

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**  
**Faculdade de Veterinária**  
**Programa de Pós-Graduação em Veterinária**



Tese

**Marcadores associados a características reprodutivas de touros**

**Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira**

Pelotas, 2017

**Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira**

**Marcadores associados a características reprodutivas de touros**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientador: PhD. Thomaz Lucia Júnior

Co-orientadora: Dra. Carine Dahl Corcini

Co-orientador: PhD. Fernando Flores Cardoso

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

F384m Ferreira, Carlos Eduardo Ranquetat

Marcadores associados a características reprodutivas de touros / Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira ; Thomaz Lucia Júnior, orientador ; Carine Dahl Corcini, Fernando Flores Cardoso, coorientadores. — Pelotas, 2017.

81 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Exame andrológico. 2. Fertilidade. 3. Paraoxonase. 4. Perímetro escrotal. 5. Seleção genômica. I. Lucia Júnior, Thomaz, orient. II. Corcini, Carine Dahl, coorient. III. Cardoso, Fernando Flores, coorient. IV. Título.

CDD : 636.2

Carlos Eduardo Ranquetat Ferreira

Marcadores associados a características reprodutivas de touros

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 22/02/2017

Banca examinadora:

Prof. Dr. Thomaz Lucia Júnior (Orientador)  
PhD em Eficiência reprodutiva pela University of Minnesota

Prof. Dra. Arione Augusti Boligon  
Doutora em Genética e Melhoramento Animal pela Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Cássio Cassal Brauner  
Doutor em Zootecnia pela Universidade Federal de Pelotas

Dra. Karina Lemos Goularte  
Doutora em Reprodução Animal pela Universidade Federal de Pelotas

**Dedico este trabalho à minha família, alicerce de minha vida!**

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, ao Deus criador, fortaleza e guia a quem sempre agradeço a vida, a força e inspiração para superar os desafios.

Nesta caminhada, consigo novamente agradecer pessoalmente a meus pais Ayeza e Carlos pelo amor e tempo dispensados em minha educação e formação. Em especial, agradeço a presença de minha mãe exemplo de resiliência, fortaleza, persistência e motivação de sempre seguir em frente.

Nesta etapa da vida, agradeço a minha esposa Débora por compartilhar sua vida comigo e pela família que estamos formando. Através do amor caminhamos juntos em busca da felicidade que se completou ainda mais com a chegada de nossa amada filha. Giovana motivação de vida!!!

Em especial ao meu orientador Thomaz pelas oportunidades que me fizeram evoluir pessoal e profissionalmente. Aos meus co-orientadores Fernando e Carine pelo exemplo como profissionais. Aos professores Arnaldo e Rafael pela amizade, orientação, oportunidades e exemplo de conduta.

Agradeço a pessoas especiais que se apresentaram durante a caminhada. Ao amigo Bernardo pela amizade, companheirismo, exemplo de profissional dedicado e comprometido com a formação das pessoas com as quais convive. Também gostaria de agradecer ao amigo Gabriel pelo auxílio, parceria de viagens e estudos. A amiga de longa data Karina e por fim, aos colegas do grupo ReproPel pela amizade, suporte, descontração, parceria, companheirismo e troca de experiências que nos fazem evoluir. A CAPES, pela concessão da bolsa, Embrapa Pecuária Sul pelo suporte e à Conexão DeltaG pela atenção e disponibilidade dos animais.

Foram anos de convivência, de batalhas profissionais e pessoais que modificaram pensamentos, condutas, formas de agir e pensar. Que possamos sempre evoluir, com os acertos e erros de nossas vidas, para o caminho do bem. Que possamos sempre lembrar e agradecer a tudo e a todos que se colocam em nossa caminhada. MUITO OBRIGADO!

## Resumo

FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat. **Marcadores associados a características reprodutivas de touros**. 2017. 81f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A fertilidade dos reprodutores é de suma importância para a maximização das taxas de prenhez e melhoramento genético. O exame andrológico é uma importante ferramenta para a identificação de reprodutores sub férteis e para o monitoramento da qualidade seminal. Porém, poucas características do exame estão correlacionadas com a fertilidade *in vivo*. Assim, é fundamental a identificação de métodos que possam auxiliar na seleção mais precisa dos futuros reprodutores. Os objetivos do primeiro trabalho foram avaliar as acurácias e o viés das predições genômicas, utilizando diferentes métodos, para a característica perímetro escrotal ajustado à idade e ajustado à idade e peso em touros das raças Hereford e Braford. Os valores estimados para a herdabilidade apresentaram magnitude moderada a alta (0,39 a 0,48), demonstrando que é possível a obtenção de ganhos genéticos a partir da seleção. A predição de valores genéticos utilizando informações genômicas pelos métodos índice de seleção e *single-step* possibilitou o aumento de acurácia (em torno de 30%) para as características estudadas. Os ganhos de acurácia obtidos com os métodos, combinando as informações tradicionais com a genômica em relação ao método BLUP tradicional indicam que as predições genômicas podem ser usadas como ferramenta para melhorar os ganhos genéticos e reduzir o intervalo de gerações. Já o segundo artigo teve como objetivos: determinar a expressão de RNAm das paraoxonases (PON) 1, 2 e 3 no parênquima testicular, vesículas seminais e epidídimo de touros, avaliar a atividade de PON1 na circulação sanguínea e no plasma seminal; e correlacionar esta atividade com características avaliadas durante o exame andrológico. A caracterização da expressão dos genes foi realizada por qRT-PCR e a determinação da atividade de PON1 foi realizada em amostras de soro e plasma seminal provenientes de 110 touros. As PON 1, 2 e 3 foram expressas no parênquima testicular dos animais analisados. Observou-se uma correlação positiva entre a atividade sérica e seminal de PON1 com diversos indicadores de fertilidade.

**Palavras-chave:** exame andrológico; fertilidade; paraoxonase; perímetro escrotal; seleção genômica

## Abstract

FERREIRA, Carlos Eduardo Ranquetat. **Markers associated with the reproductive characteristics of bulls.** 2017. 81f. Thesis (Doctor degree in Sciences) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Male fertility is important to optimize pregnancy rates and genetic improvement. Breeding soundness evaluations are key tools to identify sub fertile males and to survey characteristics of sperm quality. However, few sperm quality traits are correlated with fertility *in vivo*. Thus, it is essential to identify methods that can assist in more precise selection of future bulls. The goals of the first study were to evaluate the accuracy and the bias of the genomic predictions, using different methods, for the characteristic scrotal perimeter adjusted to age and adjusted to age and weight in Hereford and Braford bulls. The estimates for the heritability showed moderate to high magnitude (0.39 to 0.48), demonstrating that it is possible to obtain genetic gains from selection. The prediction of genetic values using genomic information by methods of selection index and single-step made possible the increase of accuracy (around 30%) for the characteristics studied. The gains in accuracy obtained with the methods, combining the traditional with the genomic information compared to traditional BLUP method indicate that the genomic predictions can be used as a tool to improve the genetic gains and reduce the range of generations. The second article had as its objectives: to determine the mRNA expression of paraoxonases (PON) 1, 2 and 3 in the testicular parenchyma, seminal vesicles, and epididymis of bulls, to evaluate the activity of PON1 in the bloodstream and in seminal plasma; and to correlate that activity with characteristics of breeding soundness. Characterization of gene expression by qRT-PCR and the determination of PON1 activity were performed in serum and seminal plasma from bulls 110. The PON 1, 2 and 3 were expressed in testicular parenchyma of the animals examined. There was a positive correlation between activity and serum PON1 seminal with different breeding soundness estimators.

**Keywords:** breeding soundness evaluations; fertility; genomic selection; paraoxonase; scrotal perimeter

## Lista de Figuras

### Artigo 1

- Figura 1 Acurácia dos valores genômicos diretos (DGV) predito para a característica perímetro escrotal ajustado a idade a partir da validação cruzada utilizando agrupamento k-médias e diferentes métodos..... 40
- Figura 2 Acurácia dos valores genômicos diretos (DGV) predito para a característica perímetro escrotal ajustado a idade e peso a partir da validação cruzada utilizando agrupamento k-médias e diferentes métodos..... 41
- Figura 3 Acurácia dos valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV), para perímetro escrotal ajustado à idade, preditos a partir da validação cruzada usando agrupamento k-médias utilizando diferentes métodos..... 44
- Figura 4 Acurácia dos valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV), para perímetro escrotal ajustado à idade e peso, preditos a partir da validação cruzada usando agrupamento k-médias utilizando diferentes métodos..... 44

### Artigo 2

- Figura 1 Correlation between the activity of the Paraoxanase 1 (PON1) enzyme in the seminal plasma and sperm motility of bulls..... 68

## Lista de Tabelas

### Artigo 1

Tabela 1	Estrutura dos dados para avaliação de perímetro escrotal (PE) em touros das raças Hereford e Braford.....	29
Tabela 2	Médias a posteriori das variâncias genética aditiva direta ( $\sigma_a^2$ ), variância residual ( $\sigma_e^2$ ) e herdabilidade direta ( $h_a^2$ ).....	35
Tabela 3	Número de animais (N), proporção de zebu, coeficiente de endogamia e parentesco genômico no grupo e entre os grupos (Gij) para agrupamento k-médias, para o perímetro escrotal (PE) avaliada ao desmame.....	36
Tabela 4	Correlações genéticas do fenótipo ajustado com o valor genômico direto (DGV) predito da validação cruzada ( $rg_{aa}$ ) e coeficientes de regressão ( $\beta$ ) para perímetro escrotal (PE), usando diferentes métodos.....	37
Tabela 5	Correlações genéticas do fenótipo ajustado com o valor genético aprimorado pela genômica (GEBV) predito da validação cruzada ( $rg_{aa}$ ) e coeficientes de regressão ( $\beta$ ) usando diferentes métodos para perímetro escrotal (PE) medido ao sobreano.....	43
Tabela 6	Ganhos em acurácia (%) das metodologias de estimação de efeitos de marcadores em relação ao método tradicional BLUP para perímetro escrotal (PE).....	45
Tabela 7	Ganhos em acurácia (%) das metodologias de aprimoramento genômico em relação ao método tradicional BLUP para o perímetro escrotal (PE) medido ao sobreano.....	46

## Artigo 2

Tabela 1	Initiators use for gene expression analyses.....	69
Tabela 2	Descriptive statistics for parameters of breeding soundness evaluation for bulls.....	70
Tabela 3	Correlations among the activity of the Paraoxanase 1 (PON-1) enzyme and parameters of breeding soundness evaluation for bulls.....	71

## Lista de Abreviaturas e Siglas

BLUP	Melhor preditor linear não viesado
DEBV	Valores genéticos desregredidos
DGV	Valor genômico direto
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EA	Exame andrológico
EBV	Valor genético aditivo
GEBV	Valor genético aprimorado pela genômica
IA	Inseminação artificial
MN	Monta natural
PE	Perímetro escrotal
PEi	Perímetro escrotal ajustado a idade
PEip	Perímetro escrotal ajustado a idade e peso
PON	Paraoxonase
QTL	Loco de característica quantitativa
SG	Seleção genômica
SNP	Polimorfismo de um único nucleotídeo

## Sumário

<b>1 Introdução.....</b>	<b>12</b>
<b>2 Revisão da Literatura.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1 Exame andrológico em touros.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2 Componentes do EA e sua correlação com fertilidade <i>in vivo</i>.....</b>	<b>16</b>
<b>2.3 Melhoramento genético e seleção genômica de bovinos.....</b>	<b>20</b>
<b>2.4 Proteínas e marcadores de fertilidade.....</b>	<b>22</b>
<b>2.5 Paraoxonases.....</b>	<b>22</b>
<b>3 Artigos.....</b>	<b>25</b>
<b>3.1 Artigo 1.....</b>	<b>25</b>
<b>3.2 Artigo 2.....</b>	<b>55</b>
<b>4 Considerações Finais.....</b>	<b>72</b>
<b>Referências.....</b>	<b>73</b>
<b>Anexo.....</b>	<b>80</b>

## 1 Introdução

O Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo composto por aproximadamente 215 milhões de cabeças (IBGE, 2015). Esses volumes demonstram a importância desta espécie para o agronegócio do país.

Conforme a Associação Brasileira de Inseminação Artificial (ASBIA), no ano de 2014, o total de fêmeas bovinas aptas à reprodução era de 56 milhões de cabeças. No mesmo período, foram comercializadas 12 milhões de doses de sêmen bovino (59% corte e 41% leite). Observa-se que a inseminação artificial (IA) foi empregada em 11,9% das matrizes. O restante do rebanho de vacas é acasalado através do sistema de monta natural, por mais de três milhões de touros, considerando uma relação de um touro para 25 vacas (MENEGASSI et al., 2012). Conforme as informações expostas, a gestão da fertilidade dos reprodutores é de suma importância para a maximização das taxas de prenhez (CHENOWETH e BALL, 1980; PARKINSON, 2004) e melhoramento genético (FORTES et al., 2013).

O EA em touros é realizado por médicos veterinários com o objetivo de identificar indivíduos aptos a produzir bezerros em sistema de MN, (CBRA, 2013) além de identificar animais sub férteis (PALMER, 2016). O andrológico tem por objetivo a avaliação dos fatores que contribuem para a função reprodutiva do touro, consistindo basicamente no exame clínico geral; exame do sistema genital interno e externo; medição da circunferência escrotal; avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen e avaliação do comportamento sexual (MENEGASSI et al., 2012; PARKINSON, 2004). Cabe ressaltar, que apesar do EA se apresentar como única ferramenta disponível para estimar a fertilidade, poucas de suas características estão correlacionadas com a fertilidade *in vivo*. Denota-se a necessidade pela busca de marcadores capazes de esclarecer os eventos associados à fertilidade e que possam ser utilizados para auxiliar na seleção dos reprodutores (THUNDATHIL et al., 2016).

Durante a realização do EA, uma importante variável avaliada é o PE. A característica é medida com o auxílio de fita métrica na região do maior diâmetro dos testículos sendo de fácil execução e de alta repetibilidade ( $r > 0,90$ ) (KASTELIC, 2014).

O PE apresenta correlações fenotípicas e genéticas com características qualiquantitativas de machos e fêmeas como: maior percentual de espermatozoides normais, motilidade e concentração espermática (FOOTE, 2003; WALDNER et al, 2010), maior produção de bezerros (VAN MELIS et al., 2010), antecipação da puberdade e machos e fêmeas (PARKINSON, 2004; CORBET et al., 2013) e características de crescimento (KEALEY et al., 2006). Devido à facilidade de avaliação, herdabilidade e correlações com características econômicas de interesse, esta medida, é utilizada como critério de seleção em programas de melhoramento genético (BOLIGON et al., 2010).

Tradicionalmente, nos programas de melhoramento genético de bovinos, a seleção de características de importância econômica, como o PE, depende da coleta de fenótipos e de informações do *pedigree* para a predição dos valores genéticos (EBV) (SAATCHI et al., 2011). Nos últimos anos, principalmente após o sequenciamento completo do genoma bovino, os programas de avaliação genética passaram a contar com informações disponíveis no genótipo dos animais (ELSIK et al., 2009).

Com base nas informações fornecidas pelos marcadores moleculares, foi proposta a SG que utiliza marcadores do tipo SNP. Estes marcadores estão densamente distribuídos por todo genoma com o objetivo de estimar os efeitos de todos os *loci* e prever os valores genéticos genômicos para os fenótipos de interesse (MEUWISSEN et al., 2001). Desta forma, a SG combina dados genotípicos, fenotípicos, e de *pedigree* para predizer os EBV. Esta metodologia tem possibilitado ganhos em acurácia, redução do intervalo de gerações e dos custos com testes de progênie (SCHAEFFER, 2006; VANRADEN et al. 2009; HAYES et al., 2013).

Além da importância da avaliação andrológica e dos programas de melhoramento animal, diversos estudos têm avaliado proteínas presentes no plasma seminal e membrana dos espermatozoides, com o intuito de identificar possíveis marcadores associados à fertilidade (BYRNE et al., 2012; REGO et al., 2014).

As PON são enzimas antioxidantes que degradam os peróxidos lipídicos (BARRANCO et al., 2015a). A família de genes PON é formada por três diferentes membros (PON1, PON2 e PON3) que apresentam propriedades antioxidantes (PRÉCOURT et al., 2011). A PON1 é uma lipoproteína de fase aguda negativa produzida especialmente pelo fígado e liberada na corrente sanguínea (BIONAZ et al., 2007). Após a síntese, algumas moléculas desta proteína ficam nos hepatócitos e outras são liberadas na circulação, onde por associação com apolipoproteína (A1) se ligam à lipoproteína de alta densidade (HDL) (MACKNESS et al., 1998). Desta forma, atua prevenindo modificações oxidativas em lipoproteínas de baixa densidade (LDL) (VERIT et al., 2009).

Recentemente, a PON foi alvo de estudos associados à fertilidade masculina, sendo detectada nos espermatozoides e no plasma seminal de humanos e suínos (VERIT et al., 2009; MARSILLACH et al., 2011; LAZAROS et al., 2011; BARRANCO et al., 2015a). A PON1 demonstrou efeito protetivo contra o estresse oxidativo, sendo associada com a fertilidade *in vivo* de amostras de sêmen (BARRANCO et al., 2015b).

Até o presente momento, não foram relatados estudos avaliando a expressão das PON, bem como correlações com características de fertilidade em bovinos.

Com base nas informações expostas e considerando o impacto da gestão dos reprodutores na cadeia de bovinocultura, se elaborou o presente trabalho, que tem por objetivos:

- Avaliar a acurácia e o viés das predições genômicas para a característica PE em touros das raças Hereford e Braford;
- Determinar a expressão de RNAm de PON1, 2 e 3 no parênquima testicular, nas vesículas seminais e no epidídimo de touros, avaliar a atividade de PON1 na circulação sanguínea e no plasma seminal e sua correlação com indicadores de fertilidade avaliados durante o exame andrológico.

## **2 Revisão da Literatura**

### **2.1 Exame andrológico em touros**

O andrológico tem por objetivo a avaliação dos fatores que contribuem para a função reprodutiva do touro, consistindo basicamente no exame clínico geral; exame do sistema genital interno e externo; medição da circunferência escrotal; avaliação dos aspectos físicos e morfológicos do sêmen e avaliação do comportamento sexual (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008; MENEGASSI et al., 2012; PARKINSON, 2004). A fertilidade dos animais é composta por diversas etapas, exigindo que machos e fêmeas sejam capazes de realizar todas as fases críticas a cada ciclo reprodutivo. Portanto, os reprodutores devem produzir e ejacular certa concentração de espermatozoides normais e férteis (FOOTE, 2003). Cabe ressaltar que a fertilidade inerente a cada indivíduo contribui para as taxas de reprodução do rebanho (CORBET et al., 2013). Desta forma, a avaliação andrológica dos reprodutores nos períodos que antecedem a estação de monta e comercialização é indispensável para a seleção dos animais (HANCOCK et al., 2016).

O EA é realizado por médicos veterinários com o objetivo de identificar indivíduos aptos a produzir bezerros em sistema de monta natural e doadores de sêmen em centrais (CBRA, 2013; KASTELIC e THUNDATHIL, 2008) e identificar indivíduos sub férteis (PALMER 2016). A conduta adequada durante cada etapa do exame permite que médicos veterinários, compradores de touros, proprietários e gestores possam tomar as decisões mais adequadas sobre cada indivíduo avaliado (FORDYCE et al., 2006).

Atualmente, o EA se apresenta como a única ferramenta capaz de estimar a fertilidade dos reprodutores mantidos a campo. O EA é constituído por diferentes etapas, incluindo o exame físico, clínico, avaliações da circunferência escrotal, da qualidade seminal, da libido e de capacidade de acasalamento (WALDNER et al., 2010). O EA segue uma sequência lógica, sendo que os parâmetros desejáveis em cada etapa são definidos por colegiados formados por médicos veterinários e especialistas em reprodução animal (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008). Nos

Estados Unidos estes parâmetros são definidos pela *American Society for Theriogenology* ([www.therio.org](http://www.therio.org)) e no Brasil pelo Colégio Brasileiro de Reprodução Animal (CBRA, 2013).

Considerando a complexidade dos eventos que envolvem a fertilização, nenhum critério ou medição isolado é capaz de predizer com acurácia a fertilidade dos indivíduos, sendo necessário avaliar várias características em conjunto (KASTELIC e THUNDATHIL, 2008; OLIVEIRA et al., 2012). Entre as características avaliadas durante o EA, as que apresentam maior correlação com a fertilidade *in vivo* são o PE e os parâmetros de motilidade e morfologia espermática (PARKINSON, 2004; FORDYCE et al., 2014).

## **2.2 Componentes do EA e sua correlação com fertilidade *in vivo***

### **2.2.1 Avaliação do perímetro escrotal (PE)**

O PE é medido com o auxílio de uma fita métrica na altura do maior diâmetro dos testículos. É uma técnica não invasiva, rápida, de fácil execução e alta repetibilidade ( $r > 0,90$ ), com herdabilidade de moderada a alta (KASTELIC, 2014).

O PE é um componente crucial do EA (MCGOWAN et al., 2002) pois animais com maior PE apresentam correlações fenotípicas e genéticas com características reprodutivas em machos e fêmeas: maior concentração espermática, motilidade e percentual de espermatozoides normais (FOOTE, 2003); maior produção de bezerros em rebanhos *Bos indicus* (VAN MELIS et al., 2010); e puberdade mais precoce em machos e fêmeas (PARKINSON, 2004; CORBET et al., 2013). Esta medida é utilizada como critério de seleção em programas de melhoramento genético, buscando indivíduos com maior PE (BOLIGON et al., 2010).

Coe e Gibson (1993) avaliaram 264 touros de 13 raças, para verificar se o PE ajustado aos 200 dias de idade poderia predizer o PE aos 365 dias de idade. Os autores observaram que bezerros com PE > 23 cm (aos 200 dias) tinham uma probabilidade de 95% de apresentar PE > 34 cm aos 365 dias de idade. Ao passo que animais com PE < 23 cm (aos 200 dias) tinham apenas 54% de probabilidade de alcançar PE > 34 cm aos 365 dias. O estudo destaca que a avaliação aos 200 dias pode auxiliar na seleção dos reprodutores com PE desejável aos 365 dias de idade.

O PE é considerado bom indicador da produção diária de espermatozoides, especialmente em touros jovens, nos quais a produção diária é bastante constante entre 9 a 12 x 10<sup>6</sup> espermatozoides por grama de testículo (FORDYCE et al., 2014). O tamanho dos testículos está altamente associado com a produção diária de espermatozoides e com a puberdade dos machos, sendo recomendado que touros em atividade reprodutiva apresentem PE de no mínimo 30 cm (PARKINSON, 2004).

O PE apresenta relação com a morfologia espermática (WALDNER et al., 2010). Neste estudo, os autores observaram que a percentagem de espermatozoides morfologicamente normais foi menor em touros com PE ≤ 34 cm quando comparados com touros que apresentavam >34 cm. Os touros com PE < 34 cm foram considerados pré-púberes, pois não produziram espermatozoides maduros.

Corbet et al. (2013) avaliaram características de produção e reprodução de touros jovens totalizando 1639 animais da raça Brahman e 2424 animais composto tropical. Aos 18 meses de idade, para a raça Brahman foram estimadas herdabilidades de 0,75, 0,24, 0,15 e 0,25 para PE, turbilhonamento, motilidade progressiva e total de espermatozoides normais, respectivamente, enquanto que para animais composto tropical foram obtidas herdabilidades de 0,43, 0,13, 0,15 e 0,20, para as mesmas características.

### **2.2.2 Motilidade espermática**

A motilidade espermática (Mot) é uma medida indireta da qualidade seminal, importante para a avaliação da qualidade do sêmen em diferentes espécies animais (CHENOWETH e BALL, 1980). A estimativa visual do percentual de espermatozoides móveis em uma amostra de sêmen é provavelmente o ensaio mais realizado em nível de campo (NÖTHLING e Santos, 2012). O exame é realizado através da observação subjetiva do movimento espermático, em uma gota de sêmen entre lâmina e lamínula aquecidas a 37°C, por microscopia óptica, com aumento de 200 ou 400x (KASTELIC e THUNDATHIL 2008; CBRA, 2013).

A partir de diversos estudos, existe consenso de que touros utilizados em regime de monta natural devem apresentar Mot progressiva de no mínimo 30% (PARKINSON, 2004). Esta variável apresenta correlações positivas com a fertilidade *in vivo* de touros (GILLAN et al., 2008) e com a taxa de concepção em vacas (OLIVEIRA et al., 2013).

Gillan et al. (2008) avaliaram a performance *in vitro* do sêmen congelado de touros e sua correlação com a fertilidade *in vivo*. O conjunto de correlações de várias avaliações espermáticas *in vitro* (Mot, concentração, morfologia normal, integridade do acrossoma e da cromatina e migração no muco cervical) explicou dois terços da variação da fertilidade *in vivo* nos indivíduos avaliados. Análise de regressão *stepwise* identificou testes que, quando combinados, produziram modelos com uma forte correlação ( $R^2 > 0,9$ ) com a fertilidade *in vivo* (GILLAN et al., 2008).

Oliveira et al. (2013) utilizaram um modelo de regressão para estimar as associações de características seminais *in vitro* com a taxa de concepção. Foram avaliadas 191 vacas Nelore, submetidas a IA em tempo fixo com doses de sêmen provenientes de três touros. Os preditores mais importantes da taxa de concepção foram a Mot total e progressiva, avaliadas pelo sistema Computer-assisted sperm analysis (CASA), além da função da membrana plasmática, avaliada pelo teste hiposmótico, e da integridade da membrana e do acrossoma.

### **2.2.3 Morfologia espermática**

A avaliação da morfologia espermática é realizada a partir do preparo de uma câmara úmida utilizando uma alíquota de 10  $\mu$ l de sêmen fixado (corado ou não) colocada entre lâmina e lamínula. São avaliados 200 espermatozoides ao microscópio de contraste de fase ou óptico (1000 x), determinando a proporção de células normais e com defeito (BARTH e OKO, 1989). Outra forma de avaliação da morfologia espermática, consta da utilização de esfregaços em lâmina associados (eosina-nigrosina), posteriormente avaliadas em microscópio óptico em aumento de 1000x (CBRA 2013).

A avaliação da morfologia espermática é de grande importância fornecendo uma indicação da normalidade da função testicular e do epidídimo. Fatores hereditários ou ambientais durante a espermatogênese e a maturação dos espermatozoides se refletem na produção de espermatozoides morfologicamente anormais (ATTIA et al., 2016).

A morfologia espermática pode ser classificada quanto a região do espermatozoide onde ocorrem as alterações (cabeça, peça intermediária, cauda) (BARTH e OKO 1989). O total de espermatozoides normais apresenta correlação positiva com a produção de bezerros (HOLROYD et al., 2002; FITZPATRICK et al.,

2002), sendo que a sua redução está associada a redução da fertilidade (AL-MAKHZOOMI et al., 2008).

Utilizando um modelo de regressão em 138 touros das raças Santa Gertrudis e Brahman, o total de espermatozoides normais apresentou uma correlação positiva com o total de bezerros nascidos (HOLROYD et al. 2002).

Em estudo realizado por Fitzpatrick et al. (2002) foram avaliadas as correlações entre as análises seminais e fertilidade. Foram utilizados 363 touros distribuídos em 12 propriedades e acasalados em uma proporção entre 2,5 a 6,0%, sendo a paternidade dos bezerros avaliada através de microssatélites. O percentual de células espermáticas normais foi correlacionado ao total de bezerros/touro. Os touros com < 50% de espermatozoides normais apresentaram as menores taxas de paternidade, enquanto touros com as maiores taxas de paternidade apresentavam > 70% de espermatozoides normais.

Al-Makhzoomi et al. (2008) realizaram um estudo retrospectivo para determinar se a morfologia espermática de touros utilizados em teste de progênie era correlacionada a fertilidade após a IA. Os resultados do estudo indicam que defeitos de cabeça (espermatozoides delgados na base ou piriformes), quando superiores a 10%, estão correlacionados a menor fertilidade.

Nagy et al. (2013), avaliando 46 touros utilizados em 256.000 IA durante oito anos, observaram que a percentagem de espermatozoides normais apresentou uma correlação significativa com a fertilidade *in vivo* avaliada à partir de taxas de não retorno ao estro e taxa de prenhez. Estudo recente (ATTIA et al., 2016), demonstrou efeito da morfologia espermática normal sobre a taxa de parição, indicando que quanto maior a proporção de espermatozoides normais, maiores eram as taxas de parição. Um aumento de 10% na proporção de espermatozoides normais resultou em um aumento de 0,73 unidades na taxa de prenhez.

Ainda que o EA seja considerado o único método capaz de estimar a fertilidade dos touros, sua utilização permite identificar apenas animais com baixa fertilidade, sendo estimado que 20 a 40% dos reprodutores utilizados apresentam fertilidade reduzida ou são inférteis (KASTELIC; THUNDATHIL 2008). Desta forma, é necessária a identificação de métodos complementares que possam auxiliar na seleção mais precisa dos futuros touros (FORTES et al., 2012).

### 2.3 Melhoramento genético e seleção genômica de bovinos

O melhoramento genético tem como um dos objetivos a seleção de reprodutores com melhores méritos genéticos, que serão utilizados como pais da próxima geração. Tradicionalmente, a seleção de características de importância econômica depende da acumulação e análise fenotípica e de informações do *pedigree* para prever os EBV (SAATCHI et al., 2011).

Programas de melhoramento genéticos convencionais tendem a prorrogar as avaliações das medidas fenotípicas dos candidatos à seleção para incluir características de interesse, ou então, atrasar as decisões de seleção além da puberdade quando o desempenho fenotípico pode ser observado na progênie ou em outros parentes (GARRICK, 2011). Estender o intervalo de gerações para aumentar a acurácia de seleção reduz as taxas de ganho anuais, quando comparado, à disponibilidade de animais jovens com EBV associados a maiores acurácias que possibilitaria seu uso como pais da próxima geração no momento imediato de atingirem a idade de reprodução (GARRICK, 2011).

Programas de melhoramento de bovinos de corte têm dificuldades para alcançar a melhoria equilibrada de todas as características de interesse. A causa deste problema é que o modelo misto utilizado para as predições de mérito genético utilizam a matriz de parentesco e, quando aplicada para animais jovens com dados históricos suficientes é capaz de prever os efeitos dos pais. Entretanto é incapaz de prever os efeitos de amostragem mendeliana quando observações fenotípicas sobre o indivíduo ou seus descendentes não estão disponíveis (VANRADEN; WIGGANS 1991).

Nos últimos anos, os programas de melhoramento genético bovino passaram a utilizar informações contidas no genótipo dos animais, principalmente após o sequenciamento completo do genoma bovino (ELSIK et al., 2009). O sequenciamento possibilitou o desenvolvimento de chips de DNA contendo milhares marcadores moleculares do tipo SNP que permitem a genotipagem dos animais em larga escala (MATUKUMALLI et al., 2009).

Com base nas informações fornecidas pelos marcadores moleculares, foi proposta a SG que utiliza painéis de marcadores SNP densamente distribuídos por todo genoma para estimar os efeitos de todos os *loci* e prever os valores genéticos genômicos dos animais (MEUWISSEN et al. 2001). Desta forma, a SG combina

dados genotípicos, fenotípicos, e de *pedigree* para estimar os valores genéticos (VANRADEN et al. 2009). Os marcadores de DNA distribuídos em todo o genoma se encontram em desequilíbrio de ligação com as mutações causais podendo ser utilizados para capturar o efeito de todos estes *loci* (MEUWISSEN et al., 2001). A SG visa reduzir erros de predição de EBV dos candidatos em idade de reprodução, explorando as informações sobre a transmissão de fragmentos do cromossomo de pais dos candidatos à seleção em conjunto com o conhecimento sobre o valor de cada fragmento de cromossomo (GARRICK, 2011).

A SG pode ser explicada como um processo contendo duas etapas: a primeira etapa consiste na estimativa dos efeitos dos marcadores em uma população de animais (população de treinamento) que possuem informação de genotipagem e fenótipos coletados. Na segunda etapa são estimados os efeitos dos marcadores que serão utilizados na predição genômica de outros animais (população de predição) que pertençam à mesma população, tal que o desequilíbrio de ligação entre marcadores e QTL persista da população de treinamento para a população de predição.

A soma dos efeitos estimados de todos os marcadores vai compor o DGV (MONTALDO et al., 2014). A acurácia da predição do DGV está relacionada: a) ao nível de desequilíbrio de ligação entre os marcadores e os QTL; b) ao número de animais na população de treinamento que serão utilizados para estimação dos efeitos dos marcadores; c) a herdabilidade da característica e d) a distribuição dos efeitos dos QTL (HAYES et al., 2009).

Seja qual for a espécie doméstica, o ganho genético anual depende de quatro parâmetros: variabilidade genética da característica, intensidade de seleção, acurácia das predições dos EBV e intervalo de geração. Os três últimos podem ser modificados através da SG (BOICHARD et al., 2016). Com a abordagem da SG ampla, os ganhos genéticos são obtidos devido a maior acurácia de seleção e a redução do intervalo de gerações (GODDARD & HAYES, 2007). Na SG, a partir da utilização de marcadores moleculares são gerados os valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV) sendo reportados aumentos de acurácia entre 20 a 50% em relação aos métodos tradicionais (VANRADEN et al. 2009). Além do ganho em acurácia, a SG pode contribuir com a redução do intervalo de geração, pois decisões de seleção podem ser feitas antes que os candidatos à seleção tenham seu fenótipo avaliado (HAYES et al., 2013). O uso dos SNP possibilita

predições genéticas mais acuradas e mais cedo na vida dos animais permitindo economia substancial na condução de testes de progênie (SCHAEFFER, 2006; HAYES et al., 2009).

Desta forma, métodos que combinam informações tradicionais com a genômica indicam que as predições genômicas podem ser usadas como ferramenta para melhorar o ganho genético e reduzir o intervalo de gerações.

## **2.4 Proteínas e marcadores de fertilidade**

Os mecanismos moleculares que determinam o potencial fertilizante de uma amostra de sêmen ainda não estão completamente esclarecidos. Assim, o entendimento sobre estes eventos se torna essencial para a obtenção da eficiência reprodutiva (THUNDATHIL et al., 2016). Desta forma, estudos sobre proteínas que compõem o plasma seminal têm contribuído para a compreensão dos eventos associados com a fertilidade dos indivíduos (PEDDINTI et al., 2008).

O plasma seminal é uma mistura complexa de secreções produzidas nos testículos, epidídimos e glândulas acessórias, que fornece suporte aos espermatozoides durante os processos de ejaculação, migração no trato reprodutivo feminino e fertilização (REGO et al., 2014). As proteínas do plasma seminal modulam funções e processos vitais para a atividade reprodutiva, como motilidade e capacitação espermática, proteção celular, reação acrossômica e fertilização.

As relações entre índices de fertilidade e proteínas seminais em determinadas espécies indicam que estas proteínas têm o potencial de serem identificadas como marcadores da capacidade reprodutiva do macho (MOURA et al., 2011).

## **2.5 Paraoxonases**

A família de genes PON é composta por três membros (PON1, PON2 e PON3). O membro mais estudado é a PON1, uma lipoproteína de alta densidade com atividade esterase/lactonase, com capacidade de hidrolisar compostos organofosforados, porém as três proteínas podem evitar o estresse oxidativo e combater processos inflamatórios (PRÉCOURT et al., 2011).

PON1 é uma esterase de cálcio-dependente que foi descrita pela primeira vez por sua capacidade de hidrolisar organofosforados e pesticidas, incluindo o paraoxon (que inspirou o nome das três enzimas). A PON1 é uma glicoproteína de 43-45 kDa, expressa em uma variedade de tecidos (MARSILLACH et al., 2008). A PON2 e 3 são semelhantes a PON1 em termos de expressão, função e localização (NG et al., 2001; MARSILLACH et al., 2008).

A expressão de proteínas da PON1, 2 e 3 foi observada em diversos tecidos de ratos como: epitélios da pele, língua, estômago, intestino, traqueia, bronquíolos, retina, glândulas sebáceas, hepatócitos, pâncreas, encéfalo, medula espinhal, músculo esquelético e cardíaco, adipócitos, fluido folicular, túbulos seminíferos, espermatozoides e túbulo renal (MARSILLACH et al., 2008). Neste mesmo trabalho, os autores observaram maior imunomarcagem da PON1 e 3 em relação à 2, sendo esta ausente em alguns dos tecidos avaliados. Já a PON2 foi detectada em diversos tecidos humanos, com maior expressão no fígado, pulmão, placenta, testículos e coração (NG et al., 2001).

De modo geral, a PON1 tem sido relacionada com a hidrólise de organofosforados e a redução dos valores séricos associada com a patogênese de uma série de distúrbios incluindo arteriosclerose, desordens cardiovasculares, diferentes tipos de câncer, síndromes metabólicas e neurológicas (GOSWAMI et al., 2009; PRÉCOURT et al., 2011). Nos últimos anos, além das associações com a patogênese de diversas doenças, a PON1 vem sendo alvo de diversos estudos associados à fertilidade masculina, sendo detectada nos espermatozoides e plasma seminal de humanos e suínos (VERIT et al., 2009; MARSILLACH et al., 2011; LAZAROS et al., 2011; BARRANCO et al., 2015a).

A PON1 parece desempenhar funções no sistema reprodutivo masculino, uma vez que, foi localizada por imonohistoquímica nas espermatogônias, espermátocitos, espermátides, células de Sertoli e Leydig de ratos e humanos (MARSILLACH et al. 2008; MARSILLACH et al. 2011). Além disso, foi verificada baixa atividade de PON1 no plasma seminal de homens subférteis ou inférteis (VERIT et al., 2009; LAZAROS et al., 2011; TAVILANI et al., 2014).

Em estudo conduzido por Verit et al., (2009) foi avaliada a atividade de PON1 e as correlações da PON1 com parâmetros seminais de homens normais e subférteis. Os autores observaram que o nível antioxidante total e o nível de estresse oxidativo foram significativamente mais elevados e que a atividade de

PON1 e o *status* antioxidante seminal foram significativamente menores em homens subférteis. Além disso, a atividade de PON1 apresentou forte correlação com a concentração, motilidade e morfologia espermática. Assim, o estudo sugere que a PON1 pode desempenhar uma importante fonte de estudos quanto à patogênese da subfertilidade.

Na espécie suína, Barranco et al., (2015a) caracterizaram a presença de PON1 e PON2 no sêmen e células espermáticas de suínos e sua correlação com parâmetros seminais. A atividade de PON1 no plasma seminal foi negativamente correlacionada com o volume ejaculado e positivamente correlacionado com a concentração espermática. Além disto, os autores detectaram, pela primeira vez na espécie suína, a presença de PON2 na cabeça e cauda de espermatozoides com membrana intacta.

Barranco et al., (2015b) avaliaram a variabilidade na atividade de PON-1 no plasma seminal de diferentes reprodutores suínos e nas diferentes frações do ejaculado. A atividade plasmática de PON1 foi correlacionada com parâmetros espermáticos de qualidade e funcionalidade e com a fertilidade *in vivo* dos ejaculados. Os autores observaram variações na atividade plasmática de PON1 entre os reprodutores e maior atividade na porção rica em espermatozoides. A atividade foi positivamente correlacionada com a motilidade espermática e negativamente associada com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS). Além disso, as maiores taxas de atividade de PON1 foram observadas em reprodutores que geraram as maiores taxas de parição.

Na espécie bovina, Dedeoglu et al (2014) realizaram o isolamento da PON1 do sêmen de touros e avaliaram sua atividade frente a diferentes metais pesados. Os autores concluíram que diversos metais pesados inibem a atividade da PON1 sendo capazes de aumentar o risco do desenvolvimento de estresse oxidativo e reduzir a qualidade seminal. Entretanto, nesta espécie, são escassos os estudos confirmando a presença das paraoxonases nos tecidos reprodutivos assim como a atividade da PON1 e sua associação com características reprodutivas em touros.

Embora a PON1 já tenha sido detectada em amostras de células espermáticas e no plasma seminal de algumas espécies, ainda são escassos os estudos sobre a expressão e atividade das PON nas diferentes porções do trato reprodutivo de bovinos.

### **3 Artigos**

#### **3.1 Artigo 1**

**Acurácia de predição genômica para perímetro escrotal em bovinos Hereford e Braford**

**Ferreira, C.E.R.; Campos, G.S.; Goularte, K.L.; Corcini, C.D.; Lucia, T. Jr.;  
Cardoso, F.F.**

**Será submetido à revista Science and Animal Health**

## ACURÁCIA DE PREDIÇÃO GENÔMICA PARA PERÍMETRO ESCROTAL EM BOVINOS HEREFORD E BRAFORD

### RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar as acurácias e o viés das predições genômicas, utilizando diferentes métodos, para a característica perímetro escrotal em bovinos das raças Hereford e Braford. Foram utilizados dados fenotípicos de 18.172 animais pertencentes ao programa de melhoramento Conexão Delta G, e um conjunto de 3.545 animais genotipados com o chip de 50K e 131 touros pais com o de 777K. Os fenótipos foram ajustados por modelo animal para estimação dos componentes de (co) variâncias, parâmetros genéticos e prever os valores genéticos. Posteriormente, estes valores foram usados para calcular os valores genéticos desregredidos (DEBV). Os animais genotipados foram divididos em quatro grupos por duas estratégias de validação cruzada, K-médias e aleatoriamente. A acurácia foi calculada como a correlação genética entre o fenótipo ajustado e as predições genômicas em uma análise bi-característica. De forma geral, as acurácias dos valores genômicos diretos (DGV) variaram de 0,23 a 0,78, porém os métodos genômicos foram inferiores ao BLUP tradicional. Em relação aos métodos de aprimoramento genômico, que combinam as informações de fenótipos e *pedigree* com o DGV podemos verificar que quase todos os métodos possibilitaram ganhos em acurácia. Os maiores ganhos foram observados nos métodos índice de seleção (IS\_GBLUP e IS\_BayesB) e no método single step (ssGBLUP). O método com o melhor ganho em relação ao BLUP, foi o IS\_GBLUP, para a característica PEI com o agrupamento k-médias, de 68,75%. Os valores de acurácia para os métodos de estimação dos efeitos de marcadores foram menores quando utilizado o agrupamento k-médias, indicando que as predições genômicas diminuem a medida que o parentesco entre os animais no conjunto de treinamento é mais distante. Os ganhos obtidos com os métodos combinando as informações tradicionais com a genômica em relação ao método BLUP tradicional indicam que as predições genômicas podem ser usadas como ferramenta para aumentar a acurácia e, como consequência, melhorar os ganhos genéticos e diminuir o intervalo de geração em relação ao método tradicional.

**Palavras chave:** bovinos de corte; reprodução; seleção genômica; touro.

## INTRODUÇÃO

A avaliação do perímetro escrotal (PE) é uma etapa fundamental do exame andrológico (MCGOWAN et al., 2002). Devido à facilidade de medição, herdabilidade moderada e apresentar correlações favoráveis com várias características de interesse econômico, o PE é utilizado como critério de seleção em programas de melhoramento genético (BOLIGON et al., 2010).

O PE é facilmente aferido com o auxílio de uma fita métrica, na região do maior diâmetro dos testículos, apresentando alta repetibilidade ( $r > 0,90$ ) (KASTELIC, 2014). A herdabilidade do PE varia de 0,36 a 0,71, em touros da raça Hereford (KNIGHTS et al., 1984; EVANS et al., 1999; KEALEY et al., 2006). Várias características reprodutivas quali-quantitativas de machos e fêmeas apresentam correlações fenotípicas e genéticas favoráveis com o PE, como o percentual de espermatozoides normais, motilidade e concentração espermática (FOOTE 2003; WALDNER et al, 2010), produção de bezerros (VAN MELIS et al., 2010), antecipação da puberdade em machos e fêmeas (PARKINSON 2004; CORBET et al., 2013) e características de crescimento (KEALEY et al., 2006). Tradicionalmente, a seleção de características de importância econômica, como o PE, depende da acumulação e da análise fenotípica e de informações do *pedigree* para prever os valores genéticos (EBV) (SAATCHI et al., 2011). Nos últimos anos, os programas de avaliação genética de bovinos passaram a utilizar informações contidas no genótipo dos animais, principalmente após o sequenciamento completo do genoma bovino (ELSIK et al., 2009). O sequenciamento possibilitou o desenvolvimento de chips de DNA contendo milhares de marcadores moleculares do tipo Polimorfismo de um Único Nucleotídeo (SNP) que permitem a genotipagem dos animais em larga escala (MATUKUMALLI et al., 2009). Com base nas informações fornecidas pelos marcadores moleculares, foi proposta a Seleção Genômica (SG) utilizando marcadores SNP densamente distribuídos por todo o genoma, para estimar os efeitos de todos os *loci* e para prever os valores genéticos genômicos para fenótipos de interesse (MEUWISSEN et al. 2001). Desta forma, a SG combina dados genotípicos, fenotípicos e de *pedigree* para prever os valores genéticos (VANRADEN et al. 2009).

Quando utilizados mapas densos, alguns SNP podem estar próximos a Quantitative Trait Loci (QTL) de interesse e em desequilíbrio de ligação com este. Assim, a variância genética pode ser explicada por estes marcadores (GODDARD & HAYES 2007). Na SG, a partir da utilização de marcadores moleculares são gerados os valores genéticos aprimorados pela genômica

(GEBV), sendo reportados aumentos de acurácia entre 20 a 50% em relação aos métodos tradicionais (VANRADEN et al. 2009).

Além do ganho em acurácia, a SG pode contribuir com a redução do intervalo de geração, pois decisões de seleção podem ser feitas antes que os candidatos à seleção tenham seu fenótipo avaliado (HAYES et al., 2013). O uso dos SNP possibilita previsões genéticas mais acuradas e mais precoces na vida dos animais, permitindo uma economia substancial na condução de testes de progênie (SCHAEFFER, 2006; HAYES et al., 2009). O objetivo deste trabalho foi avaliar a acurácia e o viés das previsões genômicas através de diferentes métodos para o PE ajustado para a idade e ajustado para a idade e peso em bovinos das raças Hereford e Braford.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **ARQUIVO DE DADOS FENOTÍPICOS, PEDIGREE E GENOTÍPICOS**

Foram utilizados registros fenotípicos de 18.172 animais das raças Hereford e Braford, nascidos entre os anos de 1991 a 2012. Estes reprodutores fazem parte do programa de melhoramento Conexão Delta G, estando alojados em fazendas localizadas no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O PE foi medido com fita métrica, na região da maior circunferência escrotal, no sobreano (aproximadamente aos 550 dias de idade), sendo ajustado para a idade do animal na mensuração (PEi) e para a idade e peso do animal na mensuração (PEip). Para a avaliação genotípica, 3.545 animais foram genotipados utilizando o *Illumina BovineSNP50 Bead Chip* (50K; Illumina, San Diego, CA) e 131 touros pais foram genotipados com o *Illumina High-Density Bovine Bead Chip Array* (HD; Illumina). O controle de qualidade foi realizado com auxílio do software *R/SNPStats package* (Clayton, 2014). Foram removidas amostras com taxa de genotipagem (*Call Rate* – CR) < 0,90, heterozigocidade com três desvios acima ou abaixo da média observada, com erros de identificação de sexo ou com registros duplicados. Para os SNPs mapeados em autossomos, os critérios adotados para inclusão foram: equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $P > 10^{-7}$ ); CR > 0,98; alelo menos frequente (MAF) > 0,03; correlação entre SNPs > 0,98; e SNPs na mesma posição.

Os dados do chip de alta densidade (HD) foram filtrados para selecionar somente SNPs que também estavam presentes no painel de 50K. Após a edição, um total de 41.045 marcadores SNPs e 3.552 amostras foram utilizadas nas análises. Dados perdidos em genótipos (0,86%

de todos os genótipos) foram imputados usando o software *FImpute* (Sargolzaei et al., 2011).

### ANÁLISES E MODELO ESTATÍSTICO

Os componentes de (co)variâncias e parâmetros genéticos foram estimados usando inferência bayesiana, através de amostragem de Gibbs, utilizando métodos de Monte Carlo via Cadeias de Markov (MCMC), através do programa Gibbs1f90 (Misztal et al., 2002). Foram considerados 800.000 ciclos, com descarte inicial de 200.000 ciclos e intervalo de amostragem de 20. Os componentes de (co)variâncias estimados foram utilizados na predição dos valores genéticos com o uso do software BLUPF90 (Misztal et al., 2002) conforme o modelo estatístico abaixo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{e} \quad [1]$$

em que:  $\mathbf{y}$  é o vetor de observações que representa a característica de interesse (variável dependente);  $\mathbf{b}$  são os efeitos fixos;  $\mathbf{u}$  é o efeito aleatório aditivo do animal (genético);  $\mathbf{e}$  são efeitos não genéticos ou resíduos do modelo (ambiente);  $\mathbf{X}$  e  $\mathbf{Z}$  são matrizes de incidência para os efeitos fixos ( $\mathbf{b}$ ) e aleatórios ( $\mathbf{u}$ ).

Foram considerados efeitos fixos de grupos contemporâneos (GC), formados por mesmo ano, fazenda, estação de nascimento, grupo de manejo, data de avaliação do PE e um total de 15 classes de idade das mães, em que a classe 1 correspondia a vacas com 2 anos de idade e a classe 15 correspondia a vacas com mais de 16 anos de idade. Além disso, foram incluídas, como covariáveis, os efeitos linear e quadrático da idade do animal na mensuração e os efeitos lineares aditivos e maternos da proporção de Nelore na composição racial e da heterozigose individual. Foram eliminados GC com menos de cinco animais e com medidas de 3,5 desvios-padrão acima ou abaixo da média de seu respectivo GC. Na Tabela 1 observa-se a estrutura geral do arquivo de dados.

**Tabela 1.** Estrutura dos dados para avaliação de perímetro escrotal (PE) em touros das raças Hereford e Braford.

Característica	Observações (n)	Média ± DP (cm)	GC*	Touros (n)	Vacas (n)
PE	18.172	30,44 ± 3,75	1.246	1.611	12.912

\* GC- grupos contemporâneos

## PREDIÇÃO GENÔMICA

Foi utilizada a abordagem proposta por Garrick et al. (2009) para calcular os valores genéticos desregredidos (*deregression breeding values* - DEBV) e correspondentes ponderadores ( $\mathbf{w}$ ) =  $\{w_j\}$  para todos os animais, livres do efeito médio dos pais, a partir dos valores genéticos e respectivas confiabilidades. Os DEBVs ponderados foram usados como variáveis respostas para estimar os efeitos dos marcadores SNP através de diferentes métodos. Em todos os casos, o seguinte modelo linear foi ajustado:

$$DEBV_j = \mu + \sum_{k=1}^k M_{jk} g_k + \varepsilon_j \quad [2]$$

em que:  $DEBV_j$  é o DEBV do animal  $j$ ,  $\mu$  é a média geral,  $k = 41.045$  é o total de marcadores SNPs no painel,  $M_{jk}$  é a covariável que representa o genótipo do animal  $j$  no marcador  $k$  pelo número de alelos B na codificação Illumina A / B (ILLUMINA, 2006),  $g_k$  é o efeito aleatório do marcador  $k$  e  $\varepsilon_j$  é o componente residual com distribuição normal e variância heterogênea,  $\varepsilon_j \sim N(0, w_j^{-1} \sigma_\varepsilon^2)$ , em que  $\sigma_\varepsilon^2$  é a variância residual e  $w_j$  é o ponderador como uma função da confiabilidade do  $DEBV_j$  (GARRICK et al., 2009).

Devido ao fato de que o número de marcadores com efeito sobre as características excede o número de observações fenotípicas disponíveis, restrições foram aplicadas no modelo, para tornar estimáveis os efeitos dos marcadores (GIANOLA et al., 2009).

As diferenças nos métodos empregados na SG decorrem de diferentes pressuposições adotadas a respeito das distribuições dos efeitos dos marcadores: 1) SNP\_BLUP (MEUWISSEN et al., 2001): os efeitos dos marcadores são considerados como pertencendo a uma mesma distribuição normal e assumindo-se que todos os marcadores possuem a mesma variância  $\sigma_g^2$ , isto é,  $g_k \sim N(0, \sigma_g^2)$  para todo  $k$ ; 2) BayesB (MEUWISSEN et al., 2001): assume um modelo com distribuições misturadas, em que uma fração dos marcadores tem efeito nulo ( $\pi = 0,95$ ), enquanto que a outra fração de marcadores restante ( $1 - \pi$ ), diferente de zero, são elaboradas a partir de uma distribuição normal,  $g_k \sim N(0, \sigma_{g_k}^2)$  com variância específica  $\sigma_{g_k}^2$ , derivada de uma distribuição qui-quadrado invertida escalonada, isto é,  $\sigma_{g_k}^2 \sim \chi_{(\nu, S^2)}^{-2}$ ); 3) BayesC (HABIER et al., 2011): também é um modelo com distribuições misturadas similar ao BayesB, porém assume variância comum

homogênea para distribuição dos efeitos dos marcadores não nulos ( $1 - \pi$ ), isto é,  $g_k \sim N(0, \sigma_g^2)$ .

Os valores genômicos diretos (DGV) foram obtidos como:

$$DGV_j = \sum_{k=1}^k M_{jk} \hat{g}_k,$$

sendo as estimativas dos efeitos dos SNPs representadas por sua média a posteriori nos métodos bayesianos.

O método SNP\_BLUP foi implementado empregando seu equivalente BLUP genômico (GBLUP) (STRANDEN & GARRICK, 2009) usando os softwares da família BLUPf90 (MISZTAL et al., 2002). Os métodos bayesianos Bayes B e Bayes C foram implementados usando o software Gensel (FERNANDO & GARRICK, 2009). Para os métodos bayesianos, foi utilizado um tamanho de cadeia de 42.000 amostras depois de 2.000 ciclos de burn-in e hiperparâmetros para distribuição dos parâmetros foram especificados com base nos componentes de variância estimados no modelo [1].

#### INCORPORAÇÃO DA INFORMAÇÃO TRADICIONAL COM A GENÔMICA

Foram usadas três abordagens alternativas para combinar o DGV com os dados de pedigree e desempenho para obtenção dos GEBV.

A primeira abordagem foi realizada com base no índice de seleção de VanRaden et al. (2009). O primeiro conjunto do índice são os DGVs, o segundo conjunto foi calculado para um subconjunto dos animais genotipados usando o parentesco tradicional e seu DEBV, excluindo os dados dos animais não genotipados e o terceiro conjunto, é o EBV tradicional obtido a partir do modelo [1]. Esta abordagem permite calcular o GEBV de cada animal como a diferença entre as previsões genômicas e tradicionais adicionados à média dos pais com o seguinte ÍNDICE (VANRADEN et al., 2009):

$$GEBV = b_1 DGV + b_2 SPA + b_3 PA$$

em que,  $\mathbf{b} = [b_1 \ b_2 \ b_3] = \mathbf{c}' \mathbf{V}^{-1}$ , e  $\mathbf{c}'$  é um vetor com as confiabilidades correspondentes aos 3 termos do índice e  $\mathbf{V}$  é um matriz simétrica 3x3 com os elementos de  $\mathbf{c}$  na diagonal e a seguinte função das 3 confiabilidades fora da diagonal:

$$V_{12} = V_{23} = r_{SPA}^2, \text{ e}$$

$$V_{13} = r_{SPA}^2 + (r_{DGV}^2 - r_{SPA}^2)(r_{PA}^2 - r_{SPA}^2)/(1 - r_{SPA}^2).$$

Para todos os animais,  $V_{11}$  ( $r_{DGV}^2$ ) e  $V_{33}$  ( $r_{PA}^2$ ) foram construídas para serem maiores do que  $V_{22}$  ( $r_{SPA}^2$ ) para garantir matrizes positivas definidas (VANRADEN et al., 2009).

Em uma segunda abordagem, o GEBV foi obtido com base em uma análise bi-características entre o fenótipo e o DGV usando o pedigree tradicional (MACNEIL et al., 2010). O mesmo modelo [1] foi usado para os dados fenotípicos, enquanto que para o DGV, o seguinte modelo foi assumido  $DGV = \mu + \alpha_j + \varepsilon_j$ , em que,  $\mu$  é a média geral,  $\alpha_j$  é o efeito genético aditivo do  $j$ -ésimo animal e  $\varepsilon_j$  é o efeito residual. Nesse modelo bivariado assumiu-se para os efeitos genéticos aditivos dos fenótipos (**a**) e para  $\alpha = \{\alpha_j\}$  a seguinte distribuição:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \boldsymbol{\alpha} \end{bmatrix} \sim N \left( \begin{bmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & \mathbf{A}\sigma_{a\alpha} \\ \mathbf{A}\sigma_{a\alpha} & \mathbf{A}\sigma_\alpha^2 \end{bmatrix} \right),$$

em que:  $\sigma_a^2$  é a variância genética aditiva para o DGV e  $\sigma_{a\alpha}$  é a covariância genética entre o DGV e o registro fenotípico. No entanto, assumiu-se para os efeitos residuais aleatórios para o fenótipo (**e**) e para o DGV  $\varepsilon = \{\varepsilon_j\}$  a seguinte distribuição:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{e} \\ \boldsymbol{\varepsilon} \end{bmatrix} \sim N \left( \begin{bmatrix} \mathbf{0} \\ \mathbf{0} \end{bmatrix}, \begin{bmatrix} \mathbf{I}\sigma_e^2 & 0 \\ 0 & \mathbf{I}\sigma_\varepsilon^2 \end{bmatrix} \right),$$

em que: neste modelo bi-característica, há um empréstimo de informações entre o valor genético tradicional e o DGV através da covariância ( $\sigma_{a\alpha}$ ) e ambas as estimativas de  $a_j$  e  $\alpha_j$  são valores candidatos para representar o GEBV do animal  $j$ .

A terceira e última metodologia utilizada foi combinando diretamente as informações fenotípicas, de pedigree e genômicas usando o single step GBLUP (ssGBLUP) (MISZTAL et al., 2009; AGUILAR et al., 2010; CHRISTENSEN & LUND, 2010). Na metodologia ssGBLUP, foi utilizado o mesmo modelo linear [1], porém a matriz de parentesco tradicional (**A**) foi substituída pela matriz **H**, que inclui a informação genômica. Embora **H** seja complexa (LEGARRA et al., 2009), sua inversa tem forma simples (AGUILAR et al., 2010):

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix},$$

em que: **G** é a matriz de parentesco genômica construída como em VanRaden (2008) usando frequências alélicas e **A**<sub>22</sub> é a matriz do numerador do parentesco somente para os animais genotipados. As análises foram realizadas usando o software da família BLUPf90 e o ssGBLUP

foi implementado usando o programa preGSf90, com as opções padrão para ajuste das matrizes  $\mathbf{G}$  e  $\mathbf{A}_{22}$  e tornando  $\mathbf{G}$  positiva definida (AGUILAR & MIZSTAL, 2014).

### VALIDAÇÃO CRUZADA E ACURÁCIA DE PREDIÇÃO

Os animais genotipados para as características estudadas foram divididos em quatro grupos, por duas estratégias de validação cruzada, usando o programa R (R Core Team, 2013): agrupamento em função do parentesco genômico, pelo método K-médias, e de forma aleatória, de acordo com Saatchi et al. (2011) com a finalidade de formar grupos de treinamento e validação independentes. Essas estratégias foram utilizadas para representar dois cenários de seleção genômica, para que os animais tenham parentesco mais distante ou mais próximo ao conjunto de treinamento. O método K-médias agrupou os indivíduos em função do parentesco genômico, de forma que o relacionamento genético dentro de cada grupo fosse maior que entre grupos. A outra estratégia particionou os animais selecionando-se os indivíduos ao acaso (SAATCHI et al., 2011).

A validação cruzada foi realizada no grupo não usado no treinamento, ou seja, em cada análise foram excluídos os dados de um grupo como conjunto de treinamento para estimar as predições dos grupos restantes (conjunto de validação), além dos efeitos dos marcadores para os métodos de aprimoramento genômico. A mesma estratégia de validação cruzada foi aplicada usando o pedigree tradicional (BLUP), como forma de comparação com as predições genômicas e também para gerar os GEBVs nos métodos de aprimoramento genômico.

As acurácias de predição dos animais genotipados a partir dos conjuntos de validação foram derivadas como a correlação genética entre o fenótipo ajustado ( $y^*$ ) para os efeitos fixos e o valor genômico direto (DGV) ou o valor genético genômico (GEBV), estimadas em um modelo animal bi-características, como demonstrado a seguir:

$$\begin{bmatrix} \mathbf{y}^* \\ \mathbf{DGV/GEBV} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{X}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{X}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\beta}_1 \\ \boldsymbol{\beta}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \mathbf{Z}_1 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{Z}_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \boldsymbol{\alpha}_1 \\ \boldsymbol{\alpha}_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} \boldsymbol{\varepsilon}_1 \\ \boldsymbol{\varepsilon}_2 \end{bmatrix}$$

em que:  $\boldsymbol{\beta}_1$  e  $\boldsymbol{\beta}_2$  são os vetores de efeitos fixos (mesmos efeitos usados em [1] para  $\boldsymbol{\beta}_1$  e efeito de classe dos grupos usados na validação para  $\boldsymbol{\beta}_2$ );  $\boldsymbol{\alpha}_1$  e  $\boldsymbol{\alpha}_2$  são os vetores de efeitos genéticos aditivos para as duas características,  $Var(\alpha_1) = A^* \sigma_{\alpha_1}^2$ ,  $Var(\alpha_2) = A^* \sigma_{\alpha_2}^2$  e  $Cov(\sigma_1, \sigma_2) = A^* \sigma_{\sigma_1, \sigma_2}$ , onde  $\mathbf{A}^*$  é uma matriz do numerador de parentesco, em que as

covariâncias entre indivíduos de diferentes grupos foram zeradas, conforme Saatchi et al. (2013):

$$\mathbf{A}^* = \begin{bmatrix} \mathbf{A}_{11} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{A}_{22} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{A}_{33} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{A}_{44} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{A}_{55} \end{bmatrix}$$

Devido à quantidade de informações disponíveis, os componentes de (co)variâncias e correlações genéticas foram estimados por meio de inferência bayesiana com base no método de Monte Carlo via Cadeias de Markov, utilizando 60.000 ciclos e período de descarte inicial de 10.000 amostras usando o software Gibbs2f90 (MISZTAL et al., 2002).

Dentro de um dado grupo (g), as acurácias preditas foram estimadas como a correlação ( $\hat{r}_{a\hat{a}g}$ ) entre o predito ( $\hat{a}$ ) e o verdadeiro (a) valor genético, como proposto por Legarra et al. (2008):

$$\hat{r}_{a\hat{a}g} = r(\mathbf{y}_g^*, \hat{\mathbf{y}}_g^*) / h \quad [5]$$

em que:  $\mathbf{y}_g^*$  é o vetor dos fenótipos dos animais pertencentes ao grupo g ajustados para os efeitos fixos como na equação [1] e  $\hat{\mathbf{y}}_g^*$  são os valores preditos a partir da validação cruzada, o DGV para predições diretas e GEBV para os métodos de aprimoramento genômico e h é a raiz quadrada da herdabilidade da característica. Para cada método, o coeficiente de regressão do  $\mathbf{y}_g^*$  sobre o  $\hat{\mathbf{y}}_g^*$  foi calculado para avaliar o grau de inflação/deflação das predições genômicas (DGV/GEBV). Para modelos não viesados, são esperados coeficiente e regressão iguais a 1.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### COMPONENTES DE COVARIÂNCIA PARA PERÍMETRO ESCROTAL AO SOBREANO

Enquanto a característica PEi apresentou herdabilidade moderada, o PEip apresentou herdabilidade superior, indicando que existe variabilidade aditiva genética para esta característica (Tabela 2). Estes resultados estão dentro da faixa de valores (0,36 a 0,71) obtidos em outros estudos com a raça Hereford (KNIGHTS et al., 1984; EVANS et al., 1999; KEALEY et al., 2006). A idade e o peso dos animais são importantes fontes de variação e

devem ser incluídos no modelo, principalmente, quando o PE for considerado como critério de seleção para melhorar geneticamente a precocidade sexual (PEÑA et al., 1999). Esta afirmação corrobora Brito (1997), que sugere que as medidas de PE sejam padronizadas para uma mesma idade ou peso corporal, obtendo progressos genéticos em precocidade sexual. Ainda que os valores observados para a variância genética aditiva direta tenham sido próximos, a variância residual estimada para PEi foi mais elevada (Tabela 2). Esses resultados sugerem que os touros possuem semelhante composição genética, que sofrem influência dos diferentes ambientes e que combinações gênicas podem estar interferindo sobre a característica PE, o que pode ser atribuído ao fato de que estes animais tenham sido submetidos a manejos distintos. Resultados obtidos em nosso estudo, são semelhantes aos encontrados por Dias et al. (2003), que observaram variância genética de 2,289, para o PE ajustado para a idade e o peso, e de 2,311, para o PE ajustado para a idade. Já a variância residual obtida pelos mesmos autores foi de 3,207 e 3,363 para ajuste a idade e peso e idade respectivamente. De acordo com os parâmetros genéticos obtidos, no mesmo trabalho, os autores concluíram que o PE ajustado para a idade e o peso ao sobreano apresentou maior herdabilidade do que quando foi ajustado apenas para a idade ou peso. Portanto, o PE ajustado para a idade e o peso ao sobreano pode ser utilizado como critério de seleção quando se busca, principalmente, maior precocidade sexual (DIAS et al., 2003).

**Tabela 2:** Médias a posteriori das variâncias genética aditiva direta ( $\sigma_a^2$ ) e residual ( $\sigma_e^2$ ) e herdabilidade ( $h^2$ )

Características	$\sigma_a^2$	$\sigma_e^2$	$h^2 \pm DP$
Perímetro escrotal ajustado à idade	2,831	4,324	0,395 $\pm$ 0,03
Perímetro escrotal ajustado à idade e peso	2,922	3,113	0,484 $\pm$ 0,03

#### AGRUPAMENTO DA VALIDAÇÃO CRUZADA

O agrupamento k-médias resultou em grupos com número heterogêneo de animais. Além disso, podemos observar que o parentesco genômico dentro de cada grupo foi superior à média de parentesco entre os grupos (Tabela 3). No método k-médias o agrupamento é realizado a partir da utilização de uma matriz de parentesco baseada no *pedigree* dos animais (SAATCHI et al., 2011; 2012; 2013)

No presente trabalho, devido à presença de informações incompletas de *pedigree* para parte dos animais, foi utilizado o parentesco genômico para o agrupamento (BODDHIREDDY et al.,

2014). Os resultados demonstram que o agrupamento k-médias dividiu os grupos primeiramente pela composição racial (um grupo contendo praticamente animais da raça Hereford) e em seguida, foram formados grupos (raça Braford) de acordo com o grau de endogamia e de parentesco genômico. Podemos observar que foi formado um grupo onde foram alocados, em sua grande maioria, animais da raça Hereford. Neste grupo, foram observados coeficientes de endogamia mais elevados: 0,082 para o PEi e 0,080 para o PEip. Resultados semelhantes foram obtidos por Saatchi et al. (2011), com obtenção de um grupo com maior grau de endogamia e de parentesco dentro do grupo, resultando em menor acurácia dos DGVs obtidos.

**Tabela 3:** Número de animais (N), proporção de Nelore, coeficiente de endogamia e parentesco genômico no grupo e entre os grupos ( $G_{ij}$ ) para agrupamento k-médias, para o perímetro escrotal (PE) avaliado ao sobreano.

Características	Grupo	N	% de Nelore	Coefficiente de endogamia	$G_{ij}$ dentro de grupo	$G_{ij}$ entre grupos
<b>PE ajustado à idade</b>	1	419	0,361	$0,001 \pm 0,025$	$0,027 \pm 0,044$	$-0,004 \pm 0,042$
	2	312	0,024	$0,082 \pm 0,038$	$0,132 \pm 0,047$	$-0,013 \pm 0,075$
	3	190	0,378	$-0,009 \pm 0,037$	$0,114 \pm 0,071$	$-0,007 \pm 0,042$
	4	375	0,353	$-0,008 \pm 0,034$	$0,004 \pm 0,038$	$-0,001 \pm 0,039$
<b>PE ajustado à idade e peso</b>	1	190	0,379	$-0,009 \pm 0,028$	$0,116 \pm 0,074$	$-0,006 \pm 0,041$
	2	415	0,360	$-0,001 \pm 0,032$	$0,027 \pm 0,043$	$-0,003 \pm 0,004$
	3	378	0,336	$-0,007 \pm 0,034$	$0,004 \pm 0,039$	$-0,001 \pm 0,030$
	4	312	0,024	$0,080 \pm 0,037$	$0,133 \pm 0,040$	$-0,012 \pm 0,062$

No agrupamento de forma aleatória, os grupos formados apresentaram um número de animais balanceados e intimamente relacionados, com média similar de endogamia de 0,01 e composição racial ao redor de 30%. Não houve diferença nos valores de  $G_{ij}$  dentro e entre grupos, sendo estes valores próximos de zero (dados não mostrados). Estes resultados foram obtidos devido a centralização da matriz de parentesco genômico (VANRADEN, 2008). O objetivo de formar grupos distintos para representar cenários com animais de parentesco mais distante (k-médias) e outro, com parentesco mais próximo (aleatório), para as populações de treinamento e validação foi atingido em ambos os métodos utilizados.

### ACURÁCIA E VIÉS DAS PREDIÇÕES GENÔMICAS

Foram utilizadas quatro metodologias (BLUP, GBLUP, Bayes C e Bayes B) para estimar os efeitos dos marcadores. As correlações genéticas entre o fenótipo PE<sub>i</sub> e o DGV obtido a partir da validação cruzada foi de 0,23 a 0,32 no agrupamento k-médias. No agrupamento aleatório, as correlações genéticas foram superiores (0,49 a 0,59). Para o PE<sub>ip</sub>, foram observadas correlações genéticas entre 0,34 e 0,49 para o agrupamento k-médias e maiores correlações (0,71 a 0,78) entre o fenótipo e DGV, no grupo aleatório (Tabela 4).

**Tabela 4:** Correlações genéticas do fenótipo ajustado com o valor genômico direto (DGV) predito da validação cruzada ( $r_{g_{\alpha\alpha}}$ ) e coeficientes de regressão ( $\beta$ ) para perímetro escrotal (PE), usando diferentes métodos.

Característica	Método <sup>1</sup>	K-médias		Aleatório	
		$r_{g_{\alpha\alpha}}$	$\beta$	$r_{g_{\alpha\alpha}}$	$\beta$
<b>PE ajustado à idade</b>	BLUP	0,32 ± 0,09	1,16	0,59 ± 0,23	1,20
	GBLUP	0,26 ± 0,09	0,67	0,49 ± 0,26	0,69
	Bayes C	0,23 ± 0,09	1,36	0,49 ± 0,25	1,20
	Bayes B	0,24 ± 0,09	0,68	0,49 ± 0,27	0,73
<b>PE ajustado à idade e peso</b>	BLUP	0,49 ± 0,28	1,01	0,71 ± 0,23	1,00
	GBLUP	0,34 ± 0,18	0,61	0,74 ± 0,26	0,59
	Bayes C	0,34 ± 0,21	1,20	0,77 ± 0,24	1,04
	Bayes B	0,43 ± 0,29	0,60	0,78 ± 0,23	0,74

<sup>1</sup>BLUP: BLUP tradicional; GBLUP: BLUP genômico; BayesC: modelo misturado bayesiano com distribuição normal e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi=0,95$ ); BayesB: modelo misturado bayesiano com distribuição-t e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi=0,95$ ).

De modo geral, os métodos genômicos foram similares ao BLUP, porém apresentaram menores correlações genéticas. Este resultado pode sofrer influência do número relativamente baixo de animais genotipados e com fenótipo para a característica PE (1296 touros). Saatchi et al. (2011) destacam que o DGV apresenta menores correlações em características que possuem menos animais com DEBV disponível. Os autores observaram que a acurácia do DGV para a taxa de prenhez foi de 0,26 e 0,37 nos agrupamentos k-médias e aleatório, respectivamente. Já para o PE, as acurácias foram de 0,48 e 0,60, respectivamente, para os mesmos agrupamentos. Porém, o número de animais com informações disponíveis de DEBV foi de 698 touros para a característica taxa de prenhez e 2.464 touros com DEBV para a característica PE.

Em nosso estudo, nas duas características, foram observadas maiores correlações na validação cruzada com grupos formados aleatoriamente em relação ao k-médias. O maior aumento na correlação genética foi observado para o PEip no método Bayes B em agrupamento aleatório (Tabela 4). Saatchi et al. (2011) também encontraram menores acurácias no agrupamento k-médias. Os autores acreditam que a principal razão para a obtenção de menores correlações foi que o método k-médias busca minimizar/diminuir a relação de parentesco entre membros da população de treinamento e de validação, reduzindo a acurácia. Estes resultados corroboram por Habier et al. (2007), que demonstraram que o DGV reduz a acurácia à medida que um candidato de seleção possui menor relação genética com a população de treinamento.

A acurácia do DGV é fundamental para determinar a utilidade do DGV em relação aos custos de genotipagem. Em estudos que utilizam dados de campo, as correlações entre o DGV e a variável resposta (registros de fenótipo, EBV, DEBV, etc.) normalmente subestimam a precisão do DGV, devido à contribuição de efeitos ambientais e do erro aleatório para a variável (SAATCHI et al., 2011).

Outra razão para as baixas acurácias pode ser em decorrência de que a acurácia do EBV dos touros genotipados (usada para derivar a variável de resposta DEBV) é mais baixa em touros de corte do que em touros leiteiros, em função do uso menos frequente de inseminação artificial (GARRICK & GOLDEN 2008). Assim, em contraste com os rebanhos leiteiros, nas populações de gado de corte, os candidatos à seleção são muitas vezes constituídos por touros utilizados em acasalamentos naturais, que possuem relacionamento distante com os touros mais utilizados que compõem a população de treinamento. Desta forma, se a

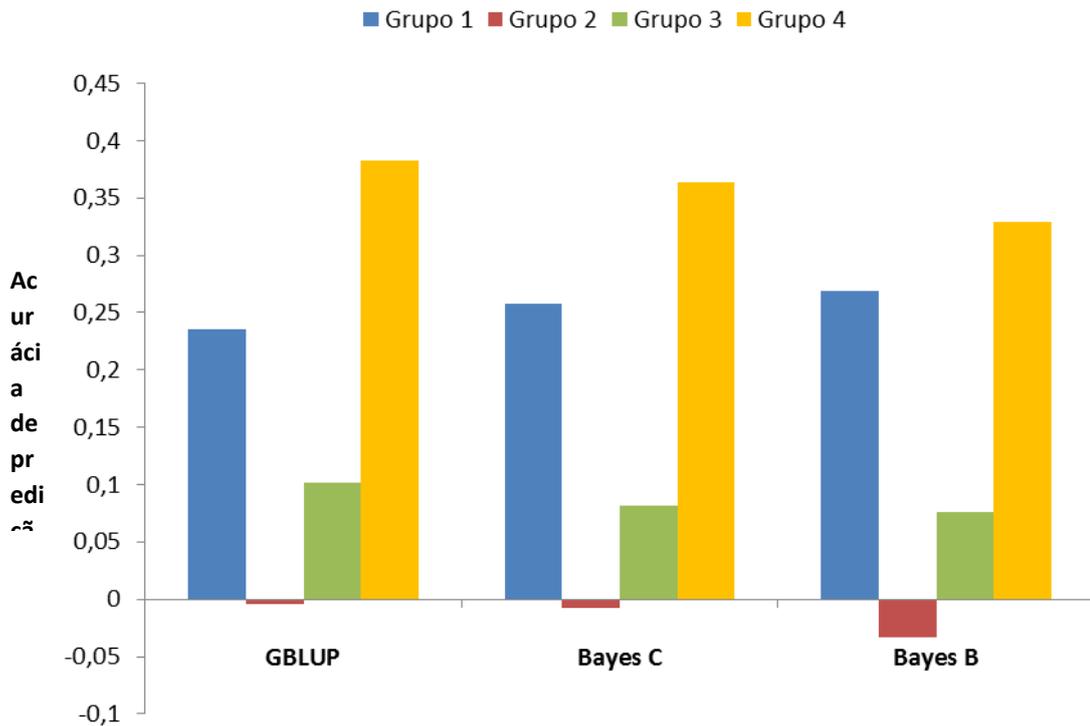
acurácia do DGV é altamente dependente de relações genéticas, a aplicação da seleção genômica poderia ser limitada para candidatos a seleção distantemente relacionados (SAATCHI et al., 2014). A acurácia do DGV aumentará de acordo com a acurácia do EBV, pois a variável resposta será mais próxima ao valor verdadeiro.

Em nosso estudo utilizando o método Bayes C as acurácias dos DGV foram de 0,23 e 0,49 para o PEi e 0,34 e 0,77 para o PEip. Saatchi et al. (2011) observaram acurácias para PE entre 0,48 e 0,60 para os mesmos agrupamentos e para o mesmo método, em touros da raça Angus. Posteriormente, Saatchi et al. (2012) observaram correlação genética de 0,45 entre o PE e o DGV em touros da raça Limousin, utilizando o método Bayes C. Neves et al. (2014), analisaram dados de bovinos da raça Nelore e obtiveram valores de acurácia para o PE de 0,68 e 0,72 para os métodos GBLUP e Bayes C, respectivamente. Conforme os autores, os valores encontrados no estudo são decorrentes de touros com alto valor de acurácia no conjunto de treinamento, mesmo que utilizando um conjunto menor de animais genotipados do que no presente estudo.

A média dos coeficientes de regressão de  $y^*$  sobre as predições genômicas (DGV), calculados como indicadores do viés de predição variaram entre 0,60 e 1,36 para o método de agrupamento k-médias e de 0,59 a 1,20 para a metodologia aleatória (Tabela 4). Os coeficientes para o PEi e o PEip foram subestimados para os métodos GBLUP e Bayes B (valores menores que 1) e superestimados (valores maiores que 1) para a metodologia BLUP e Bayes C, em ambos os métodos de agrupamento. O viés de predição pode ser um problema, particularmente se as predições de animais genotipados (DGV) e não genotipados (EBV) precisam ser comparados para o ranking e decisões de seleção. Neste caso, as previsões do DGV conteriam valores extremos, favorecendo os indivíduos que possuem informações genômicas (CARDOSO et al., 2015).

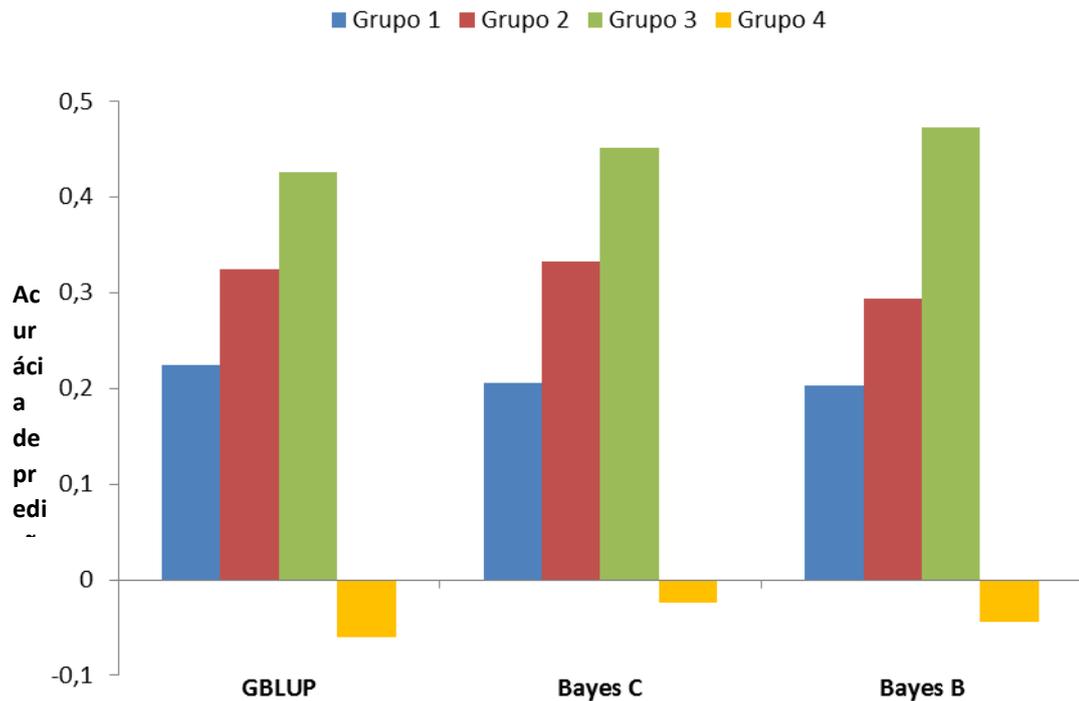
Quanto as acurácias para o PEi, com base na equação [5], os resultados mais baixos foram observados no grupo formado em sua maioria por animais da raça Hereford (PEi - Grupo 2) (Figura 1). Estes resultados já eram esperados, pois Cardoso et al. (2015), trabalhando com o mesmo conjunto de dados, porém para a característica de resistência ao carrapato e utilizando a mesma metodologia para formação dos grupos, também encontraram menores acurácias para o grupo contendo somente animais da raça Hereford. Os autores concluíram que populações de treinamento formadas por animais Braford não produzem adequadas acurácias de predição para animais da raça Hereford.

Em geral, é difícil comparar a acurácia de diferentes estudos devido à diferenças em vários fatores, como herdabilidade, tipos de dados, populações de treinamento e validação, tamanhos do conjunto, métodos estatísticos e métodos de validação (definição de conjunto) para estimar os efeitos do marcador (SAACTHI et al., 2011). Outra razão para a obtenção de diferentes valores de acurácia é o padrão de desequilíbrio de ligação diferente entre populações de bovinos de corte de origem indiana e taurina (O'BRIEN et al., 2014).



**Figura 1:** Acurácia dos valores genômicos diretos (DGV) predito para a característica perímetro escrotal ajustado a idade a partir da validação cruzada utilizando agrupamento k-médias e diferentes métodos.

Com respeito às acurácias para o PEip, valores inferiores foram observados no Grupo 4, também formado em maior parte por animais Hereford (Figura 2). Saatchi et al. (2013) utilizando uma população de treinamento com dados de bovinos Hereford da América do Norte, também não observaram predições acuradas para os rebanhos da mesma raça no Uruguai e na Argentina. Habier et al. (2007) mostraram que a acurácia das predições genômicas nos candidatos à seleção é reduzida à medida que a média de parentesco dos indivíduos do conjunto de treinamento diminui.



**Figura 2:** Acurácia dos valores genômicos diretos (DGV) predito para a característica perímetro escrotal ajustado a idade e peso a partir da validação cruzada utilizando agrupamento k-médias e diferentes métodos.

### INCORPORAÇÃO DA INFORMAÇÃO TRADICIONAL COM A GENÔMICA

Os valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV) foram estimados a partir da incorporação do *pedigree*, fenótipo e DGV por dois métodos GBLUP e BayesB. Para estes métodos, foram utilizadas três abordagens, sendo duas abordagens multi-passos e uma passo único, para incorporação da informação tradicional com a genômica. Na primeira abordagem multi passos, o GEBV foi obtido com base em uma análise bi-características entre o fenótipo e o DGV usando o *pedigree* tradicional (MACNEIL et al., 2010). A segunda abordagem multi passos foi realizada com base no índice de seleção de VanRaden et al. (2009). Esta abordagem permite calcular o GEBV de cada animal como a diferença entre as predições genômicas e tradicionais adicionados à média dos pais (VANRADEN et al., 2009). O último método utilizado, de passo único, combinou diretamente as informações fenotípicas, de *pedigree* e genômicas usando o single step ssGBLUP (MISZTAL et al., 2009).

Na primeira abordagem, são gerados dois GEBV para cada animal, um para os dados do fenótipo PE (a) e outro para o DGV ( $\alpha$ ) (MACNEIL et al., 2010). Neste estudo quando utilizado o método GBLUP, o GEBV(a) foi considerado melhor preditor, com discreto aumento de correlação genética de 0,02 no PEi e de 0,03 no PEip em relação ao BLUP tradicional, pelo

método k-médias. Já nos grupos formados aleatoriamente, o GEBV(a) foi inferior ao BLUP tradicional para as duas características. A única exceção foi no GEBV( $\alpha$ ), onde foi observado ganho de 0,05 na correlação genética com o BLUP tradicional (Tabela 5). Estes pequenos ganhos podem ser em decorrência do reduzido conjunto de animais com informações do fenótipo e do genótipo utilizados nos cálculos do DGV. Resultados semelhantes foram observados no método BayesB com ganhos de acurácia para as duas características no GEBV(a) em agrupamento K-médias. Quando formados grupos aleatórios os resultados foram inferiores para quase todas as características.

Na segunda abordagem, foi utilizado o índice de seleção proposto por VanRaden et al. (2009), que é uma função das confiabilidades médias dos animais usados na predição. Para ambos os métodos utilizados (GBLUP e BayesB), na abordagem do índice de seleção, foi observado aumento na correlação genética quando comparado ao BLUP tradicional. Os ganhos foram na faixa de 0,13 a 0,20 e 0,07 a 0,11 para agrupamento k-médias e aleatório respectivamente (Tabela 5). Neste índice, a média de parentesco dos pais é calculada usando os dados de todos animais e uma média de parentesco derivada dos animais que foram genotipados, em funções de suas confiabilidades (VANRADEN et al., 2009).

Na última abordagem, foi utilizado o método ssGBLUP que combina diretamente as informações fenotípicas, de pedigree e genômicas (MISZTAL et al., 2009). Nesta abordagem também foram observados aumentos na correlação genética para as duas características. Estes ganhos foram muito semelhantes aos obtidos na abordagem do índice de seleção. A avaliação genética de etapa única (single step) com matriz de parentesco complementada com informações genômicas fornece previsões genômicas com acurácia e viés de predição comparável aos métodos multi passos além da maior facilidade de implementação (AGUILAR et al., 2010).

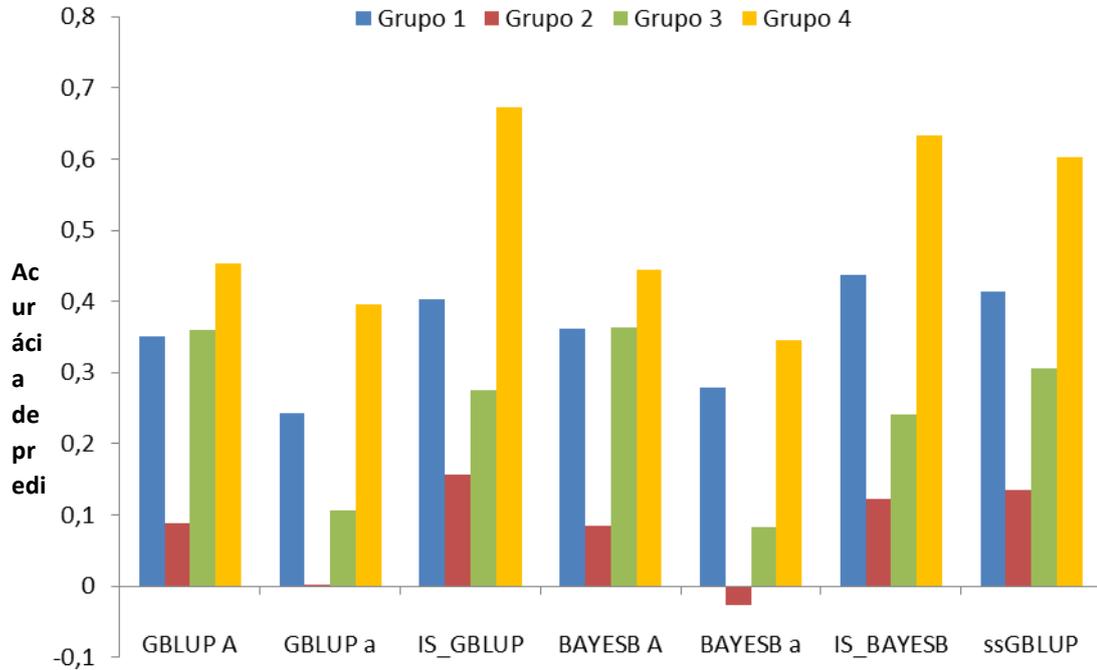
**Tabela 5:** Correlações genéticas do fenótipo ajustado com o valor genético aprimorado pela genômica (GEBV) predito da validação cruzada ( $r_{g_{\alpha\alpha}}^g$ ) e coeficientes de regressão ( $\beta$ ) usando diferentes métodos para perímetro escrotal (PE) medido ao sobreano.

Característica	Método <sup>1</sup>	K-médias		Aleatório	
		$r_{g_{\alpha\alpha}}^g$	$\beta$	$r_{g_{\alpha\alpha}}^g$	$\beta$
<b>PE ajustado à idade</b>	GBLUP_Biv(a)	0,34 ± 0,08	1,08	0,51 ± 0,21	0,89
	GBLUP_Biv( $\alpha$ )	0,27 ± 0,09	0,73	0,50 ± 0,26	0,74
	IS_GBLUP	0,54 ± 0,23	0,94	0,66 ± 0,23	0,97
	BayesB_Biv(a)	0,34 ± 0,09	1,11	0,56 ± 0,23	1,01
	BayesB_Biv( $\alpha$ )	0,25 ± 0,09	0,76	0,51 ± 0,26	0,78
	IS_BayesB	0,52 ± 0,23	1,04	0,66 ± 0,23	0,97
	ssGBLUP	0,50 ± 0,20	0,81	0,69 ± 0,21	0,81
<b>PE ajustado à idade e peso</b>	GBLUP_Biv(a)	0,52 ± 0,27	0,74	0,63 ± 0,26	0,35
	GBLUP_Biv( $\alpha$ )	0,39 ± 0,22	0,66	0,76 ± 0,24	0,67
	IS_GBLUP	0,62 ± 0,25	0,84	0,82 ± 0,19	0,79
	BayesB_Biv(a)	0,53 ± 0,28	0,73	0,67 ± 0,25	0,74
	BayesB_Biv( $\alpha$ )	0,39 ± 0,22	0,66	0,78 ± 0,22	0,81
	IS_BayesB	0,62 ± 0,25	0,85	0,83 ± 0,18	0,93
	ssGBLUP	0,61 ± 0,25	0,74	0,83 ± 0,18	0,69

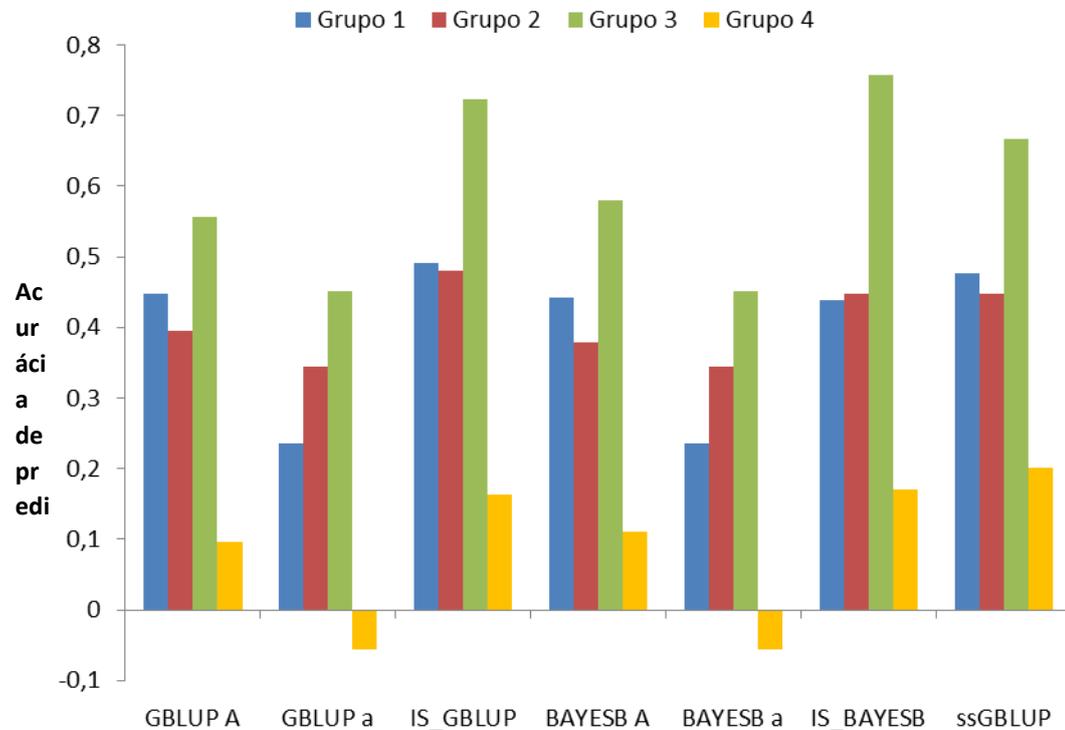
<sup>1</sup>GBLUP: BLUP genômico; BayesB: modelo misturado bayesiano com distribuição-t e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi = 0,95$ ); Biv: análise bivariada combinando o fenótipo e o DGV produzido 2 GEBV, um para dados fenotípicos (a) e um para os dados dos valores genômicos diretos; IS: Índice de seleção ponderando o DGV, média dos pais usando todos os animais (PA) e média dos pais usando apenas os dados dos animais genotipados (SPA); ssGBLUP: GBLUP de passo único.

Podemos observar que a acurácia dos valores genéticos aprimorados pela genômica-GEBV (obtidos pela equação 5) foram semelhantes para cada grupo nos diferentes métodos utilizados (Figuras 3 e 4). As menores acurácias foram obtidas nos grupos formados em grande maioria por animais da raça Hereford no grupo 2, para o PEi, e no grupo 4, para o PEip. Portanto, mesmo após combinando *pedigree* e informação genômica, é evidente que o grupo composto em sua grande maioria por animais Hereford necessita de um maior

conjunto de dados para produzir previsões precisas para candidatos à seleção desta raça (CARDOSO et al., 2015).



**Figura 3.** Acurácia dos valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV), para perímetro escrotal ajustado à idade, preditos a partir da validação cruzada usando agrupamento k-médias utilizando diferentes métodos.



**Figura 4.** Acurácia dos valores genéticos aprimorados pela genômica (GEBV), para perímetro escrotal ajustado à idade e peso, preditos a partir da validação cruzada usando agrupamento k-médias utilizando diferentes métodos.

De forma geral, não houve aumento da acurácia utilizando as metodologias de estimação dos efeitos dos marcadores em relação ao método BLUP (Tabela 6). Os únicos ganhos obtidos em acurácia foram observados para o PE<sub>i</sub>, quando em grupos aleatórios, nos três métodos utilizados. Os bayesianos (BayesB e BayesC) tiveram maiores médias de ganho em relação ao método frequentista (GBLUP).

**Tabela 6.** Ganhos em acurácia (%) das metodologias de estimação de efeitos de marcadores em relação ao método tradicional BLUP para perímetro escrotal (PE) ao sobreano

Característica	Grupo	Metodologias <sup>1</sup>		
		GBLUP	BayesC	BayesB
<b>PE ajustado à idade</b>	K-médias	-18,75	-28,12	-25,00
	Aleatório	-16,95	-16,95	-16,95
<b>PE ajustado à idade e peso</b>	K-médias	-30,61	-30,61	-12,24
	Aleatório	4,22	8,45	9,86
<b>Média</b>		-15,52	-16,81	-11,08

<sup>1</sup>GBLUP: BLUP genômico; BayesC: modelo misturado bayesiano com distribuição normal e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi = 0,95$ ); BayesB: modelo misturado bayesiano com distribuição-t e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi = 0,95$ ).

Quanto aos métodos de aprimoramento genômico, podemos verificar que quase todos os métodos possibilitaram ganhos em acurácia (Tabela 7). Os únicos métodos nos quais não foi observado ganho médio foram na abordagem bi-características GBLUP Biv( $\alpha$ ) e GBLUP e BayesB Biv( $\alpha$ ). Os maiores ganhos foram observados nos métodos índice de seleção (IS GBLUP e IS BayesB) e no método single step (ssGBLUP). O método com a melhor média de ganho em relação ao BLUP foi o ISGBLUP, na característica PE<sub>i</sub> com o agrupamento k-médias, de 68,75%.

**Tabela 7.** Ganhos em acurácia (%) das metodologias de aprimoramento genômico em relação ao método tradicional BLUP para o perímetro escrotal (PE) medido ao sobreano.

Característica	Grupo	Metodologias <sup>1</sup>				
		GBLUP_Biv (a)	IS_GBLUP	BayesB_Biv (a)	IS_BayesB	ssGBLUP
<b>PE ajustado à idade</b>	K-médias	6,25	68,75	6,25	62,50	56,25
	Aleatório	-13,56	11,86	-5,08	11,86	16,94
<b>PE ajustado à idade e peso</b>	K-médias	6,12	26,53	8,16	26,53	24,49
	Aleatório	-11,27	15,49	-5,63	16,90	16,90
<b>Médias</b>		-3,115	30,6575	0,925	29,4475	28,645

<sup>1</sup>GBLUP: BLUP genômico; BayesB: modelo misturado bayesiano com distribuição-t e ponto de massa em zero e probabilidade ( $\pi=0,95$ ); Biv: análise bivariada combinando o fenótipo e o DGV produzindo 2 GEBV, um para dados fenotípicos (a) e um para os dados dos valores genômicos diretos; IS: Índice de seleção ponderando o DGV, média dos pais usando todos os animais (PA) e média dos pais usando apenas os dados dos animais genotipados (SPA); ssGBLUP: GBLUP de passo único.

Dentre os métodos testados, o índice de seleção e o ssGBLUP apresentaram os melhores resultados de acurácia para ambas as características. De acordo com Cardoso et al. (2015), a escolha da metodologia testada irá depender do modelo de negócios adotado para os testes genômicos e a estrutura dos programas de avaliação genética. Por exemplo, se companhias privadas entregam o DGV sem os genótipos individuais, como acontece na *American Angus Association*, o modelo bivariado proposto por MacNeil et al. (2010) é o mais indicado. Por outro lado, se os genótipos estão disponíveis para avaliação genética, o índice de seleção (VANRADEN et al., 2009) ou o ssGBLUP (AGUILAR et al., 2010), utilizados em gado de leite e na *American Hereford Association* podem ser facilmente adaptados.

## **CONCLUSÕES**

A seleção permite a obtenção de ganhos genéticos em perímetro escrotal de touros, em função de sua moderada a superior herdabilidade. A predição de valores genéticos utilizando os métodos índice de seleção e single-step gerou valores mais acurados. O método de agrupamento k-médias gerou menor acurácia, indicando que as predições genômicas são menos precisas quando o parentesco entre os animais no conjunto de treinamento é mais distante. A acurácia foi menor em grupos com predominância de animais Hereford do que grupos com animais Braford. Portanto, estimativas acuradas de efeitos dos marcadores na raça Hereford exigem um maior número de animais genotipados e incluídos no conjunto de treinamento. Quando comparados ao método BLUP tradicional, os ganhos de acurácia obtidos com métodos que combinam informações tradicionais com a genômica indicam que as predições genômicas podem ser usadas como ferramenta para melhorar o ganho genético e reduzir o intervalo de gerações.

## **GENETIC PREDICTION ACURACY FOR SCRATCH PERIMETER IN HEREFORD AND BRAFORD CATTLE**

### **ABSTRACT**

The aim of this study was to evaluate the accuracy and bias of the genomic predictions, using different methods, to scrotal circumference trait in Hereford and Braford cattle. Phenotypic data were used from 18.172 animals belonging to the Conexão Delta G Connection breeding program, and a set of 3,545 animals were genotyped with the 50 k chip and 131 bulls parents with 777K. The phenotypes were adjusted by animal model for estimation the components (co)variance and genetic parameters and to predict genetic values. Subsequently, these values were used to calculate the genetic values deregressed (DEBV). Genotyped animals were divided into four groups by two cross-validation strategies, K-means and random. The accuracy was calculated as the genetic correlation between the adjusted phenotype and the genomic predictions in a analysis two-traits. In general, the accuracy of direct genomic values direct (DGV) ranged from 0.23 to 0.78, however the genomic methods were lower than the BLUP. In relation to information's genomic improvement methods, combining phenotypes and pedigree with DGV, we can see that nearly all methods have enabled gains in accuracy. The largest gains were seen in the

selection index methods (IS\_GBLUP and IS\_BayesB) and the single step genomic method (ssGBLUP). The method with the best gain in relation to the BLUP was the IS\_GBLUP for Pei trait with the k-means clustering of 68.75%. The accuracy to the estimation methods of the effects of markers were lower when using the k-means clustering, indicating that the genomic predictions decreases as the kinship between animals in the training set is more distant. The gains obtained combining traditional and genomic information in relation to traditional BLUP methods indicate that the genomic predictions should be used as a tool to improve accuracy and, as consequence the genetic gains and decrease the range of generation compared to the traditional method.

**Key words:** beef cattle; bull; genomic selection; reproduction.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, I.; MISZTAL, I.; JOHNSON, D. L.; LEGARRA, A.; TSURUTA, S.; LAWLOR, T. J. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. **Journal of Dairy Science**, v.93, p.743–752, 2010.

AGUILAR, I.; MISZTAL, I. (2014) **PreGSF90**.

<<http://nce.ads.uga.edu/wiki/doku.php?id=readme.seekparentf90>>. (Acessado em 02/03/2015).

BODDHIREDDY, P.; KELLY, M. J.; NORTHCUTT, S.; PRAYAGA, K. C.; RUMPH, J.; DENISE, S. Genomic predictions in Angus cattle: Comparisons of sample size, response variables, and clustering methods for cross-validation. **Journal of Animal Science**, v.92, p.485–497, 2014.

BOLIGON, A. A.; SILVA, J. A. V.; SESANA, R. C.; SESANA, J. C.; JUNQUEIRA, J. B.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimation of genetic parameters for body weights, scrotal circumference, and testicular volume measured at different ages in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1215-1219, 2010.

BRITO, F.V. Influência da idade e peso corporal sobre o perímetro escrotal em touros Hereford - Estimativas de fatores de correção. In: **Reunião Anual da Sociedade Brasileira De Zootecnia**, Juiz de Fora. Viçosa, MG: Sociedade Brasileira de Zootecnia, 1997. N.34, p.130-132, 1997.

CLAYTON, D. (2014). snpStats: SnpMatrix and XSnpmatrix classes and methods. R package version 1.18.0. [http://www.bioconductor.org/packages /release/bioc/html/snpStats.html](http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/snpStats.html). (Acessado em 02/03/2015).

CARDOSO, F. F.; GOMES, C. C. G.; SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, M. M.; ROSO, V. M.; PICCOLI, M. L.; HIGA, R. H.; YOKOO, M. J.; CAETANO, A. R.; AGUILAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. **Journal of animal science**, v.93, n.6, p.2693-2705, 2015.

CORBET, N. J.; BURNS, B. M.; JOHNSTON, D. J.; WOLCOTT, M. L.; CORBET, D. H.; VENUS, B. K.; LI, Y.; MCGOWAN, M. R.; HOLROYD, R. G. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. **Animal Production Science**, v.53, p.101–113, 2013.

CHRISTENSEN, O. F.; LUND, M.S. Genomic prediction when some animals are not genotyped. **Genetics Selection Evolution**, v.42, p.2, 2010.

DIAS, L.T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L.G. Estimativas de herdabilidade para perímetro escrotal de animais da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.32, p.1878-1882, 2003.

EVANS, J. L.; GOLDEN, B. L.; BOURDON, R. M.; LONG, K. L. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v.77, p.2621–2628, 1999.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A.; et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.24, p.522-8, 2009.

FERNANDO, R. L.; GARRICK, D. J. (2009). GenSel: User manual for a portfolio of genomic selection related analyses. <http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2105-12-186-S1.pdf>. (Acessado em 02/03/2015).

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119–139, 2003.

GARRICK, D. J.; GOLDEN, B. L. Producing and genetic evaluations in the United States beef industry of today. **Journal of Animal Science**, n.87, p.E11-E18, 2009.

GARRICK, D. J.; TAYLOR, J.F; FERNANDO, R.L. Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. **Genetics Selection Evolution**, v.41, p.55, 2009.

GIANOLA, D.; DE LOS CAMPOS, G.; HILL, W. G.; MANFREDI, E.; FERNANDO, R. Additive genetic variability and the Bayesian alphabet. **Genetics**, v.183, p.347–363, 2009.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. Genomic selection. **Journal Animal Breed Genet**, v.124, p.323–330, 2007.

HABIER, D.; FERNANDO, R. L.; DEKKERS, J. C. M. The impact of genetic relationship information on genome-assisted breeding values. **Genetics**, v.177, n.4, p.2389-2397, 2007.

HABIER, D.; FERNANDO, R. L.; KIZILKAYA, K.; GARRICK, D. J. Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. **BMC Bioinformatics**, v.12, p.186, 2011.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; GODDARD, M. E. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.433–443, 2009.

HAYES, B. J.; LEWIN, H. A.; GODDARD, M. E. The future of livestock breeding: Genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. **Trends in Genetics**, v.29, n.4, p.206–214, 2013.

ILLUMINA. 2006. "TOP/BOT" strand and "A/B" allele: **A guide to Illumina's method for determining strand and allele for the GoldenGate and Infinium assays. Technical note** [http://res.illumina.com/documents/products/technotes/technote\\_topbot.pdf](http://res.illumina.com/documents/products/technotes/technote_topbot.pdf). (Acessado em 20 de Novembro de 2014).

KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. **Theriogenology**, v.81, p.18–23, 2014.

KEALEY, C. G.; MACNEIL, M. D.; TESS, M. W.; GEARY, T. W.; BELLOWS, R. A. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of line 1 Herefords bulls. **Journal of Animal Science**, v.84, n.2, p.283-290, 2006.

KNIGHTS, S. A.; BAKER, .; R. L.; GIANOLA, D.; GIBB, J. B. Estimates of heritabilities and of genetic and phenotypic correlations among growth and reproductive traits in yearling Hereford. **Journal of Animal Science**, v.58, p.887–893, 1984.

LEGARRA, A.; ROBERT-GRANIE', C.; MANFREDI, E.; ELSEN, J.M. Performance of genomic selection in mice. **Genetics**, v.180, p.611–618, 2008.

LEGARRA, A.; AGUILAR, I.; MISZTAL, I. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.4656–4663, 2009.

MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; FORDYCE, G.; FITZPATRICK, L. A.; MILLER, R. G.; JAYAWARDHANA, G.A.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; HOLROYD, R. G. BULL selection and use in northern Australia. 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.25–37, 2002.

MACNEIL, M. D.; NKRUMAH, J. D.; WOODWARD, B. W.; NORTHcutt, S. L. Genetic evaluation of Angus cattle for carcass marbling using ultrasound and genomic indicators. **Journal of Animal Science**, v.88, p.517–522, 2010.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C. T.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; ALLAN, M. F.; HEATON, M. P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S. S.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS ONE**, v.4, Issue 4, 2009.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v.157, p.1819–1829, 2001.

MISZTAL, I. et al. (2002). BLUPF90 and related programs (BGF90) In: **7th World congress on Genetics applied to livestock production**, Montpellier, France. CD-ROM. Communication number 28-07.

NEVES, H. H. R.; CARVALHEIRO, R.; O'BRIEN, A. M. P.; UTSUNOMIYA, Y. T.; CARMO, A. S.; SCHENKEL, F. S.; SÖLKNER, J.; MCEWAN, J. C.; VAN TASSELL, C. P.; COLE, J. B.; SILVA, M. V. G. B.; QUEIROZ, S. A.; SONSTEGARD, T. S.; GARCIA, J. F. Accuracy of genomic predictions in *Bos indicus* (Nelore) cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.46, p.17, 2014.

O'BRIEN, A. M. P.; UTSUNOMIYA, Y. T.; MÉSZÁROS, G.; BICKHART, D. M.; LIU, G. E.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; SILVA, M. V. B.; GARCIA, J. F.; SÖLKNE, J. Assessing signatures of selection through variation in linkage disequilibrium between taurine and indicine cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.46, p.19, 2014.

PARKINSON, T.J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v.168, p.215–229, 2004.

PEÑA, C. D. O.; CAMPOS, F. P.; FEITOSA, J. V.; QUEIROZ, S. D.; ALENCAR, M. M.; ROCHA, J. C. M. C.; SIQUEIRA, R. P. G.; HELLMEISTER FILHO, P.; ROCHA. C. E. (1998) **Estimativas de**

**herdabilidade do perímetro escrotal, peso corporal e suas relações em tourinhos da raça nelore no Paraguai.** Anais da XXXV Reunião da SBZ- Botucatu SP.

R CORE TEAM. 2013. **The R Project for Statistical Computing.** <http://www.R-project.org/>. (Acessado em 15 de Maio de 2014).

SAATCHI, M.; MCCLURE, M. C.; MCKAY, S. D.; ROLF, M. M.; KIM, J.; DECKER, J. E.; TAXIS, T. M.; CHAPPLE, R. H.; RAMEY, H. R.; NORTHCUTT, S. L.; BAUCK, S.; WOODWARD, B.; DEKKERS, J. C. M.; FERNANDO, R. L.; SCHNABEL, R. D.; GARRICK, D. J.; TAYLOR, J. F. Accuracies of genomic breeding values in American Angus beef cattle using K-means clustering for cross-validation. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.40, 2011.

SAATCHI, M.; SCHNABEL, R. D.; ROLF, M. M.; TAYLOR, J. F.; GARRICK, D. J. Accuracy of direct genomic breeding values for nationally evaluated traits in US Limousin and Simmental beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v.44, p.38, 2012.

SAATCHI, M.; WARD, J.; GARRICK, D. J. Accuracies of direct genomic breeding values in Hereford beef cattle using national or international training populations. **Journal of Animal Science**, v.91, p.1538–1551, 2013.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. Flmpute – An efficient imputation algorithm for dairy cattle populations. **Journal of Animal Science**, v.89, p.333, 2011.

STRANDEN, I.; GARRICK, D. J. Derivation of equivalent computing algorithms for genomic predictions and reliabilities of animal merit. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.2971–2975, 2009.

SCHAEFFER, L.R. Strategy for applying genome-wide selection in dairy cattle. **Journal Animal Breed Genet**, v.123, p.218–223, 2006.

VAN MELIS, M. H.; ELER, J. P.; ROSA, G. J. M.; FERRAZ, J. B. S.; FIGUEIREDO, L. G. G.; MATTOS, E.; OLIVEIRA, H. N. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer

pregnancy, and stayability in Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3809–13, 2010.

VANRADEN, P. M. Efficient methods to compute genomic predictions. **Journal of Dairy Science**, v.91, p.4414–4423, 2008.

VANRADEN, P. M.; VAN TASSELL, C. P.; WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD, T. S.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; SCHENKEL, F. S. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.16–24, 2009.

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

### **3.2 Artigo 2**

**Expression of paraoxonase types 1, 2 and 3 in reproductive tissues and activity of paraoxonase type 1 in the serum and seminal plasma of bulls**

**C.E.R. Ferreira, C.S. Haas, K.L. Goularte, M.T. Rovani, F.F. Cardoso,  
A. Schneider, B.G. Gasperin, T. Lucia Jr.**

**Artigo aceito na revista Andrologia**

1 **Expression of paraoxonase types 1, 2 and 3 in reproductive tissues and activity of**  
2 **paraoxonase type 1 in the serum and seminal plasma of bulls**

3 **Running head:** Paraoxonases in reproductive tissues of bulls

4 C.E.R. Ferreira<sup>1,2</sup>, C.S. Haas<sup>1,2</sup>, K.L. Goularte<sup>1,2</sup>, M.T. Rovani<sup>3</sup>, F.F. Cardoso<sup>4</sup>,

5 A. Schneider<sup>3</sup>, B.G. Gasperin<sup>1,2</sup>, T. Lucia Jr.<sup>1,2</sup>

6 <sup>1</sup>ReproPEI, <sup>2</sup>Faculdade de Veterinária, <sup>3</sup>Faculdade de Nutrição

7 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brazil

8 <sup>4</sup>Embrapa Pecuária Sul, Bagé-RS, Brazil

9 [\\*tluciajr@gmail.com](mailto:tluciajr@gmail.com)

10 **Abstract**

11 The paraoxonases types 1, 2 and 3 (PON1, PON2 and PON3, respectively) are enzymes that  
12 degrade lipid peroxides, preventing oxidative damages relevant for male reproductive  
13 function. This study determined the expression of those three paraoxonases in reproductive  
14 tissues of bulls and evaluated correlations among the activity of PON1 in the serum and  
15 seminal plasma with breeding soundness parameters in bulls. The expression of *PON1*, *PON2*  
16 and *PON3* was characterized by RT-PCR in samples of testicular parenchyma, vesicular glands  
17 and epididymis collected from three slaughtered bulls. All three paraoxonases were expressed  
18 in the testicular parenchyma, *PON2* and *PON3* were both expressed in the epididymis head  
19 and *PON3* was also expressed in the epididymis tail. The PON1 activity was determined in  
20 samples of serum and seminal plasma from 110 bulls submitted to breeding soundness  
21 evaluation. There was a strong correlation ( $r = 0.90$ ) between the activity of the PON1 in both  
22 serum and seminal plasma ( $P < 0.0001$ ). The PON1 activity in the seminal plasma was positively  
23 correlated with ejaculate's color, sperm mass activity ( $P = 0.04$ ), motility, vigor and viability (all  
24  $P < 0.01$ ). Thus, PON1 may be a potential marker for sperm motility and viability in bulls.

25 Key words: acute phase proteins; reproductive tissues; sperm quality; bulls.

## 27 Introduction

28           The paraoxonases types 1, 2 and 3 (PON1, PON2 and PON3, respectively) are acute  
29 phase proteins capable to degrade lipid peroxides (Barranco et al., 2015a), presenting  
30 antioxidant activity (Précourt et al., 2011). In rats, expression of *PON1*, *PON2* and *PON3* was  
31 reported in many tissues such as intestines, stomach, pancreas, hepatocytes, adipocytes,  
32 muscles, follicular fluid, seminiferous tubules and spermatozoa (Marsillach et al., 2008). The  
33 *PON2* expression was detected in fewer tissues compared to *PON1* and *PON3*, but it was  
34 already detected in the liver, lungs, placenta, heart and testicles of humans (Ng et al., 2001).

35           The PON1 is involved in male reproductive functions, since it was identified in sperm  
36 lineage cells, Sertoli cells and Leydig cells of rats and humans (Marsillach et al., 2008; 2011).  
37 Low activity of PON1 was observed in the seminal plasma of infertile or sub fertile men (Verit  
38 et al., 2009; Lazaros et al., 2011; Tavailani al., 2014) and in ejaculates of azoospermic men  
39 (Gulum et al., 2017). In boars, activity of PON1 was determined in the seminal plasma  
40 (Barranco et al., 2015a) and its antioxidant activity was related to subsequent fertility *in vivo*  
41 (Barranco *et al.*, 2015b). Such antioxidant activity would be beneficial for sperm quality and  
42 function since spermatozoa are sensitive to oxidative stress induced by increased production  
43 of reactive oxygen species (ROS) (Chatterjee & Gagnon 2001; Guthrie & Welch, 2006), due to  
44 the lack of efficient antioxidant systems (Bucak et al., 2008),

45           Potential antioxidant activity of PON1 was reported in bull semen (Dedeoglu et al.,  
46 2014), but the presence of paraoxonases in reproductive tissues of bulls and associations  
47 among PON1 activity and reproductive traits were not determined yet. Nevertheless, at field  
48 level, potential bull fertility is most commonly estimated through breeding soundness  
49 evaluations, which includes conventional evaluations of semen quality (Kastelic & Thundathil,  
50 2008; Waldner et al., 2010). However, after censoring bulls with obvious physical and  
51 reproductive flaws, ejaculates classified within generally recommended levels do not  
52 necessarily differentiate bulls with distinct fertility, which requires the evaluation of several

53 parameters of sperm quality altogether (Gillan et al., 2008; Puglisi et al., 2012). Thus, the  
54 search of potential marker capable to detect highly fertile individuals still need to be  
55 developed. The objectives of this study were: to determine the expression of *PON1*, *PON2* and  
56 *PON3* mRNA in the testicular parenchyma, epididymis and vesicular glands of bulls; and to  
57 evaluate *PON1* activity in the serum and seminal plasma and potential correlations with  
58 breeding soundness parameters in bulls.

59

## 60 **Material and methods**

61 The procedures involving bulls were approved by the Ethics in Animal Experimentation  
62 Committee (CEEA-UFPEL; process # 1943).

### 63 *Experiment 1*

64 Samples of testicular parenchyma, vesicular glands and of the head, body and tail of  
65 the epididymis were collected from three bulls in a local slaughterhouse. Such bulls were the  
66 only ones sent to slaughter during a 6-month period and had no defined racial and genetics  
67 pattern. The samples were immediately stored in 2 mL cryotubes into liquid Nitrogen (LN<sub>2</sub>).

68 To identify the gene expression of the paraoxonases, the total RNA of the collected  
69 tissues was extracted using Trizol<sup>®</sup> (Invitrogen), following the manufacturer's  
70 recommendations. The extracted RNA was quantified by spectrophotometry (NanoDrop,  
71 Thermo Scientific; Abs 260/280 nm ratio). The purity of the RNA was evaluated through the  
72 absorption rate of the OD260/OD280 ratio, so values inferior to 1.8 were not used. The total  
73 RNA was treated with DNase (Promega) at 37°C for 5 min to digest any contaminant genomic  
74 DNA. After inactivation of the DNase at 65°C for 10 min, the reverse transcriptase reaction was  
75 performed using the iScript cDNA Synthesis kit (BioRad), as recommended by the  
76 manufacturer. Gene expression was conducted through real time PCR (CFX384 real-time PCR;  
77 BioRad) using SsoFast™ EvaGreen<sup>®</sup> supermix (BioRad) and bovine specific primers. The  
78 integrity of the cDNA samples was certified by amplification of the constitutive gene *GAPDH*.

79 The primers used for the *PON1*, *PON2* and *PON3* genes (Table 1) were designed from  
80 sequences obtained in GenBank (NCBI) using the Primer-BLAST tool  
81 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). Only samples that amplified the *GAPDH*  
82 gene were used to confirm the results. The specificity of the obtained amplicons was evaluated  
83 through analyses of dissociation curves (melting) and the size of the amplicons. For such  
84 procedure, 10 µl of the PCR product of each gene was analyzed by electrophoresis on a 2.0%  
85 agarose gel containing ethidium bromide, and the amplicon size was compared with a DNA  
86 ladder.

### 87 *Experiment 2*

88 This experiment included 110 Braford bulls with approximately two years of age, from  
89 seven farms located in the Rio Grande do Sul State, Brazil (29°45'17" S latitude and 57°05'18"  
90 W longitude), all from the same breeding program. Breeding soundness evaluations were  
91 conducted as described elsewhere (Kastelic & Thundathil 2008; Waldner et al., 2010). Body  
92 weight and scrotal circumference were determined for all bulls. Ejaculates were collected  
93 using a manually controlled electro ejaculator (Palmer et al., 2005). The ejaculate volume (mL)  
94 was recorded and the ejaculate color was classified through a score from 1 to 5, in which 1  
95 means clear and 5 means creamy (McGowan et al., 2002). Motility, vigor and mass activity  
96 were evaluated for fresh sperm, at the time of breeding soundness evaluation, through optical  
97 microscopy. Sperm motility was evaluated under a 200 x magnification, considering a scale of 0  
98 to 100%. Sperm vigor was classified through a score from 1 to 5, in which 1 means no  
99 progressive movement and 5 means maximum progressive movement. Sperm mass activity  
100 was classified through a score from 0 to 4, in which 0 means no activity and 4 means rapid  
101 swirling activity (Fitzpatrick et al., 2002). Normal sperm morphology was determined in  
102 samples extended in buffered formol saline (Fitzpatrick et al., 2002) and sperm viability was  
103 assessed in smears stained with eosin-nigrosin (Brito et al., 2003), both through optical

104 microscopy. Subsequently, semen samples were stored in 15 mL conic tubes and centrifuged  
105 at 200 x G for 5 min. The seminal plasma was fractioned in 1.5 mL tubes and frozen in LN<sub>2</sub>.

106 At the time of the breeding soundness evaluations, blood samples were collected  
107 through puncture of the coccygeal vein using a BD Vacutainer® system with a 25 x 8 mm  
108 needle. The blood was placed in sterile 10 mL tubes with no anticoagulant. Blood samples  
109 were centrifuged at 6,000 rpm during 10 min. Serum samples were conditioned in 1.5 mL  
110 cryotubes and frozen in LN<sub>2</sub>.

111 The PON1 arylesterase activity in serum and in seminal plasma was determined as  
112 described by Browne et al. (2007). Briefly, samples were diluted 1:3 in a 20 mM Tris/HCl buffer  
113 solution (1 mM CaCl<sub>2</sub>). Absorbance was measured at 270 nm through spectrophotometry  
114 (Cirrus 80ST), using 3.3 µl of the diluted samples in 500 µl of the buffer solution (containing 4  
115 mM phenylacetate), for 60 s. The PON1 activity, expressed in U/mL, was determined by the  
116 formula:  $\Delta \text{absorbance} * 115 * 3$ .

#### 117 *Statistical analyses*

118 Data were tested for normality using the Shapiro-Wilk test. Scrotal circumference was  
119 normally distributed, whereas the activity of PON1 in seminal plasma and serum were  
120 normalized using logarithmic transformation. Correlations among such variables were  
121 determined by the Pearson's coefficient. As the remaining breeding soundness parameters  
122 were either categorical or not normally distributed, correlations involving such variables were  
123 determined by the Spearman's coefficient for non-parametric data. All analyses were  
124 conducted using Statistix® (2013).

125

## 126 **Results**

### 127 *Experiment 1*

128 The three paraoxonases were expressed in the testicular parenchyma. Expression of  
129 *PON2* and *PON3* was also observed in the head of epididymis. The *PON3* was also expressed in

130 the tail of the epididymis. None of those three enzymes was expressed in the vesicular glands.

131 The *GAPDH* gene was expressed in all samples of all bulls.

### 132 *Experiment 2*

133 The PON1 activity in the serum was  $24.4 \pm 16.7$  U/mL, ranging from 2.2 to 80.7 U/mL.

134 In the seminal plasma, mean PON1 activity was  $7.4 \pm 5.1$  U/mL, with values ranging from 0.9 to

135 27.1 U/mL. The PON1 activity in serum was highly correlated ( $r = 0.90$ ) with the PON1 activity

136 in the seminal plasma ( $P < 0.0001$ ).

137 The results of the breeding soundness evaluations are shown in Table 2. As shown in

138 Table 3, the ejaculate volume was the only breeding soundness parameter positively

139 correlated with the serum PON1 activity ( $P < 0.05$ ). However, PON1 activity in the seminal

140 plasma was positively correlated with the ejaculate color ( $P < 0.01$ ) and with sperm mass

141 activity ( $P = 0.04$ ), vigor and viability (all  $P < 0.01$ ). Sperm motility was positively correlated ( $P <$

142  $0.01$ ) with PON1 activity in the seminal plasma (Figure 1), but uncorrelated with PON1 activity

143 in the serum ( $r = 0.13$ ,  $P > 0.05$ ).

144

### 145 **Discussion**

146 The expression of *PON1*, *PON2* and *PON3* in the testicular parenchyma and the PON1

147 activity in the seminal plasma and serum of bulls was characterized for the first time in this

148 study. Expression of those three enzymes has been previously reported in mice, not only in the

149 testicular parenchyma, but also in Leydig cells and in germ cells (Marsillach et al., 2008).

150 Furthermore, those three paraoxonases were also identified by immunohistochemistry in the

151 testicular parenchyma of sub fertile men (Marsillach et al., 2011), although their concentration

152 in semen was reduced, likely due to cell catabolism. Additionally, *PON2* and *PON3* were both

153 expressed in the head of the epididymis and *PON3* was expressed in the tail of the epididymis.

154 The PON2 was previously identified in the head and in the tail of boar spermatozoa with intact

155 membranes (Barranco et al., 2015a). Those findings indicate that three paraoxanases are

156 present in bull testicles and may play a role in protecting spermatozoa against oxidative stress,  
157 at both intra and extracellular level.

158         Although PON1 activity was nearly three times greater in the serum than in the  
159 seminal plasma, the PON1 activity in the seminal plasma was correlated with a greater number  
160 of parameters of ejaculate and sperm quality compared to the serum PON1. The seminal  
161 plasma includes a variety of proteins originated from the testicles, epididymis and accessory  
162 sex glands, which are involved in processes such as sperm metabolism, maturation,  
163 capacitation, acrosome reaction and interaction with oocytes (Rodriguez-Martinez et al., 2011,  
164 Boe-Hansen et al., 2015; Rego et al., 2015). The fact that PON1 activity was observed in the  
165 seminal plasma of bulls (in the present study) and in the sperm-rich portion of boar's  
166 ejaculates (Barranco et al., 2015b), suggests that PON1 may be originated from either the  
167 testicles or the epididymis. Even though ejaculates of bulls do not have distinct portions, as  
168 occurs in boars, the positive correlation of the activity of serum PON1 with the ejaculate color  
169 (a subjective indicator of sperm concentration), apparently corroborates the hypothesis of the  
170 testicular/epididymal origin of the seminal plasma PON1, which is to be confirmed by future  
171 research. An unbalanced activity of PON1 may result in oxidative stress at testicular level (Rego  
172 et al., 2014; Barranco et al., 2015a). Therefore, excessive formation of ROS may occur, leading  
173 to damages in spermatozoa's membrane and DNA (Bucak et al., 2008). Such detrimental  
174 effects on spermatogenesis likely result in negative effects on seminal traits that are  
175 detectable in conventional breeding soundness evaluations (Fitzpatrick et al., 2002). As  
176 suggested by our results, bulls with greater PON1 activity in the seminal plasma may present  
177 ejaculates with increased volume and improved sperm mass activity, motility, vigor and  
178 viability. Such traits are correlated among themselves and have moderate repeatability  
179 (Fitzpatrick et al., 2002), but, individually, their correlations with field fertility are commonly  
180 poor (Johnson, 1997), indicating that precise evaluations of fertility should be based on several  
181 combined assays (Kastelic & Thundathil 2008). Thus, although PON1 may qualify as a candidate

182 marker for bull sperm quality, potential associations with subsequent fertility still require  
183 further investigation.

184 The expression of the three paraoxanases was confirmed in all samples by the  
185 amplification of the gene *GAPDH* and the specificity of the amplified fragments was confirmed  
186 by both the size of the amplicons estimated through the comparison with the DNA marker and  
187 by the inexistence of unspecific bands. Distinct levels of enzymatic activity may be genetically  
188 driven by polymorphisms in the promoting and encoding regions of the *PON1* gene, as  
189 observed in humans (Padungtod et al., 1999; Camps et al., 2009) and in cows (Silveira et al.,  
190 2015). The *PON1* 55M, *PON1* 192R and *PON2* 311C alleles are associated with the activity of  
191 the *PON1* and with increased levels of oxidative stress in men's seminal plasma (Lazaros et al.,  
192 2011). However, the presence and the activity of the *PON2* and *PON3* in the seminal plasma  
193 and in spermatozoa of bulls still need to be determined, since only the expression of the mRNA  
194 of such enzymes was investigated in the present study.

195

## 196 **Conclusions**

197 The *PON1*, *PON2* and *PON3* were expressed in the testicular parenchyma of bulls. As  
198 the *PON1* activity in the seminal plasma was positively correlated with some breeding  
199 soundness traits, *PON1* may be a potential marker for bull sperm motility and viability.

200

## 201 **Funding**

202 This research was funded with a scholarship given to the first author by CAPES

203 .

## 204 **Conflict of interest**

205 The authors have no conflict of interest to declare.

206

207

208 **References**

- 209 Barranco I, Roca J, Tvarijonaviciute A, Ruber M, Vicente-Carrillo A, Atikuzzaman M, Ceron JJ,  
210 Martinez EA, Rodriguez-Martinez H (2015a). Measurement of activity and  
211 concentration of paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2  
212 in the sperm of boar ejaculates. *Mol Reprod Dev* 82:58-65.
- 213 Barranco I, Tvarijonaviciute A, Perez-Patiño C, Alkmin DV, Ceron JJ, Martinez EA, Rodriguez-  
214 Martinez H, Roca, J (2015b). The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar  
215 seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo  
216 fertility. *Andrology* 3:315–320.
- 217 Boe-Hansen GB, Rego JPA, Crisp JM, Moura AA, Nouwens AS, Li Y, Venus B, Burns BM,  
218 McGowan MR (2015). Seminal plasma proteins and their relationship with percentage  
219 of morphologically normal sperm in 2-year-old Brahman (*Bos indicus*) bulls. *Anim*  
220 *Reprod Sci* 162:20–30.
- 221 Brito LFC, Barth AD, Bilodeau-Goeseels S, Panich PL, Kastelic JP (2003). Comparison of methods  
222 to evaluate the plasmalemma of bovine sperm and their relationship with in vitro  
223 fertilization rate. *Theriogenology* 60:1539-1551.
- 224 Browne RW, Koury ST, Marion S, Wilding G, Muti P, Trevisan M (2007). Accuracy and biological  
225 variation of human serum Paraoxonase 1 activity and polymorphism (Q192R) by  
226 kinetic enzyme assay. *Clin Chem* 53:310–317.
- 227 Bucak MN, Atessahin A, Yuce A (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters  
228 on ram semen after the freeze–thawing process. *Small Rumin Res* 75:128-134.
- 229 Camps J, Marsillach J, Joven J (2009). The paraoxonases: role in human diseases and  
230 methodological difficulties in measurement. *Crit Rev Clin Lab Sci* 46:83–106.
- 231 Chatterjee S, Gagnon C (2001). Production of reactive oxygen species by spermatozoa  
232 undergoing cooling, freezing, and thawing. *Mol Reprod Dev* 59:451-458.

- 233 Dedeoglu N, Arslan M, Erzenegin M (2014). Purification of Holstein bull semen Paraoxonase 1  
234 (PON1) by hydrophobic interaction chromatography and investigation of its inhibition  
235 kinetics by heavy metals. *Biol Trace Elem Res* 158:29–35.
- 236 Fitzpatrick LA, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Doogane VJ, de Faveri J, Miller RG,  
237 Holroyd RG (2002). Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits.  
238 *Anim Reprod Sci* 71:39-49.
- 239 Guthrie HD, Welch GR (2006). Determination of intracellular reactive oxygen species and high  
240 mitochondrial membrane potential in Percoll-treated viable boar sperm using  
241 fluorescence-activated flow cytometry. *J Anim Sci* 84:2089-2100.
- 242 Gillan, L, Kroetsch T, Maxwell WMC, Evans G (2008). Assessment of in vitro sperm  
243 characteristics in relation to fertility in dairy bulls. *Anim Reprod Sci* 103:201-214.
- 244 Gulum M, Gumus K, Yeni, E, Dogantekin E, Ciftci H, Akin Y, Savas M, Altunkol A (2017). Blood  
245 and semen paraoxonase - arylesterase activities in normozoospermic and azoospermic  
246 men. *Andrologia* Doi: 10.1111/and.12752.
- 247 Johnson WH (1997). The significance to bull fertility of morphologically abnormal sperm. *Vet*  
248 *Clin North Am* 13:255–270.
- 249 Kastelic JP, Thundathil JC (2008). Breeding soundness evaluation and semen analysis for  
250 predicting bull fertility. *Reprod Dom Anim* 43 (Suppl. 2):368-373.
- 251 Lazaros LA, Xita NV, Hatzi EG, Kaponis AI, Stefos TJ, Plachouras NI, Makrydimas GV, Sofitikis  
252 NV, Zikopoulos KA, Georgiou IA (2011). Association of paraoxonase gene  
253 polymorphisms with sperm parameters. *J Androl* 32:394-401.
- 254 McGowan MR, Bertram JD, Fordyce G, Fitzpatrick LA, Miller RG, Jayawardhana GA, Doogan VJ,  
255 de Faveri J, Holroyd RG (2002). Bull selection and use in northern Australia. 1. Physical  
256 traits. *Anim Reprod Sci* 71:25-37.
- 257

- 258 Marsillach J, Camps J, Beltran-Debón R, Rull A, Aragones G, Maestre-Martínez C, Sabench F,  
259 Hernández M, Castillo DD, Joven J, Mackness M, Mackness B (2011).  
260 [Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1 and 3 in human atheromatous](#)  
261 [plaques. Eur J Clin Invest 41:308-314.](#)
- 262 Marsillach J, Mackness B, Mackness M, Riu F, Beltrán R, Joven J, Camps J (2008).  
263 Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal  
264 mouse tissues. *Free Radical Biol Med* 45:146-157.
- 265 Ng CJ, Wadleigh DJ, Gangopadhyay A, Hama S, Grijalva VR, Navab M, Fogelman AM, Reddy ST  
266 (2001). Paraoxonase-2 is a ubiquitously expressed protein with antioxidant properties  
267 and is capable of preventing cell-mediated oxidative modification of low density  
268 lipoprotein. *J Biol Chem* 276:44444-44449.
- 269 Padungtod C, Niu T, Wang Z, Savitz DA, Christiani DC, Ryan LM, Xu X (1999). Paraoxonase  
270 polymorphism and its effect on male reproductive outcomes among Chinese pesticide  
271 factory workers. *Am J Ind Med* 36:379-387.
- 272 Palmer CW, Brito LFC, Arteaga AA, Soderquist L, Persson Y, Barth AD (2005) Comparison of  
273 electroejaculation and transrectal massage for semen collection in range and yearling  
274 feedlot beef bulls. *Anim Reprod Sci* 87: 25-31.
- 275 Précourt LP, Amre D, Denis MC, Lavoie JC, Delvin E, Seidman E, Levy E (2011). The three-gene  
276 paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. *Atherosclerosis* 214:20-  
277 36.
- 278 Puglisi R, Pozzi A, Foglio L, Spano M, Eleuteri P, Grollino MG, Bongioni G, Gall A (2012). The  
279 usefulness of combining traditional sperm assessments with in vitro heterospermic  
280 insemination to identify bulls of low fertility as estimated in vivo. *Anim Reprod Sci*  
281 132:17-28.
- 282 Rodriguez-Martinez H, Kvist U, Ernerudh J, Sanz L, Calvete JJ (2011). Seminal plasma proteins:  
283 what role do they play? *Am J Reprod Immunol* 66:11–22.

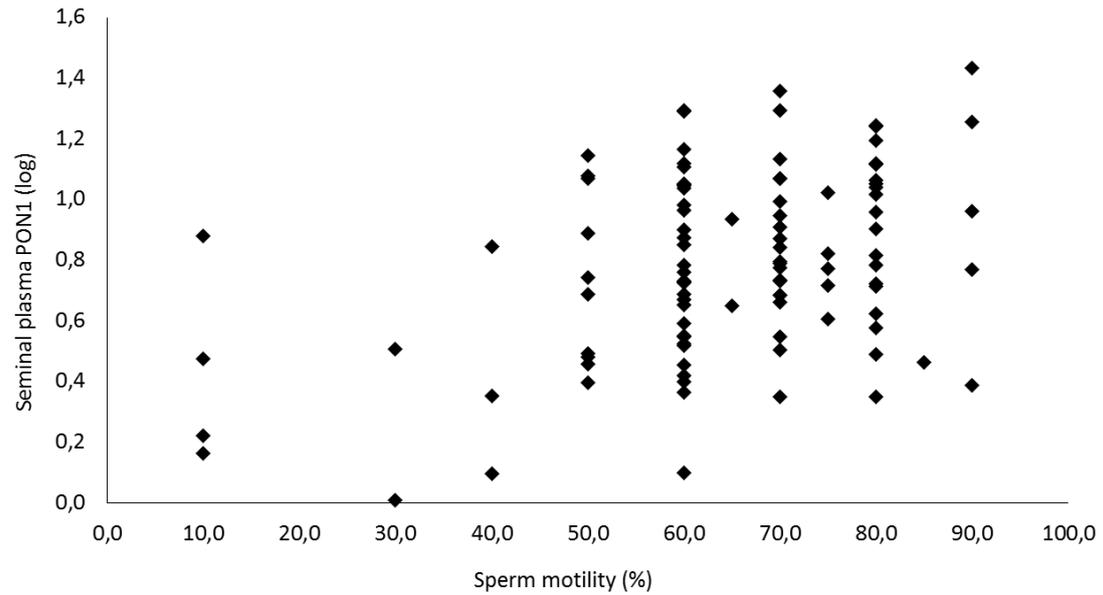
- 284 Silveira PAS, Schwegler E, Montagner A, Krause ART, Acosta DAV, Halfen J, Garlet T, Barros CC,  
285 Corrêa MN, Schneider A (2015). Characterization of single nucleotide polymorphisms  
286 in the promoter region of the bovine paraoxonase 1 (PON1) gene affecting serum  
287 enzyme activity in dairy cows. *Vet J* 205:101-103.
- 288 Tavilani H, Fattahi A, Esfahani M, Khodadadi I, Karimi K, Bahrayni E, Vatannejad A, Vaisi-  
289 Raygani A, Ghorbani M, Latifi Z (2014). Genotype and phenotype frequencies of  
290 paraoxonase 1 in fertile and infertile men. *Syst Biol Reprod Med* 60:361–366.
- 291 Verit FF, Verit A, Ciftci H, Erel O, Çelik HC (2009). Paraoxonase-1 activity in subfertile men and  
292 relationship to sperm parameters. *J Androl* 30:183-189.
- 293 Waldner CL, Kennedy RI, Palmer CW (2010). A description of the findings from bull breeding  
294 soundness evaluations and their association with pregnancy outcomes in a study of  
295 western Canadian beef herds. *Theriogenology* 74:871-883.

296

297 **FIGURE 1** Correlation between the activity of the Paraoxanase 1 (PON1) enzyme in the seminal plasma

298 and sperm motility of bulls - Experiment 2\*

299



300

301 \*r (Pearson's coefficient) = 0.38; P &lt; 0.01; n = 106.

302

303 **TABLE 1** Initiators used for gene expression analyses - Experiment 1\*

Gene		Sequence	Amplicon bp	Access number		
<i>PON1</i>	F	ACTCCATTGAAGTCTCTGGACTG	191	NM_001046269.2		
	R	ACCACCGTAACTTTGGGTTCT				
<i>PON2</i>	F	TCTCTTTGTTGTAAACCACCCA	148	NM_001013588.1		
	R	ATGTTCTGGTCCAACAGCTATGA				
<i>PON3</i>	F	TGTTGATCCTGACACGGGAG	122	NM_001075479.1		
	R	CAGACAAAGCGTCCGGATG				
<i>GAPDH</i>	F	GATTGTCAGCAATGCCTCCT	94	NM_001034034.		
	R	GGTCATAAGTCCCTCCACGA				
	*F:	Forward	primer;	R:	Reverse	primer

304

305

306 **TABLE 2** Descriptive statistics for parameters of breeding soundness evaluation for bulls -

307 Experiment 2

<b>Parameter</b>	<b>n</b>	<b>Mean</b>	<b>SD</b>
<b>Ejaculate color (1–5)</b>	95	2.8	1.0
<b>Ejaculate volume (mL)</b>	95	2.8	2.5
<b>Sperm mass activity (0-4)</b>	58	2.5	1.1
<b>Sperm motility (%)</b>	109	62.5	19.4
<b>Sperm vigor (1-5)</b>	109	3.1	0.9
<b>Sperm viability (%)</b>	110	75.1	24.5
<b>Sperm normal morphology (%)</b>	110	84.8	13.8
<b>Scrotal circumference (cm)</b>	110	37.6	3.1
<b>Live weight (kg)</b>	95	601.0	64.8

**TABLE 3** Correlations among the activity of the Paraoxanase 1 (PON1) enzyme and parameters of breeding soundness evaluation for bulls - Experiment 2\*

Parameter	n	Serum PON1	P	Seminal plasma PON1	P
Ejaculate color (1-5)	95	-0.03	0.76	0.27	< 0.01
Ejaculate volume (mL)	95	0.20	< 0.05	0.17	0.10
Sperm mass activity (0-4)	58	0.10	0.46	0.27	0.04
Sperm vigor (1-5)	109	0.03	0.78	0.28	< 0.01
Sperm viability (%)	110	0.04	0.70	0.24	< 0.01
Normal sperm morphology (%)	110	-0.14	0.15	-0.12	0.12
Scrotal circumference (cm)	110	-0.10*	0.30	-0.03*	0.76
Body live weight (kg)*	95	-0.14	0.18	-0.02	0.84

\*Pearson's coefficient. All other correlations were determined using the Spearman's coefficient for non-parametric data.

#### 4 Considerações Finais

A avaliação da fertilidade dos reprodutores a partir da utilização dos testes atualmente disponíveis no exame andrológico proporciona limitada correlação com a fertilidade *in vivo*.

No primeiro artigo, os valores estimados para a herdabilidade apresentaram magnitude moderada a superior, demonstrando que é possível a obtenção de ganhos genéticos a partir da seleção. A predição de valores genéticos utilizando informações genômicas pelos métodos índice de seleção e *single-step* possibilitou ganhos de acurácia. Os resultados obtidos, nas populações avaliadas, indicam que a SG pode ser utilizada como ferramenta para melhorar os ganhos genéticos e reduzir o intervalo de gerações.

Com base nos resultados do segundo artigo, podemos verificar que as PON 1, 2 e 3 são expressas no parênquima testicular dos animais analisados. Além disso, observou-se expressão da PON 2 e 3 na cabeça do epidídimo, e PON 3 na cauda do epidídimo. A PON1 apresentou correlações positivas entre a atividade no soro e no plasma seminal com características reprodutivas avaliadas *in vitro* durante o exame andrológico.

Além da SG, com base nos genótipos disponíveis, é possível a avaliação de regiões do genoma associadas com a característica estudada através de Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS). A partir dos resultados obtidos será possível ampliar o entendimento sobre regiões do genoma e genes associados com a característica. Quanto às paraoxonases, os dados sugerem que estudos mais robustos sejam realizados como avaliação do nível de ROS e antioxidantes totais associados a indicadores de fertilidade *in vivo* (taxa de não retorno ao cio ou taxas de prenhez). Desta forma, será possível a avaliação destas como marcadoras de fertilidade de touros.

A partir dos resultados obtidos e estudos sugeridos será possível a obtenção de informações relevantes sobre marcadores associados com características de fertilidade dos touros.

## Referências

ASBIA- **Associação Brasileira de Inseminação Artificial**. Relatório Index ASBIA 2014. ASBIA. Uberaba. 35p, 2015.

ATTIA, S.; KATILA, T.; ANDERSSON, M. The effect of sperm morphology and sire fertility on calving rate of Finnish Ayrshire AI bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v.51, p.54–58, 2016.

AL-MAKHZOOMI, A.; LUNDEHEIM, N.; HAARD, M.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Sperm morphology and fertility of progeny-tested AI dairy bulls in Sweden. **Theriogenology**, v.70, p.682–691, 2008.

BARTH, A. D.; OKO, R. J. **Abnormal morphology of bovine spermatozoa**. Iowa State University Press, Ames, p.130–192, 1989.

BARRANCO, I.; ROCA, J.; TVARIJONAVICIUTE, A.; RUBER, M.; VICENTE-CARRILLO, A.; ATIKUZZAMAN, M.; CERON, J. J.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Measurement of activity and concentration of Paraoxonase 1 (PON-1) in seminal plasma and identification of PON-2 in the sperm of boar ejaculates. **Molecular Reproduction and Development**, v.82, p.58–65, 2015a.

BARRANCO, I.; TVARIJONAVICIUTE, A.; PEREZ-PATIÑO, C.; ALKMIN, D.V.; CERON, .J. J.; MARTINEZ, E. A.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H.; ROCA, J. The activity of paraoxonase type 1 (PON-1) in boar seminal plasma and its relationship with sperm quality, functionality, and in vivo fertility. **Andrology**, v.3, p.315–320, 2015b.

BIONAZ, M.; TREVISI, E.; CALAMARI, L.; LIBRANDI, F.; FERRARI, A.; BERTONI, G. Plasma Paraoxonase, health, inflammatory conditions, and liver function in transition dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v.90, p.1740–1750, 2007.

BYRNE, K.; LEAHY, T.; MCCULLOCH, R.; COLGRAVE, M. L.; HOLLAND, M. K. Comprehensive mapping of the bull sperm surface proteome. **Proteomics**, v.12, p. 3559–3579, 2012.

BOICHARD, D.; DUCROCQ, V.; CROISEAU, P.; FRITZ, S. Genomic selection in domestic animals: Principles, applications and perspectives. **Comptes Rendus Biologies**, v.339, p.274–277, 2016.

BOLIGON, A. A.; SILVA, J. A. V.; SESANA, R. C.; SESANA, J. C.; JUNQUEIRA, J. B.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimation of genetic parameters for body weights, scrotal circumference, and testicular volume measured at different ages in Nelore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.1215-1219, 2010.

CBRA. **Procedimentos para exame andrológico e avaliação de sêmen animal**. 3ª. Ed. Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013. 104 p.

CHENOWETH, P. J.; BALL, L. Breeding soundness evaluation in bulls. In: MORROW, D.A. **Current Therapy in Theriogenology**. W. B. Saunders Company, 1980, p.330-339.

COE, P. H.; GIBSON, C. D. Adjusted 200-day scrotal size as a predictor of 365-day scrotal circumference. **Theriogenology**, v.40, p.1065–1072, 1993.

CORBET, N. J.; BURNS, B. M.; JOHNSTON, D. J.; WOLCOTT, M. L.; CORBET, D. H.; VENUS, B. K.; LI, Y.; MCGOWAN, M. R.; HOLROYD, R. G. Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. **Animal Production Science**, v.53, p.101–113, 2013.

DEDEOGLU, N.; ARSLAN, M.; ERZENGIN, M. Purification of Holstein Bull Semen Paraoxonase 1 (PON1) by Hydrophobic Interaction Chromatography and Investigation of Its Inhibition Kinetics by Heavy Metals. **Biological Trace Element Research**, v.158, p.29–35, 2014.

ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C.; GIBBS, R. A., et al. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science**, v.24, p.522-8, 2009.

FOOTE, R. H. Fertility estimation: a review of past experience and future prospects. **Animal Reproduction Science**, v.75, p.119–139, 2003.

FITZPATRICK, L. A.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; MILLER, R. G.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.39–49, 2002.

FORDYCE, G.; ENTWISTLE, K.; NORMAN, S.; PERRY, V.; GARDINER, B.;  
 FORDYCE, P. Standardizing bull breeding soundness evaluations and reporting in  
 Australia. **Theriogenology**, v.66, p.1140–1148, 2006.

FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; LISLE, A.; MULLER, T.; ALLEN, J.; DUFF, C.;  
 HOLROYD, R. G.; CORBET, N. J.; BURNS, B. M. Scrotal circumference of  
 Australian beef bulls. **Theriogenology**, v.81, p.805–812, 2014.

FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; HAWKEN, R. J.; BOLORMAA, S.; LEHNERT, S.  
 A. Candidate genes associated with testicular development, sperm quality, and  
 hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in  
 Brahman bulls. **Biology of Reproduction**, v.87, p.1–8, 2012.

FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; KELLY, M.; MCCULLOCH, R.; LEHNERT, S. A.  
 Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth  
 factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. **Andrology**, v.1, p.644–  
 650, 2013.

GARRICK, D. J. The nature, scope and impact of genomic prediction in beef cattle in  
 the United States. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.17, 2011.

GILLAN, L.; KROETSCH, T.; MAXWELL, W. M. C.; EVANS, G. Assessment of *in*  
*vitro* sperm characteristics in relation to fertility in dairy bulls. **Animal Reproduction**  
**Science**, v.87, p.1–8, 2008.

GOSWAMI, B.; TAYAL, D.; GUPTA, N.; MALLIKA, V. Paraoxonase: a multifaceted  
 biomolecule. **Clinica Chimica Acta**, v.410, p.1–12, 2009.

HANCOCK, A. S.; YOUNIS, P. J.; BEGGS, D. S.; MANSELL, P. D.; STEVENSON,  
 M. A.; PYMAN, M. F. An assessment of dairy herd bulls in southern Australia: 1.  
 Management practices and bull breeding soundness evaluations. **Journal of Dairy**  
**Science**, v.99, p.1–15, 2016.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding and**  
**Genetics**, v.124, p.323–330, 2007.

HAYES, B. J.; BOWMAN, P. J.; CHAMBERLAIN, A. J.; GODDARD, M. E. Invited  
 review: Genomic selection in dairy cattle: progress and challenges. **Journal of Dairy**  
**Science**, v.92, p.433–443, 2009.

HAYES, B. J.; LEWIN, H. A.; GODDARD, M. E. The future of livestock breeding: Genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation. *Trends in Genetics*, v.29, n.4, p.206–214, 2013.

HOLROYD, R. G.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; FORDYCE, G.; MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; VANKAN, D. M.; FITZPATRICK, L. A.; JAYAWARDHANA, G. A.; MILLER, R. G. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Animal Reproduction Science*, v.71, p.67–79, 2002.

IBGE. **Produção da Pecuária Municipal. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística** (IBGE). Brasil. v.47, 2015.

KASTELIC, J. P.; THUNDATHIL, J. C. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. *Reproduction in Domestic Animals*, v.43, (Suppl.2), p.368–373, 2008.

KASTELIC, J. P. Understanding and evaluating bovine testes. *Theriogenology*, v.81, p.18–23, 2014.

KEALEY, C. G.; MACNEIL, M. D.; TESS, M. W.; GEARY, T. W.; BELLOWS, R. A. Genetic parameter estimates for scrotal circumference and semen characteristics of line 1 Herefords bulls. *Journal of Animal Science*, v.84, n.2, p.283-290, 2006.

LAZAROS, L. A.; XITA, N. V.; HATZ, I. E. G.; KAPONIS, A. I.; STEFOS, T. J.; PLACHOURAS, N. I.; MAKRYDIMAS, G. V.; SOFITIKIS, N. V.; ZIKOPOULUS, K. A.; GEORGIU, I. A. Association of paraoxonase gene polymorphisms with sperm parameters. *Journal of Andrology*, v.32, p.394–401, 2011.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C. T.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; ALLAN, M. F.; HEATON, M. P.; O'CONNELL, J.; MOORE, S. S.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. *PLoS ONE*, v.4, 2009.

MEUWISSEN, T. H. E.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, v.157, p.1819–1829, 2001.

MACKNESS, B.; DURRINGTON, P. N.; MACKNESS, M. I. Human serum paraoxonase. *General Pharmacology*, v.31, p.329–336, 1998.

MARSILLACH, J.; MACKNESS, B.; MACKNESS, M.; RIU, F.; BELTRÁN, R.; JOVEN, J.; CAMPS, J. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1, 2, and 3 expression in normal mouse tissues. **Free Radical Biology & Medicine**, v.45, p.146–157, 2008.

MARSILLACH, J.; CAMPS, J.; BELTRAN-DEBÓN, R.; RULL, A.; ARAGONES, G.; MAESTRE-MARTÍNEZ, C.; SABENCH, F.; HERNÁNDEZ, M.; CASTILLO, D. D.; JOVEN, J.; MACKNESS, M.; MACKNESS, B. Immunohistochemical analysis of paraoxonases-1 and 3 in human atheromatous plaques. **European Journal of Clinical Investigation**, v.41, p.308-314, 2011.

MCGOWAN, M. R.; BERTRAM, J. D.; FORDYCE, G.; FITZPATRICK, L. A.; MILLER, R. G.; JAYAWARDHANA, G. A.; DOOGAN, V. J.; DE FAVERI, J.; HOLROYD, R. G. Bull selection and use in northern Australia. 1. Physical traits. **Animal Reproduction Science**, v.71, p.25–37, 2002

MENEGASSI, S. R. O.; BARCELLOS, J. O. J.; BORGES, J. B. S.; PERIPOLLI, V.; MCMANUS, C. Causas de reprovação de touros britânicos no exame andrológico. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, p.1032, 2012

MONTALDO, H. H.; CASAS, E.; FERRAZ, J. B. S.; VEGA-MURILLO, V. E.; ROMÁN-PONCE, S. I. Opportunities and challenges from the use of genomic selection for beef cattle breeding in Latin America. **Animal Frontiers**, v.2, n.1, p.27, 2012.

MOURA, A. A.; ANDRADE, C. R.; SOUZA, C. E. A.; RÊGO, J. P. A.; MARTINS, J. A. M.; OLIVEIRA, R. V.; MENEZES, E. B. S. Proteínas do plasma seminal, funções espermáticas e marcadores moleculares da fertilidade. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.35, p.139-144, 2011.

NAGY, S.; JOHANNISSON, A.; WAHLSTEN, T.; IJÄS, R.; ANDERSSON, M.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Sperm chromatin structure and sperm morphology: their association with fertility in AI-dairy Ayrshire sires. **Theriogenology**, v.79, p.1153–1161, 2013.

NG, C. J.; WADLEIGH, D. J.; GANGOPADHYAY, A.; HAMA, S.; GRIJALVA, V. R.; NAVAB, M.; FOGELMAN, A. M.; REDDY, S. T. Paraoxonase-2 Is a Ubiquitously Expressed Protein with Antioxidant Properties and Is Capable of Preventing Cell-mediated Oxidative Modification of Low Density Lipoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, v.276, n.48, p.44444-9, 2001.

NÖTHLING, J. O.; SANTOS, I. P. Which fields under a coverslip should one assess to estimate sperm motility? **Theriogenology**, v.77, p.1686–1697, 2012.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; OLIVEIRA, C. S.; LIMA, V. F. M. H. Assessment of field fertility and several in vitro sperm characteristics following the use of different Angus sires in a timed-AI program with suckled Nelore cows. **Livestock Science**, v.146, p.38–46, 2012.

OLIVEIRA, L. Z.; ARRUDA, R. P.; ANDRADE, A. F. C.; CELEGHINI, E. C. C.; REEB, P. D.; MARTINS, J. P. N.; SANTOS, R. M.; BELETTI, M. E.; PERES, R. F. G.; MONTEIRO, F. M.; LIMA, V. F. M. H. Assessment of in vitro sperm characteristics and their importance in the prediction of conception rate in a bovine timed-AI program. **Animal Reproduction Science**, v.137, p.145–155, 2013.

PALMER, C. W. Management and breeding soundness of mature bulls. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**, v.32, p.479-495, 2016.

PARKINSON, T. J. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. **The Veterinary Journal**, v.168, p.215–229, 2004.

PEDDINTI, D.; NANDURI, B.; KAYA, A.; FEUGANG, J. M.; BURGESS, S. C.; MEMILI, E. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. **BMC Systems Biology**, v.2, p.19, 2008.

PRÉCOURT, L. P.; AMRE, D.; DENIS, M. C.; LAVOIE, J. C.; DELVIN, E.; SEIDMAN, E.; LEVY, E. The three-gene paraoxonase family: physiologic roles, actions and regulation. **Atherosclerosis**, v.214, p.20–36, 2011.

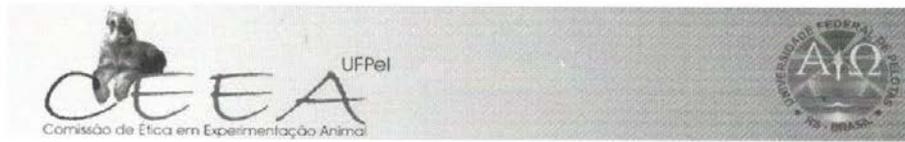
REGO, J. P. A.; CRISP, J. M.; MOURA, A. A.; NOUWENS, A. S.; LI, Y.; VENUS, B.; CORBET, N. J.; CORBET, D. H.; BURNS, B. M.; BOE-HANSEN, G. B.; MCGOWAN, M. R. Seminal plasma proteome of electroejaculated *Bos indicus* bulls. **Animal Reproduction Science**, v.148, p.1–17, 2014.

SAATCHI, M.; MCCLURE, M. C.; MCKAY, S. D.; ROLF, M. M.; KIM, J.; DECKER, J. E.; TAXIS, T. M.; CHAPPLE, R. H.; RAMEY, H. R.; NORTHCUTT, S. L.; BAUCK, S.; WOODWARD, B.; DEKKERS, J. C. M.; FERNANDO, R. L.; SCHNABEL, R. D.; GARRICK, D. J.; TAYLOR, J. F. Accuracies of genomic breeding values in American Angus beef cattle using K-means clustering for cross-validation. **Genetics Selection Evolution**, v.43, p.40, 2011.

SCHAEFFER, L. R. STRATEGY for applying genome-wide selection in dairy cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v.123, p.218–223, 2006.

- TAVILANI, H.; FATTAHI, A.; ESFAHANI, M.; KHODADADI, I.; KARIMI, J.; BAHRAYNI, E.; VATANNEJAD, A.; VAISI-RAYGANI, A.; GHORBANI, M.; LATIFI, Z. Genotype and phenotype frequencies of paraoxonase 1 in fertile and infertile men. **Systems Biology in Reproductive Medicine**; v.60, n.6, p.361–366, 2014.
- THUNDATHIL, J. C.; DANCE, A. L.; KASTELIC, J. P. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. **Theriogenology (in press)**, p.1–9, 2016.
- VAN MELIS, M. H.; ELER, J. P.; ROSA, G. J. M.; FERRAZ, J. B. S.; FIGUEIREDO, L. G. G.; MATTOS, E.; OLIVEIRA, H. N. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy, and stayability in Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, v.88, p.3809–13, 2010.
- WALDNER, C. L.; KENNEDY, R. I.; PALMER, C. W. A description of the findings from bull breeding soundness evaluations and their association with pregnancy outcomes in a study of western Canadian beef herds. **Theriogenology**, v.74, p.871–883, 2010.
- VANRADEN, P. M.; WIGGANS, G. R. Derivation, calculation, and use of national animal model information. **Journal of Dairy Science**, v.74, p.2737-2746, 1991.
- VANRADEN, P. M.; VAN TASSELL, C. P.; WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD, T. S.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; SCHENKEL, F. S. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v.92, p.16–24, 2009.
- VERIT, F. F.; VERIT, A.; CIFTCI, H.; EREL, O.; ÇELIK, H. C. Paraoxonase-1 activity in subfertile men and relationship to sperm parameters. **Journal of Andrology**, v.30, p.183-189, 2009.

**Anexo**



Pelotas, 27 de março de 2015

**De:** Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva

*Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)*

**Para:** Professor Thomaz Lucia Jr

*Faculdade de Veterinária*

Senhor Professor:

A *CEEA* analisou o projeto intitulado: **“Identificação de marcadores moleculares associados a características reprodutivas em touros Hereford e Braford”**, processo nº23110.001943/2015-01, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, considerando ser o assunto pertinente e a metodologia compatível com os princípios éticos em experimentação animal e com os objetivos propostos.

**Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.**

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao Departamento de Pesquisa e Iniciação Científica para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº **CEEA 1943-2015**).

Sendo o que tínhamos para o momento, subscrevemo-nos.

Atenciosamente,

**Prof. Dr. Éverton Fagonde da Silva**

*Presidente da CEEA*

Ciente em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/2015

Assinatura do Professor Responsável:

---