arterias hipofisarias inferiores. En la adenohipófisis los tipos celulares existentes se clasifican de acuerdo al tipo de hormona que producen: adenocorticotrópicas (ACTH), mamotrópicas (prolactina), somatotrópicas (GH), tirotrópicas (TSH) y gonadotrópicas (FSH y LH) (Sánchez y col., 1985).

Las células gonadotrópicas se caracterizan porque su forma es alargada o poliédrica. En su interior se identifican por tinciones específicas o por visualización al microscopio

electrónico, numerosos gránulos de glucoproteínas, acorde a la naturaleza de la FSH y LH (Geneser, 1992)

Las dos hormonas gonadotróficas, son de naturaleza glicoproteica y están involucradas en la fisiología testicular, actuando en el epitelio germinal, en los tubos seminíferos y en el espacio intersticial (Sánchez y col., 1985; Hafez, 2000).

### **3.1.3. Testículos**

Desarrollo embrionario y fetal del testículo.

Los mamíferos poseen su fenotipo y conducta sexual determinados durante la organogénesis embrionaria, 13 a 45 días post-fecundación. La diferenciación de los sexos es un proceso secuencial controlado primero por factores genéticos (cromosoma *Y-sexo masculino* y cromosoma *X-sexo femenino*) y luego endocrinos, para el caso específico del macho, dado que la hembra no tiene necesidad de una acción hormonal específica. Los machos en la etapa embrionaria muy temprana poseen esbozos de los conductos genitales masculinos (o de Wolff) y los conductos femeninos (o de Müller). Los testículos fetales secretan andrógenos (fundamentalmente androsteniona) que promueven el desarrollo de los órganos masculinos y la hormona inhibidora de los conductos de Müller o antimüllerina (AMH) que anula el desarrollo de todo vestigio femenino.

Durante la etapa embrionaria las gónadas masculinas se desarrollan en el interior del abdomen en posición medial respecto al riñón, como un engrosamiento celómico o crestas gonadales. Estas crestas luego son invadidas por células germinales primordiales que llegan desde el saco vitelino, a través del intestino primitivo y mesenterio dorsal. Posteriormente, se produce la proliferación de las crestas gonadales que dan origen a los cordones

epiteliales, que se profundizan en el tejido mesenquimático. Hasta este punto el desarrollo testicular es común al de las gónadas femeninas. Luego, los cordones epiteliales a partir de la determinación genética masculina del embrión, se modifican dando origen a la *rete testis*. El tejido mesenquimático circundante forma la túnica albugínea. Las células germinales primordiales invaden el interior de los cordones epiteliales, que desde ahí se llaman cordones sexuales. Entre los 50 a 80 días post-fecundación las células germinales atraviesan una intensa división y proliferación, para luego entrar en la fase G0 ó G1, manteniéndose sin mitosis hasta después del nacimiento. Los cordones sexuales tienen célula germinal (gonocitos) en posición central y periféricamente células de sostén y una membrana basal. El tejido mesodérmico que queda entre los cordones sexuales se transforma en el tejido intersticial. Cada uno de esos cordones sexuales termina uniéndose a la *rete testis*, la cual vía vasos eferentes termina en el epidídimo.

En la segunda mitad de gestación y periodo postnatal temprano, el testículo de los toritos no sufre grandes modificaciones, salvo un lento crecimiento constante. Cada testículo está formado por una túnica albugínea externa fibrosa que contiene estroma muy vascularizado donde se encuentran células de Leydig condensadas y cordones sexuales sólidos, formados por una membrana basal, células de sostén y célula germinal. La producción de andrógenos por parte de las células de Leydig fetales está representada mayoritariamente por androsteniona, dado que la testosterona aun se produce en poca cantidad.

Inclusive en el periodo perinatal la concentración de esta hormona es baja, manteniéndose así hasta los 5 meses aproximadamente, momento en el empieza a aumentar

hasta llegar a los niveles de los toros adultos. (Sánchez y col., 1985; Hafez, 2000; Bagu, 2006; Brito, 2006).

En el toro el desplazamiento de sus gónadas a través de la cavidad abdominal fetal hacia los rudimentos escrotales se denomina descenso testicular. Por eso a medida que avanza el crecimiento del feto, el testículo se dirige hacia caudal dentro del abdomen, hasta llegar al anillo inguinal profundo, para dirigirse luego al anillo inguinal superficial. Inmediatamente el testículo ingresa y baja hasta el fondo del escroto, siguiendo el recorrido del *gubernaculum testis*, que es un ligamento fibroso recubierto en una invaginación de peritoneo abdominal. En los fetos de machos bovinos el descenso de las gónadas ocurre alrededor del cuarto mes de gestación.

#### Desarrollo postnatal del Testículo

En los testículos de los toritos los tipos de células intertubulares son: a) mesenquimáticas, b) fibroblastos, c) células de Leydig, d) contráctiles peritubulares y mononucleares.

##### a) Células Mesenquimáticas

Entre la 4 y 8 semana de edad son las células mayoritarias en el tejido intersticial. Son células pluripotenciales, por eso por mitosis sucesivas dan origen a células de Leydig, fibroblastos y células contráctiles peritubulares. La diferenciación en células peritubulares sucede hacia las 16 semanas de edad cuando se elonga marcadamente el núcleo. Mientras que la transformación en fibroblastos se da alrededor de la semana 24 de vida. En la semana 16 de vida las células mesenquimáticas dejan de proliferar (sólo son el 20% sobre la población intersticial total) y las que quedan se diferencian en precursores de las células

de Leydig y de las células contráctiles peritubulares. A las 20 semanas de edad las células mesenquimáticas ya son raras (Bagu, 2006; Brito, 2006).

b) Mononucleares

Una particularidad de estas células es que a lo largo de toda la vida del toro representan entre un 20 a un 30% de sobre el total de células intersticiales. Se pueden encontrar linfocitos, células plasmáticas, monocitos, macrófagos y células claras intercaladas (derivan de los monocitos, siempre se asocian a lacélulas de Leydig y son típicas de los toros; Brito, 2006).

c) Células de Leydig

Esta población celular está siempre presente en el espacio intersticial testicular, tanto en la etapa fetal como en la vida postnatal, tanto unas como otras surgen por diferenciación de las células mesenquimáticas. El proceso que termina con las células de Leydig adultas incluye cinco estadios: Precursor Mesenquimático, Célula Progenitora, células de Leydig Resiente, células de Leydig Inmadura y células de Leydig Madura.

Hacia la cuarta semana de edad el 70% de las células intersticiales son células mesenquimáticas (con intensísima mitosis). Las células de Leydig sólo representan el 6% de la población celular del intersticio testicular, al tiempo que conviven células de Leydig fetales en degeneración y células de Leydig postnatales.

Como su número sigue creciendo a las 8 semanas de edad la proporción de células de Leydig, respecto al total intersticial, es del 20% y ya representan el 10% del volumen testicular total. A esta edad las células de Leydig fetales degeneran, haciendo que queden únicamente las que surgen luego del nacimiento.

A partir de las 4 semanas y hasta las 30 semanas de vida la intensidad de diferenciación y número de las células de Leydig es muy alta, siéndolo en los toritos particularmente alrededor de las 12 semanas. Esto hace que hasta la semana 20 de edad convivan células de Leydig diferenciándose, células de Leydig adultas y células de Leydig degeneradas (sobre todo fetales).

Desde la 30-40 semanas de vida en adelante, hasta la vida adulta, se establece una población definitiva y fija de células de Leydig. En caso de degeneración y muerte de alguna, es reemplazada para mantener el número total prefijado. En este periodo, el espacio dentro de los testículos, ocupado por las células de Leydig aumenta considerablemente porque hay hipertrofia celular, fundamentalmente a expensas del aumento del número de mitocondrias. Este aumento en el volumen celular se hace más evidente aun, cuando los toritos tienen aproximadamente 15 meses de edad, por el incremento del diámetro nuclear y del citoplasma.

Histológicamente, las células de Leydig se caracterizan porque son grandes (20 a 30  $\mu\text{m}$ ) y de forma poligonal. Tienen uno o dos núcleos excéntricos, de forma esférica u oval. Los nucléolos pueden ser uno o dos. Las mitocondrias son abundantes, mayoritariamente de tipo globular y en cercanías del núcleo. El aparato de Golgi está formado por vesículas diseminadas por el citoplasma. El retículo endoplásmico rugoso es escaso, a la inversa del retículo endoplásmico liso que es muy abundante. Además, se observan gotas de colesterol en el citoplasma. El conjunto de estas características histológicas de las células de Leydig son coherentes con su función de producir andrógenos de naturaleza esteroidea, como son la testosterona (la principal post-nacimiento) y la androsteniona. Por la importancia de esta función, se considera que una célula de Leydig está madura cuando su sistema enzimático



es capaz de iniciar la esteroideogénesis a pleno. En los toritos en crecimiento, este proceso es independiente de que se hubiese o no alcanzado el número final de células de Leydig, lo que hace que convivan células de Leydig inmaduras con otras que ya producen andrógenos. (Sánchez y col., 1985; Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008).

#### d) Células de Sertoli

En los toros adultos el número de células de Sertoli adultas es un factor determinante en lo referido al tamaño testicular final y a la producción diaria de espermatozoides, debido a que la función principal que tienen estas células es constituir una estructura de sostén para las célula germinal dentro de los tubos seminíferos. (Bagu, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009)

Las células de Sertoli proliferan a partir de las células de soporte indiferenciadas (también llamadas células de Sertoli Indiferenciadas) que están presentes en los tubos seminíferos desde el nacimiento hasta las 20 semanas de edad.

Las células de Sertoli Indiferenciadas tienen poca actividad mitótica hasta la 4 semana de vida, a partir de aquí y hasta la semana 8 de edad la proliferación es muy alta, para descender nuevamente hasta las 16 semanas de edad. A partir de aquí las células de Sertoli Indiferenciadas comienzan a madurar en forma muy rápida, al tiempo que su número se incrementa entre las 20 y 40 semanas de edad. La proliferación de las células de Sertoli se produce en las etapas neonatal (desde el nacimiento a las 8-10 semanas de edad) y prepuberal (desde las 8-10 hasta 20-24 semanas de edad) del desarrollo sexual de los toritos.

Durante la 4 semana de edad las células de Sertoli Indiferenciadas poseen núcleo (con heterocromatina), son de forma redondeada y representan el tipo celular más

importante dentro de los tubos seminíferos. La membrana celular de cada una de estas células de Sertoli-Indiferenciadas posee interdigitaciones que la unen a otras células de Sertoli Indiferenciadas. En el citoplasma de estas células, se encuentran aparato de Golgi supranuclear bien desarrollado, retículo endoplásmico rugoso prominente y gran cantidad de mitocondrias. A partir de la semana 16 de edad, las espermatogonias entrelazan parte de su membrana celular con las membranas celulares de las células de Sertoli Indiferenciadas adyacentes formando uniones intercelulares complejas. En esta etapa el núcleo se observa elongado y con menor heterocromatina. Se observan vacuolas nucleares que indican que la célula está en plena maduración, este estadio celular previo a las células de Sertoli es denominado células de Sertoli Presuntivas. Hacia las 20 semanas de edad se hacen numerosos, sobre todo en el área basal de los tubos seminíferos, desaparecen los grumos de cromatina del núcleo, se observan nucléolos y paralelamente aumenta la cantidad de mitocondrias. A partir de las 24 semanas de edad las células de Sertoli Presuntivas tienen muy desarrollada la función de entrelazamiento. Se observa claramente que las células de Sertoli Presuntivas que se ubican en la parte basal del tubo seminífero contienen espermatogonias, mientras que las células de Sertoli Presuntivas localizadas en la porción adluminal poseen célula germinal en los últimos estadios de la espermatogénesis. Luego de las 28 semanas de edad la gran mayoría de las células de Sertoli Presuntivas adquieren el aspecto definitivo de células maduras ya que posee vacuolas nucleares y el retículo endoplásmico liso se extiende en la zona basal del epitelio. Las interdigitaciones entre células de Sertoli vecinas son muy fuertes, particularmente en la parte basal del epitelio. Histológicamente, las uniones entre las células de Sertoli consisten en líneas de fusión entre

las membranas celulares, lo cual es reforzado por filamentos y por la incorporación del retículo endoplásmico liso en ellas.

Esta fuerte unión de las células de Sertoli permite la formación de la barrera hémato-testicular la cual es una barrera fisiológica altamente especializada, que impide que las células germinales entren en contacto con los vasos sanguíneos y linfáticos. Posee un compartimento basal, donde se encuentran contenidas las célula germinal en estadios iniciales y el compartimento adluminal en el cual se encuentran las célula germinal más maduras, y donde además se vuelcan los líquidos de secreción de las células de Sertoli. De esta manera, barrera hémato-testicular, proporciona a las célula germinal sostén, protección contra macromoléculas (ej. inmunoglobulinas), cambios químicos bruscos de la sangre, nutrición y transporte de sustancias necesarias para el metabolismo. La barrera hémato-testicular se completa con una cadena incompleta de células mioides, la cual se ubica por debajo de la lámina basal del tubo seminífero. La funcionalidad completa de la barrera hémato-testicular se inicia alrededor de las 24-25 semanas de edad, cuando se produce la apertura de la luz de los tubos seminíferos.

Las células de Sertoli, además poseen otras funciones relacionadas a la fisiología testicular:

- Producción de estradiol: La testosterona que ingresa a las células de Sertoli es convertida en  $17\beta$ -estradiol.
- Fagocitosis de células germinales degeneradas.
- Secreción de:

- Proteína transportadora de andrógenos, esta proteína se une a los andrógenos intersticiales transportándolos hasta el epitelio germinal de los tubos seminíferos y epidídimo,
- Activina, proteína que estimula la secreción de FSH, y que además tiene acción paracrina y autocrina en la secreción de esteroides,
- Inhibina, proteína que inhibe la liberación de FSH, y que además posee acción paracrina y autocrina en la secreción de esteroides,
- Factor Activador del Plasminógeno,
- Transferrina, proteína transportadora de hierro,
- Ceruloplasmina, proteína transportadora de cobre,
- Galactosil transferasa, enzima que glicosila proteínas,
- Lactato, sirve de combustible metabólico para las célula germinal
- Piruvato, similar la lactato,
- Líquidos necesarios para el transporte de los espermatozoides inmaduros hasta el epidídimo.

Una característica de las células de Sertoli es que la síntesis proteica que llevan a cabo, se hace mucho más intensa a partir del inicio de la espermatogénesis (Amann y col., 1983; Sánchez y col., 1985; Hafez, 2000; Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009).

#### e) Células Germinales

Al momento del nacimiento la población de células germinales está constituida por gonocitos, los mismos poseen núcleo grande, nucléolos bien desarrollados y se ubican centralmente dentro del cordón seminífero (ídem cordón sexual en la etapa prenatal).

Entre las 4 y 16 semanas de edad la proliferación de células germinales es lenta. Los gonocitos gradualmente son desplazados a una posición cercana a la lámina basal, sufriendo mitosis para dar origen a las espermatogonias-A. Hacia las 20 semanas de edad los gonocitos desaparecen del cordón seminífero por diferenciación y degeneración. Al mismo tiempo y hasta las 24 semanas de edad, las espermatogonias-A se dividen por mitosis en espermatogonias-B, entrando luego en meiosis, dando origen a los espermatocitos primarios, cuyo número aumenta lentamente hasta las 32 semanas de edad. En los toritos ese aumento continúa inclusive hasta los 15 meses de edad.

Hacia las 28 semanas de edad comienzan a observarse los espermatocitos secundarios y espermátides redondas. Las mismas cuando se llega a las 32 semanas de vida comenzarán a diferenciarse en espermátides elongadas.

Los primeros espermatozoides maduros son observables en la luz de los tubos seminíferos a partir de las 32-40 semanas de edad, momento en el cual la gran número de espermátides hace que sean la población predominante dentro de las células germinales.

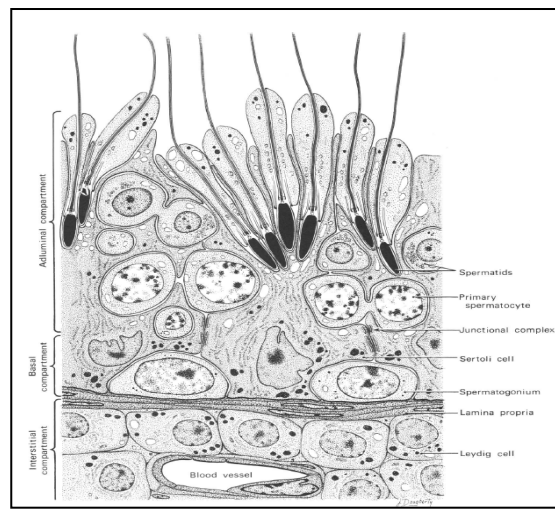


Figura1. Representación gráfica de un corte histológico transversal de un tubo seminífero donde se observan células de Sertoli, células de Leydig y espermátides en diversos estadios (Amann, 1983).

### Curva de crecimiento testicular y espermatogénesis

En los toritos el crecimiento testicular describe una curva sigmoidea, es lento desde el nacimiento hasta las 20-25 semanas de edad, luego se hace rápido, inclusive a lo largo de la pubertad, desacelerándose cuando el animal adquiere calidad seminal de adulto (Barth y Ominski, 2000; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009; Figuras 1 y 2). Se ha observado que toritos Holstein que tuvieron un peso para ambos testículos de  $9,0 \pm 1$  g a los 3 meses alcanzaron un peso de  $117,0 \pm 10$  g cuando su edad era de 8 meses. En pruebas de eficiencia, utilizando al perímetro escrotal, como indicador del tamaño testicular, se determinó que la tasa de aumento diario promedio del perímetro escrotal entre los 7 a 12 meses de edad fue de  $0,05-0,07$  cm y entre los 12 a 16 meses fue de  $0,03-0,05$  cm, llegándose a aumentos mensuales totales de 1,8 cm (Curtis y Amann, 1981; Barth, 2011).

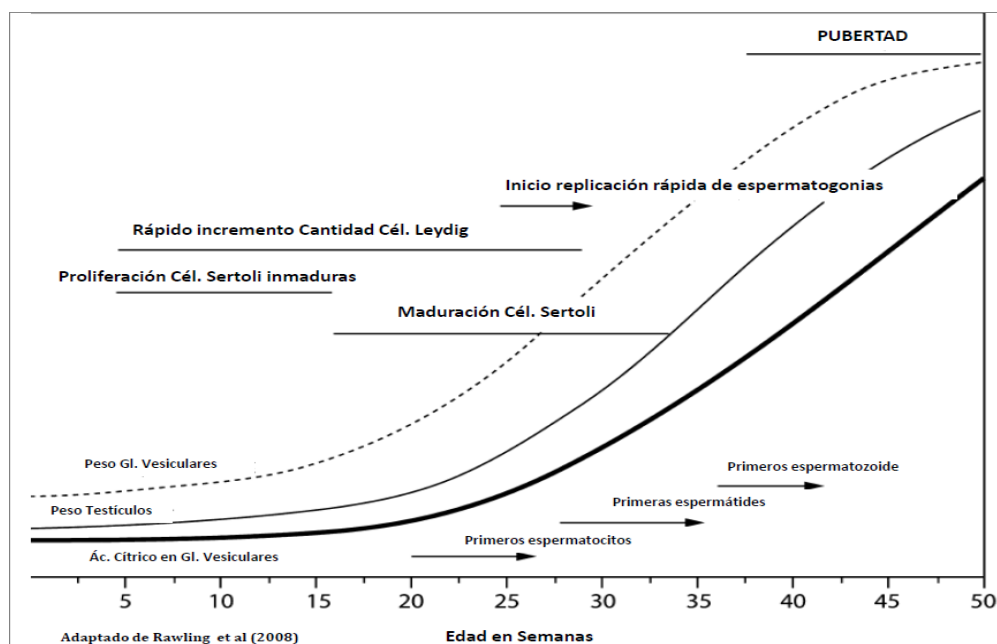


Figura 2. Crecimiento y desarrollo de partes del aparato genital de toritos desde el nacimiento a la pubertad (Adaptado de Rawling y col., 2008).

Dentro de la espermatogénesis el intervalo entre la aparición del primer espermatozoides primario y el primer espermatozoides maduro en los toritos pre-puberales es de 90 días, mientras que en los toros adultos ese periodo es de 41 días. Dicha diferencia, se debe a que este proceso en los animales jóvenes implica la degeneración de 3 a 5 generaciones de espermatogonias (cada generación de espermatogonias requiere para surgir 13,5 días).

El rendimiento de la diferenciación y división de las células germinales aumenta con el avance de la edad, que va desde el inicio de la espermatogénesis hasta la adultez del toro. Así por ejemplo, toritos Holstein a las 32 semanas de edad produjeron  $4 \times 10^6$  espermatozoides/g de parénquima testicular y cuando se hicieron adultos su producción fue de  $12 \times 10^6$  espermatozoides/g de parénquima testicular (Curtis y Amann, 1981). Por ende, en los toritos la calidad del semen eyaculado, mejora gradualmente en función de mayor eficiencia de la espermatogénesis. Paralelamente, a la mejora de la producción de célula germinal, aumenta el número de células de Sertoli para soporte de epitelio germinativo (Aponte y col., 2005). Este proceso de crecimiento testicular, permite que toros de razas taurinas, con una adecuada nutrición, a los 24 meses de edad alcancen el 90% del tamaño testicular adulto. (Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009; Barth, 2011).

#### **3.1.4. Control hormonal del desarrollo sexual**

El proceso de crecimiento sexual en el macho bovino está dado, por la maduración gradual del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal. El desarrollo sexual puede dividirse, arbitrariamente, teniendo en cuenta las variaciones en las concentraciones de las

gonadotrofinas y la testosterona en cuatro periodos: Fetal, Infantil, Prepuberal y Puberal (Rodriguez y Wise, 1989; Brito, 2006).

### Periodo Fetal

Durante la gestación, los fetos de machos bovinos comienzan a secretar hacia el segundo mes LH. La consecuencia inmediata es que las gónadas fetales comiencen con la producción y secreción principalmente de androsteniona y en menor medida de testosterona. En este momento, la placenta mediante un mecanismo enzimático, aromatiza parte de los andrógenos convirtiéndolos en estradiol, haciendo que su concentración comience a subir a nivel fetal. En el último tercio de gestación, al elevarse la cantidad de andrógenos y estradiol circulantes, por feedback negativo, la hipófisis del feto, suprime la secreción de LH hasta luego del nacimiento (Rodriguez y Wise, 1989).

### Periodo Infantil

Esta etapa se caracteriza por una baja concentración de gonadotrofinas y testosterona, extendiéndose aproximadamente entre el nacimiento y las 8-10 semanas de edad. Las bajas cantidades circulantes de LH y FSH de este periodo se deben a los escasos pulsos de secreción de GnRH por parte del hipotálamo. Esta situación se da porque los siguientes mediadores bioquímicos y hormonales contribuyen a ello:

- Sustancias Opioides: Estos mediadores químicos hipotalámicos bloquean los pulsos secretorios de GnRH. Aparentemente actuarían sobre derivados dopaminérgicos, los cuales estimulan la secreción de GnRH (Evans y col., 1993; Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009).



- Estradiol: En los toros, fisiológicamente, este estrógeno es producido por los testículos y las glándulas adrenales. Su concentración sérica es alta entre la 1 y 6 semanas de edad. La concentración de receptores de estradiol, disminuye en el hipotálamo y aumenta en la hipófisis desde las 6 a las 10 semanas de edad. Además de impedir la secreción de gonadotrofinas, el estradiol contribuiría a una temprana maduración de neuronas hipotalámicas especializadas en la síntesis de GnRH y a aumentar el número de receptores de GnRH en la hipófisis. Durante esta etapa los pulsos secretorios de la GnRH van aumentando linealmente desde las 2 semanas de edad (3,5 pulsos/10h) hasta las 12 semanas de edad (8,9 pulsos/10h; Bagu, 2006; Rawlings y col., 2008)

La GnRH se detecta en el sistema porta hipotálamo-hipofisario en la 2 semana de edad, pero la LH no se detecta antes de las 8 semanas de edad. Esto deja a las claras, que el aumento de la concentración sérica de GnRH no se acompaña necesariamente de una mayor cantidad de LH en el suero sanguíneo. Esto se explica por la inmadurez de la hipófisis que no tiene capacidad para responder a los estímulos de la GnRH. No obstante, dicha glándula va adquiriendo paulatinamente, características de madurez como son un mayor peso, el incremento del número de receptores de GnRH, y más presencia de LH- $\beta$  ARNm y mayores reservas de LH en su interior. Es importante mencionar que la cantidad de receptores de GnRH se incrementa 4 veces entre las 6 y 10 semanas de edad. Tal vez, durante este periodo el accionar persistente de los pulsos secretorios de GnRH, hagan que durante el periodo inmediato, es decir el Prepuberal, se produzca el intenso aumento de la concentración sérica de gonadotrofinas (Rodríguez y Wise 1989; Brito, 2006). En este periodo los testículos de los toritos se encuentran en su fase de crecimiento lento.

### Periodo Prepuberal

Lo más característico de este periodo, es la ocurrencia del pico temprano en la concentración sérica de gonadotrofinas, tanto de la FSH como de la LH. En el pico temprano de LH, la concentración sérica de LH comienza a aumentar a partir de las 6-8 semanas de vida, alcanza su zenit entre las 12 a 16-18 semanas de edad y a partir de las 20 a 25 semanas de edad comienza a declinar, volviendo entre las 25 a 35 semanas de edad, a concentraciones similares a las del Periodo Infantil (Amann y Walker, 1983; Evans y col., 1996; Bagu, 2006; Bagu y col., 2006; Brito, 2006; Brito y col., 2007a; Brito y col., 2007b; Brito y col., 2007c; Barth y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009).

El pico temprano de LH se inicia al disminuir el efecto de inhibición ejercido sobre el hipotálamo por sustancias opioides (Rawlings y col. 2008), aminoácidos inhibitorios (gama amino butyric acid [GABA], taurina; Bagu, 2006) y estradiol. Este último, cuando se inicia el pico temprano de LH desciende en su concentración sérica y también lo hacen sus receptores hipotalámicos. Entonces, el hipotálamo, ahora con más peso, recibe el estímulo de aminoácidos excitatorios (aspartato y el glutamato [que actúa sobre el receptor NMDA]), de las catecolaminas (dopamina y epinefrina) y de péptidos (como el kisspeptin), aumentando la frecuencia de los pulsos secretorios de GnRH, mediante la transmisión o modulación neuronal. Esto induce a la hipófisis a amplificar la descarga de LH, acrecentando su concentración sérica.

En este momento, la hipófisis que ha aumentado de tamaño, acrecienta su contenido de LH y muestra una mayor frecuencia de los pulsos de secreción de esa hormona, que pasan de 1 cada 24 h (4 semanas de edad) a 1 cada 2 h (12-16 semanas de edad). Estos

pulsos secretorios de LH, no manifiestan un patrón único en cuanto al volumen hormonal secretado, dado que el mismo puede aumentar, disminuir o permanecer sin cambios. Simultáneamente, en la hipófisis se observa un número mucho más elevado de receptores de GnRH (Amann y Walker, 1983; Amann et al, 1986; Rodriguez y Wise, 1989; Rawlings y Evans, 1995; Ojeda et al., 2005; Bagu, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009).

El pico temprano de LH culmina alrededor de las 20 a 25 semanas de edad, principalmente por acción de los andrógenos testiculares, en especial la testosterona, que ejercen un feedback negativo sobre la hipófisis y consecuentemente sobre la secreción de LH. Las sustancias opioides, los aminoácidos inhibitorios (GABA, taurina) y el estradiol vuelven a neutralizar la liberación hipotalámica de GnRH. Por su parte, en este momento, el estradiol recupera su concentración sérica del Periodo Infantil (Bagu, 2006; Evans y col., 1993; Rawlings y Evans, 1995; Rawlings y col., 2008).

Los estudios que se han hecho respecto al pico temprano de FSH no son unánimes en sus resultados, como sí lo han sido para el pico temprano de LH. Esas diferencias entre las publicaciones, se deberían a una mayor vida media de la FSH (respecto a la LH) en el suero sanguíneo, lo que dificulta arribar a conclusiones contundentes. La concentración elevada de la FSH en sangre se observa ya hacia las 2 semanas de edad, llegaría a su máxima expresión en la 10 semana de edad, para empezar a descender entre las 20 a 25 semanas de edad, junto con la LH. La activina es una hormona proteica secretada por las células de Sertoli que promueve la secreción de FSH por parte de la hipófisis también participa en este proceso (Amann y Walker, 1983; Evans et al., 1995; Hafez, 2000; Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans y Rawlings, 2009).

La finalización del pico temprano de FSH es similar al del pico temprano de LH, también ocurre entre las 20 a 25 semanas de edad e involucra al feedback negativo de los andrógenos testiculares, al tono opioide, al estradiol y a la inhibina. Esta última, es una hormona proteica, producida por las células de Sertoli y cuya concentración en sangre declina totalmente luego de los 6-7 meses de edad. La inhibina al actuar también sobre las células de Leydig estimula la producción de andrógenos (Evans y col., 1993; Rawlings y Evans, 1995; Hafez, 2000; Bagu, 2006; Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Fortes y col., 2012).

En los toritos, a lo largo de las primeras 16 semanas de edad, los niveles de la concentración sérica de testosterona son bajos y no acompañan el aumento inicial de los pulsos secretorios de LH. Pero inmediatamente después de las 16 semanas de edad, se produce un aumento gradual de la testosterona, acompañando el incremento de la concentración de LH del pico temprano de LH. La secreción de testosterona pasa de 0,3-2,3 pulsos/24 h (4 a 16 semanas de edad) a 7,5-9 pulsos/24 h (20 semanas de edad). Desde esta edad en adelante, la frecuencia de los pulsos secretorios se mantiene, sin mayores variaciones, así por ejemplo entre las 24 y 40 semanas de edad dicha frecuencia es de 3,4-6,8 pulsos/24 h. Este tipo de secreción pulsátil de LH por parte de la hipófisis garantiza que realizar una esteroidegénesis correcta, ya que una exposición constante de las células de Leydig disminuiría la eficiencia de dicha función (Brito, 2006; Bagu y col., 2008). El pico temprano de gonadotrofinas es crucial para el desarrollo sexual de los toritos, especialmente el pico temprano de LH. Diferencias en la frecuencia de los pulsos secretorios de LH y en su consecuente concentración sérica determina distintas edades de arribo a la pubertad. Así se pudo constatar, en diversos estudios que toritos más precoces

fueron púberes a las 42 semanas de edad, mientras que los más tardíos lo hicieron en las 48 semanas de edad. Los animales que llegaron antes a la pubertad, respecto a los más tardíos, se caracterizaron porque sus pulsos de secreción de LH entre las 10-20 semanas de edad, tuvieron una frecuencia mayor y porque exhibieron siempre una concentración sérica de LH más alta. También, los toritos precoces al iniciarse el pico temprano de LH comenzaron a incrementar la concentración de LH en el suero sanguíneo 10 semanas antes respecto a los machos menos precoces (Brito, 2006).

La alta concentración sérica de LH durante este periodo también es importante porque contribuye a la proliferación, desarrollo y maduración de las células de Leydig en sus diferentes estadios. Respecto a la esteroidogénesis la LH determina en las células de Leydig la correcta funcionalidad de sus organoides específicos y a la hipertrofia de las mismas. Inclusive, a partir de esto se establece un círculo virtuoso porque los andrógenos producidos por las células de Leydig inducen, dentro de su propio linaje celular, la diferenciación de los estadios iniciales, los cuales ya presentan receptores androgénicos (Bagu, 2006).

Otro evento trascendental dentro del desarrollo sexual del torito, es que la LH en el momento de su máxima concentración sérica (12-16 semanas de edad) provoca una diferenciación masiva de células de Leydig-Progenitoras en células de Leydig-Adultas. La consecuencia inmediata de esto es que las células de Leydig dejan de producir androsteniona y comienzan a secretar testosterona, lo que hace que su concentración sanguínea empiece a incrementarse paulatinamente. Esta mayor cantidad de testosterona sérica estimula la maduración de células de Sertoli (16 a 28 semanas de edad; Bagu, 2006).

También en el Periodo Prepuberal, aparecen en mayor concentración testicular factores de crecimiento como los TGF (Transforming Growth Factors). Son polipéptidos (isómeros  $\beta$  [TGF $\beta$ 1, 2 y 3]) que regulan el crecimiento testicular, aparentemente interviniendo en las etapas iniciales de la diferenciación de las células de Sertoli y células de Leydig, como así también en la producción de los primeros espermatozoides y espermátidas. Las concentraciones testiculares de estos factores de crecimiento tienen correlación positiva, con las concentraciones de sérica de LH y testicular de LH-R y FSH-R, lo que demuestra una interacción entre ellos (Bagu, 2006).

La trascendencia del pico temprano de FSH en la maduración sexual de los toritos reside en que la FSH focaliza su acción en las células de Sertoli, de hecho se la ha detectado en los tubos seminíferos desde el nacimiento hasta las 16 semanas de edad. La FSH provoca que las células de Sertoli aumenten su mitosis, proliferación, diferenciación y maduración. Asimismo, la FSH estimula en las células de Sertoli la síntesis y secreción de estradiol, Proteína transportadora de Androgenos, inhibina, fluido tubular, etc. (Bagu, 2006; Brito, 2006).

Habría una interrelación funcional entre las células de Leydig y las células de Sertoli, ya que durante esta etapa, cuando aumenta levemente la producción de testosterona las células de Sertoli intensifican su maduración. Al mismo tiempo, es probable que esta interrelación entre las células de Leydig y células de Sertoli también contribuya a la diferenciación de gonocitos en espermatozoides.

El pico temprano de gonadotropinas termina cuando la concentración de testosterona sérica, que aumenta gradualmente entre las 16 a 20-25 semanas de edad, genera un feedback negativo sobre la hipófisis.

Al término de este periodo y dentro del esquema del desarrollo sexual de los toritos se ha logrado que:

- a) Las células de Sertoli hayan finalizado su diferenciación,
- b) La barrera hémato-testicular esté establecida y funcionando,
- c) Se produjera la apertura de la luz de los tubos seminíferos,
- d) Se iniciara la meiosis de las célula germinal,
- e) Las células de Leydig hayan iniciado la producción de testosterona, (Amann y Walker, 1983; Bagu y col., 2006; Brito, 2006)

Los testículos de los toritos durante este periodo continúan en su fase de crecimiento lento.

### Periodo Puberal

Esta etapa se inicia aproximadamente a las 25 semanas de edad y transcurre hasta la pubertad. Posee como aspectos distintivos:

- a) Bajos niveles de secreción y concentración sérica de gonadotrofinas.
- b) La testosterona, a la inversa, aumenta su secreción y niveles en sangre.
- c) El desarrollo testicular es muy rápido.

(Amann y Walker, 1983; Amann y col., 1986; Rawlings y Evans, 1995; Evans, 1996; Bagu, 2006, Brito, 2006; Rawlings y col., 2008; Evans 2009).

Posteriormente al fin del pico temprano de gonadotrofinas, actúan a nivel del sistema nervioso central los aminoácidos excitatorios (glutamato y aspartato) contribuyen a estimular la secreción de LH y FSH, no obstante su acción se ve solapada por el potente efecto de feedback negativo de los andrógenos testiculares. Las catecolaminas como

dopamina y epinefrina, también inducen la secreción de gonadotrofinas en esta etapa, pero su accionar tampoco se nota por el fuerte impacto inhibitorio androgénico (Amann y col., 1983; Bagu, 2006; Rawlings y col., 2008; Bagu, 2008).

La baja concentración sérica de LH y FSH observada en el periodo puberal es compensada por una mayor afinidad y concentración de receptores de gonadotrofinas (LHR, FSHR) localizados en los testículos (Bagu, 2006). Los niveles altos de la concentración de testosterona observables luego de las 28 semanas de edad y que se extienden posteriormente a la pubertad, se deberían a una mejora sustancial en la esteroidegénesis o en el mayor número de células de Leydig (Amann, 1983; Brito, 2007; Figura 3). Respecto a esto, ensayos hechos con toritos de razas británicas demostraron que la concentración sanguínea de testosterona se incrementa gradualmente entre las 6 y las 35 semanas de edad y luego nuevamente en forma intensa a partir de las 42 semanas de edad (Evans y col., 1996). Otros autores trabajando, con animales Angus x Hereford, indicaron que la concentración de testosterona plasmática fue baja entre la 1 a 4 semanas de edad, para incrementarse gradualmente hasta las 28 semanas de edad (promedio del periodo  $1,63 \pm 0,43$  ng/ml) y luego, aumenta notablemente hasta las 40 semanas de edad (promedio de periodo  $6,40 \pm 0,75$  ng/ml; Rawlings y col., 1978). En investigaciones hechas con toritos Holstein, la variación fue de  $0,70 \pm 0,2$  ng/ml a los 105 días (14 semanas) de edad hasta  $2,30$  ng/ml a los 120 días (17 semanas) de edad. En este lapso los pulsos secretorios de la hormona oscilaron entre los  $0,20 \pm 0,1$  ng/ml y los  $4,30 \pm 1,9$  ng/ml. Posteriormente la concentración de testosterona siguió incrementándose hasta alcanzar a  $3,10 \pm 0,8$  ng/ml a la edad de 160 días (22 semanas), entrando luego en una meseta. Un aspecto observado por estos autores es que la variación de la concentración de la testosterona sanguínea aumenta



bruscamente en poco tiempo, por ejemplo puede pasar de 0,50 ng/ml a más de 2 ng/ml en solo uno a dos días (Renaville y col., 1993; Renaville y col., 1993). Otra publicación, indica que la concentración de testosterona circulante de toritos Holstein a las 10 semanas de edad fue 2,2 veces mayor que a las 6 semanas de edad, al tiempo que se registró un crecimiento progresivo de dicha concentración, desde la 14 a la 18 semanas de edad (Amann y col., 1986). En investigaciones realizadas en toritos Hereford x Charolais, las concentraciones de testosterona sérica se incrementaron entre las 8 y 20 semanas de edad, luego declinaron y volvieron a crecer pronunciadamente hacia las 28 semanas de edad (Bagu, 2008).

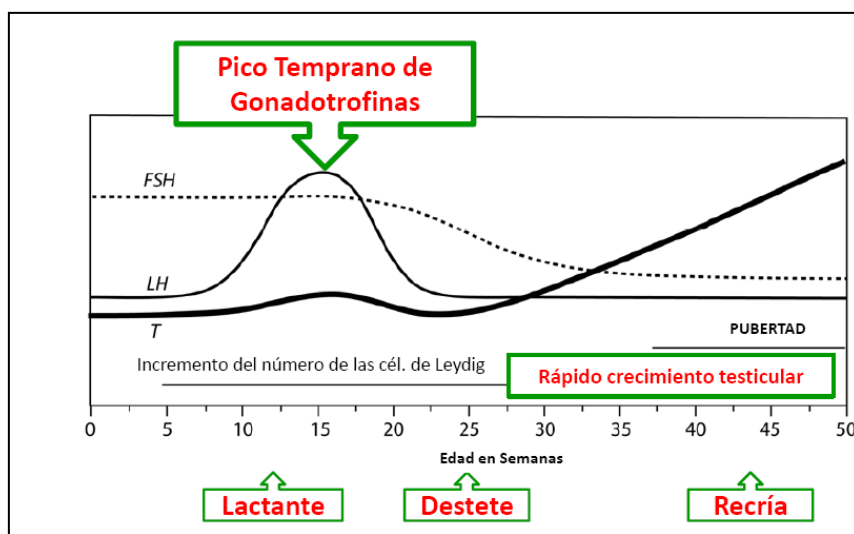


Figura 3. Patrones temporales de la concentración plasmática de las hormonas reproductivas en relación al desarrollo de toritos desde el nacimiento a la pubertad (Adaptado de Rawling y col., 2008).

Los andrógenos, durante el periodo puberal, además de establecer el feedback negativo con la hipófisis en la secreción de gonadotropinas, cumplen otras funciones de gran relevancia relacionadas a la fertilidad del animal, ellas son:

- En las Células de Leydig
  - Estímulo a la proliferación, diferenciación y maduración de las propias células de Leydig.
  - En sinergia con el estradiol bloqueo de la diferenciación de las mesenchymal-like cell en las precursoras de las células de Leydig, para que éstas permanezcan en un número fijo en el animal adulto. Síntesis de IGF-1 y del receptor de IGF (Bagu, 2006; Brito, 2006).
  
- En las Células de Sertoli
  - Diferenciación de las células de Sertoli-Indiferenciadas a células de Sertoli-Adultas.
  - Producción y actividad de la glicoproteína proteína transportadora de Androgenos. Esta proteína transporta moléculas de testosterona, desde el intersticio testicular, a través del citoplasma de las células de Sertoli hasta la luz del tubo seminífero donde son utilizadas por célula germinal avanzadas (Hafez, 2000; Brito, 2006; Bagu, 2006).
  - Contribuye a la producción de estradiol a partir de ser transformada por una enzima reductasa en 17 $\beta$ -estradiol que actúa en los tubos seminíferos durante la espermatogénesis (Barth, 2011). Síntesis de IGF1 y del receptor de IGF1 (Brito, 2006).

- En las Células Germinales
  - Se activa la meiosis de los espermatocitos primarios en profase a espermatocitos primarios en metafase y de éstos a espermatocitos secundarios.
  - Conjuntamente con la FSH, haría que los espermatocitos secundarios se diferencien en espermátides y que estas, a su vez, lo hagan en espermatozoides maduros (Sánchez y col., 1985; Barth, 2011).
- En los Túbulos Seminíferos en su conjunto
  - El diámetro externo se incrementa rápidamente entre las 10 y 45 semanas de edad, mientras que el diámetro interno lo hace entre las 30 a 35 semanas de edad (Evans y Pierson, 1996).
- En los órganos accesorios
  - Inducción de la primera protrusión del pene (31 semanas de edad) y separación entre este y el prepucio (35 semanas de edad) (Almquist y Amann, 1974).
  - Hace que luego de los 8 semanas de edad se desarrollen las vesículas seminales y después de la 20-24 semanas de edad comiencen a producir ácido cítrico y fructosa en cantidades crecientes (Rawlings y col., 2008).
- En los caracteres secundarios
  - Contribuye a que el torito desarrolle el aspecto definido de macho (pelaje, color, vocalizaciones, etc.).
  - Influencia en el crecimiento actuando como anabólico, especialmente en la musculatura.
- En el comportamiento sexual

- El torito comienza a tener una conducta masculina en relación a sus congéneres (Sánchez y col., 1985).

Durante el Periodo Puberal interactúan en los tejidos testiculares los metabolitos hormonales endógenos (metabolitos hormonales endócrinos), tales como IGF1, insulina, leptinas y GH. Los mismos son intermediarios metabólicos que cumplen múltiples funciones dentro del organismo regulando procesos metabólicos (de los glúcidos, de las grasas, del crecimiento, etc.). Asimismo, los metabolitos hormonales endócrinos sirven de enlace humoral con el hipotálamo para informarlo sobre el balance energético, generando una respuesta reproductiva específica. Finalmente, se ha comprobado que los metabolitos hormonales endócrinos intervienen en forma particular en el desencadenamiento de la pubertad (Brito, 2006).

Los metabolitos hormonales endócrinos aumentan sostenidamente sus concentraciones sanguíneas durante el periodo puberal, en el cual las cantidades de gonadotrofinas séricas son bajas. Esto demuestra que su acción a nivel gonadal es independiente del hipotálamo y la hipófisis. El origen de los metabolitos hormonales endócrinos con acción sobre las células testiculares, es local cuando es producido por ellas mismas (secreción autocrina/paracrina) o bien llega a ellas, desde otros órganos, por el torrente circulatorio.

Respecto a IGF1 existen estudios hechos en toritos Holstein que muestran que sus concentraciones aumentaron entre los 10 a 56 semanas de edad (Renaville y col., 1993; Renaville y col., 1996). En estudios hechos con animales de raza Angus y Angus X Charolais, la concentración de IGF1 se incrementó entre las 14 y 50 semanas de edad, manteniéndose luego en meseta hasta las 74 semanas de edad (Bagu, 2006; Brito, 2006).

El IGF1 es un polipéptido que se relaciona con la mitosis celular, donde estimula reacciones bioquímicas que tienen que ver con la glucosa y los sulfatos. En el hipotálamo de roedores, existen receptores de IGF1 (muy abundantes en núcleo preóptico, septum e hipotálamo anterior). Las neuronas secretoras de GnRH muestran estos receptores en su cuerpo celular y en sus terminales neuronales. Dentro de dichas neuronas, se detectó ARNm que interviene en la síntesis de IGF1, IGF2, receptor de IGF1 e IGFBP (proteína transportadora de IGF-1), lo cual indica que dentro de la población de neuronas secretoras de GnRH, hay una regulación autocrina del IGF1 (Brito, 2006). En rata macho se han encontrado receptores de IGF1 en espermatogonias, espermatocitos, células de Leydig y células de Sertoli. En el epidídimo también se localizaron IGF1R, porque a este nivel, el IGF1 contribuiría a la diferenciación de las células espermáticas. (Yilmaz A y col., 1999)

El IGF1 promueve la diferenciación y proliferación de las células de Leydig en todos sus estadios, empezando por las células tipo mesenquimáticas hasta las células de Leydig adultas. El IGF1 a nivel de la fisiología de las células de Leydig regula y estimula la esteroidogénesis. Lo hace aumentando la concentración del receptor de LH y su sensibilidad a la LH (por lo que tendría sinergia con ella). En las células de Sertoli mejora la síntesis de ADN, regulando el metabolismo celular en general, al tiempo que promueve la síntesis y secreción del Factor Activador del Plasminógeno. También, en las células de Sertoli inhibe a la enzima aromatasa responsable de intervenir en la producción de estradiol, con lo que se garantiza un buen desarrollo testicular (Yilmaz y col., 1999; Brito, 2006; Brito, 2007; Bagu, 2010). En toritos evaluados desde el destete hasta aproximadamente los 15 meses se observó que altas concentraciones de IGF1 se asociaron

a un mayor perímetro escrotal y porcentaje de motilidad rectilínea de los espermatozoides (Thomas y col., 2002; Yilmaz y col., 2004).

La GH es una hormona proteica secretada por la hipófisis que interviene en el crecimiento animal y además tiene funciones en la faz reproductiva. Respecto a esto, en humanos la GH, junto al IGF1, interviene en la etapa temprana del desarrollo sexual, contribuyendo a regular la secreción de GnRH (Brito, 2006). En toritos Angus y Angus x Charolais, se reporta que la GH mantiene baja su concentración en sangre, entre las 4 semanas previas y las 4 semanas posteriores, con respecto al inicio de la pubertad (Brito, 2006; Brito y col., 2007a). Sin embargo, otros trabajos describen asociaciones estadísticas entre la concentración plasmática de GH y el perímetro escrotal de toritos Angus, Brangus y Brahman, menores a 15 meses de edad (Thomas y col., 2002).

La leptina es una proteína sintetizada por los adipocitos del tejido graso blanco, y sus niveles sanguíneos aumentan cuando hay más grasa corporal, o sea cuando mejora la condición corporal por una mejor alimentación. Es un nexo hipersensible entre el balance energético (léase reservas de tejido graso o condición corporal) y el aparato reproductor. Las leptinas a nivel hipotalámico estimulan la secreción de GnRH y de la LH por parte de la hipófisis. Las concentraciones de leptinas se incrementan rápidamente entre las 20 y 12 semanas previas a la pubertad. Sin embargo, el aumento de las concentraciones de leptinas hasta las 8 semanas posteriores a la pubertad es muy lento. En roedores hay receptores Ob en las células de Leydig y células germinales. Los receptores Ob sufren cambios en su expresión a nivel celular, lo que está indicando un crecimiento testicular activo. Sobre esto, algunos autores opinan que los receptores Ob son indicadores de la madurez de las células de Leydig cuando ya producen testosterona plenamente. En los toritos en desarrollo las

concentraciones de testosterona y leptinas aumentan paralelamente; pero su correlación es mínima, aunque positiva. La concentración de leptinas tiene correlación positiva con la concentración de IGF1 indicando una posible asociación entre la producción y secreción de ambas hormonas (Brito, 2006; Brito y col. 2007a).

La insulina, hormona pancreática que regula el metabolismo de la glucosa, presenta receptores hipotalámicos en ratones y carneros. Su acción específica sería la de estimular la secreción de LH, vía la secreción hipotalámica de GnRH. Por su íntima relación con el metabolismo de los hidratos de carbono, ante la más mínima mejora del balance energético por aumento de los niveles nutricionales, se incrementa la concentración de insulina circulante en sangre y en el líquido cefalorraquídeo. En el mismo ensayo de los toritos Angus y Angus x Charolais, la insulina tuvo altos niveles séricos desde las 8 semanas antes del inicio de la pubertad, hasta 8 semanas posteriores. Las correlaciones moderadas, pero positivas entre insulina e IGF1 indicaría una posible interacción entre ambas (Brito, 2006). Los metabolitos hormonales endócrinos estimulan el crecimiento testicular en conjunto con la testosterona, dado que aumentan el tamaño de los tubos seminíferos. Cada tubo seminífero incrementa su largo, su diámetro y el número de célula germinal, haciendo que pasen a ocupar mucho volumen dentro de cada testículo (Brito, 2006; Brito y col. 2007a).

El proceso fisiológico progresivo, que incluye eventos físicos, hormonales y comportamentales, culmina exitosamente cuando el torito ha alcanzado la pubertad. Esto implica que el eyaculado tiene una concentración de  $50 \times 10^6$  espermatozoides por mililitro, con un 10% de motilidad rectilínea (Wolf y col., 1965; Randel, 1990).

Ahora bien, la edad en la cual los toritos inician la pubertad puede variar por diferentes razones.

- Nutrición: Variable estrechamente ligada a las particularidades físicas, manejo diario y gestión económica de los sistemas productivos,
- Genotipo del animal y Selección Genética: Aspecto vinculado a las condiciones impuestas por el ambiente, el biotipo elegido para sobrellevarlas y a las características fisiológicas intrínsecas de dicho biotipo (Thomas y col., 2002).

### **3.2. Nutrición y pubertad**

La influencia de la nutrición, sobre el proceso fisiológico que conduce que se inicie la pubertad de un toro, puede darse en las etapas de desarrollo fetal, predestete y/o postdestete.

#### Etapas fetal

En carneros, se ha comprobado que el aumento de la edad de inicio de la pubertad se debió a que sus madres fueron restringidas nutricionalmente cuando los estaban gestando. Esa restricción fue crítica ya que redundó en una menor proliferación y desarrollo de las células de Sertoli y célula germinal, al tiempo que se retrasó el crecimiento y maduración del eje hipotálamico-hipofisiario-gonadal (Da Silva y col., 2001; Bielli y col., 2002). En vaquillonas de 15 meses se logró disminuir la edad de inicio de pubertad y aumentar los índices de preñez, al recibir sus madres (múltiparas) suplementación proteica cuando las estaban gestando (Funston y col., 2010; Summers y Funston, 2012). En otras vaquillonas de 15 meses, hijas a su vez de vaquillonas similares, se logró una edad de inicio de pubertad menor cuando las madres fueron suplementadas energéticamente durante la gestación (Corah, 1975; Brito, 2006; Summers y Funston, 2012). En toritos hijos de vaquillonas (sobre todo de 15 meses), se presume que durante su gestación, el volumen



uterino reducido de sus madres, determinaría un espacio físico muy limitado para su desarrollo y una menor afluencia de nutrientes por una vascularización más acotada. A esto hay que agregarle que la propia madre, de 15 meses, particularmente, compite por esos nutrientes, ya que ella misma también los necesita para crecer. Tampoco habría que descartar, una deficiencia de nutrientes en la etapa fetal, en los machos hijos de vacas carniceras con altas producciones de leche, que cuando no se pueden satisfacer sus demandas energéticas comienzan a desviar nutrientes a la glándula mamaria. Otra situación de subnutrición fetal, se da cuando por razones climáticas, la oferta forrajera que recibe la madre, es de mala cantidad y calidad (Funston, 2011). Estas condiciones, en parte, serían las causales de un menor crecimiento testicular y una mayor edad de inicio de pubertad (Barth y col., 2008).

En Australia se investigó sobre el impacto en el desarrollo sexual de toritos (Periodo Prepuberal) de la alimentación recibida por sus madres cuando los estaban gestando. Los animales pertenecían a un Compuesto Tropical, en tanto que las dietas, suministradas en los diferentes tercios de la preñez, estaban integradas con distintos niveles proteicos. Los resultados fueron que si los niveles de proteína dada en el primer y segundo tercio de gestación fueron de 75% y 63% del total demandado, respectivamente, los toritos mostraron más concentración sérica de FSH y tubos seminíferos con tendencia a tener más diámetro. Cuando la cantidad de proteína dada a las madres en el primer trimestre de la gestación fue inferior a los requerimientos y en el segundo por encima de dichos requerimientos, los hijos machos tuvieron mayor volumen testicular. En cambio, si durante los primeros tres meses de preñez, la dieta materna estuvo excedida en el contenido proteico en un 250% respecto a los requerimientos del NRC, el efecto logrado fue

perjudicial porque las crías tuvieron menos volumen testicular e inferiores concentraciones de FSH, IGF1 y leptinas (Sullivan y col., 2010).

### Etapa predestete

El efecto de una restricción nutricional predestete, básicamente energética, es muy negativo para el desarrollo sexual de los toros, ya que actúa directamente sobre el pico temprano de LH y el pico temprano de FSH.

La restricción nutricional predestete impacta en todos los niveles del eje hipotálamico-hipofisario-gonadal. El primer órgano afectado es el hipotálamo ya que es el “sensor metabólico” del organismo, es a dónde llegan las señales del balance energético desde la periferia del organismo, vía humoral. Debido a eso, las neuronas secretoras de GnRH automáticamente disminuyen los pulsos secretorios de GnRH, lo que a su vez determina, que la hipófisis baje la frecuencia de pulsos de secreción de LH, disminuyendo de inmediato su concentración sérica. Consecuentemente, las células de Leydig tendrán una menor tasa de proliferación y diferenciación, como así también menos actividad esteroidogénica.

Durante la respuesta hipotalámica a la restricción nutricional predestete interviene el IGF1, debido a que el IGF1 es un metabolito hormonal endócrino y como tal, informa al hipotálamo del balance energético negativo. Las neuronas del centro secretor de GnRH del hipotálamo tienen receptores para IGF1. A dichos receptores, se unen las moléculas de IGF1 que inducen la secreción de GnRH, pero como la concentración sérica del IGF1 en este momento está disminuida por la restricción nutricional predestete, en consecuencia también baja el estímulo a producir GnRH.

También, en las células de Leydig hay receptores de IGF1, ya que el mismo promueve la esteroidogénesis (junto a la LH) activando el complejo enzimático, que redundaría en mayor cantidad de testosterona sanguínea. Pero frente a la restricción nutricional predestete esto se ve minimizado por la menor disponibilidad sérica de IGF1 (Brito, 2006; Brito y col., 2007a; Brito y col. 2007b; Barth y col., 2008).

La restricción nutricional predestete, paralelamente, provoca un descenso en la síntesis y secreción de FSH por parte de la hipófisis, determinando su menor concentración en sangre. Esto afecta a las células de Sertoli, en particular a su proliferación, la cual se da intensamente hasta aproximadamente las 20 a 25 semanas de edad (Barth y col., 2008). Por ende, y teniendo en cuenta que el número final de células de Sertoli es fijo, indirectamente esto incide en la cantidad posible de célula germinal, debido a que las células de Sertoli les dan soporte (Orth, 1984, Bagu y col., 2004; Barth y col., 2008).

Las concentraciones séricas de GH, leptinas e insulina se mantienen estables, a pesar de la restricción nutricional predestete, lo cual muestra que para que se modifiquen la restricción debería ser extremadamente severa (el animal no podría acceder a más del 75% de lo que requiere). La estabilidad de estas concentraciones indica que dichos metabolitos hormonales endócrinos, no facilitan la producción y secreción GnRH, pero tampoco la inhiben (Brito y col. 2007b; Barth y col., 2008).

Asimismo, si los toritos reciben una suplementación predestete (suplementación post-destete) de tipo energética, se logra un importante desarrollo corporal, altas concentraciones séricas de testosterona y cuando llegan a los 16 meses, gran volumen testicular y muy buena producción y calidad de semen. El aumento diario de peso óptimo que se lograría se ubica entre 1,00 a 1,20 kg.

Esto se debe a que la suplementación post-destete aumenta los pulsos secretorios de GnRH del hipotálamo, haciendo también que la hipófisis incremente la frecuencia de los pulsos secretorios de LH y la cantidad de hormona secretada en cada uno de ellos. Entonces la concentración en sangre de LH será mucho mayor y más prolongada.

El IGF1 ante una suplementación post-destete eleva su concentración porque el balance energético ahora es positivo, promoviendo la secreción de GnRH (centro secretor de GnRH hipotalámico) y la multiplicación y esteroidogénesis por parte de las células de Leydig.

El mayor volumen testicular logrado frente a una suplementación post-destete, responde al hecho que al haber mayor concentración de FSH en sangre, se logra un mayor número final de células de Sertoli, que a su vez implica una mayor cantidad de células germinales con una espermatogénesis activa. Ambas cosas generan tubos seminíferos de mayor diámetro, que ocupan mucho parénquima en cada uno de los testículos. Esto, junto a un espacio intersticial extendido (por muchas células de Leydig), son los determinantes del mayor volumen testicular y de la calidad seminal óptima. Los niveles circulantes de GH, leptinas e insulina frente a una suplementación post-destete son elevados (Bagu, 2004; Brito y col. 2007a; Barth y col., 2008).

Todas las características fenotípicas referidas al desarrollo sexual de los toritos frente a una suplementación post-destete mencionadas anteriormente, son típicas de animales que cuando estaban al pie de la madre recibieron alimentación extra mediante la técnica del creep feeding (Brito y col. 2007a).

Aquellos animales que fueron sometidos a una restricción nutricional predestete retrasaron el comienzo de la pubertad entre las 50 y 56 semanas de edad, y tuvieron menos

volumen testicular y menor número de espermatozoides y espermátidas en el epitelio germinal (Bagu, 2004; Brito y col. 2007b; Barth y col., 2008).

A la inversa, se puede decir, que los animales que tuvieron suplementación post-destete, a la misma edad lograron más volumen testicular y calidad seminal, aunque no adelantaron de un modo superlativo el inicio de la pubertad. Para esto, tal vez, habría que llevar la suplementación post-destete hasta antes de las 10 semanas de edad o elevar aun más el nivel de energía dietario (Brito y col. 2007b; Barth y col., 2008).

Se ha comprobado que los toros que durante su etapa de lactante han atravesado por una restricción nutricional, cuando se les mejora la nutrición después del destete, las concentraciones sanguíneas de IGF1, GH, leptinas, insulina y testosterona se elevan a valores similares o mayores al de aquellos animales no restringidos. No obstante, los testículos de esos animales a las 70 semanas de edad fueron más livianos que los de los animales sin restricción. Fisiológicamente, esto significa que para que los metabolitos hormonales endócrinos actúen exitosamente en el Período Puberal, previamente deben actuar la LH y la FSH durante el pico temprano de gonadotropinas, que se da justamente cuando el animal está al pie de su madre (Brito y col. 2007a; Brito y col. 2007b; Barth y col., 2008).

Desde la perspectiva de los sistemas de cría, donde se pretende la mayor eficiencia y eficacia de parte de los toros, la correcta alimentación de los mismos cuando están al pie de la madre, debería ser un punto crítico. Esto es porque durante la lactancia se determina con el pico temprano de gonadotropinas la edad de inicio de pubertad, la cual a su vez, fijará la edad de madurez sexual (un mínimo de 70% de espermatozoides normales con 30% de motilidad progresiva) del reproductor. Las características seminales que definen la madurez

sexual constituyen el principal predictor de la cantidad de terneros que producirá un toro durante el servicio (Fitz Patrick y col., 2002; Holroyd y col., 2002; Brito y col., 2007a; Brito y col., 2007b; Barth y col., 2008; Barth, 2011).

Los primeros ensayos se hicieron con animales Holstein, en la segunda mitad de la década de 1950. Los mismos fueron sometidos a dietas con tres niveles de energía: alta (140-160% de los requerimientos), media (100%) y baja (60-70%), desde la semana 1 a la semana 80 de edad, y se les extraía semen con un intervalo de 14 d. Los resultados favorecieron a los toritos que más energía habían consumido, ya que fueron los que tuvieron el mejor desarrollo sexual y alcanzaron antes la pubertad (Bratton y col., 1956; Tabla 3).

Tabla 3. Efecto de distintos niveles de energía en la dieta sobre la edad de arribo a la pubertad en toritos Holstein.

	Nivel de energía		
	Bajo	Medio	Alto
Edad a la pubertad (semanas)	57	49	43
Peso a la pubertad (kg)	255	288	330
Númeroro de eyaculados hasta la semana 80	12	12	19
Espermatozoides/eyaculado ( $\times 10^9$ )	2,3	3,8	3,7
Índice de preñez 60-90d (%)	74,1	72,9	74,2

Lunstra y col. (1985) determinaron inferiores medidas de perímetro escrotal de los hijos de vacas primerizas de 2 años respecto de los de vientres múltiparos cuando las ajustaron a 354 días de edad. Algo parecido observaron Barth y col. (2008), cuando midieron la concentración de LH entre la semana 8 a 20 de edad. Esto es atribuible en ambos ejemplos, a que las vacas primerizas normalmente producen menos leche por un inferior desarrollo de la glándula mamaria, además del consabido efecto de intrauterino. Algo similar ocurre con las vacas múltiparas que al superar los 10 años de edad comienzan

a producir menos leche, que repercute en un menor perímetro escrotal de sus hijos (Bourdon y Brinks, 1986; Lunstra, 1988; Kriese, 1991; Carrillo, 1997; Evans, 1999; Crews y Porteus, 2003; Brito, 2006). Otra cuestión investigada, fue saber cómo incide la cantidad y calidad de leche consumida por toritos al pie de sus madres sobre su desarrollo sexual. La producción láctea de los vientres está muy influenciada por la alimentación. En línea con estas premisas, se evaluó el impacto de dos dietas suministradas durante toda la lactancia a un grupo de vacas primerizas madres de toritos. Una dieta estaba integrada con 16% de proteína cruda y 8,5MJ de energía metabolizable y la otra lo estaba con 8% de proteína cruda y 8,0 MJ de energía metabolizable. Los resultados obtenidos en los toritos hijos de vacas con restricción protéica fueron un menor peso vivo al destete, baja concentración sérica de inhibina (120 días), menor perímetro escrotal (380 y 440 días de edad), mayor cantidad de vacuolas observables en los espermatozoides a los 440 días, bajo porcentaje de espermatozoides normales a los 500 días, y una alta correlación entre las concentraciones sanguíneas de LH y FSH a los 4 meses con la edad de inicio de pubertad. Se concluyó que la dieta materna predestete impacta sobre la edad de inicio de pubertad (Callaghan y Perry, 2010).

#### Etapas postdestete

Esta fase del crecimiento de los toritos, es en la que habitualmente los cabañeros los alimentan teniendo como premisa en general la venta o su presentación en exposiciones, más que su utilización como reproductores. Por esta razón, habitualmente recurren a dietas postdestete altamente energéticas, que buscan maximizar el aumento diario de peso y el peso corporal final.

Tal vez, sobre el impacto de estas dietas post-destete en el desarrollo sexual de los toros y teniendo presente otras edades, es sobre las cuales más se ha investigado.

Uno de los trabajos demostró que los animales (Angus y Hereford) que consumieron 80% de grano y 20% de forraje desde el destete hasta los 15 meses de edad, tuvieron mayor perímetro escrotal a los 12 meses de edad, pero no al final del ensayo con respecto al lote testigo que consumió una dieta convencional. Cuando se hizo una comparación cualitativa del semen entre ambos grupos a los 12 meses de edad, se constató que los de alta energía tenían semen de mala calidad. Esto se debió a la deposición de tejido adiposo en la bolsa escrotal que generó una mala termorregulación del epitelio germinal y un perímetro escrotal engañoso (Coulter, 1987). Otro experimento en esta misma línea, evaluó toritos Angus desde los 7 meses hasta los 11 meses de edad. La mitad de los individuos recibió una dieta integrada con mucha energía. Estos animales al final de las mediciones (11 meses de edad) tuvieron un perímetro escrotal más elevado. En ese mismo momento se los faenó, comprobándose que el peso testicular entre ambos grupos evaluados no tuvo diferencias significativas, pero sí las hubo entre los pesos de las bolsas escrotales, por el contenido de grasa, que daba un falso perímetro escrotal superior. No se encontraron diferencias en la edad de inicio de pubertad, ni en la calidad seminal (Seidel, 1980). En línea con esta temática, otro grupo de investigadores usó toritos Hereford y Simmental a los que dividió en un lote con alta energía en la dieta y un lote testigo. Las conclusiones que obtuvieron fueron que aquellos animales que habían recibido una dieta muy energética tuvieron un crecimiento corporal acelerado, más tamaño testicular, aunque no disminuyeron la edad de inicio de pubertad, respecto a los testigos. También, una alimentación para los toros rica en energía desde el destete hasta los 12 meses no produce



daños seminales por exceso de grasa escrotal, sí ocurre desde esa edad hasta los 24 meses de edad (Pruitt y col., 1986). Un ensayo de similares características determinó diferencias significativas en el perímetro escrotal, a favor de los toros que consumieron más energía. No se encontró ninguna significancia en las características seminales en los días 50 y 111 de ensayo (Ohl, 1996). En Texas se hizo un trabajo de investigación, con toritos Brahman, de 8 a 9 meses de edad. Una mitad del lote recibió una suplementación post-destete para tener un aumento diario de peso de 0,100 a 0,25 kg/día y la otra mitad tuvo una suplementación post-destete para ganar de 0,75 a 1,00kg/día. No hubo diferencias de tratamientos en lo concerniente a edad de inicio de pubertad, contenido hipotalámico de GnRH, peso de la hipófisis, contenido hipofisario de LH. Los toritos con alto aumento diario de peso tuvieron mayor concentración de testosterona (circulante y testicular), células de Leydig más grandes (más desarrollo del REL) y el peso corporal a la pubertad, del epidídimo y las vesículas seminales fueron superiores respecto a los de bajo aumento diario de peso (Nolan y col., 1990).

Un peligro intrínseco de las dietas post-destete extremadamente ricas en hidratos de carbono, es que si bien no causan problemas seminales entre los 6 y 12 meses de edad, pueden provocar laminitis, ruminitis y abscesos hepáticos (que pueden derivar en infecciones de las vesículas seminales). O sea un cuadro clínico que puede inutilizar a un reproductor, que seguramente aun no se utilizado en servicio (Barth y col., 2008; Barth, 2011).

Sobre los niveles de proteína en las dietas post-destete también se investigó. En un trabajo donde se utilizaron toritos de carne se iniciaron las mediciones a los 8, 10 y 12 meses de edad. Los niveles de proteína en la dieta fueron 1,5%, 5% y 8% para los animales

restringidos y 14% para los no restringidos. El ensayo duró de 84 a 170 días. Los resultados obtenidos indicaron que los animales restringidos tuvieron testículos, epidídimos, vesículas seminales, tubos seminíferos y epitelio germinal más reducidos respecto a los testigos. La calidad seminal (morfología y motilidad) se vio afectada en aquellos machos que recibieron 1,5% de proteína en la dieta. Este mismo grupo de animales perdió hasta 40% del peso vivo, inclusive algunos murieron o fueron sacrificados (Meacham, 1963; Meacham, 1964). Otro experimento, hecho en Nigeria, usó una población de machos Bunaji (raza nativa) y cruce Holstein, desde los 6 hasta los 20 meses de edad. Se definieron dos tratamientos: 14% de proteína (testigo) y 8,5% de proteína (restringido). Luego de los 12-14 meses de edad se concluyó que los toritos que no sufrieron restricción tuvieron: más peso vivo, mayor perímetro escrotal y calidad seminal superior (concentración y motilidad) (Rekwot, 1988).

En los sistemas de cría ubicados en climas tropicales (Brasil, Australia, USA, Sudáfrica) se debe hacer frente a estaciones secas que duran medio año. Por eso es usual la suplementación con proteínas. Un ensayo que reproduce estas condiciones productivas incluyó toritos índicos puros e índicos x taurinos, que fueron destetados a los 6 meses de edad y fueron suplementados dos veces antes de los 21 meses de edad y otro grupo (de la misma composición racial) que nunca fue suplementado. Los resultados indican que los animales que tuvieron suplementación post-destete protéica lograron: más peso vivo, volumen testicular mayor, peso del epidídimo superior, tubos seminíferos más grandes, mejor producción diaria de semen y reservas epididimales de semen más consistentes respecto a los no suplementados (Brito, 2006).

En general, parecería que dichas dietas logran un muy buen desarrollo testicular, aunque no hay adelantamiento de la edad de inicio de pubertad y en consecuencia de la madurez sexual.

Por eso, se realizó un ensayo donde los objetivos incluían esta cuestión. Se usaron animales Angus y Angus x Charolais, del mismo grupo contemporáneo y con buen desarrollo para la edad. Desde el destete (6 meses de edad) hasta los 16 meses de edad se les suministró tres dietas: sin concentrado, con 14% de concentrado (8,5% de cebada rolada y 5,5% de harina de canola) y con 37% de concentrado (22% de cebada rolada y 15% de harina de canola). Todas las dietas incluían en diversas proporciones silaje de cebada, minerales y vitaminas. Se obtuvo como resultado que el índice de crecimiento no se asoció estadísticamente a una mejora en el desarrollo sexual. El peso vivo (en distintas edades) tuvo asociación estadística con menor edad de inicio de pubertad y por ende a la madurez sexual y con el volumen testicular (medido a los 16 meses de vida). Esto estaría confirmando que la edad de inicio de pubertad y la edad de madurez sexual pueden adelantarse, siempre y cuando, la dieta al pie de la madre hubiese garantizado el correcto desarrollo del pico temprano de gonadotrofinas. En este experimento, el aumento diario de peso se ubicó entre 1,00 a 1,60kg/día (dependiendo el tratamiento), con el cual se logró: no afectar la producción y calidad seminal, no provocar una excesiva deposición adiposa en el escroto, mantener correctamente la temperatura escrotal y desde lo productivo, satisfacer las metas de crecimiento (Brito y col., 2012a).

### **3.3.Genotipo, selección genética y pubertad**

#### Genotipos y pubertad

Existen diferencias genéticas entre y dentro de las razas bovinas de carne en lo referido a la edad de inicio de pubertad de los toritos. Los animales con componente genético índico (puros o derivados) alcanzan la pubertad a mayor edad y peso que aquellos pertenecientes a los genotipos taurinos. Esta tendencia se mantiene aún en condiciones ambientales adversas. Así lo reportan Chase y col. (1995), quienes observaron, en sendos ensayos hechos en Florida con clima subtropical húmedo, que las razas taurinas fueron sexualmente más precoces que las cebuínas y sus derivadas (Tabla 4).

Dentro de los bovinos de origen europeo, los toritos de razas únicamente mejoradas por su conformación carnífera (Charolais, Limousin, Hereford, etc.) son menos precoces sexualmente si se los compara con aquellos pertenecientes a grupos raciales que también fueron seleccionados por su aptitud lechera (Simmental, Gelviah, Red Poll, Pardo Suizo, etc.). Esta tendencia se acentúa en la medida que la producción láctea es mayor. En las razas de doble músculo como la Azul Belga, Piamontesa, Blonde d'Aquitaine, etc.; los toritos inician la pubertad en forma tardía y acompañada de escaso desarrollo testicular (Barth, 2004).

Tabla 4. Medias de edad a la pubertad de diversas razas y cruzas descriptas en la bibliografía

Raza	Edad Pubertad (días) (Wolf y col., 1965)	Bibliografía
Angus	308 <sup>a</sup>	Wolf et al, 1965
Hereford	315 <sup>a</sup>	Wolf et al, 1965
Nelore precoz	526±12,3 <sup>a</sup>	Brito y col., 2004
Nelore tardío	673,3±19,1 <sup>b</sup>	Brito y col., 2004
Canchim precoz	360,1±9,4 <sup>a</sup>	Brito y col., 2004
Canchim tardío	460,7±5,0 <sup>b</sup>	Brito y col., 2004
MARC III <sup>(*)</sup> x Hereford <sup>(**)</sup>	270 <sup>ab</sup>	Casas y col., 2007
MARC III <sup>(*)</sup> x Angus <sup>(**)</sup>	268 <sup>a</sup>	Casas y col., 2007
MARC III <sup>(*)</sup> x Wagyu <sup>(**)</sup>	302 <sup>c</sup>	Casas y col., 2007
MARC III <sup>(*)</sup> x Frisón <sup>(**)</sup>	278 <sup>ab</sup>	Casas y col., 2007
MARC III <sup>(*)</sup> x Noruega Col <sup>(**)</sup>	271 <sup>ab</sup>	Casas y col., 2007
MARC III <sup>(*)</sup> x Sueca C y B <sup>(**)</sup>	302 <sup>bc</sup>	Casas y col., 2007
Angus	395,8±15,9 <sup>a</sup>	Chase y col., 1997 (Ensayo 1)
Hereford	407,1±15,9 <sup>a</sup>	Chase y col., 1997 (Ensayo 1)
Brahman	485,4±17 <sup>b</sup>	Chase y col., 1997 (Ensayo 1)
Senepol	416,5-±16,4 <sup>a</sup>	Chase y col., 1997 (Ensayo 1)
Angus	429,6±18,7	Chase y col., 1997 (Ensayo 2)
Romosinuano	432,8±20,1	Chase y col., 1997 (Ensayo 2)
Brahman	509,7±20,9	Chase y col., 1997 (Ensayo 2)
Brahman x Nelore	468,3±24,2	Chase y col., 1997 (Ensayo 2)
Brahman x Angus	392±8,3	Chase et al, 2001
Senepol x Angus	356±7,2	Chase et al, 2001
Tuli x Angus	382±7,2	Chase et al, 2001
Angus	273 <sup>ab</sup>	Lunstra et al, 1978
Angus x Hereford	264 <sup>a</sup>	Lunstra et al, 1978
Hereford	261 <sup>a</sup>	Lunstra et al, 1978
Hereford x Angus	279 <sup>ab</sup>	Lunstra et al, 1978
Red Poll	258 <sup>a</sup>	Lunstra et al, 1978
Pardo Suizo	295 <sup>b</sup>	Lunstra et al, 1978
MARC III <sup>(*)</sup> x Brahman <sup>(**)</sup>	320±7 <sup>c</sup>	Lunstra et al, 2003
MARC III <sup>(*)</sup> x Boran <sup>(**)</sup>	302±8 <sup>c</sup>	Lunstra et al, 2003
MARC III <sup>(*)</sup> x Angus <sup>(**)</sup>	238±10 <sup>a</sup>	Lunstra et al, 2003
MARC III <sup>(*)</sup> x Hereford <sup>(**)</sup>	261±9 <sup>ab</sup>	Lunstra et al, 2003
MARC III <sup>(*)</sup> x Azul Belga <sup>(**)</sup>	273±7 <sup>b</sup>	Lunstra et al, 2003
MARC III <sup>(*)</sup> x Tuli <sup>(**)</sup>	284±8 <sup>b</sup>	Lunstra et al, 2003

(\*) Madres MARC III (1/4 Hereford, 1/4 Pinzgauer, 1/4 Red Poll), Clay Center, Nebraska

(\*\*) Raza paterna de los toritos

Tanto en razas índicas como en taurinas es posible encontrar individuos más y menos precoces sexualmente. Es así como en una población Nelore de Brasil se detectaron toritos precoces con edad de inicio de pubertad de 526,7 días respecto a otros más tardíos con edad de inicio de pubertad de 673,3 días. Los mismos autores describen dentro de un grupo de toritos Canchim (3/8 Cebú y 5/8 Charolais) animales con edad de inicio de pubertad temprana (360,1 días) versus individuos no precoces sexualmente, cuya edad de inicio de pubertad fue de 460,7 días (Brito y col., 2004). Otros trabajos indican edad de inicio de pubertad para la raza Hereford de 293,3 días (precoces) y de 338,1 días (tardíos; Evans y col, 1995). Lo antes descrito demuestra la variabilidad existente dentro de los diferentes grupos raciales, lo cual permite llevar adelante procesos de selección genética a favor de precocidad sexual.

En forma subyacente respecto a otros caracteres genéticos seleccionados, en los últimos cincuenta años, se ha producido para las razas Angus y Hereford una modificación en la edad de inicio de pubertad, a favor de animales más precoces. También se modificaron el perímetro escrotal y el peso vivo al momento del inicio de la pubertad. Wolf y col. (1965), indicaron una edad de inicio de pubertad de 308 días, 369 kg de peso vivo y 30,0 cm de perímetro escrotal y 315 días, 374 kg de peso vivo y 31,2 cm de perímetro escrotal en toritos Angus y Hereford respectivamente. Mientras que trabajos posteriores reportan para el Angus una edad de inicio de pubertad de 238 días, acompañada de 323 kg de peso vivo y una perímetro escrotal de 28,1 cm y para el Hereford la edad de inicio de pubertad fue de 261 días, 339 kg de peso vivo y con 27,9 cm de perímetro escrotal (Lunstra y Cundiff, 2003; Casas y col., 2007).

### Circunferencia escrotal y Pubertad

Lunstra y col., 1978; Lunstra y Cundiff, 2003 establecieron que en forma independiente de la raza (taurinos e índicos), del peso vivo y la edad de los toritos, el perímetro escrotal era en forma constante  $27,9 \pm 0,2$  cm en el momento del inicio de la pubertad, cuando los animales mostraban características seminales definitivas de la misma ( $50 \times 10^6$  esp/ml y 10% de motilidad, Wolf y col., 1965). Como dichos autores obtuvieron una correlación entre perímetro escrotal y edad de inicio de pubertad de  $-0,65$  ( $p < 0,01$ ) el perímetro escrotal se propuso como indicador indirecto de pubertad.

El perímetro escrotal es de moderada a alta heredabilidad, en un rango que va de 0,39 a 0,78 (Martínez Velázquez y col., 2003; Corbet y col., 2009; Albuquerque y Baldi, 2011; Fortes y col., 2012) lo que permite progresar rápidamente en programas de mejoramiento genético.

Diversos trabajos han reportado que un mayor perímetro escrotal está correlacionado con edad de inicio de pubertad temprana en vaquillonas emparentadas (Martin y col., 1992; Burns y col., 2011; Fortes y col., 2012). En relación a esto Morris y col. (2000), encontraron en Angus; y Vargas y col. (1998) en Brahman, una correlación genética de  $-0,25$  y  $-0,32$  entre perímetro escrotal y edad de inicio de pubertad de las hembras, respectivamente. En tanto que Brinks y col., 1989 indicaron mediante un coeficiente de regresión que por cada cm de perímetro escrotal que se gana en los toros padres, sus hijas tendrán 0,79 día menos de edad de inicio de pubertad.

Se analizaron también las correlaciones entre perímetro escrotal y dos indicadores indirectos de pubertad en vaquillonas: edad al primer parto y probabilidad de preñez. Las correlaciones con edad al primer parto es negativa y favorable con valores que oscilan entre

0,13 y -0,44. Mientras que con probabilidad de preñez, la correlación es positiva, ubicándose entre 0,11 a 0,27. Como las correlaciones obtenidas no son altas se debe esperar una respuesta lenta en planteos de selección (Albuquerque y Baldi, 2011).

### Selección genética y pubertad

Actualmente existen antecedentes de intentos de llevar adelante propuestas de selección genética a favor de precocidad sexual tanto en hembras como en machos. En Nueva Zelanda durante 23 años ininterrumpidos se llevó adelante un programa de selección genética por precocidad sexual en vaquillonas en un rodeo Angus el cual fue contrastado con un testigo sin selección específica para este carácter. El inicio de la pubertad en las vaquillonas fue determinado mediante observación visual del primer estro y la de los toritos cuando alcanzaban un perímetro escrotal de 27,9 cm (Lunstra y col., 1978). Como resultado de este proyecto las hembras de la línea precoz comenzaron a ciclar 69 días antes respecto del control, (19% respecto al promedio del rodeo). El perímetro escrotal (medida entre los 8 y 13 meses de edad) de los toritos de pubertad temprana fue 3 cm superior a los testigos (9,6% respecto al promedio del rodeo). Se obtuvo una correlación de  $-0,25 \pm 0,089$  entre edad al primer estro y perímetro escrotal (Morris y col., 2000; Morris y Amyes, 2005; Morris, 2009).

También dentro de algunas pruebas de progenie de razas carniceras se evalúan caracteres que tienen que ver directamente con la precocidad sexual. La prueba genética de Nelore de Brasil cuenta con DEPs para edad al primer parto y probabilidad de preñez precoz. En el caso de edad al primer parto las vaquillonas que paren temprano en su vida son sexualmente precoces con respecto a aquellas que lo hacen tardíamente. Para



probabilidad de preñez precoz se considera de pubertad temprana a las hembras que se preñan antes de los 21 meses de vida. Las correlaciones genéticas observadas entre probabilidad de preñez precoz y perímetro escrotal a los 365 y 450 días de edad fueron 0,43 y 0,49, respectivamente. Por esta razón, fueron incluidas las DEPs de perímetro escrotal dentro del programa de selección por precocidad sexual de la raza. (Vozzi, 2008; Albuquerque y Baldi, 2011).

Otro antecedente en este sentido es la DEP de preñez de las vaquillonas presentes en la evaluación genética de Angus de EE.UU. Mide la probabilidad de preñez de vaquillonas a los 15 meses de edad. Esto implica que los toros con muchas hijas que se preñen a corta edad, están actuando como animales mejoradores en lo referido a la precocidad sexual (<http://www.angus.org/Nce/HeiferPregnancy.aspx>).

En el concepto cuantitativo clásico de la selección genética el valor de cría - *Breeding Value*-de los diferentes caracteres está controlados por un número de genes que tiende al infinito. Cada uno de esos genes actúa en forma aditiva, sin ligamientos entre ellos, determinando el fenotipo del individuo. Por lo tanto, en la selección cuantitativa se asumió una distribución normal para el Valor de Cría surgido de la sumatoria que tiende al infinito de variables aleatorias, cada una de valor muy pequeño.

Con el avance de la genética molecular se describió que el ADN de los bovinos está constituido por 30 pares de cromosomas, en donde una mitad fue aportada por la madre y la otra por el padre del individuo. A su vez, cada cromosoma está formado por bases (adenina, citocina, guanina, timina), que en el genoma bovino suman 35.000.000.000. En la mayor parte de esas bases, todos los animales son iguales, pero cada 60.000 a 100.000 bases puede aparecer un cambio en alguna de ellas, lo que determinará diferencias individuales. Ese

cambio en un par de bases es lo que constituye un polimorfismo SNP -*Single Nucleotide Polymorphism*-. Al mismo tiempo los genes que gobiernan caracteres de importancia económica poseen entre 1000 y 5000 pares de bases y son denominados-*Quantitative Trait Loci*-(QTLs). En la expresión de las características cuantitativas algunos de esos genes tendrán un gran impacto y muchos una pequeña incidencia.

La posibilidad de asociar los SNPs conocidos (marcadores) con los QTLs desconocidos dio origen a la Selección Asistida por Marcadores o SAM. Esta tecnología consiste en la predicción del Valor de Cría sumando la contribución poligénica más los efectos individuales de los QTLs que se ubican cercanos a un marcador molecular.

La aplicación de la SAM implica dos fases. En la primera se intenta detectar dentro del genoma QTLs que gobiernen caracteres productivos relevantes. Cuando se pasa a la segunda fase se calculan las predicciones del Valor de Cría, sumando a los efectos de los QTLs marcados el Valor de Cría poligénico restante determinado por los QTLs desconocidos. La selección asistida por marcadores presenta como desventaja el hecho que se conocen pocos QTLs para cada uno de los caracteres de relevancia económica, haciendo que el impacto sobre la varianza aditiva sea bajo porque dichos caracteres están gobernados por muchos genes. Además, pueden ocurrir recombinaciones genéticas entre el marcador y el QTL, lo cual haría que algunos hijos de un padre puedan tener el marcador, pero no la variante útil del QTL que se quiere seleccionar.

Posteriormente, a partir de lo postulado por Meuwissen y col. (2001), surge la Selección Genómica. Dichos autores propusieron seleccionar por todos los QTLs que pueden afectar un carácter de importancia económica, pudiéndose predecir el Valor de Cría a través de una enorme cantidad de marcadores moleculares distribuidos a lo largo del

genoma. Esto permite detectar gran cantidad de QTLs sin necesidad de saber dónde exactamente están, ni cuántos son.

Los avances tecnológicos y la disminución de los costos han permitido alcanzar un elevadísimo número de SNPs dispersos en el genoma, necesarios para su utilización como marcadores. Actualmente hay disponibilidad en el mercado de paneles de hasta 800.000 SNPs (800K).

La selección genómica comenzó utilizarse en rodeos lecheros en la primera década del siglo XXI en los EE.UU, para preseleccionar toritos destinados a futuras evaluaciones genéticas. Metodológicamente, consiste en obtener el ADN de un universo de padres (población de referencia) con información cuantitativa de alta seguridad por tener numerosa descendencia ya incorporada en las pruebas de progenie. Para cada toro a partir del ADN se determinan los valores de los SNPs usando los paneles disponibles comercialmente. Luego, con esa información se calcula una fórmula de predicción de los efectos del área en el genoma cercana a cada SNPs, usando la información cuantitativa de los toros para los distintos caracteres evaluados. A los toritos sin progenie también se les extrae ADN, el cual es valorizado con los paneles comerciales de SNPs. Con la información de los genotipos obtenida y aplicando la ecuación de predicción se obtienen los Valores de Cría genómicos. El impacto de la selección genómica en la seguridad de la información genética de cada individuo tendrá que ver en gran medida con las correlaciones que se obtengan entre los resultados del panel de SNPs y el valor cuantitativo del Valor de Cría. Además, a mayor cantidad de SNPs en el panel, mayor será la seguridad a obtener. La información genómica obtenida tiene una seguridad equivalente a la que se logra con varios hijos evaluados. Por

ejemplo en el primer grupo de toritos Holstein elegidos por selección genómica, la seguridad fue equivalente a 11 hijas en producción con información cuantitativa completa.

La selección genómica posee las siguientes ventajas:

a) Permite abaratar costos en la realización de las pruebas de progenie dado que se pueden disminuir anticipadamente el número de reproductores a evaluar. Para el caso del Holstein se calcula que se pasa de los 500 toros por año a una dotación anual de solamente 20.

b) Aumenta el progreso genético porque:

- *Disminuye el intervalo generacional*: La cantidad de años que históricamente fueron necesarios para tener una evaluación completa (para razas lecheras 5-6 años y en las carniceras un mínimo de 6 años) baja notablemente.
- Se alcanzan valores de mayor seguridad en la información a más temprana edad, sobre todo para aquellas características de baja heredabilidad o ligadas a un solo sexo.

c) Hay un menor incremento en la consanguinidad.

d) Posibilidad de seleccionar animales a temprana edad por características que sólo se pueden medir durante la madurez (terneza, longevidad, etc.) o que son difíciles de medir por estar muy influenciadas por el ambiente o por el alto costo de hacerlo (precocidad sexual, eficiencia de conversión, etc.).

e) Desde una perspectiva comercial los beneficios serán que los cabañeros podrán ofrecer a venta toros con información muy segura, que garantizarán resultados más exitosos en el uso de esos reproductores por parte del criador. También, el cabañero ayudándose con

la tecnología genómica detecta a temprana edad un reproductor superior le permitirá ejercer una presión de selección en su propio rodeo (Cantet, 2008; Albuquerque y Baldi, 2011; Van Eenennam y col., 2011).

Actualmente, a nivel mundial la selección genómica está incorporada complementariamente a la genética cuantitativa en las pruebas de progenie tanto de bovinos de leche y de carne en países como: EE.UU, Canadá, Australia, Nueva Zelanda, Holanda, etc.

En Brasil la raza Nelore incorporó la selección genómica en su prueba de progenie para caracteres de crecimiento, carcasa y fertilidad. Dentro de esta última se tuvieron en cuenta aquellas características vinculadas a la precocidad sexual como edad al primer parto y probabilidad de preñez en las vaquillonas, y perímetro escrotal en los toritos (Lobo y col., 2012).

En resumen, la utilización de toritos de 15 meses de edad mejora la eficiencia y calidad de los sistemas de cría, disminuyendo los costos de reposición y acelerando el progreso genético porque acortan el intervalo generacional.

La bibliografía es relativamente abundante acerca del el aspecto fisiológico de la pubertad en toritos taurinos y cebuínos. Y está demostrado que el uso exitoso de los toritos en su primera temporada de apareamientos depende especialmente de la calidad seminal, la cual está condicionada por la edad de inicio de la pubertad.

Investigaciones hechas en sistemas ganaderos extensivos demostraron la factibilidad de seleccionar genéticamente a favor de la precocidad sexual. Los reportes bibliográficos mayoritariamente refieren a los marcadores genéticos asociados a la precocidad sexual de vaquillonas, pero son muy escasos los ejemplos para machos y ninguno de ellos fue

detectado en poblaciones bovinas de la Argentina. Se observa una vacancia de estudios que caracterizan la pubertad de toritos recriados bajo condiciones pastoriles típicas de la Argentina.

### **OBJETIVOS GENERALES**

1. Describir la variable fenotípica pubertad en machos bovinos en las condiciones de los sistemas pastoriles en la Argentina.
2. Estudiar la asociación entre marcadores genéticos y caracteres fenotípicos relacionados con la precocidad sexual en el macho bovino.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Estudiar la relación entre parámetros fenotípicos de pubertad y edad en toritos Angus.
2. Estimar el efecto padre y línea genética en la edad de arribo a la pubertad y perímetro escrotal en una población de toritos de raza Angus.
3. Caracterizar la edad a la pubertad de toritos de raza Angus criados en sistemas pastoriles.
4. Detectar correlaciones entre edad de inicio de pubertad, perímetro escrotal al destete y peso al destete.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Animales Experimentales**

Para el desarrollo del presente trabajo de tesis se utilizaron datos de dos grupos de animales. Los datos históricos del GRUPO a se emplearon para un estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación de la precocidad sexual en toritos Angus de una cabaña. En los animales del GRUPO b, se realizaron las determinaciones para elaborar la descripción fenotípica de la pubertad en sistemas de producción característicos de la Argentina y realizar los estudios de asociación con los marcadores genéticos.

### **Animales empleados en el estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación de pubertad en toritos Angus.**

Utilizando la base de datos de la cabaña Flores Chicas se hizo un análisis retrospectivo de los registros relacionados con el inicio de la pubertad de 1270 toritos Angus obtenidos entre los años 2002 y 2013. La información relativa a cada uno de los toritos se completó con padre, madre, edad de la madre y fecha de nacimiento. Cada camada de toritos se destetó cuando su edad promediaba aproximadamente los 6 meses, pasando a la etapa de recría, donde la alimentación estuvo basada en el pastoreo directo de verdes de invierno: avenas (*Avena sativa*), promociones de rye grass (*Lolium perenne*). El plan sanitario incluyó vacunaciones convencionales (aftosa, mancha y gangrena gaseosa, carbunco bacteriano) y desparasitaciones estratégicas contra nematodos gastrointestinales.



**Animales experimentales empleados para el estudio de parámetros fenotípicos de la pubertad en sistemas pastoriles y su asociación con marcadores genéticos.**

Para este estudio se utilizaron 286 toritos Angus, negros y colorados, nacidos entre julio y septiembre de los años 2008 y 2009, hijos de 24 padres. De cada individuo se contó con la fecha de nacimiento, madre, padre y peso al nacer. Estos animales pertenecían a las cabañas Flores Chicas de Alberto Areco (Lobería, Buenos Aires) y La Trinidad de Miguel Pertino (Bavio, Buenos Aires). Durante los muestreos del año 2009 se trabajó con 166 animales, de los cuales 95 pertenecían a la cabaña Flores Chicas y 71 eran propiedad de cabaña La Trinidad. En 2010, se repitió el trabajo con 120 toritos aportados por la primera de las cabañas.

El establecimiento Flores Chicas se encuentra en el partido de Lobería (longitud:  $58^{\circ} 28' 36,17''$ W y latitud:  $38^{\circ} 06' 45''$ S), en el sudeste de la provincia de Buenos Aires. Los suelos más frecuentes en el establecimiento son clase III y clase IV, aptos para cultivos anuales y pasturas según la clasificación de Klingebiel y Montgomery, 1961. En el año 2009 el total de lluvias fue de 758 mm y en 2010 alcanzó los 1036 mm. Los registros promedios anuales de temperatura fueron  $14,5^{\circ}\text{C}$  y  $15,0^{\circ}\text{C}$  para 2009 y 2010, respectivamente.

Por su parte, el establecimiento La Trinidad, está localizada en el área nordeste de la Cuenca del Salado, dentro del partido de Magdalena (longitud  $57^{\circ} 52,10' 48''$ W y latitud:  $35^{\circ} 8,32' 59''$ ). Predominan los suelos clase VI que no son aptos para agricultura, útiles sólo para pastoreo. Durante 2009 se alcanzaron los 996 mm de lluvias totales y una temperatura media anual de  $15,7^{\circ}\text{C}$ .

En los rodeos de origen de estos animales, el criterio de selección prioriza fertilidad, biotipo funcional, tamaño moderado, facilidad de partos, capacidad de engrasamiento y entore precoz de vaquillonas. Una particularidad de la cabaña Flores Chicas es que desde 2001 tiene fijado como uno de sus objetivos principales de selección genética la precocidad sexual, tanto en machos como en hembras. Por su parte, la cabaña La Trinidad utiliza la información objetiva de la prueba de evaluación genética Breedplan (Universidad de New England, Australia), para la elección de los reproductores y caracterización de los productos de venta.

Los toritos en la etapa predestete permanecieron juntos a sus madres pastoreando alternativamente pastizales naturales de buena calidad y/o pasturas consociadas, con especies como trébol blanco (*Trifolium repens*), festuca y agropiro (*Agropyrum elongatum*). Una vez producido el destete, la alimentación se basó únicamente en el consumo de forraje verde de alta digestibilidad, principalmente verdeos de invierno como avenas y promociones de rye grass. Esporádicamente, también se incluyeron en la dieta pasturas consociadas de trébol blanco y festuca. Todos los recursos forrajeros fueron consumidos mediante el pastoreo rotativo en franjas diarias. También en este grupo de animales, el plan sanitario incluyó vacunaciones convencionales (aftosa, mancha y gangrena gaseosa, carbunco bacteridiano) y desparasitaciones estratégicas contra nematodes gastrointestinales.

### **Momento que los toritos alcanzan la pubertad**

En el presente estudio se utilizaron las dos definiciones del momento en alcanzar la pubertad del macho bovino:

a) Cuando el eyaculado presenta una concentración de  $50 \times 10^6$  de espermatozoides por mililitro y 10% de motilidad lineal (Wolf y col., 1965).

b) Momento en el cual el perímetro escrotal ha alcanzado los  $27,9 \pm 0,2$  cm, independientemente de la raza y el peso vivo (Lunstra y col., 1978).

## **Determinación de los parámetros fenotípicos relacionados con la pubertad**

### **Estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación de pubertad en toritos Angus.**

En la cabaña Flores Chicas cada individuo fue evaluado una única vez en su vida entre los 254 y 407 días de edad mediante el análisis seminal de un eyaculado extraído por electroeyaculación, en el que se determinó concentración y motilidad espermática. Simultáneamente se midió el perímetro escrotal del animal usando una cinta metálica comercial.

Se elaboró una descripción del comportamiento de cada una de estas tres características fenotípicas en la población estudiada, para los animales púberes e impúberes para cada una de las camadas anuales de toritos.

Un análisis se realizó con los animales agrupados por edad, distribuidos en intervalos quincenales entre los 255 y los 359 días de edad.

Para analizar los antecedentes de selección genética de la cabaña en relación a la pubertad, los toros padres fueron agrupados en líneas genéticas en función de su parentesco luego de haberse determinado la existencia de conexiones entre sus respectivas genealogías. Los toritos fueron distribuidos en función de la línea genética a la cual pertenecían sus padres, para cada grupo se determinaron la edad y el perímetro escrotal a la pubertad definida por concentración y motilidad espermática.

## Estudios experimentales de parámetros fenotípicos a la pubertad en sistemas pastoriles.

Desde el destete y aproximadamente una vez al mes, se tomaron los siguientes datos fenotípicos de cada animal (Figura 3).

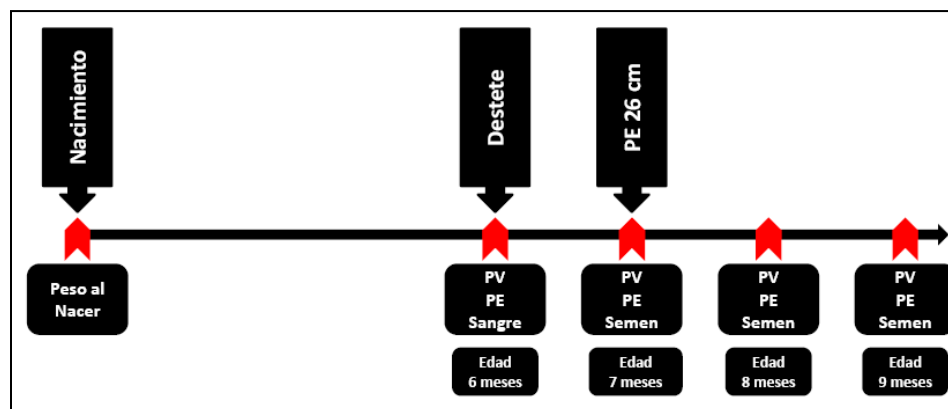


Figura 4. Esquema de flujo de los trabajos de campo realizados en ambas cabañas.

**-Peso vivo:** Las pesadas fueron hechas sin desbaste previo y en todos los casos se usaron balanzas mecánicas.

**-Perímetro escrotal:** Para cuantificar esta variable se usó un escrotómetro comercial. La técnica utilizada consistió en fijar el escrotómetro firmemente alrededor del máximo contorno descrito por ambos testículos, los cuales previamente habían sido empujados al fondo de la bolsa escrotal (Kealey, 2004; Kealey y col., 2006; Ruter y Russo, 2006; Bo y Tríbulo, 2011).

**-Calidad espermática:** Cuando los toritos alcanzaron los 26 cm de perímetro escrotal, se inició la extracción de semen mediante la técnica de electroeyaculación utilizando un equipo ElectroJac5 (Lansing, Michigan, EE.UU). En todos los casos se descartaron los líquidos transparentes pre-eyaculatorios. En cada oportunidad, se determinó la motilidad progresiva y la concentración espermática de los eyaculados obtenidos. La

determinación de la motilidad progresiva fue hecha a partir de semen diluido en buffer fosfato salino (pH 7,4) usando un microscopio óptico Nikon Eclipse E100 de 400 aumentos (Tokio, Japón), dotado con una platina térmica graduada en 37°C. (Lunstra y Echemkamp, 2002). La concentración se determinó con un espectrofotómetro Minitube, Tiefenbach, modelo SPERMACUE 12300/0500 (Baviera, Alemania).

A partir de estas mediciones se determinaron:

1. Las diferencias para edad, peso vivo y perímetro escrotal estimadas al momento de la pubertad, según los criterios de la definición de Wolf y col. (1965), entre cabañas y, entre años, sólo para Flores Chicas.
2. Las correlaciones entre edad a la pubertad, edad de la madre, peso a los 300 días y perímetro escrotal a la pubertad.
3. Las correlaciones entre edad a la pubertad, peso al destete y perímetro escrotal al destete.
4. Las diferencias en la estimación de la edad a la pubertad mediante la calidad espermática o el perímetro escrotal.

El desarrollo experimental de este trabajo contó con la aprobación específica del “Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio” (Facultad de Ciencias Veterinarias-UNLP; Res. Nro. 129/09).

### **Obtención de muestras, extracción de ADN y genotipificación por pirosecuenciación para la realización de los estudios de asociación con marcadores genéticos**

En una única oportunidad, a cada individuo se le extrajo una muestra de sangre de la vena coccígea de 10 ml, empleada como fuente de linfocitos a partir de los cuales se extrajo

el ADN total. En el sangrado se usó el anticoagulante EDTA (Ácido etilendiaminotetraacético) al 6%. Las muestras se conservaron hasta su procesamiento en el laboratorio a -20 C°. Además, a cada uno de los animales se le reservó una muestra de pelos con bulbo piloso de la cola, para asegurar la obtención de ADN frente a cualquier contingencia.

El ADN total de los linfocitos se extrajo usando el Kit Wizard Genomic (Promega, Madison, Wiscconsin, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ADN obtenido se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

Para los estudios de asociación entre marcadores genéticos y caracteres de pubertad sexual, se seleccionaron 4 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) localizados en 3 genes candidatos, dos SNPs en GNRHR, uno en LHR y uno en IGF1, reportados por Ge y col. (2001), y Liron y col. (2010), respectivamente. Los polimorfismos GNRHR-SNP5 y GNRHR-SNP6 se eligieron porque estudios previos mostraron que dichos SNPs fueron suficientes para identificar los 4 haplotipos más frecuentes de GNRHR dentro de las poblaciones Angus estudiadas (Liron y col., 2010). El SNP GF1-SnaBI, localizado en la región promotora, se seleccionó porque el análisis hecho con el software TESS (*Transcription Element Search System*; <http://www.cbil.upenn.edu/cgi-bin/tess/tess?RQ=WELCOME>) mostró que este polimorfismo se encuentra localizado en el sitio de reconocimiento del factor de transcripción NF1 dentro de la región reguladora del gen IGF1. Por otra parte, Maj y col. (2008), asociaron polimorfismos en el promotor de este gen con variaciones en los niveles de IGF1 en sangre. El cuarto polimorfismo incluido en el presente estudio correspondió al SNP LHR-I499L reportado por nuestro grupo de trabajo por re-secuenciación del exón 11

del gen LHR en las poblaciones estudiadas de Angus de Argentina. Este exón fue analizado porque codifica para la región transmembrana de la proteína, siendo este un dominio crítico para la función del receptor. A pesar que este SNP no ha sido aún asociado a la edad de pubertad en toros, estudios previos han reportado que mutaciones en esta región del gen LHR puede ser la causa de precocidad sexual en humanos, lo que justifica la búsqueda de polimorfismo en este exón y su posterior asociación con caracteres de pubertad sexual en toros (Thenmen y Huhtaniemi, 2000, Tabla 6).

Tabla 6. Listado de SNPs para receptor de GNRH (*GNRHR*) receptor de hormona luteinizante (*LHR*) e insulin-like growth factor 1 (*IGF1*) y su ubicación en genes candidatos.

SNP	Gen	Cromosoma	Posición nucleotídica - Polimorfismo – sitio amino ácido	Región génica	Tipo de mutación
GHRHR-SNP5	GNRHR	BTA6	NW_001495209,1 <sup>(1)</sup> :g. 884033T>C – aa137	Exón 1	Silente
GNRHR-SNP6	GNRHR	BTA6	NW_001495209,1 <sup>(1)</sup> :g. 871174C>T – aa236	Exón 2	Silente
LHR-I499L	LHR	BTA11	NM_174381,1 <sup>(2)</sup> c. 1504 A>C – aa499	Exón 11	No-sinónima (I>L)
IGF1-SnaBI	IGF1	BTA5	AF017143,1 <sup>(3)</sup> :g. 512T>C	Promotor	-

(1) Conting genómico del cromosoma 6 de *Bostaurus* (NW\_001495209.1/Bt6\_WGA699\_4), ensamblado de referencia (basado en el genoma Btau\_4.0, <http://www.hgsc.bcm.tmc.edu/projects/bovine/>).

(2) NM\_174381.1 receptor de la hormona luteinizante/coriogonadotropina de *Bostaurus* (*LHCGR*), ARNm.

(3) AF017143.1 IGF1 de *Bos taurus*, región 5' flanqueadora y cds parcial

Para la genotipificación de los 4 SNPs seleccionados (GNRHR-SNP5, GNRHR-SNP6, LHR-I499L, and IGF1-SnaBI) para el presente estudio, se desarrollaron 4 ensayos

basados en la tecnología de pirosecuenciación. Esta metodología es de gran utilidad para la genotipificación de pocos SNPs en un elevado número de muestras (Ahmadian et. al., 2000; Alderborn et. al., 2000; Ekstrom et. al., 2000; Nordstrom et. al., 2000), y resulta mucho más rápida, eficaz y económica que las técnicas convencionales de genotipificación, como PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), PCR-alelo específico, entre otras. Esta técnica se basa en la detección del pirofosfato (PPi), liberado durante la incorporación de un nucleótido al ADN molde durante la reacción de síntesis. El PPi forma parte de una cascada de reacciones que comienza con la incorporación de un nucleótido por la polimerasa, en la cual se libera como producto. Luego la enzima ATP sulfurilasa genera ATP a partir de APS (adenosina 5' fosfosulfato) y del PPi liberado. El ATP provee la energía necesaria para la oxidación de la luciferina y la generación de luz visible. Como la identidad de cada nucleótido incorporado se conoce, por respetar un orden de inyección, la secuencia molde puede ser determinada fácilmente registrando los picos de luz durante la reacción (Figura 4).

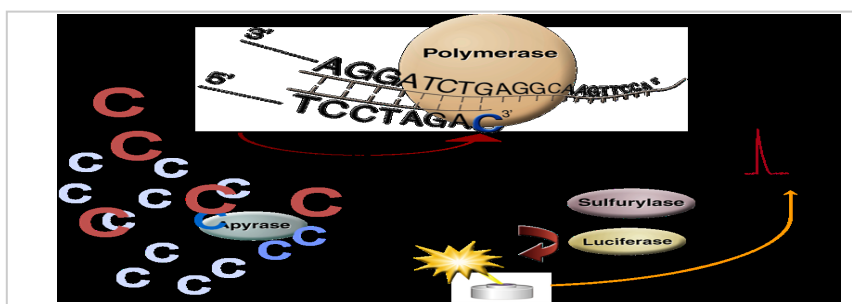


Figura 5. Esquema de las reacciones que tienen lugar durante el proceso de pirosecuenciación.



Para cada uno de los SNPs analizados, en primer lugar, se llevó a cabo una reacción de PCR en un volumen total de 50  $\mu$ l, la que contenía 20 mM Tris-HCl (pH = 8,4), 50 mM ClK, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de cada dNTP, 0,75 U Taq polimerasa (Metabion, Martinsried, Alemania), 0,1 mM de cada primer externos, y 50 ng de ADN.

Para poder realizar la purificación del producto de PCR para su posterior utilización en la reacción de pirosecuenciación, uno de los primers externos en cada reacción fue biotinilado en el extremo 5' para permitir la purificación en el paso siguiente (Tabla 7). Las condiciones de ciclado fueron: 45 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos a 56°, 58° y 60° para GNRHR-SNP6, LHR-I499L, and IGF1-SnaBI, respectivamente y 45 segundos a 72°C, con un ciclo elongación final de 7 minutos a 72°C.

Los productos de amplificación biotinilados se purificaron mediante la captura de la doble cadena biotinilada mediante el uso de perlas de sefarosa unidas estreptavidina. Posteriormente, las perlas unidas al ADN doble hebra se purificaron mediante el uso de una Estación de Lavado (*Workstation*, Biotage, AB, Uppsala, Suecia), eliminándose los componentes restantes de la reacción de PCR. Luego se utilizó un álcali para desnaturalizar el ADN doble hebra y obtener simple hebra. Se agregó 0.3  $\mu$ M del cebador interno de secuenciación correspondiente (Tabla 7), el cual hibrida con la simple hebra de ADN pura. Esta forma de purificar el molde provee información de alta calidad y bajas señales de fondo.

Tabla 7. Secuencias de Primer y temperaturas indicadas para usar en la genotipificación de SNPs mediante la técnica de pirosecuenciación.

SNP	Primer	Primer sequence	Annealing temperature	Assay reference
GHRHR-SNP5 <sup>1</sup>	GNRHr-E1-F (Biotinilado)	5'- CACTGGATGGAATGTGGAACA- 3'	63	Lirón y col., 2011
	GnRHr-E1-R GnRHr-SNP5-sec	5'- CTGTGGTCCAGCAAAGATGC-3' 5'-CGCCAGCGAGCGGTC-3'		
GNRHR-SNP6 <sup>(1)</sup>	GnRHr-SNP6-F	5'-CAGCTGCCTCTTCATCATCC- 3'	56	Lirón y col., 2012
	GnRHr-SNP6-R (Biotinilado)	5'- TGCCTCATAGGGTGATTTTGA- 3'		
	GnRHr-SNP6-sec	5'-ATGCAAAAATCATCTT-3'		
LHR-I499L <sup>(2)</sup>	LHR-F (Biotinilado)	5'- AGACTGGCAGACAGGGAGTG - 3'	58	Lirón y col., 2012
	LHR-R-pyro-int	5'- AGTGAAAAAGCCAGCC-3'		
	LHr-pioint-Angus	5'-GCATAGGTGATGGTGTG-3'		
IGF1-SnaBI <sup>(3)</sup>	IGF1-prom-F	5'- CCAGCGCTGTCTTCCATTCTA- 3'	60	Lirón y col., 2012
	IGF1-prom-R (Biotinilado)	5'- TGATTAAC TTTCTACCGGGCG- 3'		
	IGF1-prom-seq	5'-ATTGCTCGCCCATCCTC-3'		

(1) SNPs reportado por Lirón y col. (2011); (2) SNPs reportado por Lirón y col. (2012); (3) SNPs reportado por Ge y col. (2001)

Para el análisis de SNPs por pirosecuenciación, los primers de secuenciación se diseñaron de forma tal que su extremo 3' híbrido de una a tres bases antes de la posición polimórfica. En los pirogramas obtenidos se distinguen claramente los distintos genotipos; cada combinación alélica (homocigota o heterocigota) generó un patrón específico

comparado con las otras dos variantes (Ahmadian, 2000; Alderborn, 2000; Ekstrom et. al., 2000; Nordstrom et. al., 2000). Esta característica hace que la tipificación sea fácil y muy precisa.

Las reacciones de pirosecuenciación se realizaron mediante el uso de un pirosecuenciador PCQ96MA (Biotage, EE.UU) y una estación de purificación para pirosecuenciación (Biotage, EE.UU), utilizando el kit PyroMark Gold Q96 reagents (Qiagen, Hilden, Alemania). Los resultados se analizaron usando el software Pyrosequencing (Biotage, EE.UU).

### **Medición de la variabilidad genética**

La frecuencia alélica, la heterocigosidad esperada ( $h_e$ ) y el equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE) para cada SNP dentro de cada rodeo y para la población total fue estimada usando el test exacto implementado en los software GENEPOP (Rousset, 2007) y ARLEQUIN 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010). La reconstrucción de la fases de ligamiento en los dos SNPs del gen GNRHr se reconstruyeron mediante el método Bayesiano implementado en el programa Phase v2.1.1 (Li y col, 2003; Crawford y col, 2004) utilizando las opciones preestablecidas, considerando confiable las fases cuando el valor de  $p$  estimado por el programa fue mayor a 0,8.

### **Análisis estadísticos**

#### **Estudio retrospectivo de los resultados de la evaluación de pubertad en toritos Angus.**

Se analizaron las medias de perímetro escrotal entre animales púberes y no púberes mediante el test de Student.

El análisis estadístico de los valores de edad y perímetro escrotal a la pubertad en función de las líneas genéticas a la cual pertenecían los padres se efectuó mediante análisis de varianza, utilizando el software Statgraphic teniendo como covariables peso al destete y fecha de evaluación de cada uno de los animales.

$$y_{ij} = \mu + LG_j + cov(PD) + cov(E) + e_{ij}$$

Donde:

$Y_{ijkl}$	=	observaciones fenotípicas perímetro escrotal,
$\mu$	=	media general perímetro,
LG	=	efecto fijo línea genética,
Cov (PD)	=	covariable peso al destete,
Cov (E)	=	covariable edad del animal al muestreo,
$e_{ij}$	=	error aleatorio.

### **Estudios experimentales de parámetros fenotípicos a la pubertad en sistemas pastoriles.**

Edad a la pubertad se estimó por regresión mediante la ecuación logística utilizando el procedimiento NLIN implementado en el programa SAS 9.0 (SAS Inst. Inc., 2002, North Carolina, EE.UU) usando las mediciones de motilidad y concentración espermática obtenidas en los sucesivos muestreos y aplicando la definición de Wolf y col., 1965 que establece que un torito es púber cuando su eyaculado posee una concentración de  $50 \times 10^6$  esp. /ml y una motilidad del 10% y la definición de Lunstra y col., 1978 que indica que un torito alcanzó la pubertad cuando su perímetro escrotal es de 28 cm. (Quirino y col., 1999)

$$y_i = A / [1 + b e^{-k t}]$$

Donde  $y$  es la observación fenotípica de las variables medidas (Perímetro Escrotal, Concentración Espermática y Motilidad) en el individuo  $i$ ;  $t$  son los días de edad a momento de la medición;  $A$  es la variable estimada a la madurez (nivel de saturación en la curva);  $b$  es la constante de integración establecida por los valores iniciales de la variable

medida  $y$  de  $t$  (proporción inicial) y  $k$  es la constante de madurez (pendiente o punto de inflexión).

Además, en el modelo de asociación se incluyó el peso ajustado a 300 días que fue estimado a partir de la ecuación de Gompertz usando el procedimiento NLIN implementado en el programa SAS 9.0 (SAS Inst. Inc., 2002, North Carolina, EE.UU)

$$y_i = A e [ - b e( -k t)]$$

Donde  $y$  es el peso del individuo  $i$  a un tiempo  $t$ ;  $t$  son los días de edad al momento de la medición del peso;  $A$  es la variable peso estimada a la madurez;  $b$  es la constante de integración establecida por los valores iniciales del peso, y  $k$  el índice de madurez o tasa específica de crecimiento, que corresponde al punto de inflexión de la curva (Karkach, 2006).

1. El peso y perímetro escrotal a la pubertad se establecieron mediante el cálculo según la ecuación arriba descripta para edad a la pubertad. La comparación de las medias de edad, peso vivo y perímetro escrotal a la pubertad entre cabañas y entre años para Flores Chicas se realizó mediante la prueba de  $t$  de Student.
2. Las correlaciones entre edad a la pubertad, perímetro escrotal a la pubertad, peso a los 300 días y edad de la madre se establecieron utilizando el programa CORR del paquete estadístico SAS y los valores de significancia estadística fueron ajustados mediante el test de Bonferroni para pruebas múltiples.
3. El análisis de correlaciones lineales entre perímetro escrotal al destete y peso al destete con edad de pubertad se hizo primero sobre la totalidad de los animales correspondiente al año 2009,  $n= 166$  y luego se repitió, dividiendo a los toritos

por rodeo, La Trinidad n= 71 y Flores Chicas n= 95, mediante el programa CORR del paquete estadístico SAS y los valores de significancia estadística fueron ajustados mediante el test de Bonferroni para pruebas múltiples.

4. Para realizar el análisis de sobrevivencia del momento de inicio de la pubertad primero se estratificó a la población de toritos en cuatro cuartiles para el inicio de la pubertad (intervalo inicio de estudio-pubertad, IIP; PE>28 cm, Lunstra y col., 1978; PMOT>10% y CON >50 X 10<sup>6</sup>, Wolf y col., 1965). Luego se utilizó el cuartil superior de IIP para separar a los toritos en dos poblaciones, los precoces (75% inferior) y los tardíos (25% superior). El análisis de sobrevivencia del momento del inicio de la pubertad se realizó utilizando el procedimiento LIFETEST de SAS

### **Asociación entre marcadores genéticos y edad de pubertad**

Se analizó la asociación entre los SNPs y los haplotipos de los genes candidatos seleccionados GNRHR, LHR e IGF1 y ambas definiciones de la edad de pubertad.

El siguiente modelo general se utilizó para analizar la asociación entre los indicadores fenotípicos de pubertad y los genotipos:

$$Y_{ijkl} = \mu + S_i + G_j + B_k + O_l + \beta(x_{ijkl}-x) + e_{ijkl},$$

Donde:

$Y_{ijkl}$	=	observaciones fenotípicas,
$M$	=	media general,
$S_i$	=	efecto fijo de $i^{\text{th}}$ año,
$G_j$	=	efecto fijo de $j^{\text{th}}$ genotipo,
$B_k$	=	efecto fijo de $k^{\text{th}}$ rodeo,
$O_l$	=	efecto aleatorio de $l^{\text{th}}$ padre,
$\beta(x_{ijkl}-x)$	=	covariable del peso vivo a 300 días,
$e_{ijkl}$	=	error aleatorio.

El modelo usado no incluyó la matriz de parentesco porque los registros de pedigrí disponibles en los establecimientos muestreados no eran suficientes para su construcción por ausencia de datos de la línea materna y no existían puentes genéticos entre los dos establecimientos. El análisis estadístico se llevó a cabo utilizando el procedimiento MIXED implementado en el paquete SAS 9.0 (SAS Inst. Inc.). Los animales con algún dato fenotípico o genotípico faltante se excluyeron del análisis. Para la significancia estadística, los efectos se consideraron como significativos cuando el valor de  $p < 0,05$  y como una tendencia cuando  $p < 0,1$ , el método de separación de medias *Bonferroni* se usó para determinar las diferencias entre genotipos. El porcentaje de la varianza genética contabilizado para cada SNP fue computado acorde a lo propuesto por Falconer y Markey (1996).

## RESULTADOS

### Relación entre parámetros fenotípicos de pubertad y edad a la pubertad.

En este estudio el objetivo fue analizar la relación de parámetros fenotípicos indicativos de pubertad, como son perímetro escrotal, motilidad y concentración espermática con la edad de los toritos. El promedio de edad en la cual cada individuo fue evaluado una única vez en su vida fue  $310,4 \pm 22,8$  días; siendo el valor mínimo y máximo 254 y 407 días, respectivamente. Sobre el 100% de los animales estudiados se detectó el 82,8% (1051/1269) de toritos púberes y el 17,2% (218/1269) no púberes. La media de la edad de la subpoblación que había arribado a la pubertad fue  $311,9 \pm 22,8$  días y la del grupo no púber fue  $303,0 \pm 21,6$  días. Se presenta la distribución anual de toritos, púberes y no púberes, según lo definido por Wolf y col. (1965; Tabla 8).

Tabla 8. Animales evaluados, cantidad de púberes (PUB) y no púberes (NPUB) con sus respectivas edades para cada año de estudio.

Año	n	Edad	PUB (n)	PUB (%)	Edad PUB (d)	NPUB (n)	NPUB (%)	Edad N PUB (d)
2002	48	$312,7 \pm 6,2$	32	66,7	$312,9 \pm 5,9$	16	33,3	$312,2 \pm 6,9$
2003	149	$277,4 \pm 15,2$	107	71,8	$278,9 \pm 15,4$	42	28,2	$273,7 \pm 14,3$
2004	87	$312,4 \pm 15,1$	70	80,5	$314,0 \pm 14,6$	17	19,5	$305,5 \pm 16,6$
2005	110	$317,3 \pm 27,8$	87	79,1	$319,9 \pm 28,7$	23	20,9	$307,5 \pm 21,8$
2006	137	$318,7 \pm 6,9$	118	86,1	$318,5 \pm 6,9$	19	13,9	$320,1 \pm 6,8$
2007	186	$322,8 \pm 12,5$	166	89,2	$323,1 \pm 12,6$	20	10,8	$320,4 \pm 11,8$
2008	89	$328,2 \pm 13,6$	78	87,6	$328,3 \pm 14,3$	11	12,4	$327,5 \pm 6,7$
2009	95	$296,8 \pm 8,1$	69	72,6	$297,4 \pm 7,6$	26	27,4	$295,1 \pm 9,0$
2010	107	$304,3 \pm 8,7$	93	86,9	$304,8 \pm 8,6$	14	13,1	$300,6 \pm 8,6$
2011	70	$316,4 \pm 36,8$	65	92,9	$317,7 \pm 37,1$	5	7,1	$298,8 \pm 30,1$
2012	70	$336,0 \pm 21,8$	57	81,4	$338,0 \pm 23,6$	13	18,6	$327,3 \pm 6,3$
2013	122	$298,4 \pm 7,4$	109	89,3	$298,2 \pm 7,4$	13	10,7	$300,2 \pm 7,6$
Totales	1269	$310,4 \pm 22,8$	1051	82,8	$311,9 \pm 22,8$	218	17,2	$303,0 \pm 21,6$



La media de concentración espermática obtenida para los animales púberes fue  $332 \pm 307,2 \times 10^6$  esp /ml, para los animales no púberes fue  $39,5 \pm 39,2 \times 10^6$  esp/ml, y para la población total fue  $281,5 \pm 301,5 \times 10^6$  esp/ml (Tabla 9).

Tabla 9. Concentración espermática ( $10^6$ /ml) de los animales púberes (PUB), de los no púberes (NPUB) y de la población total para cada año de estudio.

Año	PUB	NPUB	Población total
2002	299,7±182,2	54,4±43,2	217,9±190,1
2003	276,6±202,9	62,0±51,5	216,1±199,0
2004	226,8±152,6	43,1±20,6	190,9±155,3
2005	338,7±401,2	23,7±12,9	272,8±378,9
2006	367,8±278,5	61,0±75,5	325,3±280,7
2007	403,3±280,8	20,4±22,2	364,0±290,8
2008	847,5±358,9	33,2±22,4	375,5±359,8
2009	253,8±241,0	28,9±15,8	192,3±228,6
2010	225,4±219,0	24,1±08,0	199,1±215,2
2011	399,4±396,0	24,0±09,2	372,5±393,7
2012	577,0±495,3	35,7±14,8	476,5±494,1
2013	216,9±216,8	24,5±13,3	196,4±213,4
Total	332 ±307,2	39,5 ±39,2	281,5 ±301,5

El promedio de motilidad espermática de la totalidad de la población fue  $30,3 \pm 21,8$  % y las medias de motilidad espermática para las subpoblaciones de animales púberes y no púberes fueron  $35,6 \pm 19,9$  % y  $8,1 \pm 5,2$  %, respectivamente. (Tabla 10).

Cuando se analizó el conjunto de los animales no púberes en función de la definición de Wolf, 1965, se vio que el 92,2% de los mismos no llegaba al 10% de motilidad espermática requerido; el 82,7% tenía una concentración espermática inferior al  $50 \times 10^6$  esp. /ml de semen y el 70,3% no satisfacía simultáneamente los valores mínimos de motilidad y concentración espermática.

Tabla 10. Motilidad espermática de la población de animales púberes, no púberes y de la población total para cada año de estudio.

Año	PUB %	NPUB %	Población total %
2002	27,7±16,9	1,9±1,7	19,1±18,5
2003	26,1±15,0	3,4±2,2	19,7±16,4
2004	34,1±17,0	4,5±1,2	28,3±19,3
2005	37,7±23,2	3,0±4,5	30,5±25,1
2006	38,0±20,8	5,4±10,6	33,7±22,6
2007	42,7±20,5	5,1±1,7	39,0±22,5
2008	42,0±22,2	3,6±2,3	37,3±24,3
2009	28,7±17,2	3,9±2,0	22,2±18,4
2010	35,6±16,6	7,6±7,1	31,9±18,4
2011	42,3±21,6	5,0±0,0	39,6±22,9
2012	32,6±17,3	5,8±2,8	27,6±18,9
2013	30,4±18,1	4,5±4,3	27,6±18,9
Total	35,6±19,9	8,1±5,2	30,3±21,8

Sobre los 1051 animales púberes, el 60,3%, 634 alcanzaron o superaron el 30% de motilidad espermática, la cual es compatible con la definición de madurez sexual (Brito y col., 2004). La media de motilidad espermática de este grupo fue  $48,2 \pm 15,6$  %, siendo los valores máximo y mínimo de 90% y 30%, respectivamente. El promedio de edad resultó  $316,4 \pm 23,0$  días. La distribución anual de animales compatibles con madurez sexual se observa en la tabla 11 y la distribución por grupo etario en el Gráfico 4.

Tabla 11. Distribucion anual de toritos púberes y de toritos con motilidad espermática compatible con madurez sexual.

Año	Púberes n	Compatibles Madurez Sexual		Edad (días)
		n	%	
2002	32	14	43,8	310,9±5,8
2003	107	43	40,2	282,9±17,5
2004	70	41	58,6	317,0±13,8
2005	87	50	57,5	327,8±31,6
2006	118	77	65,3	318,2±6,9
2007	166	125	75,3	323,9±12,6
2008	78	55	70,5	328,9±15,9
2009	69	30	43,5	297,8±7,5
2010	93	60	64,5	304,6±8,4
2011	65	49	75,4	327,2±35,0
2012	57	35	61,4	342,3±25,0
2013	109	55	50,5	297,9±7,9
Totales	1051	634	60,3	316,4±23,0

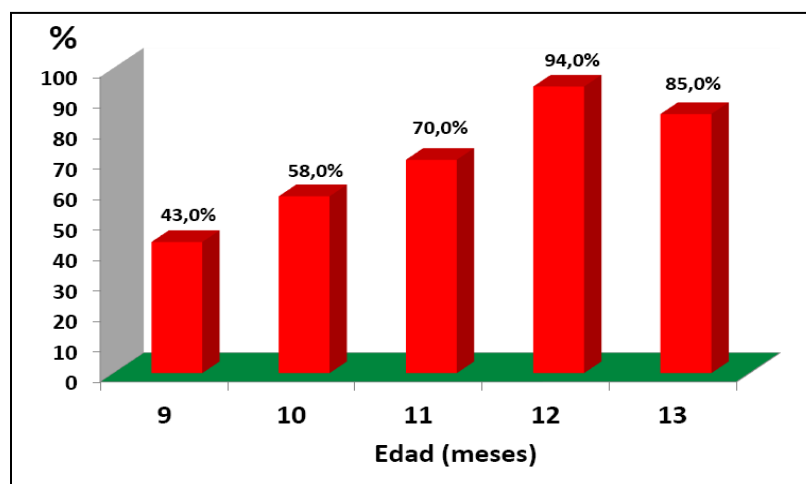


Figura 6. Distribución por edad de toritos púberes con motilidad espermática compatible con madurez sexual.

La media del perímetro escrotal para animales púberes fue de  $27,2 \pm 2,7$  cm, para los no púberes de  $26,5 \pm 1,9$  cm, y para la población total fue de  $27,1 \pm 2,8$  cm (Tabla 12).

Tabla 12. Perímetro escrotal (cm) de la población, animales púberes y no púberes para cada año de estudio.

Año	Púberes	No Púberes	Población total
2002	27,2±1,9	26,5±2,6	26,9±2,2
2003	25,9±2,0	25,7±1,8	25,8±1,9
2004	25,9±1,6	24,3±2,2	25,6±1,8
2005	26,7±2,0	26,2±2,6	26,6±2,1
2006	25,1±1,8	23,4±1,7	24,8±1,9
2007	27,6±2,1	26,8±2,0	27,5±2,1
2008	28,5±2,4	27,6±2,2	28,4±2,3
2009	30,4±2,1	30,3±2,1	30,4±2,1
2010	30,5±2,0	29,9±2,6	30,4±2,0
2011	28,5±2,6	26,6±2,1	28,3±2,6
2012	s/d	s/d	s/d
2013	24,9±1,9	23,8±1,9	24,8±1,9
Totales	27,2 ±2,7	26,5±1,9	27,1 ±2,8

Los resultados de la distribución por de edad presentan el número y porcentaje de animales púberes y no púberes, pudiéndose observar que la proporción de púberes para cada periodo nunca fue inferior al 65% (Tabla 13).

Tabla 13. Distribución por edad de la población total de toritos, de púberes y de no púberes.

Edad (días)	Animales n	Púberes		No Púberes	
		N	%	n	%
255-269	37	25	67,6	12	32,4
270-284	118	87	73,7	31	26,3
285-299	187	149	79,7	38	20,3
300-314	373	308	82,3	66	17,7
315-329	336	283	84,5	52	15,5
330-344	169	152	89,9	17	10,1
345-359	17	15	88,2	2	11,8
> 360	32	32	100	0	0
Totales	1269	1051	82,8	218	17,2

Los promedios de motilidad y concentración espermática y perímetro escrotal se presentan en el Tabla 14. Los toritos púberes para la totalidad de las quincenas de edad

evidenciaron parámetros de calidad seminal muy superiores respecto a la de los individuos no púberes. Los animales púberes tuvieron promedios de perímetro escrotal significativamente mayores en las quincenas 300-314, 315-329, 330-344, 345-359 ( $p < 0,05$ ; Tabla 14).

Tabla 14. Motilidad espermática (MOT, %), concentración espermática (CON,  $\times 10^6$  esp/ml) y perímetro escrotal (PE, cm) de toritos púberes, toritos no púberes y la población total en cada una de las quincenas de edad.

Edad (días)	Población Total			Púberes			No Púberes		
	MOT	CON	PE	MOT	CON	PE	MOT	CON	PE
255-269	18,7 $\pm$ 17,0	158,6 $\pm$ 146,1	25,4 $\pm$ 2,0	26,0 $\pm$ 16,2	205,6 $\pm$ 153,6	25,5 $\pm$ 2,1	3,5 $\pm$ 2,3	60,5 $\pm$ 53,5	25,3 $\pm$ 1,7
270-284	19,9 $\pm$ 16,6	193,1 $\pm$ 188,6	25,4 $\pm$ 2,2	25,8 $\pm$ 15,4	244,5 $\pm$ 194,1	26,2 $\pm$ 2,3	3,3 $\pm$ 2,3	49,0 $\pm$ 40,2	26,3 $\pm$ 2,1
285-299	23,6 $\pm$ 17,3	153,5 $\pm$ 159,4	26,2 $\pm$ 3,2	28,4 $\pm$ 16,1	184,3 $\pm$ 164,7	26,7 $\pm$ 3,3	4,7 $\pm$ 3,4	32,7 $\pm$ 19,6	27,0 $\pm$ 3,3
300-314	28,9 $\pm$ 21,1	244,3 $\pm$ 266,3	27,4 $\pm$ 3,1	34,1 $\pm$ 19,6	288,5 $\pm$ 272,8	27,5 $\pm$ 3,0 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 4,6	34,9 $\pm$ 34,9	26,6 $\pm$ 3,4 <sup>b</sup>
315-329	34,2 $\pm$ 23,2	326,2 $\pm$ 307,6	26,7 $\pm$ 2,4	39,4 $\pm$ 21,1	373,4 $\pm$ 308,3	26,8 $\pm$ 2,3 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 8,2	53,6 $\pm$ 78,9	26,0 $\pm$ 2,9 <sup>b</sup>
330-344	37,4 $\pm$ 21,1	396,8 $\pm$ 345,3	28,2 $\pm$ 2,3	41,1 $\pm$ 19,0	437,8 $\pm$ 340,4	28,3 $\pm$ 2,2 <sup>a</sup>	4,5 $\pm$ 2,2	30,6 $\pm$ 17,6	26,7 $\pm$ 2,7 <sup>b</sup>
345-359	48,5 $\pm$ 29,0	582,1 $\pm$ 511,0	28,8 $\pm$ 2,2	54,3 $\pm$ 25,6	656,3 $\pm$ 488,1	29,3 $\pm$ 1,9 <sup>a</sup>	5,0 $\pm$ 0,0	25,0 $\pm$ 7,1	25,8 $\pm$ 1,1 <sup>b</sup>
> 360	48,3 $\pm$ 18,4	700,6 $\pm$ 515,2	29,7 $\pm$ 2,4	48,3 $\pm$ 18,4	700,6 $\pm$ 515,2	29,7 $\pm$ 2,4	s/d	s/d	s/d

Dentro de la subpoblación de toritos no púberes distribuida por quincena de edad, el 67,9% de los animales no alcanzó la pubertad porque simultáneamente tuvo una motilidad espermática inferior al 10% y una concentración espermática por debajo de los  $50 \times 10^6$  esp/ml. El 24,3% de los toritos impúberes lo fue porque su motilidad espermática no superó el umbral del 10%, mientras el 7,8% no inició la pubertad porque su concentración estuvo por debajo de los  $50 \times 10^6$  esp/ml (Tabla 15).

Tabla 15. Distribución para cada quincena de los toritos no púberes (NPUB) según causa determinante por la cual no arribaron a la pubertad: motilidad espermática (MOT), concentración espermática (CON), o ambas.

Edad (días)	NPUB/Quincena		CON <50 x 10 <sup>6</sup>		MOT <10%		CON+MOT	
	n	%	n	%	N	%	n	%
255-269	12	32,4			6	50,0	6	50,0
270-284	31	26,3			14	45,2	17	54,8
285-299	38	20,3	3	7,9	4	10,5	31	81,6
300-314	66	30,1	8	12,1	12	18,2	46	69,7
315-329	52	15,5	5	9,6	15	28,8	32	61,5
330-344	17	10,1	1	5,9	2	11,8	14	82,4
345-359	2	11,8					2	100,0
> 360	0	0,0						
Totales	218		17	7,8	53	24,3	148	67,9

La proporción de animales con motilidad espermática compatible con la definición de madurez sexual (Brito y col., 2004) en cada quincena se incrementó con el aumento de la edad (Tabla 16).

Tabla 16. Total de animales por quincena con motilidad (MOT) compatible con madurez sexual (MS) y su % respecto al número de toritos por quincena.

Edad días	Población total n	Púberes n	MOT	MOT
			Compatible MS n	Compatible MS/Total %
255-269	37	25	8	21,6
270-284	118	87	34	28,8
285-299	187	149	71	38,0
300-314	373	308	175	46,9
315-329	336	283	189	56,3
330-344	169	152	114	67,5
345-359	17	15	12	70,6
> 360	32	32	29	90,6
Totales	1269	1051	632	49,8

### Antecedentes selección genética para precocidad: Efecto de la línea genética.

Para el análisis retrospectivo de los efectos de seleccionar genéticamente por precocidad sexual, se estimó el efecto de las líneas genéticas de los toros padres sobre la edad y el perímetro escrotal al inicio de la pubertad de su progenie. Se analizaron registros de 744 toritos nacidos entre 2001 y 2010. Hubo diferencias significativas entre las líneas genéticas en las medias de edad ( $p < 0,001$ ) y de perímetro escrotal ( $p < 0,001$ ) al inicio de la pubertad. (Tablas 17 y 18).

Tabla 17. Ranking de líneas genéticas de toros padres en función de la edad de pubertad de sus hijos (n=744).

Línea Genética	Hijos (n)	Edad Pubertad (días)	Perímetro Escrotal Pubertad (cm)
N	138	303,33±1,4 <sup>bc</sup>	27,63±0,2 <sup>bcd</sup>
B	63	303,68±2,0 <sup>b</sup>	29,57±0,2 <sup>f</sup>
F	439	306,27±0,7 <sup>b</sup>	26,90±0,1 <sup>bc</sup>
O	14	307,42±4,3 <sup>bcd</sup>	30,47±0,6 <sup>f</sup>
A	59	312,70±2,0 <sup>bcd</sup>	28,66±0,3 <sup>bcdef</sup>
D	31	314,84±2,8 <sup>d</sup>	26,50±0,4 <sup>b</sup>

Dentro de una misma columna, medias con letras diferentes difieren ( $p < 0,001$ )

Tabla 18. Ranking de toros padres según la edad de pubertad de sus hijos (n=744).

Código Padre	Hijos (n)	Edad Pubertad (días)	Perimetro Escrotal (cm)
19	14	286,00±4,0	25,28±0,6
31	10	289,70b±4,7	28,74±0,7
25	10	291,90±4,8	31,40±0,7
20	54	292,50±2,1	27,20±0,3
30	6	294,90±6,0	29,70±0,9
13	29	299,70±2,8	28,32±0,4
29	8	300,40±5,2	29,01±0,7
21	34	300,70±2,5	28,85±0,4
15	107	303,80±1,5	26,97±0,2
24	24	304,50±3,0	30,94±0,4
1	10	306,10±4,7	28,21±0,7
23	50	307,56±2,1	28,22±0,3
27	11	308,20±4,5	29,91±0,6
26	10	308,20±4,7	31,77±0,7
2	186	308,80±1,1	26,58±0,2
4	33	310,30±2,6	27,63±0,4
5	66	312,90±1,9	26,62±0,3
18	12	313,80±4,3	27,01±0,6
28	10	315,30±4,8	30,38±0,7
16	10	316,50±4,6	26,72±0,7
6	31	317,70±2,7	26,39±0,4
22	6	325,10±6,1	28,54±0,9
17	11	325,60±4,5	26,23±0,7

### **Caracterización de la edad a la pubertad en toritos Angus criados en sistemas pastoriles**

Se compararon la edad, el peso vivo y el perimetro escrotal a la pubertad de toritos de raza Angus, estimadas usando las medidas de perimetro escrotal, concentración y motilidad espermática de 286 animales, nacidos entre julio y septiembre, propiedad de las cabañas Flores Chicas (muestreos 2009 y 2010) y La Trinidad (muestreo 2009). En 2009, las edades y el peso promedios al destete fueron para Flores Chicas de 221,7±8,1 días y 240,1±19,7 kg, y para La Trinidad 203,8±23,3 días y 185±28,3 kg respectivamente. En el



segundo año de medición en Flores Chicas, los valores promedios de edad y peso al destete fueron de  $270,2 \pm 8,3$  días y  $240,1 \pm 23,1$  kg respectivamente.

En la Tabla 19, se detallan los resultados obtenidos al comparar edad de pubertad, perímetro escrotal y peso a la pubertad de los rodeos de Flores Chicas versus La Trinidad durante el primer año de trabajo; mientras que en la Tabla 20 se visualizan las mismas variables cuando se comparó a Flores Chicas entre años. Los resultados obtenidos mostraron diferencias significativas en edad a la pubertad y perímetro escrotal de Flores Chicas y La Trinidad, y sólo en perímetro escrotal en Flores Chicas entre años.

Tabla 19. Edad, peso vivo y perímetro escrotal al inicio de la pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$  esp/ml) y la motilidad (10%), de los toritos de Flores Chicas y La Trinidad para el año 2009 (media  $\pm$  DE).

	n	Edad (días)	Perímetro Escrotal (cm)	Peso vivo (kg)
Flores Chicas	95	$283,1 \pm 37,5^a$	$29,3 \pm 2,9^a$	$245,4 \pm 28,9$
La Trinidad	71	$300,7 \pm 48,7^b$	$27,4 \pm 2,5^b$	$242,4 \pm 28,7$
Total	166	$289,6 \pm 40,2$	$28,5 \pm 2,9$	$243,7 \pm 35,9$

Dentro de una misma columna, medias con letras diferentes difieren ( $p < 0,05$ ).

Tabla 20. Edad, peso vivo y perímetro escrotal al inicio de la pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$  esp/ml) y motilidad (10%), en los toritos de Flores Chicas para los años 2009 y 2010 (media  $\pm$  DE).

	n	Edad (días)	Perímetro Escrotal (cm)	Peso vivo (kg)
2009	95	$283,1 \pm 37,5^a$	$29,3 \pm 2,9$	$245,4 \pm 28,9$
2010	120	$268,1 \pm 37,3^b$	$28,4 \pm 2,5$	$249,5 \pm 38,4$
Total	215	$275,5 \pm 36,1$	$28,8 \pm 2,8$	$247,6 \pm 34,4$

Dentro de una misma columna, medias con letras diferentes difieren ( $p < 0,05$ ).

No se observaron correlaciones entre la edad de pubertad y edad de la madre y el peso a los 300 días de edad.

**Correlaciones entre edad de pubertad, perímetro escrotal al destete y peso al destete.**

Para el análisis se utilizaron los 166 toritos del muestreo de 2009, de los cuales 95 eran de Flores Chicas y los 71 restantes de La Trinidad. Los promedios correspondientes a las poblaciones medidas en 2009 y analizadas conjuntamente de Flores Chicas y La Trinidad para peso al destete, perímetro escrotal al destete y Edad de Pubertad fueron de  $189,0 \pm 23,3$  kg,  $22,0 \pm 2,5$  cm y  $290,5 \pm 43,3$  días, respectivamente. Los resultados de las variables analizadas se reportan en la Tabla 21. Se puede ver que para el peso al destete no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,01$ ) entre ambas poblaciones. Mientras que cuando se compararon los rodeos para perímetro escrotal al destete y edad de pubertad, se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ). En la totalidad de la población en estudio las correlaciones fenotípicas entre peso al destete y perímetro escrotal al destete 0,529 ( $p < 0,0001$ ) y entre perímetro escrotal al destete y edad de pubertad -0,386 ( $p < 0,0001$ ) resultaron significativas, mientras que entre peso al destete y edad a la pubertad fue de -0,166, siendo estadísticamente no significativa ( $p = 0,034$ ).

Cuando se realizó el análisis por rodeo, en Flores Chicas se obtuvieron estas correlaciones fenotípicas: entre peso al destete y perímetro escrotal al destete 0,572 ( $p < 0,0001$ ), entre perímetro escrotal al destete y edad de pubertad -0,197 ( $p = 0,579$ ), en tanto entre peso al destete y edad de pubertad fue de -0,061 ( $p = 0,55$ ). Por su parte, en La Trinidad las correlaciones fenotípicas fueron: entre peso al destete y perímetro escrotal al destete 0,550 ( $p < 0,0001$ ) entre perímetro escrotal al destete y edad de pubertad -0,473 ( $p < 0,0001$ ) mientras que entre peso al destete y edad de pubertad -0,219 ( $p = 0,069$ ; Tabla 21).

Tabla 21. Peso al destete, perímetro escrotal y edad de pubertad estimada mediante la concentración espermática ( $50 \times 10^6$  esp/ml) y motilidad (10%), de Flores Chicas, de La Trinidad del total para el año 2009.

	n	Peso al destete (kg)	Perímetro escrotal destete (cm)	Edad Pubertad (días)
Flores Chicas	95	190,9±19.8 <sup>a</sup>	23,1±2,1 <sup>a</sup>	283,1±37,5 <sup>a</sup>
La Trinidad	71	186,4±27.3 <sup>a</sup>	20,5±2,4 <sup>b</sup>	300,7±48,7 <sup>b</sup>
Total	166	189,0±23.3	22,0±2,5	290,5±43,3

Dentro de una misma columna, medias con letras diferentes difieren ( $p < 0,01$ ).

### Estimación de la edad a la pubertad mediante la calidad espermática o el perímetro escrotal.

La media±ES y la mediana y el cuartil inferior y superior para el IIP, la PE, el PMOT, la CON, el peso, y la edad a la pubertad en los toritos de acuerdo a cada definición de pubertad se encuentran en la Tabla 22. La mediana del intervalo inicio del estudio-pubertad (IIP) utilizando un PE>28 cm fue de 49 días, el cuartil inferior fue de 34 días y el cuartil superior fue de 90 días; mientras que el IIP utilizando un PMOT >10%; CON >50 X  $10^6$  fue de 49 días el cuartil inferior fue de 0 días y el cuartil superior fue de 93 días (Tabla 22).

Tabla 22. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), porcentaje de motilidad (PMOT) peso y edad a la pubertad en toritos estimados por la definición de Wolf y col. (1965) o Lunstra y col. (1978).

Pubertad	Parámetro	Media±ES	Cuartil inferior	Mediana	Cuartil Superior
PE>28 cm	IIP	56,2±2,7	34,0	49,0	90,0
	PE	29,4±0,0	28,5	29,5	30,0
	Peso	258,7±1,7	240,0	256,0	275,0
	Edad	296,0±1,8	275,0	287,0	309,0
PMOT>10%; CON >50x10 <sup>6</sup>	IIP	58,3±2,8	0	49,0	93,0
	CON	177,3±10,6	71,0	100,0	210,0
	PMOT	26,4±1,0	17,0	20,0	35,0
	Peso	259,5±2,2	235,0	256,0	280,0
	Edad	298,2±1,9	275,0	291,0	314,0

El inicio de la pubertad (PE >28 cm) para los toritos precoces fue más corto comparado con los toritos tardíos (mediana 34 vs. 125 d,  $P < 0.001$ ; Tabla 23, Figura 7). El inicio de la pubertad (PMOT >10%; CON >50x10<sup>6</sup>) para los toritos precoces fue mas corto comparado con los toritos tardíos (mediana 34 vs. 125 d,  $P < 0.001$ ; Tabla 24, Figura 8).

Tabla 23. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), peso y edad a la pubertad estimados por la definición de Lunstra y col. (1978) en toritos precoces y tardíos.

Pubertad	Parámetro	Media±ES	Cuartil inferior	Mediana	Cuartil Superior
PE>28 cm					
Precoces	IIP (d)	33,7±3,1	0,0	34,0	49,0
	PE (cm)	29,3±0,0	28,0	29,0	30,0
	Peso (kg)	256,5±1,9	238,0	255,0	290,0
	Edad (d)	282,5±1,1	273,0	279,0	352,0
Tardíos	IIP (d)	118,1±2,7	93,0	125,0	140,0
	PE (cm)	29,7±0,1	29,0	29,5	30,0
	Peso (kg)	264,8±3,9	245,0	261,0	290,0
	Edad (d)	333,5±3,1	318,5	336,0	352,5

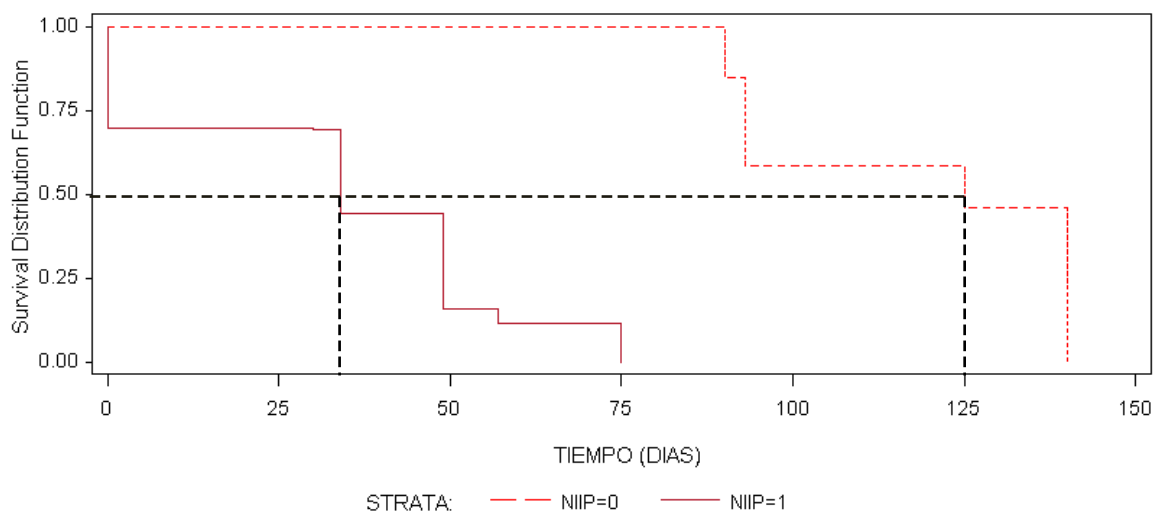


Figura 7. Análisis de supervivencia para el efecto del inicio de la pubertad en toritos precoces y tardíos utilizando como valor de corte un PE >28 cm (n=270). Mediana para los toros precoces 34 d y para los toros tardíos 125 d.

Tabla 24. Media, error estándar, cuartil inferior, mediana y cuartil superior del intervalo inicio del experimento-pubertad (IIP), perímetro escrotal (PE), peso y edad a la pubertad estimados por la definición de Wolf y col. (1965) en toritos precoces y tardíos.

Pubertad	Parámetro	Media±ES	Cuartil inferior	Mediana	Cuartil Superior
PMOT>10%; CON >50x10 <sup>6</sup>					
Precoces	IIP (d)	37,9±2,3	0,0	34,0	57,0
	CON (x10 <sup>6</sup> )	154,8±1,9	67,0	95,0	189,0
	PMOT (%)	26,3±1,0	15,0	35,0	35,0
	Peso (kg)	258,5±2,4	235,0	255,0	278,0
	Edad (d)	289,1±1,91	271,0	281,0	302,0
Tardíos	IIP (d)	118,6±2,4	93,0	125,0	140,0
	CON (x10 <sup>6</sup> )	243,6±28,7	78,5	105,0	389,0
	PMOT (%)	26,5±2,3	10,0	20,0	37,5
	Peso (kg)	262,3±4,5	239,0	269,0	287,0
	Edad (d)	325,9±3,2	303,0	330,0	349,0

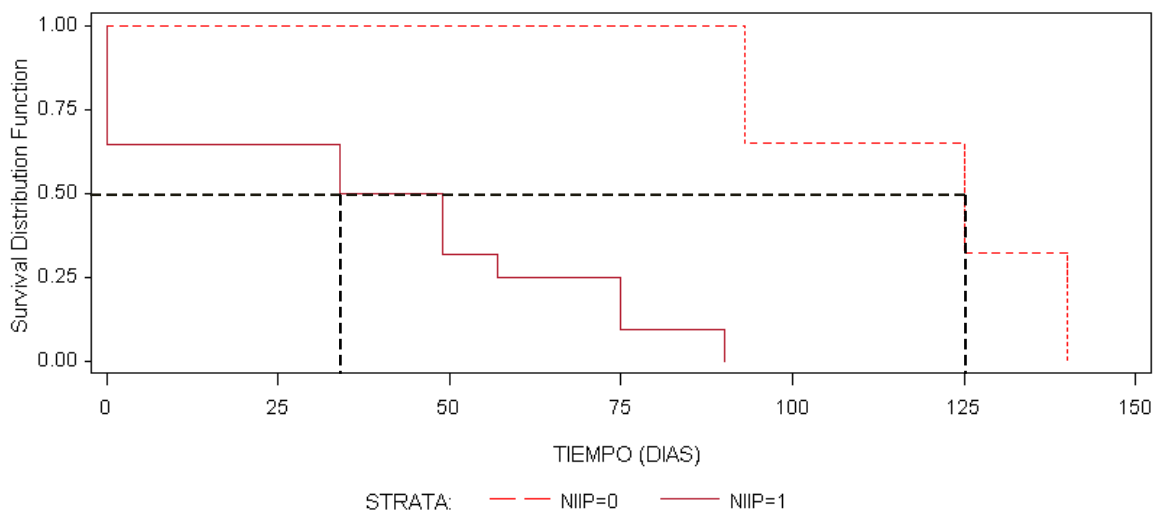


Figura 8. Análisis de supervivencia para el efecto del inicio de la pubertad en toritos precoces y tardíos utilizando como valor de corte un PMOT>10% y una CON >50x10<sup>6</sup> (n=269). Mediana para los toros precoces 34 d y para los toros tardíos 125 d.

### **Asociación entre marcadores genéticos de genes candidatos y parámetros fenotípicos de la pubertad.**

A partir del destete, 276 toritos Angus fueron evaluados mensualmente, determinándose peso vivo, perímetro escrotal, concentración y motilidad espermática. Un total de 4 SNPs, 2 dentro del gen GNRHR, 1 en el LHR y 1 en el IGF1 fueron genotipificados usando la técnica de pirosecuenciación. Los resultados obtenidos mostraron que el SNP IGF1SnaBI estuvo significativamente asociado ( $p < 0,01$ ) con edad a la pubertad determinada a partir de los 28 cm de perímetro escrotal, pero no presentó una asociación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) con la edad de pubertad definida como el momento en que el eyaculado de los toritos alcanzó una concentración de  $50 \times 10^6$  esp/ml y una motilidad rectilínea del 10%. El genotipo IGF1SnaBI CC mostró una edad a la pubertad promedio, definida en función de los 28 cm de perímetro escrotal, de 7 y 11 días menos respecto a los genotipos IGF1SnaBI CT ( $p = 0,037$ ) y IGF1SnaBI TT ( $p = 0,012$ ), respectivamente. El SNP IGF1SnaBI explicaría el 1,5% de la varianza genética de edad a la pubertad, cuando se define como el momento en que el perímetro escrotal llega a los 28 cm.

Con respecto a los polimorfismos LHR-I499L, GNRHR-SNP5 y GNRHR-SNP6 no estuvieron asociados estadísticamente a ninguna de las mediciones evaluadas ( $p > 0,05$ ). El análisis de las fases de ligamiento de los dos SNPs del gen GNRHR realizado mediante los programas Haploview y PHASE permitió detectar 4 haplotipos en la muestra analizada (Tabla 22). El análisis de asociación entre los haplotipos GNRHR y las variables fenotípicas de pubertad tampoco mostraron una asociación significativa ( $p > 0,05$ ) con la edad de pubertad determinada a partir de los 28 cm de perímetro escrotal y concentración de  $50 \times 10^6$  esp. /ml y una motilidad rectilínea del 10%.

Tabla 25. Edad de pubertad promedio estimada y error estándar (ES) en días, para los genotipos de los SNPs LHR-I499L y IGF1-SnaBI y del haplotipo de GNRHR; valor de P para los efectos genotípicos en el modelo aquí presentado para las 2 definiciones de edad de pubertad: 1) estimada a 28 cm de perímetro escrotal, y 2) estimada a partir de 10% de motilidad y  $50 \times 10^6$  esp/ml.

Marcador	Genotipo	Número	Edad a Perímetro Escrotal 28 cm		Edad a concentración $5 \times 10^6$ /ml 10% motilidad	
			Efecto Genotípico valor de p	Edad $\pm$ ES	Efecto Genotípico valor de p	Edad $\pm$ ES
LHR-I499L	AA	17		292,3 $\pm$ 6,8		288,7 $\pm$ 11,0
	AC	94	0,456	284,9 $\pm$ 4,2	0,301	287,9 $\pm$ 6,9
	CC	165		287,3 $\pm$ 3,7		279,9 $\pm$ 6,12
IGF1-SnaBI	CC	84		294,3 $\pm$ 4,6A		287,5 $\pm$ 7,6
	CT	142	0,027	287,2 $\pm$ 4,3B	0,354	281,0 $\pm$ 6,9
	TT	50		282,9 $\pm$ 4,9B		287,98 $\pm$ 8,1
GNRHR haplotypes	GC / GC	22		300,1 $\pm$ 5,9a		291,8 $\pm$ 9,6
	GC / GT	43		296,7 $\pm$ 4,3a		288,3 $\pm$ 7,1
	GC / AC	12		293,0 $\pm$ 7,6		277,9 $\pm$ 12,7
	GC / AT	78		289,8 $\pm$ 3,6		288,5 $\pm$ 6,1
	GT / GT	15	0,271	290,4 $\pm$ 6,8	0,124	262,1 $\pm$ 11,1
	GT / AT	53		289,9 $\pm$ 3,7		291,9 $\pm$ 6,3
	AC / AC	2		271,0 $\pm$ 23,7		322,2 $\pm$ 36,2
	AC / AT	5		270,2 $\pm$ 10,7b		256,4 $\pm$ 16,8
AT / AT	47		291,9 $\pm$ 4,0		290,4 $\pm$ 6,9	

Letras mayúsculas diferentes indican asociación con significancia estadística ( $p < 0.05$ ) entre promedios,  
Diferentes letras minúsculas indican asociación sugestiva ( $p < 0.1$ ) entre promedios,  
Los ajustes de los promedios de Bonferroni fueron hechos a través de comparaciones múltiples.

## DISCUSIÓN

### **Relación entre parámetros fenotípicos de pubertad y edad en toritos Angus**

El objetivo fue analizar la relación de parámetros fenotípicos indicativos de pubertad, como son perímetro escrotal, concentración y motilidad espermática con la edad de los toritos. Se estudiaron los registros de 1269 toritos Angus, nacidos entre 2001 y 2012, pertenecientes al establecimiento Flores Chicas.

El rodeo analizado posee características particulares que lo diferencian por llevar adelante un planteo de selección basado en la precocidad sexual, tanto en machos como en hembras, para una raza taurina propia de climas templados. En este esquema de trabajo, los toritos y las vaquillonas son criados y recriados en condiciones totalmente pastoriles, iniciando ambos su etapa reproductiva alrededor del año de edad. Cada cohorte anual de machos es evaluada cada año tal como fue descrito en Materiales y Métodos y a los toritos se los considera púberes cuando alcanzan o superan los  $50 \times 10^6$  esp. /ml de eyaculado con 10% de motilidad (Wolf y col., 1965). Mientras que la selección de las hembras la realiza en función de la fecha de su primer parto. Los animales mas precoces son retenidos como reproductores para su uso en la cabaña.

Con una media de  $311,9 \pm 22,8$  días de edad para los animales que resultaron púberes y fechas de nacimiento comprendidas en agosto - septiembre de cada año, teniendo en cuenta que las evaluaciones anuales de semen fueron hechas en mayo, junio o julio, se puede especular que la pubertad de esos toritos está separada por 3 a 4 meses del inicio de la temporada de servicios de primavera que para las condiciones típicas de la región Pampeana se inicia en octubre o noviembre. Varios autores coinciden en la necesidad de



lograr ese intervalo para un correcto desempeño de los toros (Lunstra y Echterkamp, 1982; Arteaga y col. 2001).

El promedio de edad de los animales púberes supera en 3,9 y 16,9 días a los 308 y 295 días a la pubertad informados para toritos Angus puros por Wolf y col. (1965) y Lunstra y col. (1978), respectivamente. Esa diferencia podría considerarse como escasa porque el Angus utilizado por Wolf y col., 1965 era mucho menos precoz sexualmente que el actual, llegaba a la pubertad con mayor edad, peso vivo y perímetro escrotal. Algo semejante ocurrió con el Angus del ensayo de Lunstra y col., 1978, aunque esos animales ya tenían cierto nivel de evolución hacia una menor edad de pubertad (Casas y col., 2007). La escasa diferenciación podría deberse al mas bajo plano nutricional de los animales analizados en esta tesis que tienen una alimentación pastoril (Pruitt y col., 1986).

Brito y col., 2012 hacen referencia específica al porcentaje de toritos púberes a diferentes edades informando un valor similar al 82,8% aquí obtenido de animales púberes entre los 322-336 días de edad, con el 100% de los toritos púberes a los 378 días de edad y un promedio de edad de madurez sexual de 357,4 días.

En la tabla 9 se visualiza que las medias anuales de concentración espermática de los animales púberes siempre estuvieron por encima de los  $200 \times 10^6$  esp. /ml, es decir cuatro veces o más que el umbral que establece la definición de pubertad de Wolf y col. (1965), esto se verificó aun en el año 2003, donde se analizó la población con menor edad de todo el periodo estudiado.

Los resultados del presente trabajo difieren con el de Lunstra y Echterkamp (1982) por cuanto las medias de concentración espermática para los animales púberes e impúberes

de esta tesis se ubican entre 205 y  $60 \times 10^6$  esp. /ml a una edad de 255-269, mientras dichos autores describen a la misma edad una concentración espermática de  $0,5 \times 10^6$  esp./ml para la raza Angus, probablemente ello podría adjudicarse a diferencias genéticas de las poblaciones analizadas.

Las medias de concentración espermática distribuidas por edad reportadas en la tabla 14, muestran que en la quincena 330-344, aproximadamente 10 meses de edad, los animales púberes superan los  $400 \times 10^6$  esp. /ml, valor de referencia mínimo de la concentración espermática considerado por Arteaga y col., 2001 y Barth y Waldner, 2001 para clasificar a un toro como maduro sexualmente.

Estos resultados sugerirían que la variable concentración espermática en la definición de Wolf y col. (1965) es menos limitante en la determinación de la pubertad.

La motilidad espermática aparece en el presente estudio como la variable crítica para que un torito inicie la pubertad, en la Tabla 10 se visualiza que los promedios anuales de los porcentajes de motilidad espermática de los animales impúberes nunca superaron el umbral del 10%. Mientras que la concentración espermática del grupo no púber pareciera no ser siempre la causa por la cual no alcanzan la pubertad, ya que en la Tabla 9 se observan algunas medias anuales superiores al mínimo de  $50 \times 10^6$  esp. /ml propuesto por la definición de Wolf y col., 1965.

La Tabla 14 muestra resultados similares al ordenarse por edad los datos de motilidad y concentración espermática de los animales púberes y no púberes. No hay en el rango de edad analizado porcentajes de motilidad espermática en los animales impúberes que supere el 10%, aunque sí la concentración espermática alcanza el umbral de los  $50 \times$

$10^6$  de esp. /ml en las quincenas de edad 255-269 y 315-329 y prácticamente lo alcanza en la quincena de edad 270-284.

Los resultados reportados en la Tabla 15 muestran que dentro de la subpoblación de toritos no púberes el 67,9% tuvo simultáneamente una motilidad espermática inferior al 10% y una concentración espermática por debajo de los  $50 \times 10^6$  esp. /ml, el 24,3% sólo no superó el umbral del 10% de motilidad espermática y solo el 7,8% no llegó a tener una concentración de  $50 \times 10^6$  esp. /ml.

Un toro es considerado sexualmente maduro cuando su eyaculado posee al menos 30% de motilidad espermática y un 70% de espermatozoides normales, siendo posible su utilización satisfactoria como reproductor tanto en servicio natural como en inseminación artificial. (Entwistle y Fordyce, 2003; Brito y col., 2004; Fordyce y col., 2006, Brito y col., 2012). En la tabla 10 se aprecia que sobre los resultados de 12 años evaluados, en 9 años de ellos, los promedios anuales de motilidad espermática de los animales púberes fueron superiores al 30%.

El 60,3% de los animales púberes superó con una media de  $48,2 \pm 15,6\%$  el umbral del 30% de motilidad espermática compatible con madurez sexual (Brito y col., 2004), con una edad promedio de  $316,4 \pm 23,0$  días ó 10,4 meses (Tabla 11), lo que es similar a lo que indican Lunstra y col. (1978) y Lunstra y Echterkamp (1982) para las razas Pardo Suizo y Red Poll, el Angus puro llega a valores parecidos 15 días después y el Hereford y sus cruza lo hacen a partir de los 11,5 mes de edad. Ellis y col. (2005) reportan para toritos de razas taurinas un promedio de motilidad espermática de  $57,8 \pm 1,6\%$  a una edad

comprendida entre los 396,5 y 427 días, puede observarse que valores similares son alcanzados aproximadamente 80 días antes en los animales del presente estudio.

Se podría inferir que el 60,3% de los toritos púberes que superaron a los  $316 \pm 23,0$  días de edad el umbral de 30% de motilidad espermática, uno de los parámetros indicativos de madurez sexual, hayan alcanzado a temprana edad el 70% de espermatozoides normales, el segundo indicador de madurez sexual (Kennedy y col., 2002; Entwistle y Fordyce, 2003; Brito y col., 2004; Hopkins, 2005; Fordyce y col., 2006). Esto ocurriría ya que existen correlaciones genéticas de moderadas a altas entre ambos caracteres (Dias y col., 2008; Siqueira y col., 2012). Al respecto, Corbet y col. (2013) proponen la posibilidad de seleccionar indirectamente a favor del porcentaje de espermatozoides normales usando la motilidad espermática determinada a edades tempranas.

Los promedios de perímetro escrotal de los toritos púberes en las diferentes quincenas de edad son similares a los indicados por algunos autores (Lunstra y Echtenkamp, 1982) e inferiores a los que informan otros (Brito y col., 2012; Morris y col., 2000), en ambos casos para la raza Angus pura .

Las diferencias con significancia estadística en el perímetro escrotal de los púberes y no púberes fueron del 3,3%, 3,4%, 5,7% y 11,9%, en las quincenas que iniciaron a los 300, 315, 330 y 345 días de edad respectivamente. Según Amyes y Morris (2009) la media del perímetro escrotal a los 13 meses de edad de toritos Angus seleccionados genéticamente por precocidad sexual, superó en 3,2 cm al promedio de los animales testigos, siendo esa diferencia equivalente al 9,6 %. En el presente trabajo se observó una diferencia ligeramente superior en animales 45 días mas jóvenes (Tabla 14).

En el presente estudio las medias de perímetro escrotal de los toritos púberes respecto a los no púberes fueron significativamente más altas recién a partir de los 300 días de edad, mientras que Evans y col. (1995) informaron que los animales sexualmente precoces tuvieron mayores perímetros escrotales entre los 162 y 302 días de edad.

Esto indicaría patrones fisiológicos distintos en relación al inicio de la pubertad entre toritos sexualmente precoces y tardíos. Al respecto, se ha citado que el pico temprano de LH, que ocurre en la etapa prepuberal, es el responsable de las diferencias genéticas relativas a los mecanismos fisiológicos del inicio de la pubertad dentro de grupos contemporáneos de toritos (Evans y col., 1995; Rawlings y Evans, 1995; Aravindakshan y col., 2000; Evans, 2009; Brito, 2015). La bibliografía describe que toritos sexualmente precoces de razas taurinas tuvieron mayores frecuencias de pulsos secretorios y concentraciones plasmáticas de LH superiores a menor edad respecto a los animales tardíos. Además, el patrón hormonal fue diferente entre ambos grupos. Se comprobó que los animales sexualmente precoces tenían niveles circulantes de LH más altos entre los 3 y 12 meses de vida. La máxima concentración de LH durante el pico temprano de dicha hormona ocurrió en los animales de precoces a los 3,7 meses de vida y en los no precoces a los 4 meses y gradualmente descendieron hasta los 6 y 5,5 meses de edad, en el grupo sexualmente precoz y en el tardío, respectivamente. Varias publicaciones coinciden en describir que el crecimiento testicular, dentro de grupos contemporáneos de toritos, fue mayor en el periodo peripuberal en los animales de pubertad temprana respecto a los tardíos (Evans y col., 1995; Aravindakshan y col., 2000; Brito y col., 2004; Brito y col., 2012).

### **Antecedentes de precocidad sexual en el rodeo de Flores Chicas**

Los resultados retrospectivos de la selección por precocidad sexual hecha entre los años 2001 y 2011 en el rodeo de Flores Chicas que se presentan en la Tabla 17, muestran diferencias significativas en las medias de edad en que se detectaron puberes ( $p < 0,001$ ) y de perímetro escrotal ( $p < 0,001$ ) entre las líneas genéticas en las que fueron agrupados los padres.

Los resultados demuestran que es posible seleccionar genéticamente por pubertad temprana en toritos Angus a partir de la variabilidad existente entre los diferentes grupos genéticos. Además, la diferencia de 11 días menos al inicio de la pubertad de la línea más precoz respecto a la más tardía implica que esos animales tendrían un mayor intervalo para normalizar su calidad seminal hasta su uso como reproductores, periodo que según Lunstra y Echterkamp (1982) debería extenderse por lo menos 90 a 120 días.

El programa neozelandés que Morris y Amyes (2005) desarrollaron a lo largo de 23 años en condiciones experimentales es un antecedente exitoso sobre la factibilidad de seleccionar genéticamente por precocidad sexual en la raza Angus en sistemas de producción pastoriles. Los machos de la línea precoz superaron a los tardíos en 3,2 cm de perímetro escrotal a los 13 meses, habiendo ganado por año  $0,19 \pm 0,03$  cm; también en las hembras, las vaquillonas precoces tuvieron en relación a las tardías 69 días menos de edad al momento de la pubertad, con una tasa de disminución de 1,6 día por año. Por otra parte, la selección por pubertad temprana favorece la fertilidad global del rodeo que se evidencia por mayores índices de preñez en la población precoz (Morris y Amyes, 2005; Amyes y Morris, 2009).

Estos resultados corresponden sólo a 9 años de trabajo y bajo condiciones comerciales, pero se podría esperar que con más años de trabajo y programas de selección genética cuantitativa y molecular se puede profundizar la mejora en la precocidad sexual de los toros.

### **Caracterización de la edad a la pubertad en toritos Angus criados en sistemas pastoriles**

Los promedios de edad de pubertad, definida por la calidad seminal (Tablas 19 y 20) son similares a los descriptos por Lunstra y col.; 1978 para toritos Angus puros, Red Poll, Angus x Hereford y Hereford x Angus, inferiores respecto a sus resultados para Hereford puro y superiores en relación al Pardo Suizo. Y en comparación a lo publicado por Evans y col., 1995 y Brito y col, 2012, quienes trabajaron con animales Hereford puros y una población mixta de Angus x Charolais y Angus puro, respectivamente, las medias de edad de pubertad del presente estudio son inferiores.

Los promedios de perímetro escrotal se sitúan en torno de los 28 cm propuestos por Lunstra y col., 1978 para indicar el inicio de la pubertad y están comprendidas dentro de un rango que va desde los 25 cm a 32 cm, coincidente con la bibliografía (Lunstra y col., 1978; Gargantini y col., 2005; Brito y col., 2012).

Las medias de peso vivo a la pubertad son inferiores a las reportadas por Lunstra y col.; 1978; Evans y col., 1995 y Brito y col, 2012. Por esto, se podría afirmar que las poblaciones aquí estudiadas representan a un biotipo de Angus de tamaño moderado adaptada a los sistemas pastoriles, que es distinto del referido en la bibliografía.

Las diferencias de edad y perímetro escrotal a la pubertad entre las cabañas no pueden explicarse con los resultados de este trabajo debido a las diferencias que se observaron también entre las poblaciones de los dos años de Flores Chicas, podrían relacionarse tanto a factores ambientales como genéticos.

### **Correlaciones entre edad de pubertad, perímetro escrotal al destete y peso al destete.**

Los resultados de las variables analizadas se reportan en la Tabla 21. Se puede observar que para el peso al destete no se detectaron diferencias significativas ( $p > 0,01$ ) entre ambas poblaciones. Mientras que cuando se compararon los rodeos para perímetro escrotal al destete y Edad de Pubertad, si se observaron diferencias significativas ( $p < 0,01$ ).

Las correlaciones fenotípicas entre el peso al destete y el perímetro escrotal de 0,53; 0,57 y 0,55 para la población total, Flores Chicas y La Trinidad, respectivamente, todas con significancia estadística, coincide con lo observado por Brito y col., 2012 para quienes los pesos de destete de los animales usados en sus ensayos, condicionaron el desarrollo sexual y las funciones reproductivas hasta los 16 meses de edad. Parecería que el crecimiento integral de los animales predestete garantiza el normal desarrollo del pico temprano de LH y por ende el desarrollo de los testículos.

Los valores de las correlaciones fenotípicas obtenidas entre el perímetro escrotal al destete y edad de pubertad resultaron respectivamente -0,39; -0,19 y -0,47 para la población total, Flores Chicas y La Trinidad, sin significancia estadística solo en la población de Flores Chicas. Los valores de esta correlación fenotípica son todos inferiores a la informada por Lunstra y col., 1978 y Lunstra y col., 1982 que fue de -0,65.



Durante el destete convencional de la Pampa Húmeda los terneros rondan los 6-7 meses de edad. Los testículos en dicho momento están en pleno crecimiento acelerado y el tamaño testicular que los toritos alcancen en este momento está predeterminado por el pico temprano de LH, que también marca el inicio de la pubertad. Si el mismo ocurrió a corta edad y con altas concentraciones de la hormona, el nivel de desarrollo testicular será mayor y la etapa puberal comenzará a menor edad.

Respecto a la correlación entre perímetro escrotal al destete y edad de pubertad de -0,19 sin significancia estadística, obtenida para Flores Chicas, se podría inferir que tiene que ver con la baja variabilidad genética existente en la población para perímetro escrotal y edad a la pubertad, como consecuencia de la selección para precocidad sexual (Spangler, 2014).

Considerando las correlaciones fenotípicas negativas y favorables, con significancia estadística también en esta tesis, el perímetro escrotal al destete podría usarse para seleccionar a favor de precocidad sexual, ya que los animales que muestren mayores medidas testiculares, arribarán a la pubertad a menor edad (Lunstra y col., 1978; Lunstra y col., 1982; Brito y col., 2004).

Entre peso al destete y edad de pubertad la correlación fenotípica fue de -0,166 y estadísticamente no significativa, por lo tanto podría inferirse que si bien el tamaño corporal se relaciona con el tamaño testicular y este con la menor edad a la pubertad, no existe relación probada entre tamaño corporal y edad a la pubertad. En las condiciones del presente trabajo, los animales de mayor peso al destete no fueron los de mayor precocidad sexual.

### **Estimación de la edad a la pubertad mediante la calidad espermática o el perímetro escrotal.**

Puede observarse, cuando se comparan los resultados de la Tabla 22 que las medias de edad al inicio de la pubertad y peso vivo de los toritos sexualmente precoces y tardíos son similares cuando se determinan por una u otra definición, a pesar que en cada una se define el momento de arribo a la pubertad con distintos parámetros. Los promedios de perímetro escrotal obtenidos usando ambas definiciones de pubertad se ubican en torno a los 29 cm, no habiendo distinción entre animales de pubertad temprana o tardía.

Esto es coincidente con lo propuesto por Lunstra y col. (1978) quienes habiendo hecho un estudio similar concluyeron que el perímetro escrotal promedio al comienzo de la pubertad determinada acorde a Wolf y col. (1965) fue  $27,9 \pm 0,2$  cm, siendo relativamente constante entre razas y entre toros con edades y pesos dispares. Otras publicaciones informan resultados similares (Lunstra y col., 1982; Lunstra y Cundiff, 2003; Casas y col., 2007). Brito y col. (2012) quienes también coinciden en estos resultados, ahondan en el análisis observando un rango de 26 a 32 cm de perímetro escrotal a la pubertad y, basados en mediciones hechas con toritos de razas taurinas, demostraron que el perímetro escrotal puede ser utilizado adecuadamente como predictor de pubertad con 83,8% de sensibilidad y 87% de especificidad. Arribando a resultados similares con investigaciones hechas con machos Nelore puros y 3/8 índicos - 5/8 taurinos (Brito y col., 2004).

El resultado de aplicar una u otra definición para discriminar el cuartil de animales tardíos del resto de la población, lo cual podría constituir un criterio de selección en la producción de toros de padres, es similar. El tiempo estimado entre el inicio del ensayo - inicio de la pubertad presentó idénticos valores en los grupos de animales precoces (mediana 34 días) y tardíos (mediana 125 días).

La medida de perímetro escrotal tiene a su favor heredabilidades que pueden alcanzar valores que van desde 0,40 hasta 0,75 por lo que el progreso genético será más rápido en programas de mejoramiento dado que los parámetros de calidad seminal tienen heredabilidades más bajas (Kealey y col. 2007; Morris y col., 2009; Corbet y col., 2013; Fordyce y col, 2014).

Con los resultados del presente trabajo se podría proponer al perímetro escrotal para seleccionar a favor de la precocidad sexual, cuando las condiciones de trabajo dificulten realizar evaluaciones de calidad seminal y/o las exigencias respecto de la precisión sean inferiores.

#### **Asociación entre marcadores genéticos de genes candidatos y parámetros fenotípicos de pubertad.**

Para los estudios de asociación entre marcadores genéticos correspondientes a tres genes candidatos y caracteres de precocidad sexual se usó la información obtenida de 276 toritos Angus evaluados mensualmente, a los que se les determinó peso vivo, perímetro escrotal y concentración y motilidad espermática.

Para asociar con las variables fenotípicas de precocidad sexual fueron seleccionados cuatro SNPs ubicados en los tres genes candidatos propuestos para el presente estudio; dos en GNRHR: SNP5 y SNP6, uno en LHR: LH-1499L y uno en IGF1: IGF-1SnaB1, reportados por Ge y col., 2001 y Lirón y col., 2010, respectivamente. La genotipificación de los cuatro SNPs propuestos, se hizo mediante la técnica de pirosecuenciación.

Los resultados obtenidos mostraron que el SNP IGF1SnaBI estuvo significativamente asociado ( $p < 0,01$ ) con edad a la pubertad determinada a partir de los 28 cm de perímetro escrotal (Lunstra y col., 1978), pero no presentó una asociación estadísticamente significativa ( $p > 0,05$ ) con la edad de pubertad definida como el momento en que el eyaculado de los toritos alcanzó una concentración de  $50 \times 10^6$  esp. /ml y una motilidad rectilínea del 10% (Wolf y col., 1965). El genotipo IGF1SnaBI CC mostró una edad a la pubertad promedio, definida en función de los 28 cm de perímetro escrotal (Lunstra y col., 1978), de 7 y 11 días mayor respecto a los genotipos IGF1SnaBI CT ( $p = 0,037$ ) y IGF1SnaBI TT ( $p = 0,012$ ), respectivamente. El SNP IGF1SnaBI explicaría el 1,5% de la varianza genética de la edad a la pubertad, definida como el momento en el cual el perímetro escrotal alcanza los 28 cm.

Los análisis de asociación entre los polimorfismos de GNRHR: SNP5 y SNP6 y de LHR: LH-1499L con la edad de pubertad definida a partir de los 28 cm de perímetro escrotal (Lunstra y col., 1978) o mediante la concentración y motilidad espermática (Wolf y col., 1965) no fueron estadísticamente significativas (Tabla 25).

Para una mejor comprensión del desarrollo sexual de los toritos se lo puede dividir en los siguientes periodos (Brito, 2006; Brito, 2015):

a) *Infantil*: Se extiende desde el nacimiento hasta aproximadamente los 2 meses de vida. Hay bajas concentraciones plasmáticas de LH, FSH y testosterona. Los animales están en la primera etapa de la lactancia y son totalmente lactantes.

b) *Prepuberal*: Va desde los 2 meses hasta aproximadamente los 6 a 7 meses de edad. Su característica más importante es el pico temprano de gonadotrofinas, que es determinante en el inicio de la pubertad y del desarrollo testicular posterior. Normalmente,

coincide con los últimos 4 meses que los toritos están al pie de sus madres y se da la transición hacia rumiantes.

c) *Puberal*: Se inicia cuando termina el periodo prepuberal y culmina al comenzar la pubertad. Lo más representativo es el crecimiento rápido de los testículos bajo la acción de los metabolitos hormonales endógenos y en forma independiente de la GnRH y de las gonadotrofinas. Esta etapa transcurre íntegramente en la recría.

El IGF-1 es un polipéptido que se relaciona con la mitosis celular, dentro de la cual induce reacciones bioquímicas que tienen que ver con la glucosa y los sulfatos. La concentración de IGF1 comienza a elevarse desde de los 3 meses de edad, junto al inicio del pico temprano de gonadotrofinas, alcanzando el estado de meseta cuando finaliza el desarrollo sexual a los 14-16 meses de vida (Renaville y col., 1993; Renaville y col., 1996; Bagu, 2006; Brito, 2006; Barth y col., 2008; Brito, 2015). El aumento de IGF1 en la circulación periférica obedecería a una elevada producción hepática, que va acompañada por una mayor concentración de la proteína transportadora IGF1-Binding 3 y disminución de la IGF1-Binding 2. También, una proporción importante del IGF1 circulante durante los periodos prepuberal y puberal es producido en los testículos por las células de Leydig y de Sertoli en forma autocrina/paracrina. Simultáneamente en los toritos, a diferencia de otras especies, disminuye el nivel plasmático de la hormona del crecimiento o GH.

El sensor metabólico es un centro neuronal que controla el balance energético transformando señales periféricas, que le llegan a través de metabolitos hormonales endógenos como el IGF1 y las leptinas, en respuestas nerviosas que son enviadas al hipotálamo para regular los pulsos secretorios de GnRH. Por ende, es decisivo para la

magnitud y duración del pico temprano de gonadotrofinas en toritos en crecimiento (Brito, 2006; Brito y col., 2007-C; Brito, 2015).

En el hipotálamo de roedores, se han detectado receptores para IGF1, especialmente en el núcleo preóptico, septum e hipotálamo anterior. Las neuronas secretoras de GnRH muestran receptores para IGF1 en su cuerpo celular y en sus terminales neuronales. Dentro de dichas neuronas, se detectó ARNm que interviene en la síntesis de IGF1, IGF2, receptores para IGF1 y de la proteína transportadora de IGF1 o IGF1Binding. Esto demuestra que las neuronas secretoras de GnRH, poseen una regulación autocrina del IGF1 (Brito, 2006; Brito, 2015).

El IGF1 promueve el aumento de la concentración de testosterona mediante la multiplicación, diferenciación y maduración de las células de Leydig e incrementa la expresión y sensibilidad de receptores para LH en las mismas. A su vez, la testosterona estimula la producción de IGF1 y la expresión de receptores para IGF1 en las células de Sertoli y de Leydig, estableciéndose un *feedback* positivo entre ambas y haciendo que las curvas de concentración de IGF1 y testosterona describan un dibujo similar (Brito y col., 2007-C; Brito, 2015)

Los toritos, durante su etapa de lactantes, frente a niveles nutricionales disminuidos por contingencias climáticas, enfermedad o por ser hijos de vaquillonas presentarán disminuida la concentración de IGF1 y consecuentemente la frecuencia y amplitud de los pulsos secretorios de GnRH. Por lo tanto, la hipófisis al producir menos LH y FSH afectará la dimensión del pico temprano de LH y FSH, que es quien determina la edad de pubertad y tamaño testicular futuro. También, como consecuencia de la disminución del IGF1

circulante merma la producción y secreción de testosterona. (Evans y col, 1995; Aravindakshan y col., 2000; Brito, 2006; Brito y col., 2007-C; Barth y col., 2008; Brito, 2015).

Desde los 6 meses de edad y durante el crecimiento testicular acelerado el IGF1 en combinación con la leptina, son determinantes del tamaño de los testículos porque aumentan: a) el largo y diámetro de los túbulos seminíferos; b) el volumen parenquimatoso ocupado por los túbulos seminíferos; c) la multiplicación de células germinales y d) el proceso madurativo de las células de Sertoli.

En toritos evaluados desde el destete hasta aproximadamente los 15 meses de edad se observaron correlaciones genéticas entre concentraciones plasmáticas de IGF1 y perímetro escrotal y motilidad espermática de 0,35 y 0,43, respectivamente (Yilmaz y col., 2004). En el norte de Australia para toritos Brahman se informó una correlación genética de 0,46 entre concentraciones plasmáticas de IGF1 y perímetro escrotal y para un Compuesto Tropical el valor de dicha correlación fue 0,42 (Burns y col., 2013). En otro ensayo, se compararon toritos Angus, Brangus y Brahman recién destetados, entre aproximadamente los 6 y 10 meses de edad. Los animales Angus tuvieron en el periodo estudiado mayores concentraciones de IGF1, respecto a las 2 razas restantes, que se asociaron con mayores medidas de perímetro escrotal y concentraciones plasmáticas de testosterona (Thomas y col., 2002). Para que los efectos de IGF1 y de otros metabolitos hormonales endógenos sobre el crecimiento testicular acelerado sean exitosos es necesario que el pico temprano de LH haya sido consistente en la etapa prepuberal. (Brito y col., 2007-C; Brito, 2015).

En base a la extensa información bibliográfica previamente publicada sobre el rol del metabolito IGF1 sobre el inicio de la pubertad en general y del desarrollo testicular en particular, se puede inferir que los animales portadores del genotipo TT del SNP IGF1SnaBI en relación a los genotipos TC y CC, tendrían altas concentraciones de IGF1 que indujo un pico temprano de LH de gran magnitud predeterminante de una menor edad de pubertad y de un mayor tamaño gonadal a los 15-16 meses. Estas diferencias en los niveles de IGF1 podrían ser consecuencia de mutaciones en los sitios regulación de la transcripción presente en la región promotora de este gen. Luego, durante el crecimiento testicular acelerado los toritos que tenían el genotipo TT del SNP IGF1SnaBI alcanzaron un mayor tamaño de los testículos, en relación a los que tenían los genotipos TC y CC, en parte debido a la acción previa del potente pico temprano de LH. Futuros estudios que evalúen los niveles de expresión génica y de concentraciones de IGF1 en los distintos genotipos son necesarios para validar esta hipótesis.

Se visualiza la influencia de IGF1 en el tamaño testicular final que se estimó fenotípica e indirectamente a través del perímetro escrotal con una correlación de 0,95 y alta repetibilidad permitiendo la asociación posterior con los genotipos de SNP IGF1SnaBI. En cambio, no hubo asociación del SNP IGF1SnaBI con la edad de pubertad estimada acorde a la definición de Wolf y col., 1965 que se basa en la concentración y motilidad espermática. Esto parecería tener lógica ya que la bibliografía indica que el IGF1 influiría sobre el crecimiento testicular y de los 2 parámetros espermáticos incluidos en la definición de Wolf y col., 1965, únicamente lo haría sobre la motilidad. (Coulter y col., 1979; Coulter y col., 1997; Thomas y col., 2002; Yilmaz y col., 2004; Burns y col., 2011; Corbet y col., 2013; Fordyce y col., 2014; Kastelic, 2014).



El pico temprano de LH que ocurre en el periodo prepuberal y que determina la edad de pubertad, es el mecanismo fisiológico que permite diferenciar genéticamente dentro de grupos contemporáneos a los animales más y menos precoces sexualmente (Evans y col., 1995; Aravindakshan y col., 2000; Brito, 2015). Por lo tanto, es muy relevante contar con marcadores genéticos del gen IGF1, tales como el SNPIGFSnab1, ya que este gen juega un rol fisiológico fundamental en el desencadenamiento y desarrollo del pico temprano de LH.

Los toritos de 12-15 meses en sistemas de cría bajo condiciones extensivas igualan en eficiencia a los toros de 2 años, aportando los siguientes beneficios: a) menores costos de compra para el criador o de recría para el cabañero, b) achican el intervalo generacional y c) aceleran el progreso genético. Sin embargo, la variabilidad para la edad de inicio de la pubertad, entre y dentro de razas, determina que el arribo a la madurez sexual se haga en un rango amplio de edades. (Farid y col., 1981; Barth y col., 2011). El desempeño exitoso de los toros jóvenes en su primera temporada de apareamientos dependerá de su habilidad de monta, pero fundamentalmente de la calidad y cantidad de semen producido. La edad de pubertad y consecuentemente de madurez sexual, es el principal factor involucrado en la calidad seminal de los toritos de 15 meses, ya que se necesitan entre 50 y 120 días para que el eyaculado tenga un 70% de espermatozoides normales y 30% de motilidad rectilínea (Lunstra y col., 1978; Lunstra y col., 1982; Barth y col., 2004; Barth y col., 2008, Brito y col., 2012). La bibliografía informa que el porcentaje de toros maduros de diversas razas taurinas a los 11, 12, 13, 14, y 15 meses de edad fue 20%, 30%, 51%, 52% y 61%, respectivamente (Arteaga y col., 2001).

El 70% de espermatozoides normales fue la característica determinante del número de terneros producidos, siendo su correlación fenotípica de 0,64 en el desempeño de toros durante servicios múltiples en condiciones extensivas (Holroyd y col., 2002; Burns y col., 2011). La madurez sexual y por ende la pubertad, es determinante para que un torito supere la Evaluación de Aptitud Reproductiva o *Breeding Soundness Evaluation* de EE.UU, si lo logra se estimó que aporta un 6% de beneficios por los kilogramos extras de terneros logrados al destete a partir de una mayor cabeza de parición obtenida (Chenoweth y col., 2002; Brito y col., 2012).

Quizás sea en este punto, cuando la pubertad aparece como determinante de la edad de madurez sexual, donde un marcador genético como el SNPIGFSnab1 podría tener una aplicación interesante. Una diferencia de 11 días en el inicio de la pubertad entre toritos precoces y tardíos, implica también distintas edades de madurez sexual y por ende, disímiles condiciones de madurez al inicio del entore.

El SNPIGFSnab1 incorporado a programas de mejora genética, en combinación con la selección genética cuantitativa y fenotípica, permitiría detectar a los toritos sexualmente precoces que garanticen una rápida llegada a la madurez sexual. Sin embargo, antes de su uso comercial será necesaria su validación en poblaciones independientes.

Además, si se tratase de toros adultos, que ya han superado su etapa puberal, se podría establecer si son portadores o no de genotipos compatibles con precocidad sexual, en el caso de requerirse esa información, para incorporarlos en planteos de mejoramiento genético específicos. En este sentido, el SNPIGFSnab1 serviría para preseleccionar tempranamente, en la lactancia y/o el destete, a aquellos animales sexualmente precoces.

De esta manera se podría evitar criar a animales tardíos sexualmente, salvo que hubiese otra característica fenotípica lo justificara, con los costos que eso implica.

Se podría especular que el SNPIGF1SnaB1 sería útil para seleccionar en favor de motilidad espermática, cuya heredabilidad está entre 0,13 y 0,22, a partir de la correlación genética de 0,43 existente entre concentración plasmática de IGF1 y motilidad espermática. Quizás, también, el SNPIGF1SnaB1 sería útil para seleccionar indirectamente a favor de madurez sexual a partir de la correlación genética cercana a 1 que hay entre motilidad espermática y porcentaje de espermatozoides normales, que hace pensar que sea el mismo grupo de genes que está involucrado en ambas características. No obstante en estos casos hay que tener la precaución de considerar las bajas heredabilidades que se han reportado para estos rasgos (Corbet y col., 2013)

En una visión sistémica de los rodeos de cría los índices reproductivos constituyen la clave de su productividad y según Cundiff y col., 1992 la edad de pubertad y el anestro posparto son los 2 factores más influyentes en la eficiencia reproductiva. Por consiguiente, la fertilidad deberá considerarse tanto para machos como para hembras. Dado que el 60 y 85% del progreso genético se logra a través de los toros incorporados en servicio natural o inseminación artificial, es posible mejorar la fertilidad de las hembras a través de padres superiores y trabajando con caracteres con suficiente heredabilidad y correlación genética con los de fertilidad femenina (Toelle y Robinson, 1985; Corbet y col., 2009; Burns y col., 2011; Johnston y col., 2011, CRC, 2011; Corbet y col. 2013).

Al respecto se demostró que la correlación genética entre la edad de pubertad de toritos, determinada cuando sus eyaculados presentaban una concentración de  $50 \times 10^6$  esp.

/mil y una motilidad del 10% (Wolf y col., 1965) y la de las vaquillonas de la misma camada fue 0,47 (Gargantini y col., 2005).

El IGF1 es importante para el desencadenamiento de la pubertad de las vaquillonas por su rol en la fisiología ovárica. Mediciones hechas en toritos Brahman mostraron que la concentración plasmática de IGF1 y el perímetro escrotal, medido a los 12 meses de edad, tenían una correlación genética favorable con la edad de pubertad de las hembras correlativas de -0,61 y 0,43, respectivamente (CRC, 2011; Johnston, 2011, Johnston y col., 2014).

Burns y col., 2011 hacen un repaso bibliográfico respecto de la asociación entre el perímetro escrotal prepuberal de toros padres y rasgos de fertilidad en su progenie femenina: a) con edad a la pubertad (Brinks y col., 1978; King y col., 1983, Vargas y col., 1998; Martínez Velásquez y col., 2003), b) con edad al primer estro (Morris y col; 1992; 1993; 1999), c) con edad al primer parto (Smith y col., 1989), d) con días al parto (Meyer y col, 1991; Morris y col., 1999; Meyer y Johnston, 2001), e) con índice de preñez al año de edad (Morris y Cullen, 1995; Eler y col., 2004), f) con índice de preñez a lo largo de la vida productiva de los vientres (Toelle y Robinson, 1985; Morris y Cullen, 1994; Morris y col., 1999; Mwansa y col., 2000), g) con kilogramos de ternero producidos a lo largo de la vida productiva de los vientres (Morris y Cullen, 1994) y con diversos *Estimated Breeding Values* o EBVs para fertilidad de las hembras (Bamualin y col., 1984).

Diversos trabajos australianos de asociación entre SNPs y mediciones fenotípicas de IGF1 y perímetro escrotal, mostraron que los mismos se ubicaban en idéntica región cromosómica tanto para machos como para hembras. Esa región, según se reportó

oportunamente, se asoció a la pubertad en machos determinada como el momento en que el perímetro escrotal alcanzaba los 26 cm y en el caso de las hembras se relacionó con el nivel plasmático de IGF1, edad de pubertad, anestro posparto, altura, peso vivo y grasa subcutánea (Johnston y col., 2009; Fortes y col., 2012-A; Fortes y col., 2012-B; Fortes y col., 2012-C; Johnston y col., 2014).

A la luz de esta información se puede inferir que el empleo del SNP IGF1SnaB1 permitiría seleccionar indirectamente desde los machos a favor de la pubertad de las hembras en particular y de la fertilidad del rodeo en general. El fundamento de esa propuesta de selección indirecta es que el SNP IGF1SnaB1 tiene que ver con el IGF1 como metabolito hormonal, a su vez está íntimamente ligado al desarrollo y tamaño testicular. Por lo tanto, aquellos individuos portadores del genotipo IGF1SnaB1 TT (potencialmente sexualmente precoces), tendrían un crecimiento testicular prepuberal rápido que les permitiría alcanzar a corta edad los 28 cm de perímetro escrotal indicativos de pubertad (Lunstra y col., 1978). Estos toros de pubertad temprana probablemente engendrarían hijas también precoces sexualmente y fértiles, de acuerdo a las correlaciones genéticas descriptas previamente relativas al perímetro escrotal.

La posibilidad futura de usar el SNPIGF1Snab1 y otros SNPs, en la selección por precocidad sexual de hembras, adultas y jóvenes, abre un panorama muy alentador que requiere de más estudios.

Durante el periodo infantil del desarrollo sexual de los toros, los niveles de gonadotrofinas circulantes son bajos debido a una ínfima secreción de GnRH por parte del hipotálamo, ya que la misma estaría anulada por un efecto inhibitorio opioideo. En esta

etapa la hipófisis gradualmente aumenta de peso, tiene en su interior mayores contenidos de LH y LH- $\beta$  ARNm e incrementa el número de receptores de GnRH.

Estos cambios progresarán hasta el desencadenamiento del pico temprano de gonadotrofinas durante el periodo prepuberal, ya que aumentan los pulsos secretorios de GnRH, en simultáneo a una marcada sensibilidad hipofisiaria hacia la GnRH, dada por una concentración elevada de receptores para dicha hormona (Brito, 2015).

Luego de los 6 meses de vida, durante el periodo puberal, se da el crecimiento testicular acelerado que está predeterminado por el pico temprano de gonadotrofinas, principalmente de LH. Este crecimiento rápido de los testículos es controlado por los metabolitos hormonales endógenos, principalmente IGF1 y leptinas. Las concentraciones periféricas de LH y FSH son bajas, mientras que la testosterona se incrementa paulatinamente.

Acompañando al crecimiento testicular acelerado y como consecuencia del pico temprano de gonadotrofinas previo, los niveles de la concentración y su afinidad a las hormonas de los receptores para gonadotrofinas estarían aumentados. Este fenómeno transcurre tanto en los receptores de LH y FSH periféricos como en los testiculares, situados en las células de Leydig y en las de Sertoli (Bagu y col., 2006).

A la luz de lo expuesto surge que la elección de los SNPs, ubicados en los 3 genes candidatos propuestos para el presente estudio; 2 en GNRHR: SNP5 y SNP6 y 1 en LHR: LH-1499L, fue correcta ya que todos estarían vinculados a puntos importantes dentro de la cascada fisiológica de la pubertad. Por lo tanto, la ausencia de asociación estadística de los SNPs precitados con la definición de pubertad de Wolf y col., 1965 no significa

necesariamente que estos genes no estén involucrados en el desarrollo de esta característica ni que no exista un componente genético para el inicio de la pubertad. El resultado negativo podría ser consecuencia de diferentes factores, como por ejemplo, la cantidad insuficiente de animales utilizados o la presencia de otros polimorfismos causales no evaluados en el presente estudio.

## CONCLUSIONES

- La concentración espermática no sería la principal variable limitante según la definición propuesta por Wolf y col. (1965), mientras que la motilidad espermática parecería ser la variable crítica.
- Existe variabilidad entre la progenie de las distintas líneas genéticas respecto a edad y perímetro escrotal al inicio de la pubertad, lo que permite seleccionar genéticamente por precocidad sexual.
- El perímetro escrotal al destete podría usarse para seleccionar por precocidad sexual debido a la existencia de una correlación fenotípica negativa edad de pubertad.
- El perímetro escrotal podría usarse como un buen predictor de la pubertad en toritos recriados en sistemas pastoriles.
- El SNP IGF1SnaBI estuvo significativamente asociado con edad a la pubertad determinada a partir de los 28 cm de perímetro escrotal.



**BIBLIOGRAFIA**

- 1) Ahmadian A, Gharizadeh B, Gustafsson AC, Sterky F, Nyrén P, Uhlén M, Lundeberg J. Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing.2000. Anal Biochem. 280:103-110.
- 2) 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, p. 299-324.
- 3) Alderborn A, Kristofferson A, Hammerling U. Determination of single-nucleotide polymorphisms by real-time pyrophosphate DNA sequencing.2000.genomic res. 8:1249-1254
- 4) Almquist J.O. & Amann R.P. Reproductive Capacity of dairy bulls. XI. Puberal characteristics and postpuberal changes in production of semen and sexual activity of Holstein bulls ejaculated frequently. Journal of Dairy Science 1974; 59:986-991
- 5) Amann RP, Walker AO. Changes in the pituitary-gonadal axis associated with puberty in Holstein bulls. J Anim. Sci. 1983; 57:433-442.
- 6) Amann RP, Wise M.E, Glass JD and Nett T.M. Prepuberal changes in the hypothalamic-pituitary axis of Holstein Bulls. Biology of reproduction 1986; 34:71-80.
- 7) Amyes N.C and Morris CA. Responses to selectionfor puberal traits in Angus cattle over 23 years. Proceedings of the New Zeland Society of Animal production 2009; 69:201-205
- 8) Aponte PM, de Rooij DG, Bastidas P. Testicular development in Brahman bulls. Theriogenology. 2005; 64: 1440-1455

- 9) Aravindakshan JP, Honaramooz A, Bartlewsky PM, Beard AP, Pierson RA and Rawlings NC. *Theriogenology* 2000; 54:339-354
- 10) 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
- 11) Bagley C.P. (1993) Nutritional management of replacement beef heifers: a review. *Journal of Animal Science* 71: 3155 – 3163
- 12) Bagu ET. Testicular development in bulls. Tesis doctoral. University of Saskatchewan, Canadá. 2006.
- 13) Bagu ET, Cook S, Gratton CL, Rawlings NC. Postnatal changes in testicular gonadotropin receptors, serum gonadotropin, and testosterone concentrations and functional development of the testes in bulls. *Reproduction*. 2006; 132: 403–411
- 14) Bamualim WRB, Entwistle KW, Goddard ME, 1984: Variation in fertility in *Bos indicus* cross bulls. *Anim Prod Aust* 15, 263–266
- 15) Barth AD, Ominski KH. The relationship between scrotal circumference at weaning and at one year of age in beef bulls. *Can. Vet. J.* 2000; 41:541-546
- 16) Barth AD and Waldner CL. Factors affecting breeding soundness classification of beef bulls examined at the Western College of Veterinary Medicine. *Can Vet J.* 2002. Vol 43:274-284
- 17) Barth A. Pubertal development of *Bos taurus* beef bulls. Proceeding 23<sup>rd</sup> World Buiatrics Congress, 2004, Quebec, Canadá.
- 18) Barth AD, Brito LFC, Kastelic JP. The effect of nutrition on sexual development of bulls. *Theriogenology*. 2008; 70: 485-494

- 19) Barth A. Factores que afectan la pubertad de los toros el uso de toros de un año en servicio a campo y en centros de inseminación artificial. En: Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la aptitud reproductiva. Ed. IRAC. Córdoba, Argentina. 2011, ISBN-10:987-22214-1-3, p. 135-148.
- 20) Benton Glaze J. Genetic selection for fertility and performance. Proceedings: Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle – Northwest. Sep. 30 – Oct. 1, 2011; Boise, Idaho, EE.UU, 255-262
- 21) Bielli A, Pérez R, Pedrana G, Milton JTB, López A, Blackberry M, Duncombe G, Rodríguez-Martínez H and Martin GB. Low maternal nutrition during pregnancy reduces the numbers of Sertoli cells in the newborn lamb. In: *Reprod. Fertil. Develop.* 2002 14. p. 333-337.
- 22) Bo, G y Tríbulo R. Certificado de la aptitud reproductiva del toro. En: Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la aptitud reproductiva. Ed. IRAC. Córdoba, Argentina. 2011 ISBN-10:987-22214-1-3 p. 122-134.
- 23) Bourdon RM and Brinks JS. Simulated efficiency of range beef production II. Fertility traits. *J. Anim. Sci.* 1987; 65:956-962
- 24) Brito LFC, Silva AEDF, Unanian MM, Dode MAN, Barbosa RT, Kastelic JP. Sexual development in early- and late-maturing *Bos indicus* and *Bos indicus* x *Bos taurus* crossbred bulls in Brazil. *Theriogenology* 2004; 62: 1198-1217
- 25) Brito LFC. Nutrition, metabolic hormones and development in bulls. Tesis doctoral. University of Saskatchewan, Canadá 2006.

- 26) Brito LFC, 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.* 2007a; 42: 502–508.
- 27) Brito LFC, Barth A, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr., Mir PS, Kastelic JP. Effect of improved nutrition during calthood on serum metabolic hormones, gonadotropins, and testosterone concentrations, and on testicular development in bulls. *Domestic Animal Endocrinology* 2007b; 33: 460–469.
- 28) Brito LFC, Barth A, Rawlings NC, Wilde RE, Crews DH Jr., Boisclair YR, Ehrhardt RA, Kastelic JP. Effect of feed restriction during calthood on serum concentrations of metabolic hormones, gonadotropins, testosterone, and on sexual development in bulls. *Reproduction* 2007c; 134: 171–181
- 29) Brito LFC, Barth AD, Wilde RE, Kastelic JP. Effect of growth rate from 6 to 16 months of age on sexual development and reproductive function in beef bulls. *Theriogenology* 2012 a; 77: 1398-1405
- 30) Brito LFC. Endocrin control of testicular development and initiation of spermatogenesis in bulls. *Bovine reproduction*. First edition. 2015 Cap 4:30-38
- 31) Burns BM, Gazzola C, Holroyd RG, Crisp J, McGowan MR. Male reproductive traits and their relationship to reproductive traits in their female progeny: a systematic review. *Reprod Dom Anim* 2011; 46: 534-553.
- 32) Burns BM, Corbet NJ, Corbet DH, Crisp JM, Venus BK, Johnston DJ, Li Y, McGowan MR and Holroyd RG. *Animal Production Science* 2013 53:87-100

- 33) Burrow H. Variances and covariances between productive and adaptive traits and temperament in a composite breed of tropical beef cattle *Livestock Production Science* 2001; 70:213--233
- 34) Callaghan MJ, Perry VEA. Restricted preweaning nutrition suppresses reproductive development in beef bulls. *Proceeding of the Biennial Conference of the Association for Applied Animal Andrology* 2010; Sydney, Australia. Agosto 28-29.
- 35) Cammack KM, Thomas MG and Ems RM. Review: Reproductive traits and their heritabilities in beef cattle. *The professional animal scientist* 2009; 25:517-528
- 36) Campero C. Servicio con toros jóvenes en el rodeo de cría. *Rev. Vet. Argentina* 1998; 15 (144)
- 37) Cantet RJC, Gualdrón Duarte JL, Munilla Leguizamón S. Selección Genómica. *Revista Argentina de Producción Animal* 2008; 28(2): 133-136.
- 38) Cardellino R y Rovira J. *Mejoramiento genetico animal*. 1997. Ed. Hemisferio Sur. 1-253
- 39) Carrillo J. *Manejo de un rodeo de cría*. 2da. Edición. Balcarce, Argentina, Ed. Centro Regional Buenos Aires Sur-INTA, 1997; p. 1-507
- 40) Casas E, Lunstra DD, Cundiff LV, Ford JJ. Growth and pubertal development of F1 bulls from Hereford, Angus, Norwegian Red, Swedish Red and White, Friesian, and Wagyu sires. *J Anim Sci*. 2007; 85:2904-2909.
- 41) Casas E, Lunstra DD, Stone RT. Quantitative trait loci for male reproductive traits in beef cattle. *Animal Genetic*. 2004; 35: 451-453. doi:10.1111/j.1365-2052.2004.01190.x

- 42) Cates W.F., Nicholson HH, Crow GH, Janzen ED. Testicular development in record of performance bulls. Proc Annual Meet Soc Theriogenology 1981; 16-30.
- 43) Chandolia RK, Evans ACO, Rawlings NC. The involvement of dopaminergic and opioidergic neuronal systems in the control of the early rise in LH secretion in bull calves. J Neuroendocrinol 1997; 9, 121–127.
- 44) Chase Jr. CC, Chenoweth PJ, Larsen RE, Olson TA, Hammond AC, Menchaca MA, Randel RD. Growth and reproductive development from weaning through 20 months of age among breeds of bulls in Subtropical Florida. Theriogenology 1997; 47: 723-745.
- 45) Chase, Jr. CC, Chenoweth PJ, Larsen RE, Hammond AC, Olson TA, West RL, Johnson DD. Growth, puberty, and carcass characteristics of Brahman-, Senepol-, and Tuli-sired F1 Angus bulls. J. Anim Sci. 2001; 79: 2006–2015.
- 46) Chenoweth P. Bull breeding soundness exam and beyond. Proceedings: Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Manhattan, Kansas, EE.UU. September 5 -6, 2002.
- 47) Chenoweth PJ. Reproductive selection of males: current and future perspectives. Rev. Bras. Reprod. Anim. 2011; Vol. 35, 2: 133-138
- 48) Cooperative Research Centre for Beef Genetic Technologies. Annual Report 2010-2011. Australia.
- 49) Corbet NJ, Burns BM, Corbet DH, Johnston DJ, Crisp JM, McGowan MR, Prayaga KC, Venus BK, Holroyd RG. Genetic variation in growth, hormonal and seminal traits of young tropically adapted bulls. Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet. 2009; 18:121-124

- 50) Corbet NJ, Burns BM, Johnston DJ, Wolcott ML, Corbet DH, Venus BK, Li Y, McGowan MR and Holroyd RJ. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bulls traits. *Animal production science*.2013; 53:101-103.
- 51) Coulter GH, Foote RH. Bovine testicular measurements as indicators of reproductive performance and their relationship to productive traits in cattle: a review. *Theriogenology* 1979; 11, 297– 311.
- 52) Coulter GH, Carruthers T D, 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. 1987; *J Anim. Sci.* 64: 254-260.
- 53) Coulter GH. Bull fertility: BSE, abnormalities, etc. *Proceedings: Range Beef Cow Symposium XV, Rapid City, South Dakota, EE.UU. Diciembre 9 -11, 1997.*
- 54) Crawford DT, Bhangale N, Li G, Hellenthal M, Rieder D, Nickerson DA, Stephens M. Evidence for substantial fine-scale variation in recombination rates across the human genome. *Nat Genet.* 2004; 36:700–706.
- 55) Crews DH Jr, Porteous DJ. Age of dam and age at measurement adjustments and genetic parameters for scrotal circumference of Canadian Hereford bulls. *Canadian Journal of Animal Science.* 2003, 83 (2) 183-188
- 56) Cummins B. Yearling becoming popular. [On line]  
<http://www.dpi.nsw.gov.au/agriculture/livestock/beef/breeding/bulls/yearling-bulls>.  
Accessed July 2013

- 57) Cundiff LV, Nuñez-Dominguez R, Dickerson GE, Gregory KE, Koch RM. Heterosis for lifetime production in Hereford, Angus, Shorthorn and crossbred cows. *J Anim Sci* 1992; 70, 2397–2410
- 58) Curtis SK y Amann RP. Testicular development and establishment of spermatogenesis in Holstein bulls. *Journal of Animal Science* 1981; 53 1645-1657.
- 59) Da Silva P, Aitken RP, Rhind SM, Racey P. A. and J. M. Wallace. Influence of placentally mediated fetal growth restriction on the onset of puberty in male and female lambs. *Journals of reproduction and fertility*. 2001; 122:375-383
- 60) Eler J, Silva JA, Evans J, Ferraz J, Dias F, Golden B. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nellore cattle. *J Anim Sci* 2004; 82, 2519–2527
- 61) Entwistle KW, Fordyce G. Evaluating and reporting bull fertility. Eight Mile Plains, Australia, *Australian Cattle Vets*; 2003
- 62) Evans ACO, Currie WD, Rawlings NC. Opioidergic regulation of gonadotrophin secretion in the early prepubertal bull calf. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993; 99: 45-51
- 63) Evans A.C.O., Davies F.J., Nasser L.F., Bowman P. and Rawlings N.C. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls and changes in semen characteristics at puberty. *Theriogenology*.1995; 43:569-578
- 64) Evans ACO, Pierson RA, García A, Mc Dougall LM, Hrudka F, Rawlings NC. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*. 1996; 46: 345-357.



- 65) Evans ACO, Golden BL, Bourdon RM. and Long KL. Additive genetic relationship between heifer pregnancy and scrotal circumference in Hereford cattle. *J. Anim. Sci.* 1999; 77:2621-2628
- 66) Evans ACO y Rawlings NC. Fisiología de la pubertad de terneros y terneras. VIII Simposio Internacional de Reproducción Animal – IRAC, Córdoba, Argentina. 2009; p. 1-15
- 67) Excoffier L, Lischer HEL. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010; 10:564–567.
- 68) Falconer DS, Mackay TFC: *Introduction to Quantitative Genetics*. Harlow Essex, England: Addison Wesley Longman Limited; 1996.
- 69) Farid A, Makarechian M, Price MA. Repeatability of reproductive performance of beef bulls as yearlings and two year-olds at pasture. *Anim. Reprod. Sci.* 1987; 14: 21-29.
- 70) Fitz Patrick LA, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Doogan VJ, De Faveri J, Miller RG, Holroyd RG. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. *Animal Reproduction Science.* 2002; 71: 39–49.
- 71) Fordyce G, Entwistle K, Norman S, Perry V, Gardiner B, Fordyce P. 2006. Standardising bull breeding soundness evaluations and reporting in Australia. *Theriogenology* 2006; 66: 1140–1148
- 72) Fordyce G, McGowan M, Lisle A, Muller T, Allen J, Duff C, Holroyd RG, Corbet NJ, Burns BM. Scrotal circumference of Australian beef Bulls. *Theriogenology* 2014; 81:805-814.

- 73) Fortes MR, Reverter A, Nagaraj SH, Zhang Y, Johnson NN, Barris W, Lenhert S.A, Bo-Hansen GB. and Hawken RJ. *J. Anim. Sci.* 2011; 89:1669-1683.
- 74) Fortes MR, Lenhert SA, Boloorma S, Reich C, Fordyce G, Corbet NJ, Whan V, Hawken RJ, Reverter A. Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. *Animal Production Science.* 2012; 52: 143–150.
- 75) Fortes MRS, Reverter A, Kelly M, McCulloch R, Lehnert SA. Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. *Andrology.* 2013; doi: 10.1111/j.2047-2927.2013.00101.x
- 76) Funston RN, Martin JL, Adams DC, Larson DM. Winter grazing system and supplementation of beef cows during late gestation influence heifer progeny. *J Anim. Sci.* 2010; 88: 4094-4101.
- 77) Funston R. Nutrition and reproduction interactions. VII simposio de producao de gado de corte. Em Livro: VII Simpósio de Produção de Gado de Corte. Ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil, 2011; p. 73-96.
- 78) Gargantini G, Cundiff LV, Lunstra DD and Van Vleck LD. Genetic relationships between male and female reproductive traits in beef cattle. *The professional animal scientist.* 2005; 21:195-199
- 79) 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. *J Anim Sci* 2001; 79:1757–1762.
- 80) Geneser F. *Histologia sobre bases moleculares.* 2a Ed. Editorial Médica Panamericana. 1992; 1-768.

- 81) Getty R. Anatomía de los animales domésticos. Tomo II. 3a Ed. Editorial Salvat Ciencia y Cultura Latinoamericana. 1982; 1339-2276
- 82) Gregory KE, Lunstra DD, Cundiff LV and Koch RM. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for puberty and scrotal traits of beef cattle. *J.Anim.Sci.*1991; 69:2795-2807
- 83) Hafez ESE, Hafez B. Reproducción e inseminación artificial en animales. 7ma Edición. México. Ed. McGraw Hill Interamericana Editores SA., 2000, p. 1-519.
- 84) 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.
- 85) Honaramooz A, Cook SJ, Beard AP, Bartlewsky PM, Rawlings NC. Nitric oxide regulation of gonadotrophin secretion in puberal heifers. *Journal of neuroendocrinology.*1999; 11:667-676
- 86) Hopkins FM. Breeding soundness evaluation and beyond. *Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Proceedings: Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle.* Lexington, Kentucky, EE.UU. November 1-2, 2005.
- 87) Johnston DJ, Barwick SA, Corbet NJ, Fordyce G, Holroyd RG, Williams PJ, Burrow HM. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern Australia and associations with heifer- and steer-production traits. *Animal Production Science.* 2009; 49: 399-412

- 88) Johnston DJ, Barwick SA, Fordyce G, RG Holroyd. Understanding the Genetics of Lactation Anoestrus in Brahman Beef Cattle to Enhance Genetic Evaluation of Female Reproductive Traits. In 9th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. (CD-ROM) Article no. 0923. Leipzig, Alemania, 2010.
- 89) Johnston D. Genetic evaluation of female reproduction traits. Conferencia 43rd Annual Research Symposium and Annual Meeting. Proceedings: Beef Improvement Federation, Bozeman, Montana, EE.UU. 2011
- 90) Johnston DJ, Corbet NJ, Barwick SA, Wolcott ML, Holroyd RG. Genetic correlations of young bull reproductive traits and heifer puberty traits with female reproductive performance in two tropical beef genotypes in northern Australia. *Animal Production Science*. 2014; 54: 74-84
- 91) Kastelic JP. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology*. 2014; 81:18-23
- 92) 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.
- 93) Kealey CG. Estimation of genetic parameters of yearling scrotal circumference and semen characteristics in Line 1 Hereford bulls. Tesis doctoral. Department of Animal and Range Science. Montana State University, EE.UU. 2004.
- 94) Kealey, CG, Mac Neil M, Tess MW, Geary MW, Bellows RA. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of Line 1 Hereford bulls. *J Anim. Sci*. 2006; 84:283–290.

- 95) King RG, Kress DD, Anderson DC, Doorbos DE, Burfening PJ. Genetic parameters in Herefords for puberty in heifers and scrotal circumference in bulls. *Proc West Sect Amer Soc Anim Sci* 1983; 34, 11–13
- 96) Knights S, Baker RL, Gianola D, Gribb J.B. Estimates heritabilities and of genetics and phenotypic correlations mong growth and reproductive traits in yearling Angus bulls. *J.Anim.Sci.* 1984; 58:887-893
- 97) Li N, Stephens M. Modeling linkage disequilibrium, and identifying recombination hotspots using SNP data. *Genetics.* 2003; 165:2213-2233.
- 98) Lirón JP, Prando AJ, Fernández ME, Rípoli 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; p.13-26.
- 99) Lirón JP, Prando A, Ripoli MV, Rogberg-Muñoz A, Posik DM, Baldo A, Peral-García P, Giovambattista G. Characterization and validation of bovine Gonadotropin releasing hormone receptor (GNRHR) polymorphisms. *Research in Veterinary Science.* 2011; 91: 391-396.
- 100) Lirón JP, Prando AJ, Fernández ME, Ripoli MV, Rogberg Muñoz A, Goszczynski D, Posik D, 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: 26. doi:10.1186/1471-2156-13-26
- 101) Lobo R, Grossi D. Incorporacao de marcadores de DNA na avaliacao genetica. 17º Seminario de Pesquisadores. Associação Nacional de Criadores y Pesquisadores, Ribeirão Preto, San Pablo, Brasil, 2011.

- 102) 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.
- 103) 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.
- 104) Lunstra DD, Cundiff LV. Growth and pubertal development in Brahman-, Boran-, Tuli-, Belgian Blue-, Hereford- and Angus-sired F1 bulls. *J Anim Sci.* 2003; 81:1414-1426.
- 105) 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. *Neuro Endocrinol. Lett.* 2008; 29, 981–989
- 106) Makarechian M. and Arthur P.F. A comparison of natural service fertility of yearling and two-year-old Bulls on pasture. *Theriogenology* 1993; 39:835-845
- 107) Makarechian M, Berg RT, Farid A. Effects of mating type and age of bull on reproductive performance. *Agric Forest Bull.* 1983; 6:12-14.
- 108) Martin LC, Brinks JS, Bourdon RM, Cundiff LV. Genetic effects on beef heifer puberty and subsequent reproduction. *J Anim. Sci.* 1992; 70: 4006-4017.
- 109) Martinez Velazquez G, Gregory KE, Bennet GL, Van Vleck LD. Genetic relationships between scrotal circumference and female reproductive traits *J Anim. Sci.* 2003; 81: 395-401.

- 110) Mercantonio S. El mercado de semen bovino en la Argentina.. Conferencia dictada en la 117<sup>a</sup> Exposición de Ganadería, Agricultura e Industria Internacional. Revista Taurus. 2003; 19:11-17
- 111) Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of Total Genetic Value Using Genome-Wide Dense Marker Maps. Genetics 2011; 157: 1819–1829.
- 112) Meyer K, Hammond K, Mackinnon MJ, Parnell PF. Estimates of covariances between reproduction and growth in Australian beef cattle. J Anim Sci 1991; 69, 3533–3543.
- 113) Morris C.A., Baker R.L., Cullen N.G. and Boyd P. Genetic parameters for body weight, scrotal circumference, and serving capacity in beef cattle. New Zeland Journal of Agricultural Research. 1992; 35:195-198
- 114) Morris CA, Wilson JA, Bennett GL, Cullen NG, Hickey SM, Hunter JC. Genetic parameters for growth, puberty, and beef cow reproductive traits in a puberty selection experiment. New Zealand Journal of Agricultural Research. 2000; 43:1, 83-91.
- 115) Morris C, Amyes NC. Response to selection for age at puberty in an Angus herd. Proc. Assoc. Advmt. Anim. Breed. Genet, Australia. 2005; 16: 157-160.
- 116) Morris CA, Pitchford WS, Cullen NG, Esmailizadeh AK, Hickey SM, Hyndman D, Dodds KG, Afolayan RA, Crawford AM: Quantitative trait loci for live animal and carcass composition traits in Jersey and Limousin back-cross cattle finished on pasture or feedlot. Anim Genet 2009; 40(5):648–654.
- 117) Mwansa P, Kemp R, Crews D Jr, Kastelic J, Bailey D, Coulter G. Selection for cow lifetime pregnancy rate using bull and heifer growth and reproductive traits in composite cattle. Can J Anim Sci 2000; 80, 507– 510

- 118) Neville, WE, Jr, Richardson, KL, Williams, DJ, III and Utley, PR. Breeding performance of beef bulls assigned to two-sire cow groups on pasture J. Anim. Sci. 1989; 67:2848-2853.
- 119) Nicol D. 2005. Comunicacion personal
- 120) Nolan CJ, Neuendorff DA, Godfrey RW, Harms PG, Welsh Jr TH, McArthur NH, Randel RD. Influence of dietary energy intake on prepubertal development of Brahman bulls. J Anim. Sci. 1990; 68: 1087-1096.
- 121) Nordstrom T., Ronaghi M., Forsberg L., de Faire U., Morgenstern R., and Nyren P.. Direct analysis of single-nucleotide polymorphism on double-stranded DNA by pyrosequencing. Biotechnol.Appl.Biochem. 2000; 31 107–112
- 122) Ojeda SR, Lomnicicz A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent A, Matagne V, Mungenast A. Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a system biology approach? Endocrinology. 2006; 147:1166-1174
- 123) Ohl MW, Ott RS, Faulkner DB, Hornbuckle T 2nd, Hess RA, Cmarik GF, Zinn GM Effects of rate of gain on scrotal circumference and histopathologic features of the testes of half-sibling yearling beef bulls. American Journal of Veterinary Research. 1996; 57:844-847.
- 124) Palasz AT, Cates WF, Barth AD, Mapletoft RJ. The relationship between scrotal circumference and quantitative testicular traits in yearling beef bulls. Theriogenology. 1994; 42:715-726



- 125) Pereyra Gomes de Freitas, S. Desempenho de novilhas expostas à reprodução aos 14/15 meses de idade. Tesis doctoral. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Brasil. 2005
- 126) Prayaga, KC, Corbet NJ, Johnston DJ, Wolcott ML, Fordyce G, Burrow HM. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. *Anim. Prod. Sci.* 2009; 49:413–425.
- 127) Pruitt RJ, Corah LR, Stevenson JS, Kirakofe GH. Effect of energy intake after weaning on the sexual development of beef bulls. II. Age at first mating, age at puberty, testosterone and scrotal circumference. *J. Anim. Sci.* 1986; 63: 579-585.
- 128) Quirino CR, Vale Filho VR, Andrade VJ, Pereira JCC. Evaluation of four mathematical functions to describe scrotal circumference maturation in Nelore bulls. *Theriogenology* 1999; 52:25–34.
- 129) Rathmann RJ. Effects of conventional or low bull to female ratio and utilization of reproductive tract scores in extensively-managed, natural mating breeding groups. Tesis doctoral. Texas A&M University, EE.UU. 2005
- 130) Rawlings N.C., Fletcher P.W., Henricks D.M. and Hill J.R. Plasma luteinizing hormone (LH) and testosterone levels during sexual maturation in beef bull calves. *Biology of reproduction.* 1978 19: 1108 -1112.
- 131) Rawlings NC, Evans ACO (1995) Androgen feedback during the early rise in LH secretion in bull calves *Journal of Endocrinology* 145 243—249
- 132) Rawlings N, Evans ACO, Chandolia RK, Bagu ET. Sexual maturation in the bull *Reprod Dom Anim.* 2008 43 (Suppl. 2), 295–301.

- 133) Renaville R, Devolder A, Massart S, Sneyers M, Burny A, Portetelle D. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1993; 99: 443-449.
- 134) Renaville R, Devolder A, Massart S, Sneyers M, Falaki M, Gengler N, Burny A, Portetelle D. *Journal of Reproduction and Fertility*. 1996; 106: 79-86.
- 135) Roberts S.J. *Obstetricia veterinaria y patología de la reproducción*. Ed. Hemisferio Sur 1979; 1-1021.
- 136) Rodriguez RE, Wise ME. Ontogeny of pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone in the bull calf during infantile and pubertal development. *Endocrinology* 1989; 124: 248–256.
- 137) Rousset F: GENEPOP'007, a complete reimplement of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour* 2007; 8:103–106.
- 138) Rutter B, Russo A. *Bases para la evaluación de la aptitud reproductiva del toro*. 2006. Ed. Agrovet. 2ª ed. p.1-270.
- 139) Sánchez L. *Temas de embriología y biología del desarrollo animal*. FCV. UNLP. 1985.
- 140) Sánchez A, Fernández Surribas J, Von Lawzewitsh I. *Lecciones de Histología Veterinaria*. 19985; Volúmenes 9 y 10. Ed. Hemisferio Sur 3ª edición
- 141) Sheeper SM, Annandale CH, Webb EC. Relationship between production Bonsmara bulls. *South African Journal of Animal Science*. 2010; 40 (3) 163-172.
- 142) Silva Mena C. Peripubertal traits of Brahman bulls in Yucatan. *Theriogenology*. 1997; 48: 675-685.
- 143) Smith BA, Brinks JS, Richardson GV. Relationships of sire scrotal circumference to offspring reproduction and growth. *J. Anim. Sci*. 1989; 67:2881-2885.

- 144) Soárez de Lima Lapetina JM. Modelo bioeconómico para la evaluación del impacto de la genética y otras variables sobre la cadena cárnica vacuna en Uruguay. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 2009
- 145) Spangler M. Does scrotal circumference impact female fertility? Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle. Stillwater, Oklahoma, EE.UU. October 8-9, 2014.
- 146) Sullivan TM, Micke GC, Greer RM, Perry VEA. Dietary manipulation of *Bos indicus* X heifers during gestation affects the prepubertal reproductive development of their bull calves. *Animal Reproduction Science*. 2010; 118: 131-139.
- 147) Summers AF, Funston RN. Fetal programming: implications for beef cattle production. Proceeding of the 44<sup>th</sup> Research Symposium and Annual Meeting Beef Improvement Federation. Houston, EE.UU. Abril, 18-21, 2012; p. 65-76.
- 148) Taylor GJ. Factors affecting the production and reproduction performance of tropically adapted beef cattle in South Africa. Tesis doctoral. Department of Animal and Wildlife Science. University of Pretoria, Sudáfrica, 2006.
- 149) Tess, M. W. Genetic aspects of replacement heifers in current and future production systems. *Proc. Am. Soc. Anim. Sci.* 1999. Available at: <http://www.asas.org/jas/symposia/proceedings/0901pdf>
- 150) Thenmen AP, Huhtaniemi IL. Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidating the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function. *Endocrine Rev* 2000; 21(5):551–583.

- 151) Thomas MG, Enns RM, Hallford DM, Keisler DH, Obeidat BS, Morrison CD, Hernandez A, Bryant WD, Flores R, Lopez R, Narro L. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in performance-tested Angus, Brangus, and Brahman bulls. *J Anim. Sci.* 2002; 80: 757-767.
- 152) Toelle VD, Robinson OW. estimates of genetic correlations between testicular measurements and female reproductive traits in cattle. *Journal of animal science.* 1985; 60:80-100.
- 153) Torres Junior JRS, Henry M. Sexual development of Guzerat (*Bos taurus indicus*) bulls raised in a tropical region. *Anim. Reprod.* 2005 Vol. 2, (2) 114-121
- 154) Trenkle A, Willham RL. Beef production efficiency. *Science.* 1977; Dec 9; 198 (4321):1009–1015.
- 155) Tríbulo HE, Barth A, Bo GA, Brogliatti GM. Fisiología de la reproducción del toro y evaluación de la capacidad reproductiva. Córdoba, IRAC. ISBN-10:987-22214-1-3. 2011; p. 1-182
- 156) Ungerfeld, R. Reproducción de los Animales Domésticos. 2003. 1ºed. 1-584.
- 157) Vale Filho VR, Andrade VJ, Azevedo NA. Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. En: Libro VII Simpósio de Produção de Gado de Corte. Ed. Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, Brasil. 2011; p. 363-412.
- 158) Van Eenennaam AL, van der Werf JHJ, Goddard ME. The value of using DNA markers for beef bull selection in the seedstock sector. *J Anim. Sci.* 2011; 89: 307-320.

- 159) Vargas CA, Elzo MA, Chase CC, Chenoweth PJ, Olson TA. Estimation of genetic parameters for scrotal circumference, age at puberty in heifers, and hip height in Brahman cattle. *J Anim. Sci.* 1998; 76:2536-2541
- 160) Vozzi PA. Análise genético-quantitativa de características de precocidade sexual na raça Nelore. Universidade de São Paulo, Brasil. 2008
- 161) 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.
- 162) Yilmaz A, Davis ME, Simmen RC. Reproductive performance of bulls divergently selected on the basis of blood serum insulin-like growth factor I concentration. *J Anim. Sci.* 1999; 77: 835-839.
- 163) Yilmaz A, Davis ME, Simmen RC. 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.