

Universidade de São Paulo  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto  
Departamento de Fisiologia

**PARTICIPAÇÃO DO DNA MITOCONDRIAL NA PRECOCIDADE  
SEXUAL DE BOVINOS MACHOS DA RAÇA NELORE**

**MARCOS FERNANDO OLIVEIRA E COSTA**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, para concorrer ao Título de Doutor, pelo curso de Pós-Graduação em Fisiologia, Área de Concentração: Fisiologia.

Orientadora: Alzira A. M. Rosa e Silva

Ribeirão Preto  
2004

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Costa, Marcos Fernando Oliveira e  
Participação do DNA Mitocondrial na Precocidade Sexual de Bovinos  
Machos da Raça Nelore -- 2004.  
91 p. : il. ; 29cm.

Bibliografia: p. 65-82.

Tese de Doutorado apresentada ao Departamento de Fisiologia –  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São  
Paulo, 2004.

Orient. : Rosa e Silva, Alzira Amélia Martins

Palavras-chave: bovinos, nelore, DNA mitocondrial, polimorfismos,  
precocidade sexual, eixo do crescimento, eixo reprodutivo.

O autor autoriza a reprodução parcial ou total desta obra, desde que citada a fonte.

Projeto realizado com auxílio FAPESP, **processo nº 99/12399-6**.

## **Sumário**

<b>Índice de Tabelas</b>	<b>i</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>ii</b>
<b>Resumo</b>	<b>iii</b>
<b>Abstract</b>	<b>iv</b>
<b>Introdução</b>	<b>1</b>
<b>Revisão da Literatura</b>	<b>4</b>
<b>Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>19</b>
<b>Resultados</b>	<b>29</b>
<b>Discussão</b>	<b>49</b>
<b>Conclusões</b>	<b>63</b>
<b>Referências Bibliográficas</b>	<b>66</b>

## Índice de Tabelas

Tabela 01: Descrição dos animais que fazem parte do trabalho com as respectivas idades em dias ao início dos experimentos.	20
Tabela 02: ANOVA do peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1, de animais de origem mitocondrial taurina e zebuína. Por fontes de variação: fazenda, mtDNA, animal e idade. GL: graus de liberdade.	31
Tabela 03: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 de animais de origem mitocondrial <i>indicus</i> e <i>taurus</i> durante o desenvolvimento sexual. A tabela mostra os coeficientes para os dados gerais calculado para os dois grupos juntos e coeficientes calculados separadamente de acordo com a origem materna. Todos os valores apresentam correlações estatisticamente significantes, $p < 0,0001$ .	38
Tabela 04: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 de animais de origem mitocondrial <i>indicus</i> e <i>taurus</i> durante o desenvolvimento sexual, dos 9 aos 16 meses de idade.	39

## Índice de Figuras

ii

- Figura 01: Visualização em gel de agarose da origem mitocondrial de animais da raça Nelore. Técnica de PCR-RFLP usando enzima de restrição Hind-III. Os números próximos às bandas indicam o RGN dos animais. Indicação de controles negativos e respectivos positivos. 22
- Figura 02: Marcação de testosterona com Iodo<sup>125</sup>. Dois picos são observados, o primeiro se trata de Iodo<sup>125</sup> livre (não ligado), o segundo pico se deve à testosterona marcada. A incorporação do Iodo ao hormônio foi de 75,2% e a atividade específica foi de 16,23  $\mu$ Ci/ $\mu$ g de hormônio. 24
- Figura 03: Titulação testosterona marcada com Iodo<sup>125</sup>. Em azul temos a contagem dos pulsos radiativos (CPM), em vermelho temos a porcentagem de ligação em relação ao total. 25
- Figura 04: Curva Padrão de testosterona marcada com Iodo<sup>125</sup>. Expressa em concentração por porcentagem de ligação. A concentração varia de 6,25 até 5000 pg/tubo. 25
- Figura 05: Curva Padrão de IGF-1 marcada com Iodo<sup>125</sup>. Expressa em concentração por porcentagem de ligação. A concentração varia de 5 até 600 ng/ml. 27
- Figura 06: Idade média de instalação em puberdade de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferente. Os animais com mtDNA *Indicus* apresentaram espermatozoides no ejaculado antes dos animais com mtDNA *taurus* (teste T de Student,  $p < 0,05$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*. 30
- Figura 07: Média  $\pm$  EPM do Peso Corporal médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA *Indicus* apresentaram maior peso corporal (ANOVA,  $p < 0,02$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*. 32
- Figura 08: Média  $\pm$  EPM do Perímetro Escrotal médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA *Indicus* apresentaram maior PE (ANOVA,  $p < 0,001$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*. 32
- Figura 09: Média  $\pm$  EPM do IGF-1 Plasmático médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA *Taurus* apresentaram maior IGF-1 (ANOVA,  $p < 0,02$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*. 33
- Figura 10: Variação diurna das concentrações plasmáticas de testosterona em bovinos machos da raça Nelore de origens maternas diferentes, *taurus* ou *indicus*, durante o período puberal. A concentração de testosterona foi maior no período da manhã nos dois grupos, as 0800 foi maior que as 1200 (ANOVA, seguida de teste de Tukey-Kramer,  $p < 0,05$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*. 34
- Figura 11: Variação diurna das concentrações plasmáticas de IGF-1 em bovinos machos da raça Nelore de origens maternas diferentes, *taurus* ou *indicus*, 34

durante o período puberal. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*.

- Figura 12: Evolução ponderal durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (--□--). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam peso corporal diferentes ( $p < 0,02$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*. 35
- Figura 13: Perímetro escrotal durante o desenvolvimento sexual, 8 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (--□--). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam perímetros escrotais diferentes ( $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*. 35
- Figura 14: Concentrações plasmáticas de Testosterona (ng/ml) durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore de origem materna diferente, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (--□--). A Análise de Variância não detectou diferenças na testosterona plasmática entre animais de diferentes origens mitocondriais. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*. 37
- Figura 15: Concentrações plasmáticas de IGF-1 (ng/ml) durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore de origem materna diferente, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (--□--). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam concentração de IGF-1 plasmático diferente ( $p < 0,06$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*. 37
- Figura 16: Correlação entre peso corporal e perímetro escrotal de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 40
- Figura 17: Correlação entre peso corporal e testosterona plasmática de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 41
- Figura 18: Correlação entre peso corporal e IGF-1 plasmático de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 42
- Figura 19: Correlação entre perímetro escrotal e testosterona plasmática de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 43

- Figura 20: Correlação entre perímetro escrotal e IGF-1 plasmático de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 44
- Figura 21: Correlação entre IGF-1 e testosterona plasmáticos de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson. 45
- Figura 21: Taxa de motilidade espermática progressiva de espermatozóides no ejaculado de animais com origem mitocondrial Taurus e Indicus. Os grupos não apresentaram diferenças significantes entre si. Dados expressos como média + EPM (Teste t de Student,  $p > 0,05$ ). 46
- Figura 23: Concentração de Óxido Nítrico (NO) no sêmen de bovinos da raça Nelore de acordo com a origem mitocondrial e parte do sêmen. **Taurus:** mtDNA taurus, **Indicus:** mtDNA indicus, **T. células:** precipitado celular do sêmen de animais com mtDNA taurus, **I. células:** precipitado celular do sêmen de animais com mtDNA indicus. Dados expressos como média + EPM. 47

# RESUMO

## RESUMO

**COSTA MFO. Participação do DNA Mitocondrial na precocidade sexual de bovinos machos da raça Nelore.** 2004, 83p. Tese de Doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

As mitocôndrias têm função importante na oxidação fosforilativa que produz energia para as células, também é fundamental para a síntese de esteróides, o primeiro e limitante passo da esteroidogênese ocorre dentro da matriz mitocondrial. As mitocôndrias possuem material genético próprio (mtDNA) e transmitem-no por herança materna. Animais de duas linhagens maternas diferentes podem atingir a puberdade em períodos diferentes. Essa diferença pode ser estendida para as diversas variáveis estudadas, na avaliação dos eixos reprodutivo e de crescimento. Variações no mtDNA afetam indiretamente a puberdade, melhorando a taxa de crescimento e podem auxiliar ainda no metabolismo energético do eixo reprodutivo. O objetivo do presente trabalho foi observar como o mtDNA pode afetar a instalação da puberdade em bovinos. Bovinos machos da raça Nelore foram acompanhados dos 8 aos 18 meses de idade a cada duas semanas, para estimativas de peso corporal, perímetro escrotal, amostras de sangue para estimativas de testosterona e IGF-1 plasmáticos e coleta de sêmen para observação do aparecimento do primeiro espermatozóide. No início dos estudos os animais foram divididos em dois grupos de mtDNA diferentes, *taurus* e *indicus*, usando a técnica de PCR-RFLP, usando a enzima de restrição *Hind III* para identificação de polimorfismos. Animais com mtDNA *indicus* atingiram a puberdade 40,2 dias antes que os animais com mtDNA *taurus*. Foram encontradas correlações positivas entre o peso corporal, perímetro escrotal, testosterona e IGF-1 plasmáticos. As variáveis estudadas aumentaram com a idade e a testosterona plasmática foi mais alta pela manhã do que ao meio dia. Não foram encontradas diferenças para os caracteres seminais. Acreditamos que a seleção de reprodutores passa necessariamente por uma avaliação criteriosa da performance reprodutiva dos animais. A indicação de que os animais portadores de mtDNA *indicus* são precoces sexualmente em relação aos animais portadores de mtDNA *taurus* é um resultado importante, tanto do ponto de vista acadêmico-científico, quanto na área de aplicação. Nesse estudo, as associações entre o mtDNA e a puberdade dos animais sugere uma relação da herança materna com os eixos reprodutivo e do crescimento. O mtDNA *indicus* adiantou a instalação da puberdade, aumentou o peso corporal e o perímetro escrotal dos animais comparado ao mtDNA *taurus*. Esses resultados nos permitem propor que este polimorfismo no mtDNA seja um marcador de precocidade sexual para bovinos em condições tropicais.

Palavras-chave: DNA mitocondrial, polimorfismos, bovinos, Nelore, puberdade, precocidade sexual, eixo do crescimento, eixo reprodutivo.

# ABSTRACT

**ABSTRACT**

COSTA MFO. **Role of the Mitochondrial DNA in sexual precocity in Nelore bulls.** 2004, 83p. Doctor Thesis – Faculty of Medicine of Ribeirao Preto, Sao Paulo University, Ribeirao Preto.

The mitochondria have a function in oxidative fosforilation that produces the cell energy, also have a fundamental role in steroid synthesis, the first and limiting step of steroid synthesis occurs at mitochondrial matrix with an enzyme present at inner mitochondrial membrane. Mitochondria have an own genome (mtDNA) and this genome is transferred by maternal inheritance. Two distinct maternal origins (*indicus* and *taurus*) could determine puberty at two different ages. Also this difference should be related to parameter used to evaluate the reproductive and growth axis. Any effect of mtDNA polymorphisms may be exerted indirectly affecting puberty cues, through improve of growth rate. Alternatively, the association of mitochondria with cellular energy metabolism suggests a possible direct effect of mtDNA polymorphism on growth and reproductive axis. The aim of this work was study if the mtDNA could interfere with the onset of puberty in bovines. Nelore bulls (*Bos indicus*) were followed between 8-18 months age biweekly, for body weight, scrotal circumference, blood for plasmatic testosterone and IGF-1, and semen to found the first motile sperm samples. Animals were divided in two groups by mtDNA, *taurus* and *indicus*, with PCR-RFLP techniques with restriction enzyme *Hind III* to polymorphism identification in ND5 region. Animals with maternal origin *indicus* were 40.2 days precocious than animals with mtDNA *taurus*. Were found positive correlations among body weight, scrotal circumference, plasmatic testosterone and IGF-1. Studied variables increased by age, and plasmatic testosterone is higher at morning than at noon. There were not differences between maternal inheritances for seminal characters. In this study, associations between the mtDNA markers and bull puberty suggest a role of maternal inheritance in growth and reproductive axis. The mtDNA *indicus* advanced the onset of the puberty, increased body weight and scrotal circumference, when compared with mtDNA *taurus*. These results permit us propose that this polymorphism in the mtDNA could be a marker to sexual precocity for Nelore bulls, under tropical conditions.

Key-words: Mitochondrial DNA, polymorphisms, Nelore bulls, puberty, sexual precocity, growth axis, reproductive axis.

# INTRODUÇÃO

## I – INTRODUÇÃO

A mitocôndria tem um papel no desenvolvimento e na senilidade dos animais, mantendo as chaves da dinâmica dos ciclos celulares e da disponibilidade energética. O DNA mitocondrial (mtDNA) pode aumentar até 20% do peso corporal em roedores, tanto ao nascer como após o desmame, mostrando-se portanto, responsável em parte pelo desenvolvimento somático (GH e IGF-1 dependentes). Além de diretamente envolvido na disponibilidade energética do organismo, o mtDNA também pode estar associado às alterações no padrão de síntese de esteróides, já que as etapas limitantes da esteroidogênese são realizadas nas mitocôndrias com as enzimas StAR e P450<sub>scc</sub>.

Existem duas linhagens de bovinos, uma oriunda da península ibérica, na Europa, que são conhecidos como gado europeu ou taurino, e, outra oriunda da região da Índia, conhecida como, indiana ou zebuína. Esses animais apresentam características diferentes porque seus ancestrais foram separados em tempos passados. No Brasil existem animais com mtDNA de *Bos taurus* (TT), de *Bos indicus* (II) e de híbridos com associação dos dois (IT). A raça Nelore é uma raça zebuína de origem indiana, mas apesar disso existem indivíduos que apresentam mtDNA taurino, denotando que em alguma fase do desenvolvimento da raça houve cruzamento com animais de raças taurinas, normalmente de machos zebus com fêmeas taurinas, uma vez que o mtDNA é transmitido por herança materna. Portanto, os bovinos da raça Nelore constituem-se bons modelos de estudo para herança mitocondrial, porque apresentam tanto mtDNA de *Bos taurus* como de *Bos indicus*.

Em bovinos de raças européias, *Bos taurus*, a instalação da puberdade ocorre precocemente (14 meses), quando comparados aos animais de raças indianas, *Bos indicus* (24-30 meses). Atualmente, devido à realização de seleção genética e/ou fenotípica em animais *Bos indicus*, esta idade foi drasticamente reduzida para cerca de 15 a 18 meses. Em estudos recentes de nosso laboratório, mostramos que estes animais selecionados apresentam precocidade sexual, caracterizada pela circunferência escrotal maior, pela espermatogênese precoce e pelas concentrações séricas de testosterona, relacionadas com a maturação testicular e espermatogênese, e de IGF-1, associado ao crescimento somático, maiores. A idade média da puberdade

desses animais foi aos 13,6 meses. Aos animais com essas características de precocidade sexual também associou-se viabilidade reprodutiva alta (>40%), concentrações séricas altas de testosterona e concentrações altas de IGF-1.

Se o mtDNA é responsável, mesmo que parcialmente, pelos mecanismos de crescimento e desenvolvimento, e do aumento de peso ao nascer e ao desmame, estaria então a herança materna associada à instalação da puberdade estimada pelos parâmetros peso corporal, circunferência escrotal, produção espermática, concentrações plasmáticas de testosterona e de IGF-1? E à determinação da qualidade de um reprodutor?

Portanto justifica-se assim um estudo que associe características de instalação da puberdade em animais que possuem diferentes tipos de mtDNA.

**REVISÃO**

## II – REVISÃO DA LITERATURA

Acreditamos que a seleção de reprodutores passa necessariamente por uma avaliação criteriosa da performance reprodutiva dos animais. A indicação de que os animais portadores de mtDNA *indicus* são precoces sexualmente em relação aos animais portadores de mtDNA *taurus* é um resultado importante, tanto do ponto de vista acadêmico-científico, quanto na área de aplicação. As diferenças encontradas nas concentrações de testosterona e IGF-1, no peso corporal e no perímetro escrotal em diversas raças bovinas sugerem que pode haver variação nos mecanismos de regulação desses hormônios e conseqüentemente variação nos efeitos, peso e tamanho de testículos (Thomas et al, 2002).

A puberdade é a transição do indivíduo infantil para adulto. Neste período, uma cascata de eventos conduz a maturação do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas, ocorrendo mudanças no perfil hormonal. O eixo passa a secretar gonadotrofinas, o hormônio luteinizante (LH) e o hormônio folículo estimulante (FSH), em resposta ao aumento da pulsatilidade do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH). Este processo fornece um ambiente adequado para que se inicie e estabeleça a androgênese e a espermatogênese, tornando o indivíduo capaz de participar do ciclo reprodutivo da própria espécie (Ojeda & Urbasnski, 1994).

A testosterona é um hormônio esteróide, principal responsável pelas características sexuais masculinas. A síntese e secreção de testosterona se dá principalmente nas gônadas masculinas. A regulação central é integrada no hipotálamo, local que responde pela síntese e secreção de GnRH, que atua na hipófise causando a liberação de gonadotrofinas, o LH e o FSH. As gonadotrofinas são liberadas na circulação e promovem seus efeitos principalmente nas gônadas (no caso do macho nos testículos). Nos testículos, o LH estimula a síntese e secreção de testosterona pelas células de Leydig, já o FSH estimula os eventos de espermatogênese e espermiogênese que levam à produção de espermatozóides (Hall, 1994).

Para que o processo da puberdade seja instalado e garanta uma produção espermática desejada na fase adulta é imprescindível que uma conexão temporal pontual exista entre o desenvolvimento somático e o gonadal. Um importante fator ligado diretamente ao crescimento e desenvolvimento somático do animal é o hormônio do crescimento (GH). O GH, assim como o LH e o FSH, é regulado pelo hipotálamo e é necessário para o desenvolvimento das gônadas masculinas e femininas (Strobl & Thomas, 1994), e participa da modulação das funções do eixo hipotálamo-hipófise-gônadas (Chandrashekar & Bartke, 1998). Após o nascimento, os efeitos do GH são mediados pelo fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1). O GH ao ser liberado pela hipófise ganha a circulação, atuando principalmente no fígado e nos ossos estimulando a produção e liberação de IGF-1 no plasma. O mRNA hepático para IGF-1 está estreitamente correlacionado às concentrações plasmáticas de IGF-1, sugerindo que a produção hepática de IGF-1 determina as concentrações plasmáticas de IGF-1 (Cordano et al, 2000). Este fator responde pela maioria das ações atribuídas ao GH, como os estímulos ao crescimento tecidual e à proliferação celular. O GH ainda age sensibilizando as gônadas para os efeitos do LH e do FSH, pela elevação do IGF-1 circulante ou pelo estímulo da produção local de IGF-1 (Strobl & Thomas, 1994). Nos testículos a regulação da produção de IGF-1 é influenciada pelo LH, pelo FSH e por andrógenos (Spiteri-Grech et al, 1991). A produção testicular de IGF-1 é regulada pelas gonadotrofinas, LH e FSH, que aumentam o conteúdo de mRNA de IGF-1 e de peptídeos, ocorrendo uma cooperação entre as células de Leydig e Sertoli para a secreção de IGF-1 (Saez, 1994). Outra importante relação de IGF-1 com a via da

esteroidogênese foi constatada por Balasubramanian et al (1997), no qual o IGF-1 estimulou a expressão do gene e a produção de mRNA da StAR (Steroidogenic Acute Regulatory Protein) em células de granulosa de suínos. Pode-se notar a estreita relação entre o eixo do crescimento e o eixo reprodutivo.

Fatores extrínsecos podem controlar o IGF-1. A alimentação aumenta tanto o IGF-1 plasmático quanto o receptor 1A hepático (Smith et al, 2002) e o status social pode inibi-lo. Sapolski & Spencer (1997) relataram a diminuição de IGF-1 plasmático de babuínos machos subordinados frente a presença do macho dominante, ou macho alfa.

### **Espermatogênese e Espermio gênese**

O aparelho reprodutor masculino é composto pelos testículos, epidídimos, canais deferentes, uretra e glândulas sexuais acessórias. Os testículos são responsáveis pela produção de espermatozóides e de andrógenos, e possuem uma estrutura enovelada de túbulos seminíferos. Estes túbulos desembocam numa região coletora chamada *rede testis* de onde os espermatozóides se dirigem ao epidídimo, órgão composto por um tubo único extremamente enovelado, constituído de cabeça, corpo e cauda. Durante o trânsito no epidídimo os espermatozóides são maturados, adquirem capacidade de fertilização e são armazenados na cauda até o momento da ejaculação (Sharpe, 1994; Luke & Coffey, 1994).

A espermatogênese é iniciada durante a puberdade como consequência do aumento da secreção do FSH e modificação na secreção de LH (Clermont, 1972, e Kierszenbaum, 1994). É possível que um dos primeiros eventos ocorridos na puberdade seja a proliferação das espermatogônias, provavelmente por controle das células de Sertoli. Esse evento de proliferação e diferenciação das células germinativas e desencadeamento dos processos de meiose é responsável por algumas importantes alterações estruturais: a formação das “tight junctions” pelas células de Sertoli formando os dois compartimentos dos túbulos e a formação da barreira hemato-testicular, e o aparecimento do lúmen devido a secreção de fluido do túbulo seminífero (STF) pelas células de Sertoli que ainda sofrem modificações nucleares e citoplasmáticas, aumentando significativamente de tamanho. Ainda no processo da maturação das células de Sertoli ocorre uma mudança na responsividade destas células, que iniciam

dependendo de FSH, e depois passam a depender de testosterona. Na preparação para essa troca de resposta, o próprio FSH parece ter um papel importante na determinação do número apropriado de células de Leydig, para que ocorra a produção das quantidades altas de testosterona (Sharpe, 1994).

O controle local da espermatogênese é realizado por uma fina interação célula-célula dos três principais tipos celulares dos testículos: Sertoli, Leydig e células da linhagem espermática. Essa regulação é responsável pela produção e utilização da testosterona e pelos complexos mecanismos de sinalização intratesticulares (Sharpe et al, 1990). Algumas interações e sinalizações entre as células de Sertoli e células de Leydig já foram observadas. Antes da puberdade (Matsuzaki et al, 2001) e durante o desenvolvimento normal do animal, as células de Sertoli secretam quantidades maiores de inibina, colaborando com a inibição das secreções de LH e FSH na hipófise (Kaneko et al, 2001).

As mitocôndrias das células germinativas iniciam a diferenciação na espermiogênese, a matriz mitocondrial se torna difusa e vacuolizada. As espermátides em diferenciação também perdem a “heat shock protein” 60 (hsp60), sugerindo uma provável deficiência nos mecanismos de importação de proteínas. Ao contrário de outras células em que a mitocôndria possui várias cópias do mtDNA, no espermatozóide maduro há apenas uma única cópia por organela (Cummins, 1998). As células germinativas da linhagem espermática ainda participam ativamente na regulação da produção do fluido intratubular, principalmente pela interação das espermátides alongadas com as células de Sertoli (Sharpe et al, 1991).

### **Puberdade Precoce, Esteroidogênese e Mitocôndrias**

Fatores relacionados diretamente ao crescimento corporal ou ao desenvolvimento sexual podem determinar que um indivíduo alcance precocemente a maturidade sexual. Entender os eventos que ocorrem na puberdade são essenciais para compreensão da regulação destes fatores, podendo assim adicionar novos parâmetros para a seleção de animais para precocidade sexual. Indivíduos precoces iniciam a vida reprodutiva mais cedo, por isso têm uma vida útil reprodutiva mais longa

e terão mais chances de deixarem descendentes com essas características de precocidade. Esse processo de redução da idade da puberdade pode diminuir os custos de produção de matrizes e reprodutores. Ainda do ponto de vista da produção, indivíduos precoces poderão atingir mais cedo o peso para o abate, diminuindo o tempo de criação, otimizando os recursos das propriedades, levando ao aumento da produção de carne, tanto pelo aumento do número de crias quanto pelo menor tempo em que os animais poderão ser destinados para o abate.

Os esteróides, no macho em especial a testosterona, estimulam o crescimento corporal e atuam como agentes anabólicos (entre outros efeitos, acarretando o ganho de massa muscular). Os andrógenos respondem pelo desenvolvimento e manutenção da genitália externa e interna, pelo aparecimento das características sexuais secundárias, pelo desenvolvimento do sistema músculo-esquelético e também atuam no eixo hipotálamo-hipófise regulando as síntese e secreção de GnRH, LH e FSH através de inibição por retroalimentação (Saez, 1994). Além disso, os andrógenos atuam diretamente nos testículos estimulando a espermatogênese, fazendo com que as concentrações intratubulares se mantenham extremamente altas, o que é imprescindível para o transcorrer da espermatogênese e da espermiogênese (Saez, 1994).

Dentro da célula, o processo de conversão dos esteróides é iniciado na mitocôndria. O colesterol atravessa a membrana da organela e sofre transformações bioquímicas até a formação de pregnenolona (Hall, 1994). Há na mitocôndria uma proteína chamada de StAR (Steroid Acute Regulatory Protein), que transporta o colesterol da membrana externa para a interna desta organela, colocando em disponibilidade o colesterol para que a enzima P 450<sub>scc</sub> converta-o em pregnenolona (Stocco, 1997). Atualmente considera-se esta a etapa limitante da produção de testosterona no macho e de estradiol na fêmea. A partir dessa fase as reações são transferidas da mitocôndria para os microsossomos para completar a síntese androgênica (Hall, 1994).

Já observamos a importância do papel da mitocôndria na esteroidogênese, contudo a função mais conhecida dessa organela é a de fosforilação oxidativa

(OXPHOS), indispensável para a respiração e sobrevivência da célula. Toda alteração nesta organela pode levar a modificações no metabolismo. Algumas situações acarretam aumento ou perda na produção energética da célula, podendo também levar ao aparecimento de doenças degenerativas. Além da fosforilação oxidativa, a mitocôndria é uma fonte de radicais livres, que são diretamente implicados no envelhecimento e em mutações no mtDNA, que está situado dentro do compartimento da mitocôndria imerso na matriz mitocondrial e não possui nenhum mecanismo de proteção contra os radicais livres (Simonetti et al, 1992). Outra função importante observada na mitocôndria é a iniciação da apoptose, que começa através da abertura do canal da membrana interna, o poro de permeabilidade transitória da mitocôndria (mtPTP), causando assim um colapso do potencial de membrana e a liberação dos fatores promotores da morte celular como o citocromo B, a flavoproteína AIF (fator indutor de apoptose) e as caspases (Wallace, 1999). Isso sem mencionar a função da síntese de vitamina D<sub>3</sub> e do armazenamento de Ca<sup>++</sup> intracelular (Meirelles, 1999).

Após a descoberta do mtDNA e da disponibilização de técnicas de sequenciamento e manipulação, tornou-se possível analisar as funções dos genes mitocondriais e identificar os seus mutantes. O efeito da função mitocondrial pela fosforilação oxidativa e produção de energia é inegável para garantir as características produtivas de qualquer celular animal, mas permanece controverso o fato de que alguma parte do mtDNA possa exercer algum efeito relevante diretamente sobre alguma característica produtiva dos mamíferos. Diversos trabalhos com a raça Holandesa citam o efeito do genoma citoplasmático sobre a variação na produção leiteira (1,5 % a 12,5% de variação na produção), a produção de gorduras (1,8% a 4,1% de variação na percentagem de gorduras) e sobre a produção de carne (Huizinga et al. 1986; Schultz et al. 1993). Entretanto, ao efeito citoplasmático somam-se os efeitos do mtDNA, do ambiente uterino e alguns outros eventos ao nascimento (Reed & Van Vleck, 1987).

### **Codificação Genética e Mitocôndrias**

A maioria das mitocôndrias sofre divisão principalmente durante a interfase por se tratar da fase mais longa do ciclo celular que antecede a divisão celular. Em uma

célula em divisão, o número de mitocôndrias passa a existir em dobro para voltar ao normal após a citocinese. No mtDNA são raras as regiões que não estão implicadas em codificar informações para a síntese protéica (Attardi, 1985).

O mtDNA possui cerca de 16.500 pares de base e, nos mamíferos em geral, a molécula de mtDNA assemelha-se ao genoma circular encontrado nos procariontes. Normalmente, o mtDNA está na forma monomérica nos mamíferos, mas também pode apresentar-se concatenado (Piko & Taylor, 1987).

O mtDNA codifica para 13 polipeptídios participantes da reação de OXPHOS, 2 RNAs ribossômicos e 22 tRNAs que participam da síntese de polipeptídios mitocondriais. A regulação da replicação do mtDNA parece estar sob controle do ciclo celular. Uma só onda de replicação acontece durante as fases S e G2 do ciclo celular (Crews et al, 1979). A meia vida do genoma mitocondrial nas células hepáticas de camundongos é de 15 dias, sendo que o processo de divisão da organela é semelhante ao processo de cissiparidade dos procarióticos (Bogenhagen & Clayton, 1977).

A  $\delta$  DNA polimerase realiza a replicação do genoma organelar e leva cerca de 90 minutos para terminar sua função (Hixson et al, 1986). A taxa de mutação do mtDNA é de 5 a 10 vezes superior a descrita para o DNA nuclear (Brown, 1982). Essa vulnerabilidade pode ser devido à ação pouco confiável da  $\delta$  DNA polimerase (Bolden et al, 1977) ou ainda pela suscetibilidade a agentes mutagênicos, tais como radicais livres formados na respiração celular, os peróxidos (Allen & Coombs, 1980). Associado a todos esses fatores ainda observa-se uma deficiência nos mecanismos de recombinação do DNA e uma inabilidade de eliminar dímeros de pirimidina (Clayton 1975).

A herança materna do mtDNA é um evento ainda desconhecido, mas algumas hipóteses vêm sendo aventadas, como o efeito de diluição de 1:1000 no qual as mitocôndrias do espermatozóide, cerca de 100 mitocôndrias, se diluem no ovócito que possui cerca de  $10^5$  mitocôndrias (Gyllesten et al, 1985). A segregação durante as clivagens no óvulo, a deficiência por estresse oxidativo das mitocôndrias do espermatozóide, ou até mecanismos de defesa intracelulares (Meirelles, 1999). São outras hipóteses, além do gargalo genético ocorrido durante as primeiras divisões do

ciclo celular (Hauswirth & Laipis, 1985), embora tenha sido sugerido que o gargalo genético seja restrito ao mtDNA durante a replicação e multiplicação das células primordiais (Jenuth, 1997). Potanto, a herança mitocondrial é na maioria das vezes de origem materna, com algumas modificações (Meirelles, 1999). Sutovsky et al (2000) lançaram a hipótese de que o motivo de ocorrer segregação das mitocôndrias paternas é que durante a espermatogênese ocorre a ubiquitinação dessas organelas, e, na fertilização, o óvulo usaria a ubiquitina para como marcador para eliminar as mitocôndrias paternas restando apenas as de origem materna.

### **Aplicação do modelo de Transferência de Núcleo e Citoplasto**

A reconstituição de zigotos por transferência de carioplasto e de citoplasto mostrou que apesar de transferir 10 a 15% de citoplasma a frequência de mtDNA nos tecidos adultos foi de apenas 1% (Smith & Alcivar, 1993). Em outro modelo semelhante para o estudo da transmissão de haplótipos em múltiplas gerações, notou-se que a heteroplasmia encontrada em pelo menos um tecido ou órgão da geração fundadora, era transmitida para a geração seguinte formando indivíduos heteroplásmicos ou homoplásmicos, mostrando diferentes caminhos da segregação entre tecidos e progênes (Meirelles & Smith, 1997).

Esses estudos mostram claramente a necessidade de se avançar nas pesquisas da relação núcleo-citoplasma e na relação genoma nuclear e mtDNA, pois só assim tornarão viáveis e aplicáveis novas técnicas de terapia gênica, citoplasmática ou nuclear, possibilitando a correção de falhas genéticas graves e tornando viável a reprodução de indivíduos que normalmente não poderiam fazê-lo.

A terapia gênica pode ser realizada pelo transplante de núcleo ou citoplasto, ou pela transferência de genes. Qualquer destas técnicas de base teórica semelhante, nos abrem um campo infinito de possibilidades. Algumas aplicações já são bem conhecidas, como nas vacas e cabras modificadas para secretarem no leite produtos biológicos desejados como a insulina. Pode-se ainda pensar na manipulação ou introdução de genes selecionados, por exemplo, para animais de produção que levariam ao aumento na taxa do crescimento e no aumento do ganho de peso. Isso realmente já foi testado,

mas conjuntamente a esses efeitos esperados ocorreram várias seqüelas devido à falta de controle, organização e regulação dos eventos e da secreção de fatores de crescimento (Nancarrow et al, 1991). Uma tentativa semelhante se deu com outros animais transgênicos, em que o aumento na expressão do fator de crescimento, no caso o IGF-1, se deu apenas no músculo esquelético, mas os altos custos acabam inviabilizando a utilização do processo em escala comercial (Nottle et al, 1998). A baixa eficiência da tecnologia atual para a geração de produtos transgênicos é um fator limitante. O custo final na produção de animais transgênicos para uso comercial é contraposto ao potencial benefício econômico da utilização dos animais a serem utilizados. Contudo, apesar destes contras, em breve no início do século 21 os animais transgênicos deverão fazer parte da agricultura comercial (Murray, 1999).

Informações sobre a biologia mitocondrial apresenta uso imediato na verificação do “background” mitocondrial de animais derivados de oócitos reconstruídos por transplante de núcleo, e claro, a avaliação da herança materna, pelo mtDNA, possibilitando assim o acompanhamento da linhagem materna. Uma outra aplicação mais nobre desta tecnologia seria no uso da clonagem para recuperação de espécies raras ou extintas por transplante de núcleo usando oócitos de espécies correlatas (Smith et al, 2000).

Outros estudos têm avaliado a viabilidade de reconstrução de embriões interespecies pela fusão de fibroblastos de pele de vacas, ovelhas, porcos, macacos e ratos em oócitos bovinos enucleados. Esses resultados podem possibilitar transplantes de núcleos de espécies raras ou extintas para espécies não correlatas ou de maior número e de mais fácil manejo (Smith et al, 2000).

O transplante de citoplasto tem potencial aplicação na medicina e na pesquisa básica com propostas de melhorar a competência e desenvolvimento de oócitos, aumentando a capacidade metabólica durante o desenvolvimento e como terapia gênica para doenças baseadas no mtDNA (Smith et al, 2000). Em breve, quando os estudos avançarem mais, todas essas metodologias e possibilidades serão viabilizadas, e, em um futuro um pouco mais distante (mas não muito) poderíamos esperar que apenas a imaginação fosse o limite.

### **Produção Animal e Associação com Mitocôndrias**

A entrada de bovinos no Brasil data da época da colonização. Inicialmente foram trazidos animais de origem européia, advindos da Península Ibérica (*Bos taurus*), mais tarde houve diversas importações de animais da Índia (*Bos taurus indicus*). No total foram importadas da Índia sete mil cabeças em diversas épocas. Atualmente o rebanho de origem indiana é estimado em mais de sete milhões de cabeças (Magnabosco et al, 1997). Essa multiplicação só poderia ser realizada com cruzamentos absorventes, o mais provável é que se tenha utilizado touros *B. indicus* em vacas não indianas ou híbridas. Assim, espera-se que no Brasil tenhamos animais da raça Nelore com mitocôndrias de origem européia e indiana. Esta suspeita foi confirmada por Meirelles et al (1997) ao encontrar animais da raça Nelore, puros de origem (PO) e puros de origem importada (POI), com mtDNA para as duas subespécies. A partir daí, animais da raça Nelore passaram a constituir uma excelente opção de modelo para estudo da herança mitocondrial nos mamíferos. Animais da raça Nelore, puros ou mestiços, mostraram-se bem adaptados à região do Brasil central e com um grande potencial de fecundação (Silva et al, 1991).

Recentemente em camundongos com mitocôndrias de subespécies diferentes, demonstrou-se um efeito mitocondrial na resistência a corridas até à exaustão e em outras características como peso ao nascer e ao desmame. Essas últimas transportadas para a produção pecuária indicam um provável efeito mitocondrial de grande importância do ponto de vista econômico, uma vez que peso ao nascer e ao desmame, associadas a outros caracteres, são informações valiosas que podem auxiliar tanto na escolha de crias maiores e mais precoces, quanto apontar quais reprodutores tem capacidade maior de transmitir precocidade aos seus descendentes (Nagao et al, 1997).

Pelas características de criação de bovinos adotada nacionalmente, buscam-se reprodutores adaptados às adversidades de clima que apresentem alta produtividade. Para atender a esses interesses, os animais devem apresentar performance reprodutiva elevada. No macho, alta performance significa grande produção de espermatozoides viáveis, aliada a maior capacidade de disseminação desse potencial, quer seja pela

inseminação artificial ou monta natural, com intuito de atingir taxas de fertilização aumentadas. A estratégia de produção varia em cada propriedade e determina o perfil do reprodutor desejado. As taxas de fertilização são diretamente influenciadas pela hiperativação espermática (batimentos de cauda mais vigorosos) e pela reação de capacitação acrossomal (Wang et al, 1993), apresentando correlação elevada com a porcentagem de espermatozoides normais e com a taxa de motilidade espermática progressiva (Duncan et al, 1993).

Costa (1999) estudou bovinos da raça Nelore em diferentes programas de suplementação alimentar. Comparando com os animais que não receberam suplementação com concentrado protéico, os animais que receberam concentrado protéico apresentaram peso corporal e circunferência escrotal maiores, mostraram ainda, concentrações séricas aumentadas de IGF-1 e de testosterona, hormônios importantes para a puberdade. Ainda neste estudo, os animais que apresentaram a taxa de motilidade progressiva acima de 40% obtiveram maiores: peso corporal, circunferência escrotal, concentrações séricas de IGF-1 e testosterona, e, concentração de espermatozoides normais no ejaculado. Os animais desse estudo apresentaram puberdade precoce, aos 13,6 meses de idade, quando comparados aos 18 meses encontrados em estudos anteriores (Silva et al, 1988).

Esses resultados indicaram que a raça Nelore apresenta uma potencialidade para a precocidade sexual. Essa é a raça bovina mais difundida no Brasil, portanto mais relevante economicamente. A raça Nelore reúne condições interessantes para esse estudo de precocidade sexual em duas subpopulações de animais com origem mitocondrial diferentes. Portanto, se faz necessário à realização de estudos mais detalhados para a compreensão dos eventos ligados a puberdade e os fatores que a influenciam.

# OBJETIVOS

### III - OBJETIVOS

Estudar, durante o desenvolvimento sexual, a influência do mtDNA na determinação da data da instalação da puberdade em animais separados pelo mtDNA em *Bos taurus* (TT) e *Bos taurus indicus* (II). Neste período avaliaremos:

- data do aparecimento do primeiro espermatozóide no ejaculado;
- o peso corporal e perímetro escrotal;
- os parâmetros seminais (motilidade, concentração de óxido nítrico);
- as concentrações plasmáticas de IGF-1;
- as concentrações plasmáticas de testosterona;

# MÉTODOS

#### IV- MATERIAL E MÉTODOS

##### 1- Animais:

Foram utilizados animais de duas fazendas de seleção e criação de reprodutores. As fazendas se localizam no Estado de São Paulo, nos municípios de Serrana e Barretos. Foi realizado contato prévio com os proprietários que aprovaram os protocolos e colocaram as estruturas das fazendas a disposição para realização dos experimentos.

Inicialmente foram realizadas coletas de sangue para determinação do mtDNA em cerca de 300 animais com idade variando de 2 a 07 meses de idade. Os animais foram mantidos em sistemas de manejo próprio em cada fazenda. Durante o período do experimento, em cada fazenda separadamente, os animais dos dois grupos, portadores de mtDNA *taurus* e portadores de mtDNA *indicus* foram mantidos unidos e submetidos ao mesmo manejo na fazenda.

Após essa análise, os animais foram classificados de acordo com a origem materna. Todos animais portadores de mtDNA *indicus* encontrados foram escolhidos e, os animais portadores de mtDNA *taurus* nascidos no mesmo dia. Quando isso não foi possível, foram escolhidos os animais nascidos o mais próximo possível dos *indicus*. Os

animais foram classificados em dois grupos, portadores de mtDNA *taurus* e portadores de mtDNA *indicus*. Os grupos foram formados por três animais *indicus* e seis animais *taurus* na fazenda 01 e por três animais *indicus* e cinco animais *taurus* na fazenda 02. A relação dos animais com as respectivas origens maternas, data de nascimento e idade em dias ao início do experimento estão na tabela 01.

Tabela 01: Descrição dos animais que fazem parte do trabalho com as respectivas idades em dias ao início dos experimentos.

RGN	NOME	mtDNA	NASC	IDADE INICIO
36	Gigante do Brumado	<b><i>taurus</i></b>	04/08/00	333
45	Gentil do Brumado	<b><i>taurus</i></b>	07/08/00	330
74	Granado do Brumado	<b><i>taurus</i></b>	20/08/00	317
78	Grafite do Brumado	<b><i>indicus</i></b>	21/08/00	316
108	Guri do Brumado	<b><i>indicus</i></b>	16/09/00	290
110	Gás do Brumado	<b><i>indicus</i></b>	18/09/00	288
122	Gongo do Brumado	<b><i>taurus</i></b>	26/09/00	280
123	Gestor do Brumado	<b><i>taurus</i></b>	28/09/00	278
EBO9081	Hebraico da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	03/09/00	255
EBO9082	Hético da Fazendinha	<b><i>indicus</i></b>	03/09/00	255
EBO9083	Heleno da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	03/09/00	255
EBO9163	Horóscopo da Fazendinha	<b><i>indicus</i></b>	20/11/00	177
EBO9164	Horus da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	20/11/00	177
EBO9165	Horse da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	22/11/00	175
EBO9182	Hubli da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	20/12/00	147
EBO9184	Holman da Fazendinha	<b><i>indicus</i></b>	21/12/00	146
EBO9185	Hábil da Fazendinha	<b><i>taurus</i></b>	25/12/00	142

## 2- Procedimento experimental para análise de mtDNA:

Foram coletados de cada animal uma amostra de 4,5 ml de sangue com auxílio de vacuntainer, homogeneizadas e mantidas em refrigeração até o início das análises do mtDNA.

As análises foram realizadas nos laboratórios de Biologia Molecular do Departamento de Genética – FMRP-USP, sob responsabilidade do professor Dr. Raysildo Barbosa Lobo e do Departamento de Reprodução Animal da FCAVJ – UNESP, sob responsabilidade do professor Dr. Joaquim Mansano Garcia, seguindo o mesmo protocolo, descrito resumidamente a seguir.

Foram utilizados 0,5 ml de sangue coletados em tubos com EDTA e as hemácias foram lisadas com uma solução de Lise Hemácia (12mM Tris HCl PH 8.2 0,32M Sucrose, 5mM EDTA e 1% de Triton 100X). As células brancas peletizadas foram digeridas com proteinase K por 3 horas e as proteínas precipitadas com uma solução de NaCl 5M. O sobrenadante foi transferido para um outro tubo e o DNA total precipitado com adição de etanol absoluto.

Para a amplificação e digestão dos fragmentos ND5 e 12S/16S, utilizou-se um fragmento de 755 pares de base da região ND5 do mtDNA (posição de 11770 à 12525 acordo com Andersen et al, 1982) e um fragmento de 773 pares de base da região contendo parte do rRNA 12 o tRNA Valina e parte do rRNA 16S (posição 817 á 1590, Andersen et al, 1982) foram amplificados á partir de 0,2µg de DNA inicial, 0,02µg de mtDNA, numa reação final de 100µl. A reação total consistiu em 10mM de tris HCl (pH 8,3), 50mM KCl, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 2 200µg de cada Dntp, 100pmol de cada oligonucleotídeo iniciador (primer) e 2,5U de taqDNA polimerase. O PCR foi realizado em 35 ciclos de desnaturação a 94° Celsius, anelamento a 64°C e expansão a 72°C. A seqüência de primer utilizada será mtF1 5'CCCAACGAGGAAAATATACC3' e mtR1 5'AACCGCAAACAACCTCTTCC3' para o fragmento do ND5 e mtF2 5'AGCCGACGCACTATAGCTA3' e mtR2 5' TCATCGTTCCCTTGCGGTAC3' para a região do gene 12S, tRNAval e 16S.

Os fragmentos amplificados foram digeridos com as enzimas de restrição *Hind*-III e *Bam*-HI respectivamente, em tampão PCR por 3 horas e visualizados em gel de agarose para determinar a origem da mitocôndria do animal analisado. O mtDNA de

origem *Bos taurus* pode ser diferenciado pela criação de um sítio *Hind*-III na região amplificada do gene ND5, que neste animal produz duas bandas de 407 e 348 pares de base cada, ou pela perda de um sítio de restrição *Bam*-HI na região 12S/16S que da origem a uma banda única enquanto os zebuínos possuem duas bandas de tamanhos aproximados mas não determinados (Meirelles et al, 1997).

Na figura 01 podemos ver um exemplo de um gel de agarose após extração, amplificação e digestão do mtDNA dos animais estudados (PCR-RFLP).

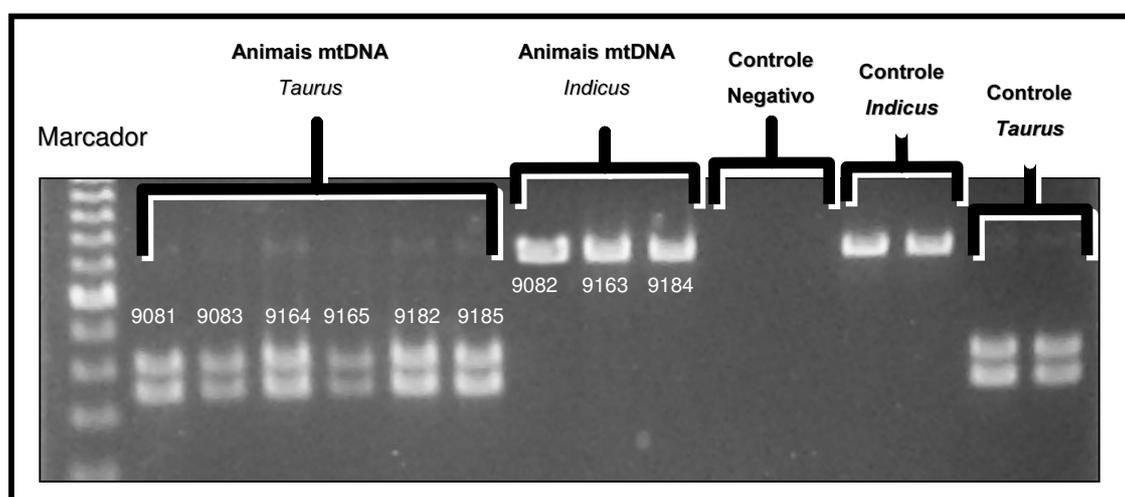


Figura 01: Visualização em gel de agarose da origem mitocondrial de animais da raça Nelore. Técnica de PCR-RFLP usando enzima de restrição *Hind*-III. Os números próximos às bandas indicam o RGN dos animais. Indicação de controles negativos e respectivos positivos.

### 3 – Determinação da data da puberdade e análise do sêmen

Uma vez selecionados, os animais foram acompanhados quinzenalmente com coleta de sangue e medidas de peso corporal e perímetro escrotal. Quando o perímetro escrotal estava próximo de 19 cm, iniciaram-se as tentativas de coleta de sêmen com auxílio de um eletroejaculador, até que fosse encontrado o primeiro espermatozóide viável no ejaculado, sendo esta considerada a data da puberdade dos animais.

O sêmen foi coletado com auxílio de um funil plástico acoplado a tubo graduado, para análise de aspecto, coloração e volume do ejaculado. Durante a ejaculação foram coletadas algumas gotas de sêmen, em uma lâmina previamente preparada (limpa e aquecida), para verificação da presença de espermatozóides, avaliação da motilidade e vigor. A motilidade a fresco foi avaliada levando-se em conta a presença de espermatozóides e a proporção dos que apresentavam movimentos, utilizando uma escala de porcentagem de 0 % (se nenhuma célula apresenta movimento) a 100% (se todos os espermatozóides se movimentam progressivamente).

No dia subsequente, ou até no máximo na semana seguinte ao aparecimento do primeiro espermatozóide (variou devido às atividades das propriedades que não poderiam ser alteradas), procedeu-se nos animais com espermatozóide positivo, a coleta seriada de sangue. A partir de 8:00 horas, foram realizadas cinco coletas de sangue com intervalo de duas horas para avaliação do perfil diurno de secreção hormonal.

#### 4 - Dosagens Hormonais:

Para dosagem de testosterona seguimos método de radioimunoensaio de duplo anticorpo padronizado em nosso laboratório (Rosa e Silva, 1999). Para a marcação da testosterona radioativa temos resumidamente: oxida-se 10 mg de testosterona TME com Cloramina T (2%) por 45 segundos a temperatura ambiente, a reação foi encerrada com o redutor metabissulfito de sódio (10%), após a marcação foi feita a separação em gel de Sephadex G25-fine obtendo 75,2% de incorporação de iodo radiativo ao hormônio e uma atividade e específica de 16,23  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de hormônio, foi escolhido o tubo 10 para os ensaios e os demais foram estocados a  $-20^{\circ}\text{C}$  (figura 02). Foi realizada a titulação do anticorpo de 1:5.000 até 1:40.000, foi escolhido o título de 1:15.000, o que mais se aproximou da faixa de ligação desejada, 25 até 40% (figura 03). Obtivemos então, uma Curva Padrão onde foram processadas as amostras de testosterona no plasma dos animais, uma curva para cada ensaio (exemplo na figura 04). A testosterona foi extraída do plasma com éter sulfúrico destilado, após evaporação os tubos foram lavados com tampão fosfato gelatina 0,05M. As amostras extraídas foram incubadas com anticorpo de coelho anti-testosterona, anticorpo de cabra anti-anticorpo

de coelho e a testosterona marcada com iodo<sup>125</sup> por 16 a 18 horas. Cada ensaio foi centrifugado por 20 minutos a 2.500RPM a 4°C, o sobrenadante foi aspirado e descartado o precipitado foi contado em contador Gama Packard-Bell. A variação intra-ensaio foi de 7,1% e a variação inter-ensaio foi de 3,64%.

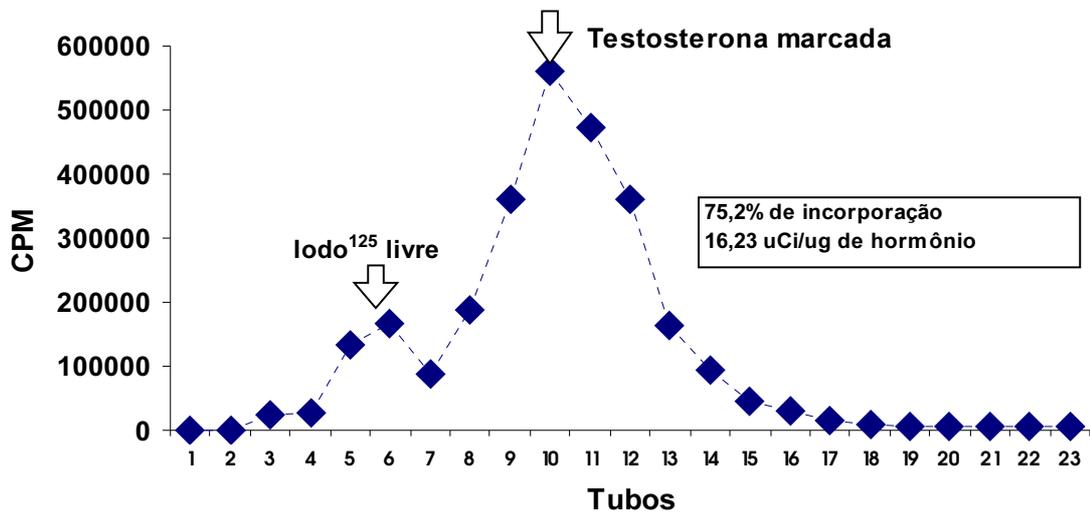


Figura 02: Marcação de testosterona com iodo<sup>125</sup>. Dois picos são observados, o primeiro se trata de iodo<sup>125</sup> livre (não ligado), o segundo pico se deve à testosterona marcada. A incorporação do iodo ao hormônio foi de 75,2% e a atividade específica foi de 16,23  $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$  de hormônio.

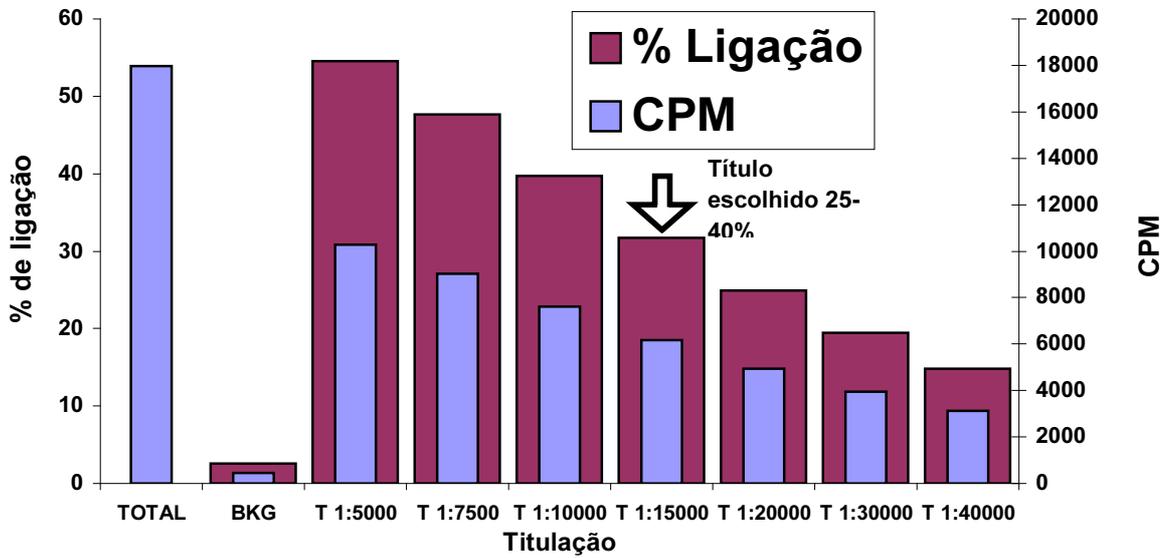


Figura 03: Titulação testosterona marcada com Iodo<sup>125</sup>. Em azul temos a contagem dos pulsos radiativos (CPM), em vermelho temos a porcentagem de ligação em relação ao total.

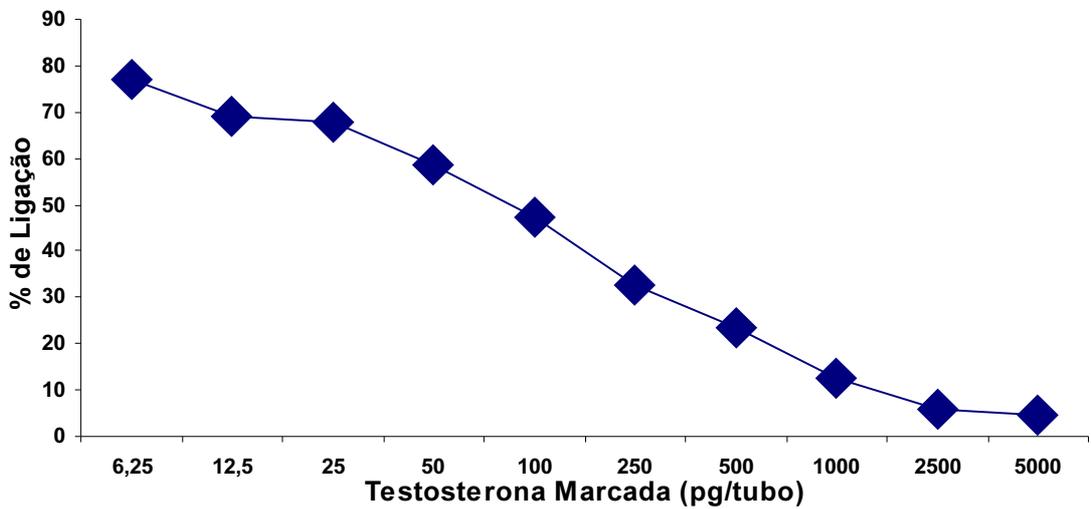


Figura 04: Curva Padrão de testosterona marcada com Iodo<sup>125</sup>. Expressa em concentração por porcentagem de ligação. A concentração varia de 6,25 até 5000 pg/tubo.

As dosagens de IGF-1 seguiram método padronizado em nosso laboratório (Costa, 1999) usando kit comercial DSL 5600 (Webster, Tx, USA). Após descongelamento e homogeneização das amostras, foi retirada uma alíquota de 50 µl de cada amostra e colocadas em tubos de 1,5 ml do tipo *ependorff*. Adicionou-se 200 µl de solução de extração (solução etanólica de ácido clorídrico), homogeneizando e incubando por 30 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Com auxílio de uma microcentrífuga os tubos foram centrifugados a 10.000 rpm por 3 minutos, à temperatura ambiente (25°C). Foram transferidos 100 µl do sobrenadante para um segundo tubo, adicionando-se 500 µl de solução de neutralização (tampão neutralizante com azida sódica como preservante) e agitando-se gentilmente para evitar a formação de espuma.

Para a realização do IRMA, 50 µl da amostra neutralizada foram pipetados nos tubos contendo anticorpos anti-IGF-1 na parede, imediatamente foi adicionado o reagente anti IGF-1 [ $I^{125}$ ] em cada tubo, agitados gentilmente e incubados à temperatura ambiente por três horas, em um agitador, a cerca de 180 rpm. Os tubos foram vertidos em recipiente para rejeitos radiativos, e as bordas limpas para evitar contaminação. Cada tubo foi lavado por três vezes com 3 ml de água mili-Q. As amostras foram analisadas em contador Gama, por 1 minuto, com auxílio de curva padrão para cada ensaio com os padrões 0, 5, 20, 65, 210 e 600 ng/ml (figura 05). A variação intra-ensaio foi de 2,31% e a variação inter-ensaio foi de 1,86%.

#### 5 – Análises estatísticas:

Os resultados foram analisados com auxílio do programa SAS (Statistic Analysis System, versão 8.02 TS, SAS Institute, Cary, NC, USA). Foram realizados testes de normalidade para todas as variáveis. Os dados de concentrações plasmáticas dos hormônios não apresentaram distribuição normal e foram convertidos para:  $\log_{10}(\text{valor } Y)$ . Em seguida a normalização dos dados hormonais, foi realizada Análise de Variância multivariada (ANOVA), que considerou significativas as diferenças onde o nível de significância foi menor do que 6% (valores de “p” menores estão indicados nos respectivos resultados). A interação entre o peso corporal, o perímetro escrotal, as

concentrações séricas de testosterona e IGF-1 foi obtida pelo coeficiente de correlação de Pearson, que considerou significativa as interações onde  $p < .06$ .

Para a análise das diferenças entre a data da instalação da puberdade e entre as taxas de motilidade espermática progressiva foi utilizado teste  $t$  de Student, considerando significantes as diferenças em que  $p < .06$ . A taxa de motilidade espermática progressiva também não apresentou distribuição normal, foi convertida para:  $\arcsen(\text{valor de } y/100)$  e só então analisada pelo teste descrito.

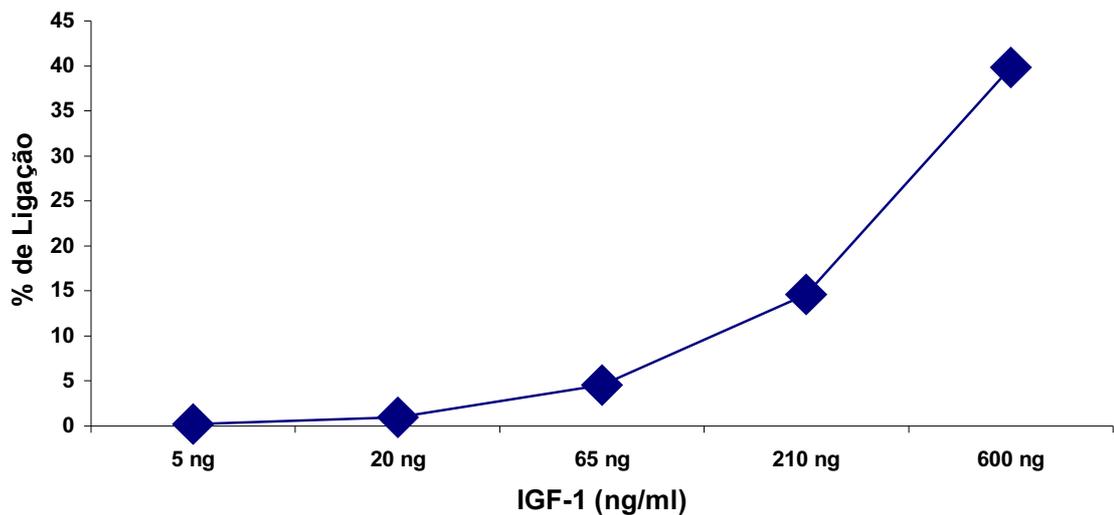


Figura 05: Curva Padrão de IGF-1 marcada com Iodo<sup>125</sup>. Expressa em concentração por porcentagem de ligação. A concentração varia de 5 até 600 ng/ml.

# RESULTADOS

## V - RESULTADOS

Segundo nosso conhecimento, nossos resultados mostram pela primeira vez na literatura que o DNA mitocondrial é determinante da idade da puberdade (analisada pelo aparecimento do primeiro espermatozóide no ejaculado). Os animais com origem mitocondrial Indicus foram em média 40,2 dias mais precoces do que os animais com origem mitocondrial Taurus. Essa diferença foi estatisticamente significativa ( $p < 0,05$ , figura 06).

A ANOVA das variáveis: peso, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 em função da origem mitocondrial, fazenda, animal e idade está representada na tabela 02. Quanto maior o valor de "F" mais significativa é a alteração, desde que o valor de "p" seja menor que 6%.

Observamos que a origem mitocondrial altera o peso dos animais ( $p = 0,0157$ ), o perímetro escrotal ( $p < 0,0001$ ) e as concentrações plasmáticas de IGF-1, que são variáveis ligadas ao eixo de crescimento e ao eixo reprodutivo (figuras 7 a 9). Observamos também que o manejo diferenciado nas duas propriedades estudadas pode interferir no peso, no perímetro escrotal e nas concentrações plasmáticas de testosterona e de IGF-1 ( $p < 0,0001$ ). As outras análises nos indicam que tanto existe diferença entre os animais ( $p < 0,0001$ ) e que no decorrer da idade ( $p < 0,001$ ) as variáveis estudadas aumentam.

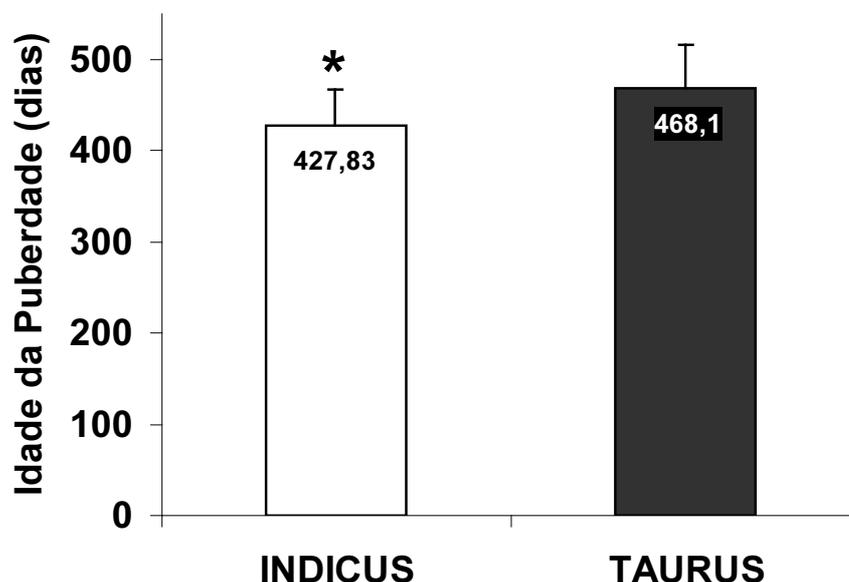


Figura 06: Idade média de instalação em puberdade de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferente. Os animais com mtDNA Indicus apresentaram espermatozoides no ejaculado antes dos animais com mtDNA taurus (teste T de Student,  $p < 0,05$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

As concentrações plasmáticas de testosterona variaram durante o dia, com um pico matutino, um declínio até o meio do dia e aumenta novamente ao final do dia (figura 10). As concentrações de IGF-1 não apresentaram flutuações significativas ao longo do dia (figura 11). A origem materna não influenciou na produção e secreção desses hormônios ao longo do dia (ANOVA,  $p > 0,06$ ).

Nas curvas de evolução ponderal (figura 12) e de desenvolvimento do perímetro escrotal (figura 13) de acordo com duas origens mitocondriais, observamos que, independente da origem materna, os animais apresentam um aumento de peso e aumento do perímetro escrotal com o aumento da idade. Animais com mtDNA indicus apresentam desenvolvimento ponderal e de perímetro escrotal maiores que os animais com mtDNA taurus ( $p < 0,02$ ), fatores que podem estar implicados na puberdade precoce dos animais mtDNA indicus.

Tabela 02: ANOVA do peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1, de animais de origem mitocondrial taurina e zebuína. Por fontes de variação: fazenda, mtDNA, animal e idade. GL: graus de liberdade.

	Variáveis	GL	Valor de F	Probabilidade
PESO CORPORAL	Fazenda	1	5358,38	<0,0001
	MtDNA	1	5,92	0,0157
	Animal	14	120,93	<0,0001
	Idade	13	225,36	<0,0001
	Erro	238	-	-
PERÍMETRO ESCROTAL	Fazenda	1	1614,24	<0,0001
	MtDNA	1	28,13	<0,0001
	Animal	14	44,26	<0,0001
	Idade	11	110,71	<0,0001
	Erro	238	-	-
TESTOSTERONA PLASMÁTICA	Fazenda	1	87,96	<0,0001
	MtDNA	1	0,50	0,4786
	Animal	9	7,44	<0,0001
	Idade	13	2,87	0,0009
	Erro	171	-	-
IGF-1 PLASMÁTICO	Fazenda	1	152,31	<0,0001
	MtDNA	1	3,77	0,0535
	Animal	10	29,36	<0,0001
	Idade	13	23,08	<0,0001
	Erro	214	-	-

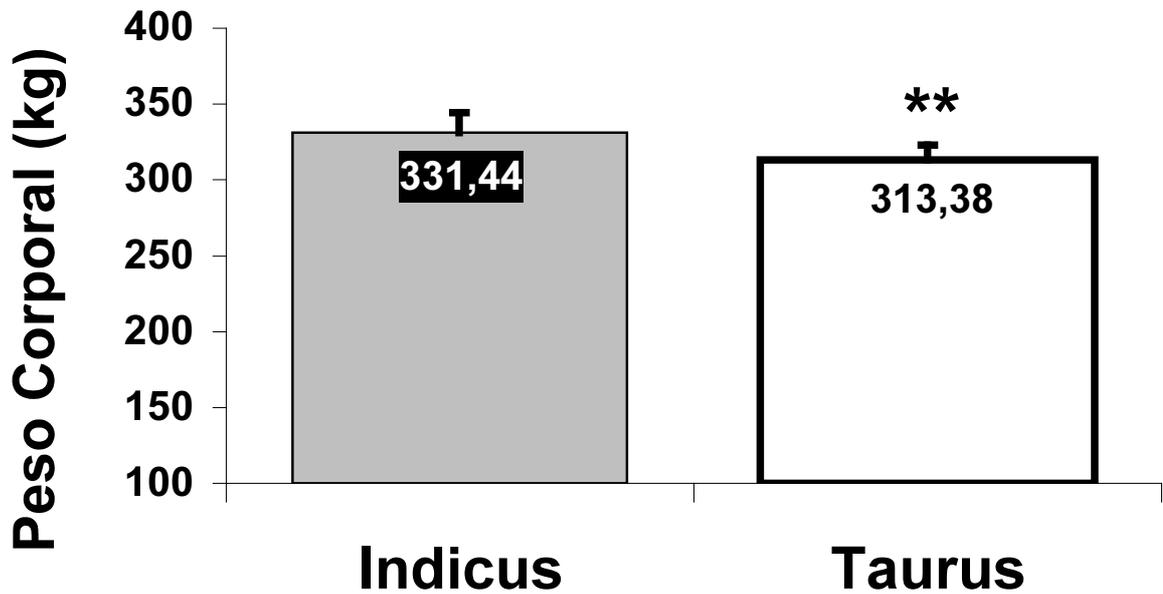


Figura 07: Média  $\pm$  EPM do Peso Corporal médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA Indicus apresentaram maior peso corporal (ANOVA,  $p < 0,02$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

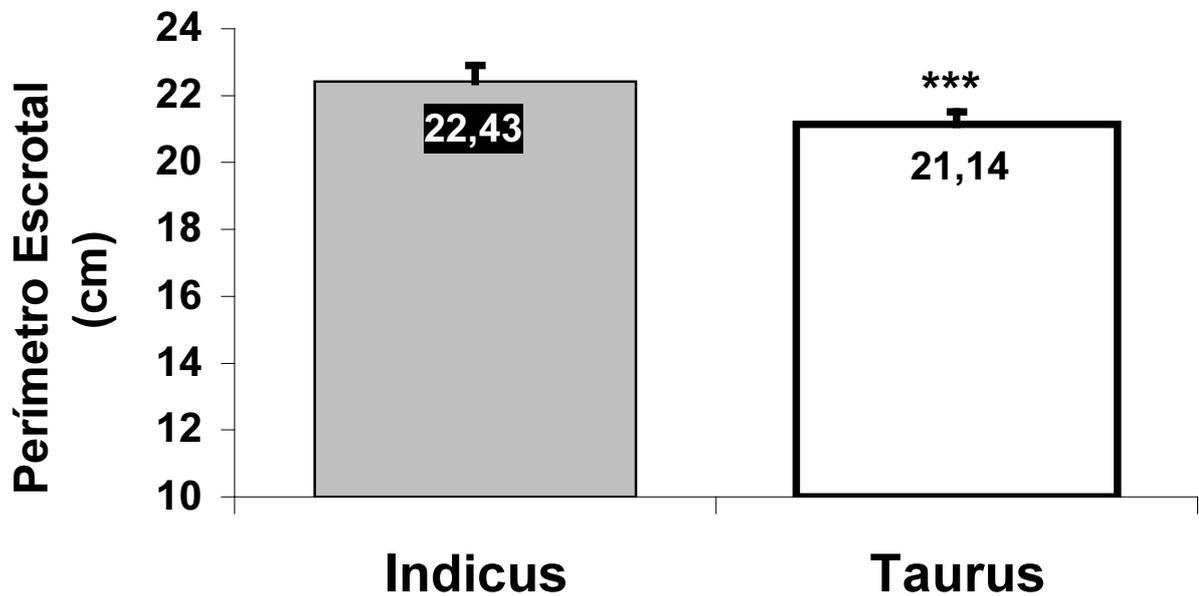


Figura 08: Média  $\pm$  EPM do Perímetro Escrotal médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA Indicus apresentaram maior PE (ANOVA,  $p < 0,001$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

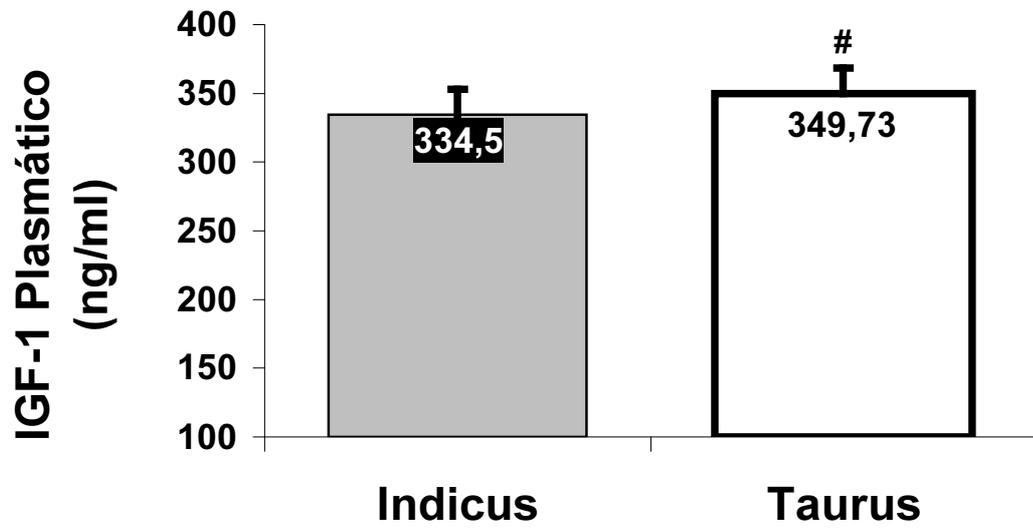


Figura 09: Média  $\pm$  EPM do IGF-1 Plasmático médio de bovinos da raça Nelore de origem mitocondrial diferentes. Os animais com mtDNA Taurus apresentaram maior IGF-1 (ANOVA,  $p < 0,02$ ).  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

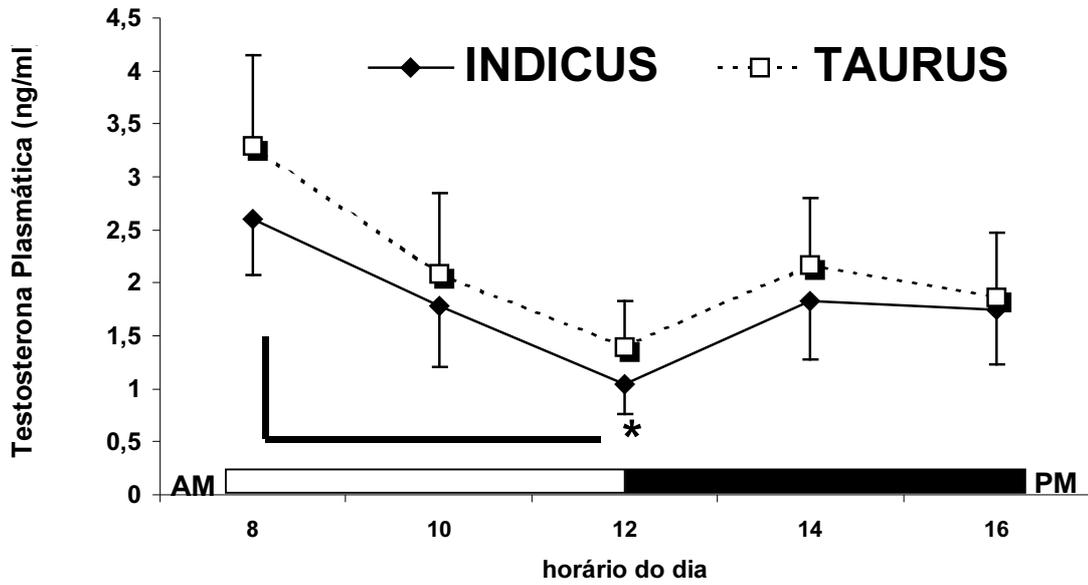


Figura 10: Variação diurna das concentrações plasmáticas de testosterona em bovinos machos da raça Nelore de origens maternas diferentes, *taurus* ou *indicus*, durante o período puberal. A concentração de testosterona foi maior no período da manhã nos dois grupos, as 0800 foi maior que as 1200 (ANOVA, seguida de teste de Tukey-Kramer,  $p < 0.05$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

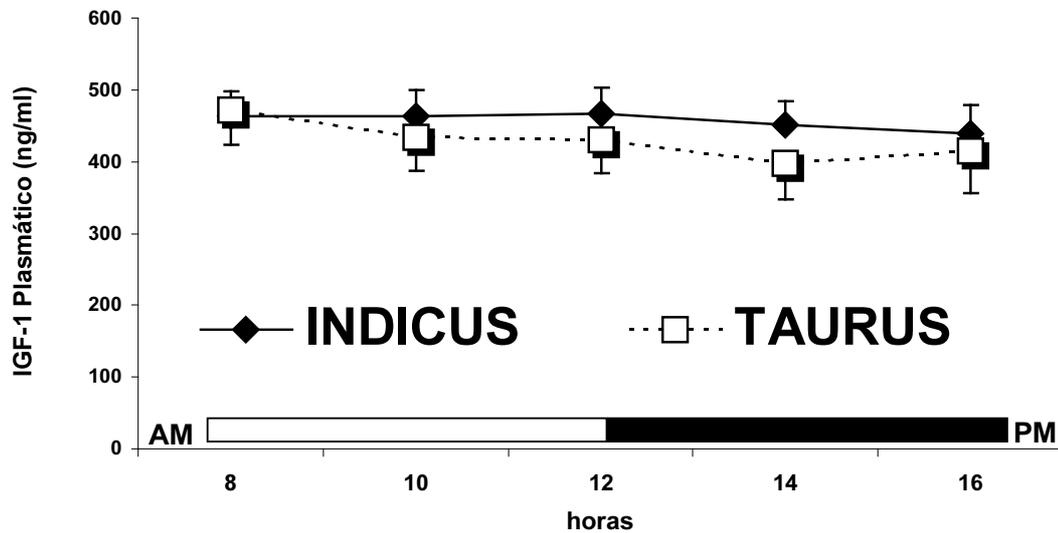


Figura 11: Variação diurna das concentrações plasmáticas de IGF-1 em bovinos machos da raça Nelore de origens maternas diferentes, *taurus* ou *indicus*, durante o período puberal. Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

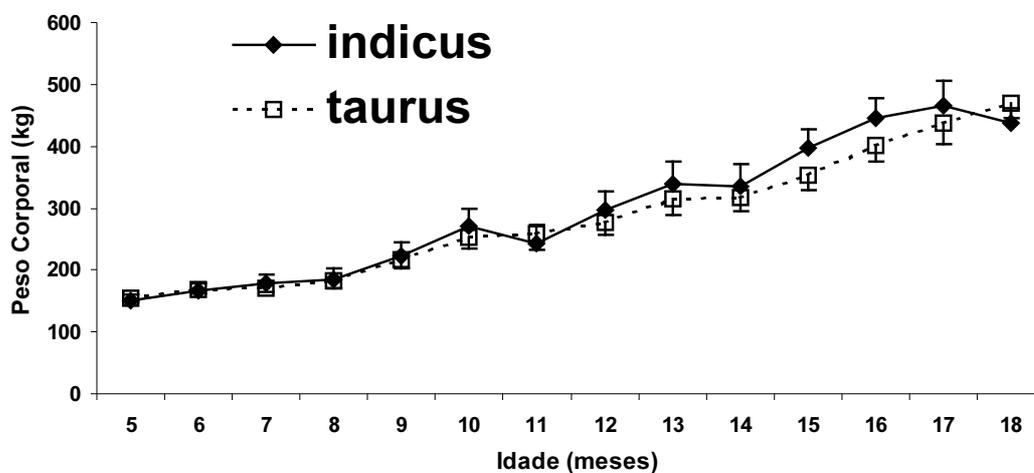


Figura 12: Evolução ponderal durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (- -□- -). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam peso corporal diferentes ( $p < 0,02$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

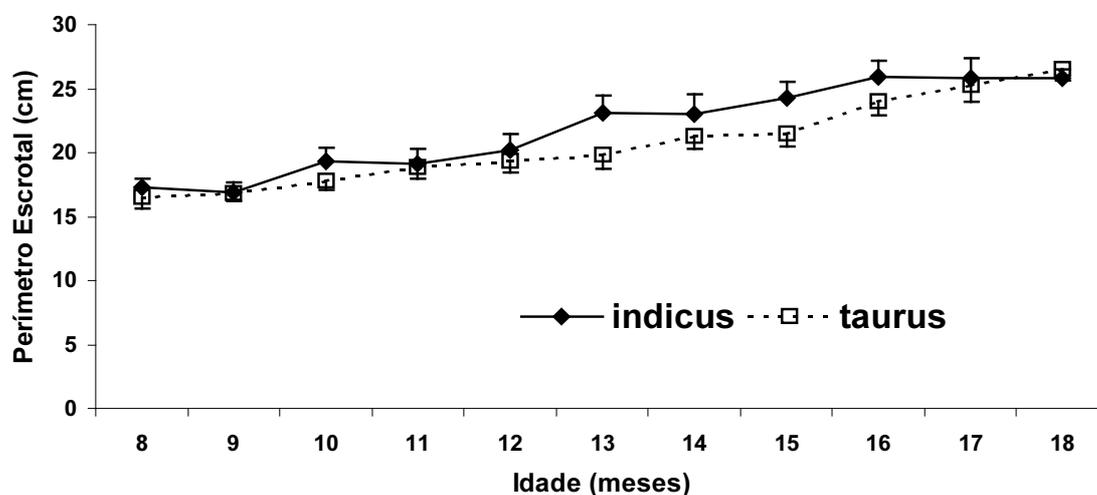


Figura 13: Perímetro escrotal durante o desenvolvimento sexual, 8 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (- -□- -). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam perímetros escrotais diferentes ( $p < 0,0001$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM,  $n=6$  *indicus*,  $n=8$  *taurus*.

As concentrações plasmáticas de testosterona (figura 14) aumentaram a partir dos 8 meses de idade ( $p < 0,0001$ ) até aproximadamente os 15 meses de idade. Apesar do aumento nos animais com mtDNA *indicus* ser mais regular não foi observada nenhuma diferença significativa entre os animais de origem materna diferente.

As concentrações plasmáticas de IGF-1 (figura 15) também aumentaram a partir dos 8 meses de idade ( $p < 0,0001$ ), com um pico discreto aos nove meses, atingindo o platô um pouco mais cedo, por volta dos 13 meses de idade. Foi observada diferença entre as origens materna com 6% de significância.

A tabela 03 apresenta as correlações entre peso, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1. O valor do coeficiente de correlação de Pearson (R) pode variar de  $-1$  até  $+1$ . Quanto mais esse coeficiente se aproxima do valor máximo mais perfeita é a relação das variáveis, se for positivo a relação é de aumento conjunto das duas variáveis, se for negativo a relação indica que se uma variável aumenta a outra diminui. Temos que levar em conta também a probabilidade do teste, quanto menor o “p” (alfa) maior a probabilidade do teste estar correto, foram desconsideradas todas as correlações em que alfa foi maior que 6%.

A relação entre o peso e o perímetro escrotal foi muito alta e positiva, isto é, próxima a  $+1$ , indicando que para um determinado aumento de peso temos um aumento do perímetro escrotal conjuntamente. As outras variáveis mostraram um valor de R menor, mas ainda assim são valores altos. Quando observamos um aumento do peso observamos aumento nas concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1. O aumento do perímetro escrotal leva ao aumento da testosterona e do IGF-1 plasmáticos. A última relação é talvez a mais importante por se tratar de uma relação endócrina, quando a testosterona plasmática aumenta o IGF-1 plasmático aumenta conjuntamente. Observamos ainda, que o coeficiente de correlação de Pearson (R) foi maior para os animais de origem mitocondrial *indicus* quando comparados aos animais *taurus*.

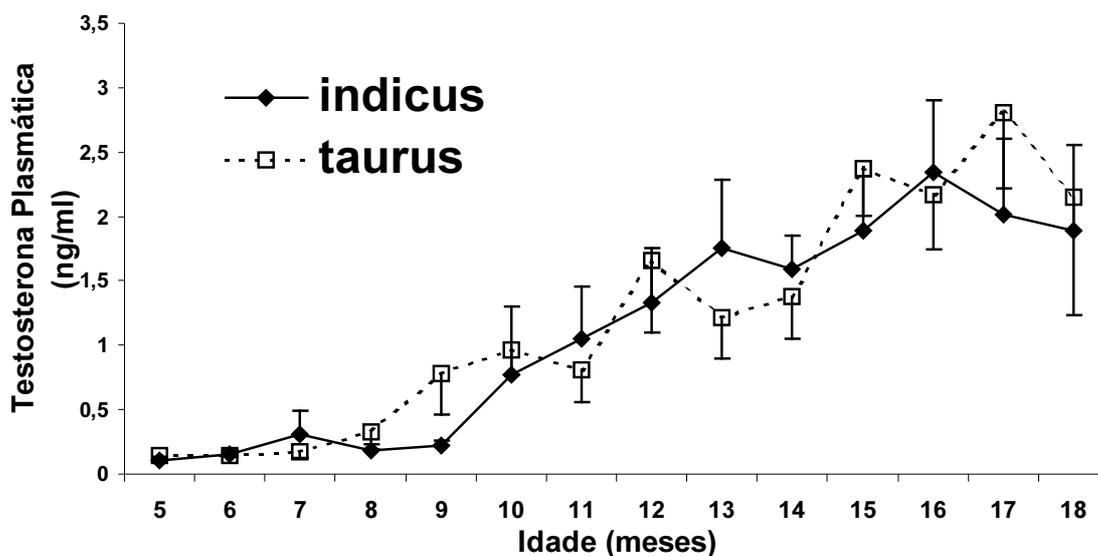


Figura 14: Concentrações plasmáticas de Testosterona (ng/ml) durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (---□---). A Análise de Variância não detectou diferenças na testosterona plasmática entre animais de diferentes origens mitocondriais. Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*.

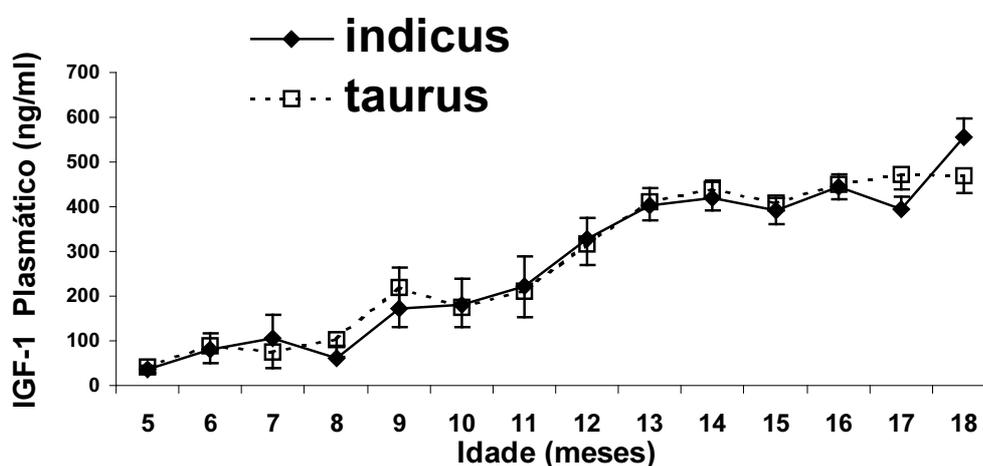


Figura 15: Concentrações plasmáticas de IGF-1 (ng/ml) durante o desenvolvimento sexual, 5 a 18 meses de idade, em bovinos machos da raça Nelore com origens maternas diferentes, mtDNA *indicus* (—◆—) ou *taurus* (---□---). A Análise de Variância demonstrou que animais de diferentes origens mitocondriais apresentam concentração de IGF-1 plasmático diferente ( $p < 0,06$ ). Dados expressos como média  $\pm$  EPM, n=6 *indicus*, n=8 *taurus*.

Tabela 03: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 de animais de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A tabela mostra os coeficientes para os dados gerais calculado para os dois grupos juntos e coeficientes calculados separadamente de acordo com a origem materna. Todos os valores apresentam correlações estatisticamente significantes,  $p < 0,0001$ .

	Geral	Taurus	Indicus
	Peso		
Perímetro Escrotal	0,963	0,967	0,960
Testosterona Plasmática	0,629	0,546	0,721
IGF-1 Plasmático	0,739	0,691	0,797
	Perímetro Escrotal		
Testosterona Plasmática	0,576	0,470	0,694
IGF-1 Plasmático	0,648	0,536	0,799
	Testosterona		
IGF-1 Plasmático	0,737	0,521	0,610

A tabela 04 apresenta as correlações entre peso, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1, nas diversas idades dos animais. Analisando inicialmente a totalidade da tabela, observamos que as correlações entre todas as variáveis se mantêm elevada em todas as idades. O Peso Corporal foi a variável que melhor correlacionou com as demais, apresentou uma forte e constante correlação positiva com o perímetro escrotal durante todo o período de desenvolvimento analisado. O peso corporal apresentou também correlação positiva, de moderada a forte, com as concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 na maioria das idades. A correlação entre perímetro escrotal, testosterona e IGF-1 plasmáticos também variou de moderada a forte na maior parte das idades avaliadas.

Tabela 04: Valores dos coeficientes de Pearson para as correlações entre peso corporal, perímetro escrotal, concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 de animais de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual, dos 9 aos 16 meses de idade.

	Idade Meses							
	9	10	11	12	13	14	15	16
	Peso Corporal							
PE	0,85***	0,92***	0,95***	0,94***	0,95***	0,95***	0,94***	0,96***
T	0,82**	ns	0,83**	0,85***	0,78**	0,51**	ns	0,42*
IGF	0,87**	0,68**	ns	0,81**	0,51*	ns	0,62**	ns
	Perímetro Escrotal							
T	ns	0,56**	0,72**	0,68**	0,65**	0,58**	ns	0,42*
IGF	0,70**	0,74**	0,75**	0,78**	0,51*	ns	0,51**	ns
	Testosterona							
IGF	0,74**	0,66**	0,82**	0,79***	0,49*	ns	ns	ns

PE : perímetro escrotal;

T: concentrações plasmáticas de testosterona;

IGF: concentrações plasmáticas de IGF-1;

\*\*\*p <0,0001, \*\*p <0,02, \*p <0,06;

ns: não significativo, p>0,06.

As figuras 16 a 21 mostram as correlações entre as variáveis estudadas, temos: estudando os dois grupos juntos: geral (A) e de acordo com a origem mitocondrial. Podemos notar que os três coeficientes são bastante parecidos, apesar dos animais com mtDNA indicus (B) apresentarem um coeficiente de correlação maior que os animais com mtDNA taurus (C).

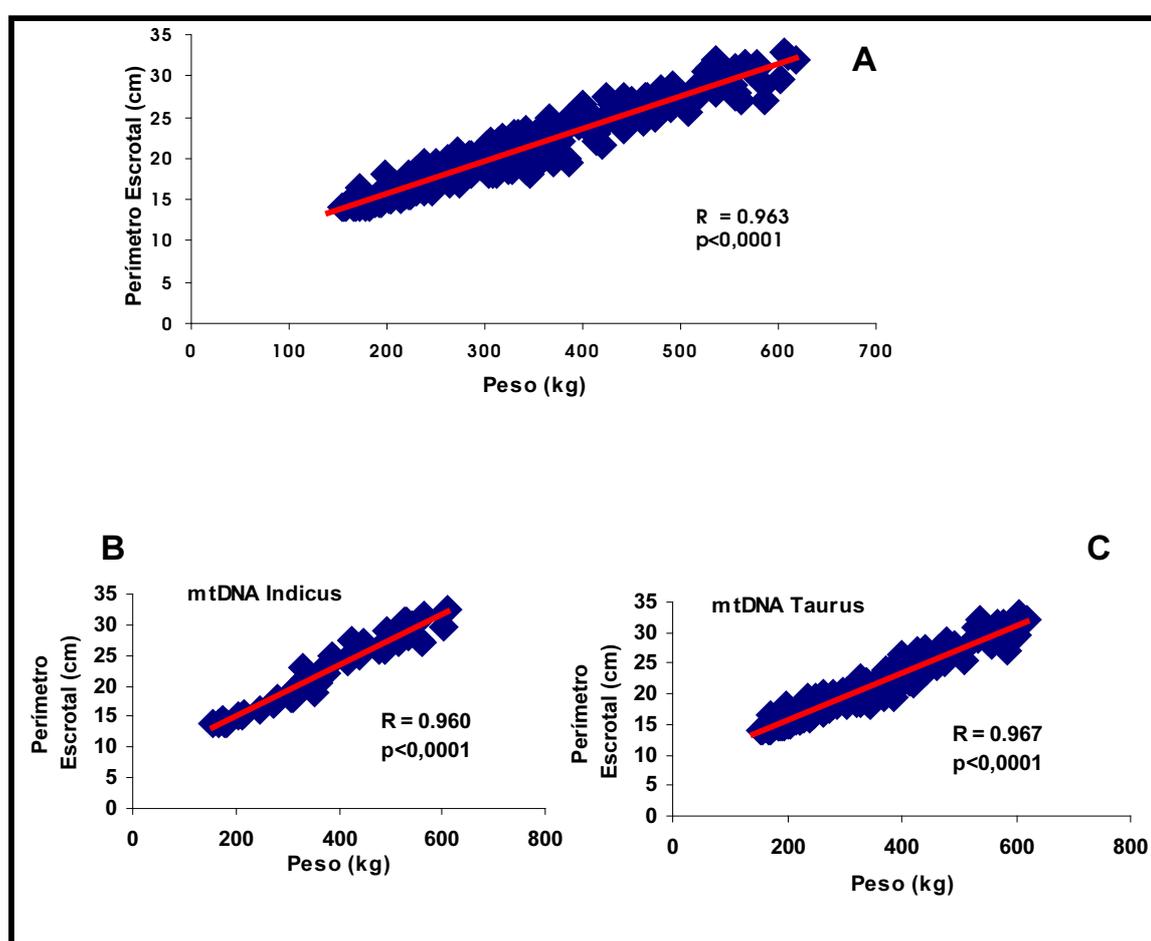


Figura 16: Correlação entre peso corporal e perímetro escrotal de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

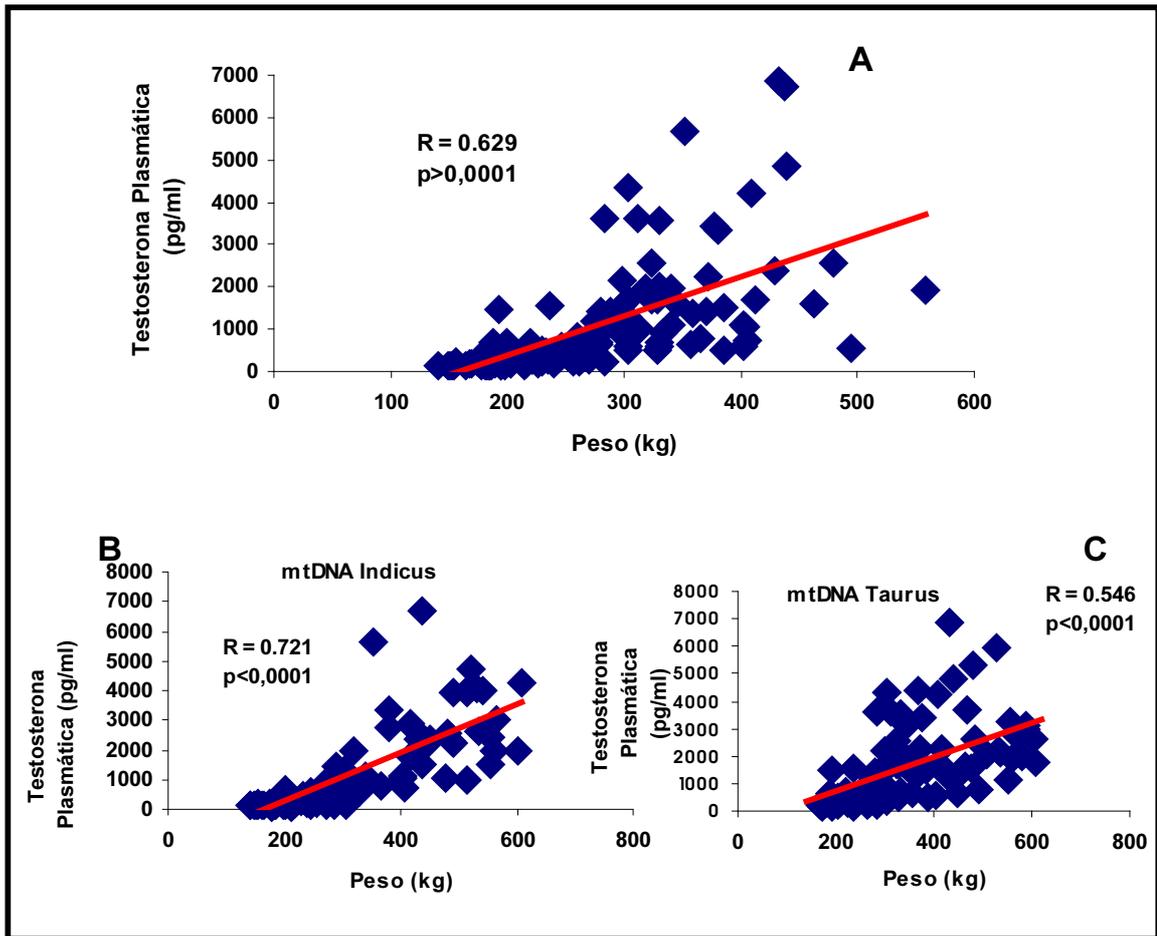


Figura 17: Correlação entre peso corporal e testosterona plasmática de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

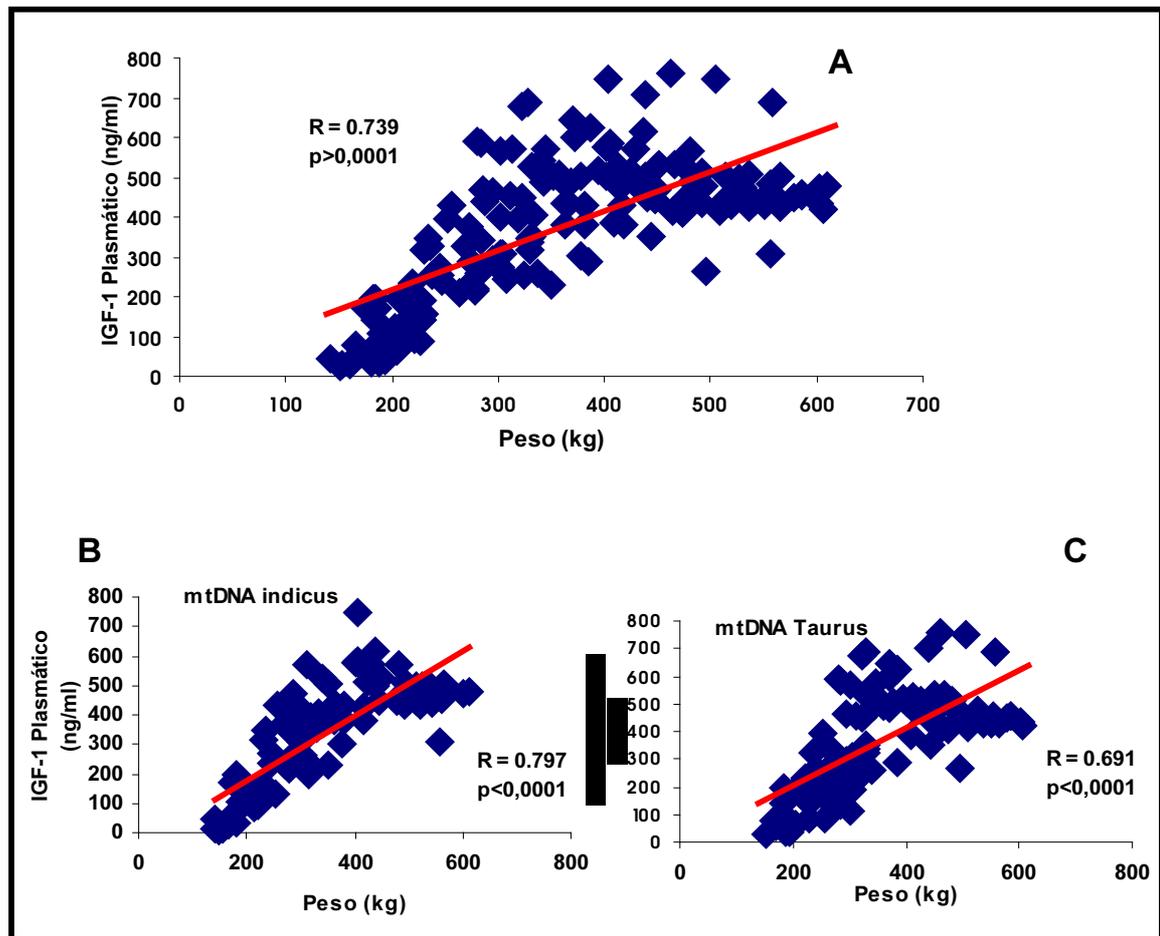


Figura 18: Correlação entre peso corporal e IGF-1 plasmático de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

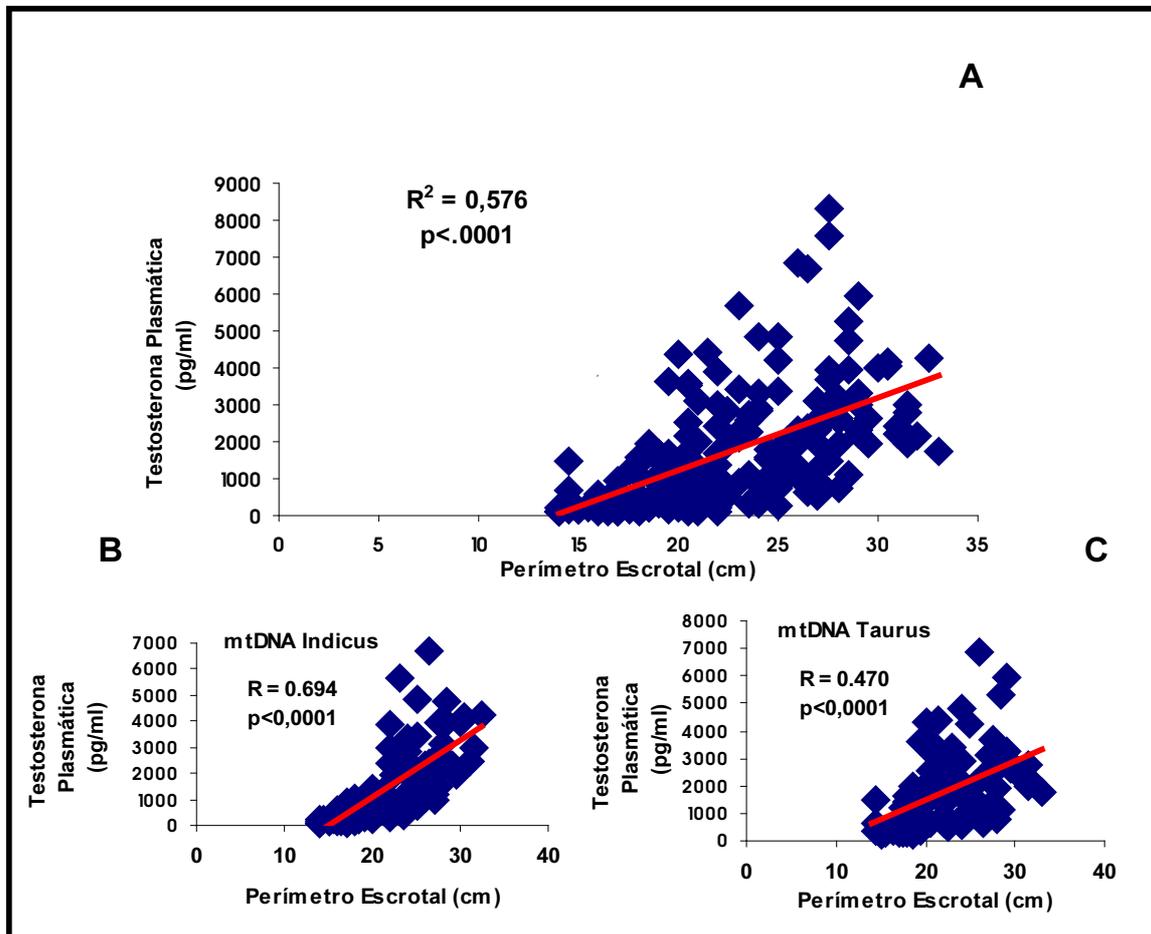


Figura 19: Correlação entre perímetro escrotal e testosterona plasmática de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

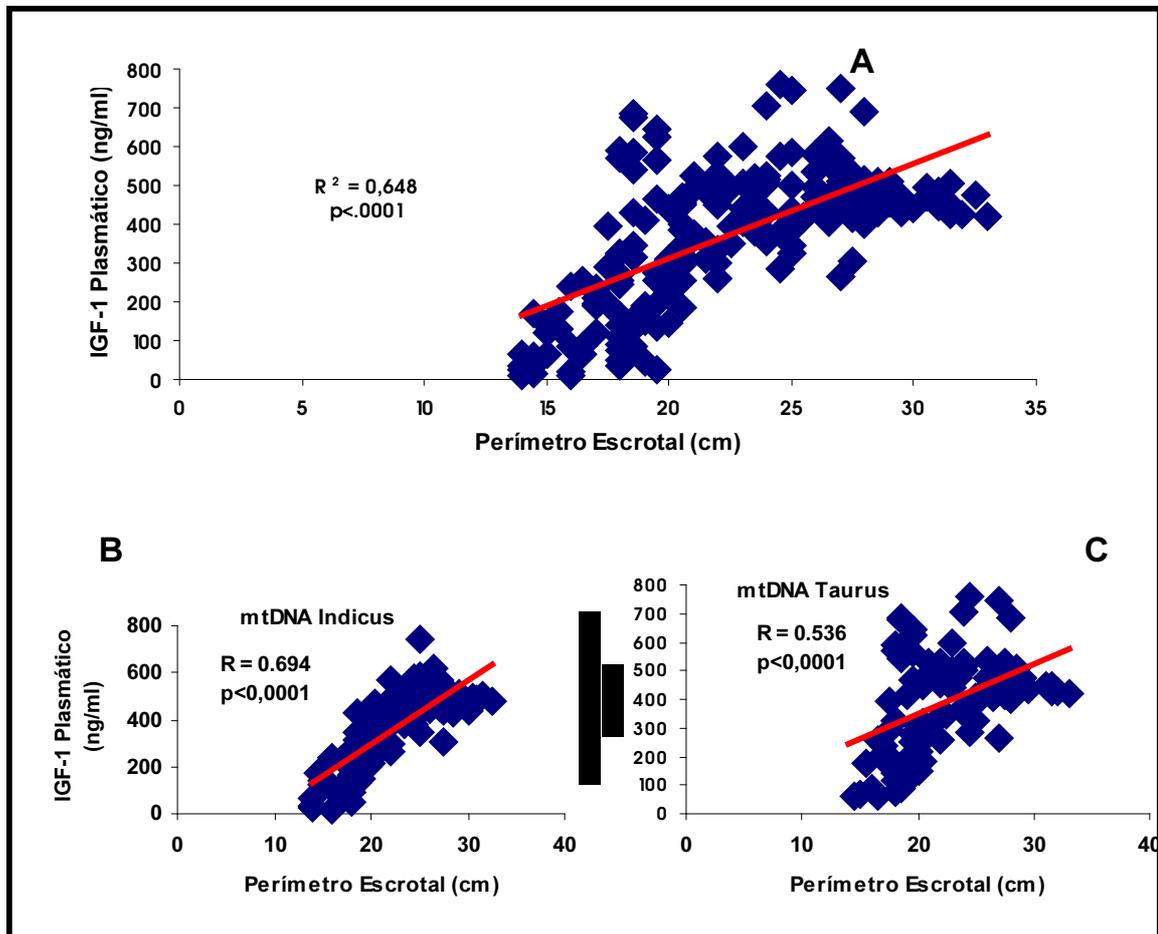


Figura 20: Correlação entre perímetro escrotal e IGF-1 plasmático de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

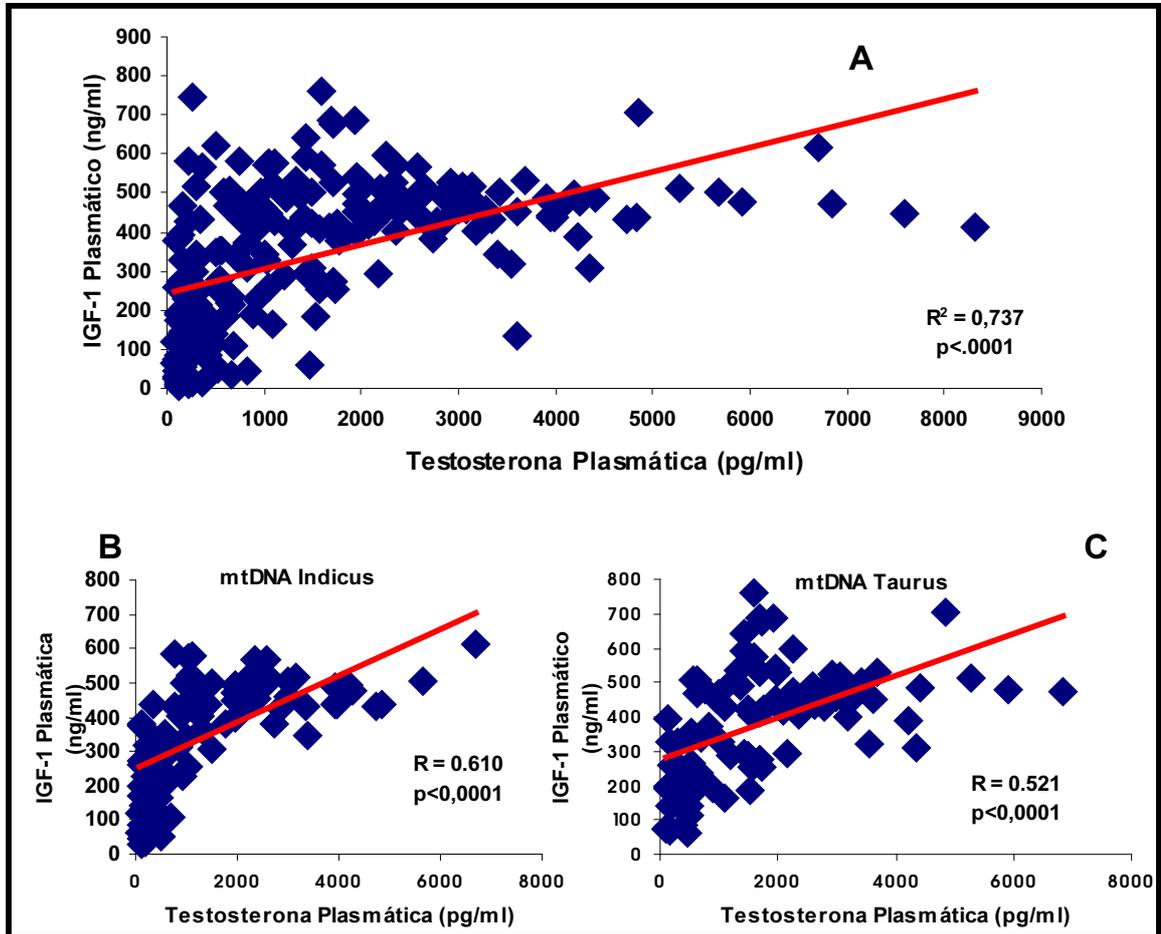


Figura 21: Correlação entre IGF-1 e testosterona plasmáticos de bovinos da raça nelore de origem mitocondrial *indicus* e *taurus* durante o desenvolvimento sexual. A: todos os animais, B: animais com mtDNA *indicus*, C: animais com mtDNA *taurus*. R: coeficiente de correlação de Pearson.

A figura 22 mostra os resultados de motilidade progressiva dos espermatozoides coleta de sêmen realizada ao término do período de coletas de dados e sangue. A origem mitocondrial não alterou a motilidade espermática progressiva, não houve diferenças estatísticas entre os grupos de animais de origem mitocondrial diferentes (Teste t de Student,  $p > 0,05$ ).

O NO foi determinado no sêmen total dos animais e somente no precipitado celular. Não foi detectada correlação entre o NO e a motilidade. A origem mitocondrial não influenciou as concentrações de NO no sêmen total, nem no precipitado celular (figura 23).

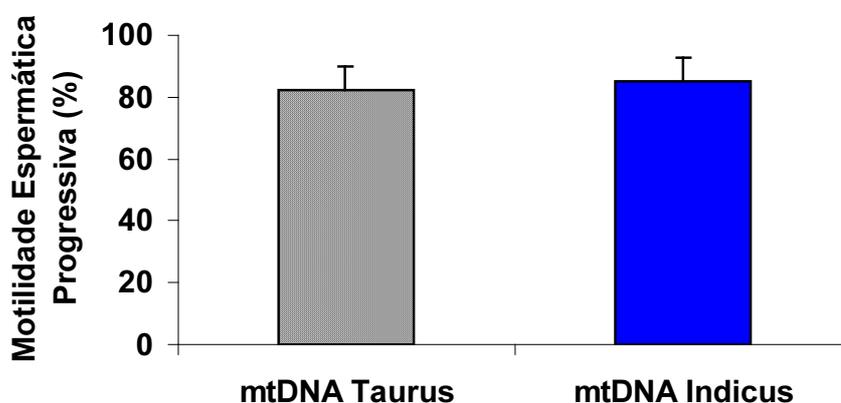


Figura 21: Taxa de motilidade espermática progressiva de espermatozoides no ejaculado de animais com origem mitocondrial Taurus e Indicus. Os grupos não apresentaram diferenças significantes entre si. Dados expressos como média + EPM (Teste t de Student,  $p > 0,05$ ).

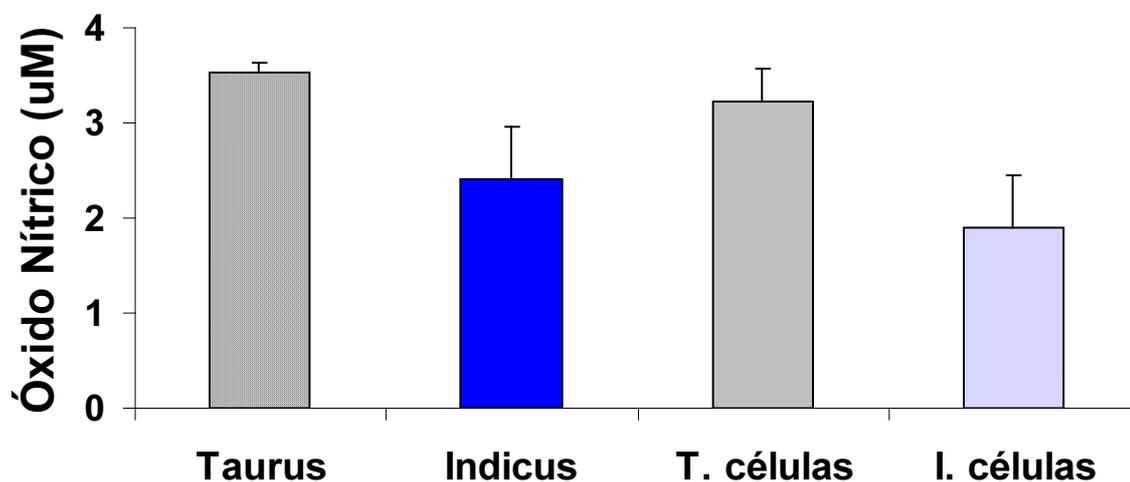


Figura 23: Concentração de Óxido Nítrico (NO) no sêmen de bovinos da raça Nelore de acordo com a origem mitocondrial e parte do sêmen. **Taurus**: mtDNA taurus, **Indicus**: mtDNA indicus, **T. células**: precipitado celular do sêmen de animais com mtDNA taurus, **I. células**: precipitado celular do sêmen de animais com mtDNA indicus. Dados expressos como média + EPM.

# DISCUSSÃO

## **VI – DISCUSSÃO**

**Os animais com origem mitocondrial Indicus atingem a puberdade em média 40,2 dias mais precocemente do que os animais com origem mitocondrial Taurus.**

Para que a puberdade seja atingida a seqüência de eventos é complexa. Vários fatores e uma fina regulação são necessários para o correto desenvolvimento do sistema reprodutor e a coordenação do crescimento corporal. O eixo do crescimento é responsável pela organização desses eventos fisiológicos. O animal deve atingir um peso crítico, aquém do qual não ocorre o desencadeamento da puberdade. As gônadas também devem apresentar um desenvolvimento adequado e um tamanho mínimo para que a produção espermática ocorra normalmente. Com o início do desenvolvimento testicular, aumenta a produção de testosterona que passa a colaborar no crescimento como agente anabolizante natural.

Para que um bovino alcance a puberdade deve atravessar todas essas etapas. Na produção animal é importante que isso ocorra o quanto antes para que o animal entre na vida reprodutiva, ressaltando o valor da precocidade sexual para a espécie bovina. A idade a puberdade de bovinos ocorre entre 14 e 18 meses de idade e, qualquer fator que contribua para melhoria desse índice, ou que possa funcionar como

um indicador de precocidade contribuirá significativamente para a seleção de reprodutores que atingirão a puberdade precocemente e podem ser capazes de transmitir essa característica de precocidade aos seus descendentes

A precocidade de 40 dias dos animais *indicus* mostra um novo caminho nesse sentido. Sinaliza que a análise do mtDNA poderá ser usada como um marcador genético de precocidade sexual que pode ser usado na seleção genética de bovinos. Sempre é válido lembrar que apesar da precocidade demonstrada pelos animais *indicus*, os dois grupos de animais são considerados precoces em relação aos animais da mesma raça estudados anteriormente (Silva et al, 1988) em que Nelores machos apresentaram a puberdade com idade de 18 meses, portanto, superior a 14,3 meses para os animais *indicus* e aos 15,6 meses para os animais *taurus* do presente estudo. O surgimento de espermatozóides no ejaculado tem forte correlação com o estabelecimento da puberdade e a normalização da produção espermática. Observa-se em machos de qualquer espécie que após o surgimento do primeiro espermatozóide, em poucas semanas os animais apresentaram sêmen de boa qualidade. Em caprinos, que são ruminantes com fisiologia semelhante aos bovinos, observa-se com 15 semanas de idade o aparecimento de espermatozóides móveis, com 17 semanas o sêmen já apresentava boa qualidade (Nishimura et al, 2000). O primeiro espermatozóide em várias raças de *Bos taurus* foi observado por Lunstra et al (1978) em média aos 8,46 meses.

Diferenças são encontradas entre os diversos índices de produtividade como produção de carne ou leite e a data da puberdade entre zebuínos e taurinos. Taurinos apresentam um processo de seleção bastante antigo na Europa que explora comercialmente a produção bovina desde tempos antigos. Os zebuínos são originários principalmente da Índia e regiões adjacentes, são considerados sagrados e nunca foram explorados comercialmente até meados do século passado. Por essa grande diferença de objetivos nas regiões de onde originaram as raças, podemos perceber que a seleção e performance produtivas são diferentes (Magnabosco et al 1997). No presente estudo, tem-se animais zebuínos com origens maternas diferentes. Nesse modelo pode-se avaliar o efeito de uma única fonte de variação sobre a produtividade desses animais, que é o mtDNA. Contudo, devemos lembrar que por se tratar de

animais zebuínos, os bovinos da raça Nelore ainda não apresentam a mesma performance produtiva e não atingem os mesmos índices de animais europeus, que possuem mais tempo de seleção. Nolan et al (1990) encontraram a idade do aparecimento do primeiro espermatozóide em machos zebuínos da raça Brahman aos 13,11 meses. Aravindakshan et al (1999) encontraram em bovinos taurinos puberdade aos  $10,03 \pm 0,21$  meses de idade. Jones et al (1991) encontraram em Hereford (taurinos) puberdade aos 7,35 meses de idade. Chase et al (2001) observaram em bovinos taurinos cruzados com Angus, o aparecimento do primeiro espermatozóides aos 10,7 meses de idade e 27 cm de perímetro escrotal.

Em bovinos da raça Holandesa (*Bos taurus*) com 13,3 meses de idade, Carter et al (1980) observaram que, nem o peso nem o perímetro escrotal, podem ser utilizados com confiança como indicativo da produção futura de espermatozóides desses animais, comprovando a necessidade da avaliação do sêmen, semelhante ao que foi observado nesse estudo. Além disso diversos outros fatores externos e/ou ambientais podem influenciar no crescimento e no desenvolvimento de bovinos, por exemplo, diferentes práticas de manejo podem alterar o comportamento alimentar dos animais, mudanças na luminosidade podem influir sobre o crescimento das plantas forrageiras modificando a qualidade e quantidade das mesmas, infestação por parasitos podem causar perda de peso e/ou queda no consumo de alimento. A diferença entre dietas também pode alterar a data da puberdade em bovinos (Nolan et al, 1990).

**As concentrações plasmáticas de testosterona variam durante o dia com um pico pela manhã, uma queda no meio do dia e um aumento ao final do dia.**

A secreção de testosterona apresenta um padrão em resposta à liberação de LH pela hipófise estimulada pela liberação de GnRH proveniente do hipotálamo, sendo que todos esses hormônios apresentam padrão pulsátil de secreção. Além de mostrar esses picos de secreção, a testosterona possui uma variação circadiana com concentrações que oscilam de acordo com a espécie, mas de maneira geral apresenta um pico matutino e um vespertino, podendo observar ou não um pico ao meio do dia (Hall, 1994). Nesse período, peripuberal, isto é, em animais jovens, encontramos para a testosterona plasmática valor médio de 2,0 ng/ml (variando de 0,4 até 8,2 ng/ml) que são valores inferiores aos encontrados por Henney et al (1990) em bovinos adultos

com valor médio de 7,0 ng/ml da testosterona plasmática e variação de 0,5 até 16,8 ng/ml no grupo de animais. Esses autores também observaram que a libido dos animais foi reduzida quando a relação estrógeno:testosterona aumentou, mostrando claramente que a testosterona não é importante apenas para o crescimento e produção espermática, mas participa decisivamente na libido e conseqüentemente na capacidade de serviço dos animais. Em touros, a testosterona plasmática está correlacionada com a produção espermática (Gabor et al, 1998) e com o comportamento sexual (Imwalle et al, 2002).

**O peso corporal, o perímetro escrotal, a testosterona e o IGF-1 plasmáticos aumentaram progressivamente com a idade, com ligeiras flutuações, normais para os padrões hormonais.**

Durante a puberdade, o pico de crescimento é mediado em parte pelo efeito direto dos esteróides gonadais nas taxas de crescimento (Attie et al, 1990). A influência desses esteróides foi estudada por Chowen et al (1996), que mostrou um padrão de resposta ontogenética bifásica da testosterona, durante o período neonatal, ou fase organizacional, o esteróide respondeu pela organização morfofuncional das áreas onde estão localizados os neurônios produtores de hormônio liberador de GH (GHRH) e somatostatina (SS). Durante o período puberal, a testosterona mostrou capacidade de aumentar a síntese e secreção de GHRH e SS. Nesse estudo percebeu-se uma atividade organizacional no período neonatal e função modulatória na puberdade.

No período peribuberal, observa-se que ocorre um aumento gradativo dos parâmetros estudados, conforme o animal se aproxima da vida adulta. Animais mais jovens apresentam peso corporal e perímetro escrotal menores, e, apresentam concentrações plasmáticas de testosterona e IGF-1 menores. Thomas et al (2002) também observaram em bovinos que a testosterona e o IGF-1 plasmáticos, o peso corporal e o perímetro escrotal aumentam com a idade. Matsuzaki et al (2001) observaram que a testosterona e o tamanho dos testículos aumentam com a idade. Jones et al (1991) observaram que a testosterona plasmática aumenta após 7.6 meses de idade ultrapassando 3,0 ng/ml. Sosa et al (2002) observaram em bovinos da raça Wagyu (zebuíno) que o peso e o perímetro escrotal aumentam com a idade.

A puberdade está relacionada a um peso crítico que o animal deve atingir antes de se tornar púbere (Ojeda & Urbanski, 1994). Além do peso corporal, as concentrações de testosterona, circunferência escrotal e produção de sêmen aumentam com a idade. As concentrações de testosterona estão relacionadas com o crescimento testicular e de outras estruturas do trato reprodutivo. Concentrações de testosterona elevadas aos doze meses de idade estão relacionadas com puberdade precoce (Pruitt et al, 1986). No bovino, a testosterona exerce sua maior função no início da puberdade com o desenvolvimento do trato genital, início e potencialização da espermatogênese (Rekwot et al 1997). Renaville et al (2000) encontraram valores de testosterona plasmática de 1,35 até 2,38 ng/ml com pulsos de 2,35 ng/ml. Huxoll et al (1998) encontraram concentração plasmática de testosterona média de 2,95 ng/ml e conseguiram reduzir para menos de 0,93 ng/ml com imunização dos animais contra GnRH e os animais imunizados apresentaram crescimento semelhante aos animais controle. Jago et al (1997) observaram que a imunização pré-puberdade também reduz a testosterona plasmática e prejudica o comportamento sexual e social dos touros jovens. Adams et al (1993) encontraram em bovinos taurinos 3,4 ng/ml de média para testosterona plasmática e 34,9 cm de perímetro escrotal.

Nolan et al (1990) observaram o aumento da testosterona plasmática e do perímetro escrotal com a idade dos animais. Moura & Erickson (2001) observaram que as concentrações de testosterona aumentam com a idade em bovinos taurinos, sendo maior a partir dos 7 meses de idade. Os autores sustentam a hipótese que não há variações hormonais consistentes durante a puberdade para seleção criteriosa dos reprodutores, mas a avaliação do tamanho dos testículos podem identificar os animais com desenvolvimento anormal das gônadas.

Nesse estudo, observamos o aumento progressivo do IGF-1 com a idade, na puberdade, encontramos valores médios de 334,5 ng/ml para animais portadores de mtDNA *indicus* e de 349,7 ng/ml para animais portadores de mtDNA *taurus*. O GH é necessário para o correto desenvolvimento das gônadas masculinas e femininas. Os efeitos atribuídos ao aumento do GH nos ovários e testículos podem ser decorrentes da elevação do IGF-I circulante, mediada por estimulação hepática pelo GH, ou mesmo pela produção local de IGF-I (Strobl & Thomas, 1994). Holzer et al (2000) encontraram

o valor de  $269 \pm 26,2$  ng/ml de IGF-1 para bovinos com 14,6 meses de idade aproximadamente. Aos 17 meses o valor médio de IGF-1 foi de 310 ng/ml (Holzer et al,1999). Renaville et al (2000) observaram que o peso corporal e o IGF-1 plasmático aumenta com a idade, variando de 100 a 300 ng/ml em 7,16 meses de experimento. Roudebush et al (2001) encontraram valores de IGF-1 plasmático de 367 até 650 ng/ml em bovinos da raça Angus. Em suínos, as concentrações plasmáticas de GH aumentam no período pré-púbere e permanece elevado durante a puberdade provavelmente em resposta ao aumento dos hormônios sexuais, que por sua vez estimulam a produção de IGFs que estimula a transcrição do gene da StAR , em mitocôndrias de células da granulosa (Balasubranian et al, 1997).

A testosterona plasmática e o GH estão relacionados ao comportamento reprodutivo em bovinos, podendo variar dependendo da atividade reprodutiva do animal (Borg et al, 1991). Buskirk et al. (1996) usaram GH exógeno e observaram que, apesar de beneficiar o crescimento dos animais, não causou melhora no trato reprodutivo. Davis & Simmen (2000) em bovinos taurinos da raça Angus encontraram o valor médio de IGF-1 plasmático de  $225,8 \pm 161,7$  ng/ml e o IGF-1 plasmático apresentando relação com diversas características produtivas na carcaça dos animais abatidos. Em outro estudo, Davis et al (1995) encontraram uma clara diferenciação nas concentrações plasmáticas de IGF-1 ligada ao sexo, sendo que os touros apresentaram o IGF-1 plasmático mais elevado que nas fêmeas. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Hunt et al (1991) em bovinos, eles observaram valores de testosterona plasmática variando entre 1,3 e 1,9 ng/ml e o IGF-1 plasmático de 150 a 304 ng/ml.

A idade parece ter clara interferência na secreção hormonal. Em humanos, a testosterona e o IGF-1 plasmáticos diminuem com a senescência (Morley et al, 1997). O IGF-1 e a testosterona plasmáticos estão relacionados e agem de maneira similar no estímulo ao pico de GH plasmático (Coutant et al, 2001). Em bovinos taurinos mestiços de Angus e Simental, o peso corporal e o IGF-1 plasmático aumentam com a idade e a testosterona está envolvida no processo, uma vez que animais castrados apresentam menores peso e IGF-1 plasmático (Schoomacker et al, 2002). O IGF-1 plasmático interfere na qualidade do sêmen modificando o conteúdo de fatores ou proteínas seminais, entre elas o fator ativador de plaquetas (Roudebush et al, 2001).

O efeito que cada hormônio exerce vem da resultante de uma complexa equação que envolve o valor das concentrações plasmáticas, a quantidade de proteínas transportadoras e a afinidade dessas proteínas ao hormônio em questão, que interfere nos efeitos teciduais dos hormônios, liberação, e a proteção dos hormônios contra a degradação (Hornick et al, 2000).

**A origem mitocondrial pode alterar o peso, o perímetro escrotal e as concentrações plasmáticas de IGF-1, que são variáveis ligadas aos eixos de crescimento e reprodutivo.**

Os animais com mtDNA *indicus* são mais pesados e tem o perímetro escrotal maior que os animais com mtDNA *taurus*. Por causa disso, os animais *indicus* podem apresentar um potencial para um maior crescimento corporal e para um maior desenvolvimento sexual. O polimorfismo no mtDNA já foi associado à taxa de nascimento, com implicações genéticas para o aumento da fertilidade de vacas (Sutarno et al, 2002). Mannen et al (1998) observaram que polimorfismo no mtDNA promove alterações na carcaça de animais abatidos e que a herança citoplasmática pode influenciar a produção de carne. Os polimorfismos no genoma podem alterar o padrão de produção espermática em touros (Lechniak et al, 1999). Mas nem todos os trabalhos conseguiram encontrar algum efeito de polimorfismo sobre características produtivas. Boettcher et al (1996) não conseguiram relacionar polimorfismos na região do D-Loop com caracteres produtivos de animais, mas enfatizam que deva existir uma associação entre os polimorfismos encontrados e a produção, gordura e energia no leite. Não foram encontradas diferenças no GH plasmático da prole de duas linhagens diferentes de vacas leiteiras (Baumgard et al, 2002). Tess & MacNeilt (1994) observaram que o peso corporal em bovinos de corte não apresenta variação devido ao efeito genético citoplasmático. Esses trabalhos mostram respostas variadas aos polimorfismos genéticos, alguns usam regiões determinadas do mtDNA, outros usam partes mais genéricas, mas nenhum trabalho conseguiu até o momento apontar os efeitos do polimorfismo de regiões específicas do mtDNA sobre o peso corporal, perímetro escrotal e IGF-1 plasmático, como os efeitos discutidos nesse trabalho.

**As correlações entre as variáveis foram altas e positivas indicando uma estreita afinidade entre elas.**

Devido à obtenção desses valores de correlação, podemos dizer que um aumento no peso corporal pode acarretar em aumento no perímetro escrotal, na testosterona e no IGF-1 plasmáticos. O aumento no perímetro escrotal está associado com a elevação das concentrações plasmáticas de testosterona e de IGF-1. Por fim, quando a concentração de testosterona no plasma aumenta o IGF-1 plasmático também eleva. Essas relações diretas são importantes porque mostram como esses dois eixos que são determinantes na vida animal, o eixo do crescimento (peso corporal e IGF-1) e o eixo reprodutivo (perímetro escrotal e testosterona), estão estreitamente ligados. Qualquer interferência em um deles pode afetar diretamente o outro, por exemplo, um retardo no crescimento provocado por carência nutricional ou alguma doença pode levar a um atraso reprodutivo. Por outro lado, fatores que aumentam o crescimento corporal podem beneficiar o desenvolvimento sexual do animal (Chandrashekar & Bartke, 1998).

Relações entre IGF-1 e testosterona foram estudados por Maor et al (1999) que observaram que parte do efeito da testosterona sobre o crescimento pode ser devido a mediação de IGF-1, onde a testosterona estimulou o crescimento e a produção local de IGF-1 e dos receptores de IGF-1 das camadas de células condrocíticas isoladas dos côndilos mandibulares de camundongos. O GH hipofisário pode ser estimulado pelos esteróides gonadais. Weissberger & Ho (1993) observaram um papel importante da testosterona no eixo do crescimento em machos, sugerindo que esse efeito é parcialmente dependente da aromatização da testosterona para estradiol. Em humanos a testosterona eleva as concentrações de IGF-1 (Hobbs et al, 1993). A influência direta dos hormônios do eixo do crescimento na reprodução pode ser observada quando Champion et al (2002) observaram que tanto o rbGH (GH recombinante bovino) quanto o rhIGF-1 (IGF-1 recombinante humano) prolongam a motilidade espermática. Baker et al (1996) observaram uma estreita relação entre a produção de IGF-1 e a testosterona produzida pelas células de Leydig.

As relações entre o eixo reprodutivo e o crescimento têm um interesse especial na produção animal, estimativas fenotípicas são mais acessíveis do que medidas hormonais, que exigem uma estrutura mais complexa para obtenção dessas medidas. Desde muito tempo procura-se tornar próximas as medidas fenotípicas de medidas

fisiológicas, a fim de melhorar o desempenho produtivo das espécies domésticas. Nesse trabalho mostramos correlações positivas entre o peso corporal, o perímetro escrotal, as concentrações plasmáticas de IGF-1 e testosterona. São correlações com valores mais altos que as encontradas por Nolan et al (1990) que observaram correlações positivas entre o peso corporal, o perímetro escrotal, e a testosterona plasmática. McGowan et al (2002) encontraram correlações positivas, entre o peso corporal e o perímetro escrotal em bovinos de raças taurinas, zebuínas e mestiços. Sosa et al (2002) encontraram correlações positivas entre o peso corporal e o perímetro escrotal em bovinos da raça Wagyu. Barash et al (1998) encontraram correlação positiva entre o peso corporal e o IGF-1 plasmático. Connor et al (2000) também encontraram correlações positivas entre o peso corporal e o IGF-1 plasmático em bovinos taurinos Angus. Auchtung et al (2001b) encontraram em bovinos uma correlação positiva entre o peso corporal e o IGF-1 plasmático. Diaz-Guerra et al (2001) encontraram correlações positivas entre o IGF-1 plasmático e a testosterona livre e conjugada à proteína carreadora andrógeno.

Contudo, notamos que o IGF-1 nem sempre apresenta uma relação positiva com os caracteres de produtividade nos animais. Foi observado que o IGF-1 se relaciona negativamente com a produção de leite (Auchtung et al, 2001a). Apesar disso o GH e o estrógeno participam ativamente do desenvolvimento mamário e estão relacionados com o IGF-1 plasmático (Berry et al, 2001).

#### **As correlações de animais mtDNA indicus foram maiores que de animais mtDNA taurus.**

Sugere-se que a origem mitocondrial pode melhorar a relação entre as variáveis estudadas. O peso corporal e perímetro escrotal maiores nos animais portadores de mtDNA indicus, indicam que esse polimorfismo no genoma mitocondrial favoreceu esse grupo de animais, fornecendo melhores condições para o desenvolvimento desses animais em condições tropicais, apesar de apresentarem menor concentração plasmática de IGF-1. Mutações no D-Loop do mtDNA afetam as regiões envolvidas no processo de replicação do mtDNA, comprometendo as funções da organela, e, essas mutações podem ser achados consistentes em uma mesma linhagem materna

(Barthélémy et al 2002). Estudando também em Nelores Albuquerque & Meyer (2001) encontraram uma heritabilidade alta com o efeito genético materno se correlacionando com as estimativas de peso dos filhos. Mialon et al (2001) não encontraram relação entre habilidades maternas e caracteres produtivos dos filhos.

**A origem mitocondrial não alterou a motilidade espermática progressiva, não influenciou as concentrações de NO no sêmen total, nem no precipitado celular. Também não foi detectada correlação entre o NO e a motilidade.**

O óxido nítrico (NO) apesar de extremamente lábil já foi encontrado tanto nos vasos testiculares, envolvido na regulação da vascularização testicular, quanto nas células testiculares, apresenta uma estreita relação com as células de Sertoli e Leydig e parece afetar a fertilidade. A produção excessiva de NO parece gerar disfunção espermática e pode estar envolvida na maturação e motilidade espermática (Battaglia et al, 2000). O´Bryan et al (1998) notaram que o NO está envolvido na fisiologia espermática normal, e que, padrões aberrantes de eNOS (NO sintase endotelial) estão associadas com redução da motilidade espermática, possivelmente pela geração excessiva de oxidantes citotóxicos.

Foi detectada a atividade da NO sintase no plasma seminal, sendo que as vesículas seminais podem ser locais importantes como fonte de NO sintase seminal (Zini et al, 2001). Aksoy et al (2000) observaram que o óxido nítrico prejudicou a motilidade espermática. A produção de NO é afetada pela síntese de estradiol no ovário (Basini & Tamanini, 2000) mostrando que o efeito do NO nas gônadas pode ser negativo. Ding et al (2002) sugerem que a melhoria da qualidade do sêmen pode levar a uma redução na produção de NO. Contudo Revelli et al (2001) em seus estudos não confirmaram a hipótese que a síntese de NO “in vivo” afete a função espermática e sugeriram que o nitrito no plasma seminal não é um marcador sensível para a produção “in vivo” de NO. Parece então, que a via Arginina-Óxido Nítrico está envolvida principalmente com a disfunção espermática e com a infertilidade de machos (Elgün et al, 2000).

Não foi detectada qualquer alteração promovida pelo NO sobre a motilidade espermática nos bovinos da raça Nelore. Já em humanos observa-se que mutações no

mtDNA podem levar a comprometimento da qualidade seminal, notando-se que todos os indivíduos que apresentaram substituições no mtDNA tinham baixa motilidade dos espermatozóides e concentração espermática reduzida (Holyoake et al, 2001). Moore & Reijo-Pera (2000) também sugerem que a herança materna pode interferir na qualidade seminal, principalmente na motilidade espermática que parece sofrer mais com as mutações no mtDNA. Ruiz-Pesini et al (2000) observaram que alterações no mtDNA em humanos estão associadas à redução na motilidade dos espermatozóides.

Em humanos, notou-se uma forte correlação do IGF-1 presente no plasma seminal com os espermatozóides normais, sem contudo determinar alguma correlação entre o IGF-1 seminal e a motilidade dos espermatozóides (Glander et al, 1996). Os autores sugeriram que o IGF-1 é importante no desenvolvimento das células germinativas e que provavelmente esteja mais envolvido na maturação dos espermatozóides. Notaram ainda que indivíduos vasectomizados apresentaram concentrações de IGF-1 no plasma seminal menores que indivíduos normais, de acordo com a hipótese de secreção tubular de IGF-1 pelo testículo e/ou epidídimo. Contudo, contrariando todas expectativas Hoeflick et al (1999) observaram em bovinos que o IGF-1 elevado no plasma seminal está associado a pior qualidade de sêmen. Uma alteração na qualidade do líquido seminal pode interferir diretamente na viabilidade espermática (Castelini et al, 2000). Em zebuínos a administração aguda de GH causa um aumento de IGF-1 plasmático, mas não altera a qualidade seminal, parece ser necessário um tempo maior para que os efeitos possam ser observados (Santos et al, 1999) ou talvez os efeitos sejam mais evidentes localmente. A qualidade espermática apresenta uma sensibilidade a uma série de outros fatores que podem interferir melhorando ou piorando dependendo do caso, como por exemplo a estação do ano e o cruzamento entre diferentes raças (Ciereszko et al, 2000). As diferenças encontradas nas concentrações de testosterona e IGF-1, no peso corporal e no perímetro escrotal em diferentes raças de bovinos sugerem que pode haver variação nos mecanismos de regulação desses hormônios e conseqüentemente variação nos efeitos, peso e tamanho de testículos (Thomas et al, 2002).

O estado fisiológico do animal interfere decisivamente na performance reprodutiva assim como a motilidade espermática interfere diretamente na fertilidade

(Brun et al, 2002). O acesso dessas informações pode fazer com que os produtores rurais modifiquem e melhorem seus sistemas de manejo para seleção de reprodutores, com conseqüentes ganhos na produção animal. A seleção de reprodutores utiliza uma série de critérios, a maioria ligada ao desempenho dos animais em ganho de peso, desenvolvimento corporal, peso ao nascer, peso ao desmame, todos parâmetros somáticos, a performance reprodutiva sempre foi parâmetro adicional, nunca primário. O teste de libido e a capacidade de serviço também podem ser adicionados para auxiliar na escolha de reprodutores (Silva-Mena et al, 2000). Holroyd et al (2002) observaram que a seleção para reprodutores deve ser realizada considerando a avaliação do sêmen, observaram também que nenhum parâmetro pode ser considerado isoladamente como critério para seleção, o perímetro escrotal e a taxa de motilidade dos espermatozóides se correlacionaram positivamente com a fertilidade medida pela produção de bezerros.

Pensando ainda na seleção de reprodutores, a coleta de sêmen precocemente permitiria uma avaliação de progênie do reprodutor, fazendo com que ele possa ser inserido num programa de reprodução o mais cedo possível (Picard-Hagen et al, 2002). Já foram encontrados touros Nelores de 29 meses com 32 cm de perímetro escrotal que apresentam capacidade de serviço semelhante a touros europeus, quando esses animais são avaliados adequadamente e em um curto período de tempo (Silva-Mena et al, 2000). Fitzpatrick et al (2002) também observaram que a seleção de reprodutores deve passar pelo exame do sêmen e que a motilidade espermática não deve ser usada isoladamente como critério de fertilidade. Mercadante et al (2003) observaram em Nelores que a seleção pelo peso corporal promove mudanças genéticas consistentes sem comprometer a performance reprodutiva desses animais. Moser et al (1996) observaram que a seleção pelo perímetro escrotal leva a redução na idade a puberdade dos descendentes. Animais que desmamam mais pesados podem não apresentar superioridade no ganho de peso, mas eles levam essa vantagem conseguida adiante quando comparado aos outros animais contemporâneos (Baker et al, 2002).

Observamos no decorrer do trabalho que o polimorfismo encontrado no mtDNA beneficia o grupo de animais portadores de mtDNA *indicus* em relação aos animais portadores de mtDNA *taurus*. Os animais *indicus* apresentaram precocidade sexual

maior, peso corporal e perímetro escrotal maiores. Uma associação de todas essas variáveis pode contribuir para a seleção de reprodutores com possibilidade de melhorar o ganho genético com uma ferramenta mais exata que é a biologia molecular. O exame de DNA pode ser um aditivo importante devido à pequena variabilidade de resultados, principalmente se comparado às avaliações de peso corporal e perímetro escrotal, sempre sujeitas à variabilidade devido a equipamento, manejo, sanidade dos animais, entre outras fontes de variação.

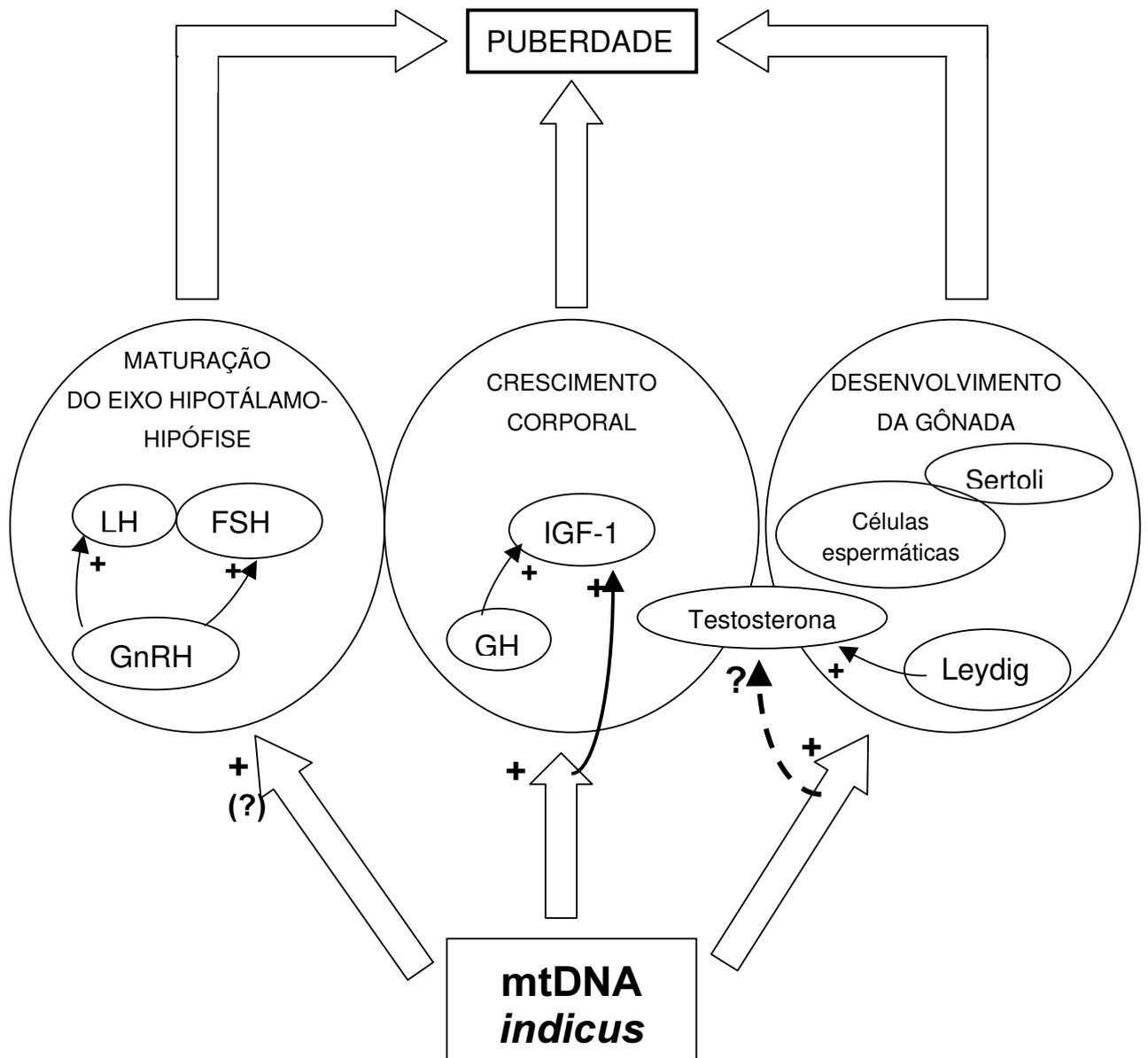
**CONCLUSÕES**

## VII- CONCLUSÕES

O mtDNA *indicus* adiantou a data da instalação da puberdade em cerca de 40 dias, favoreceu maiores peso corporal e perímetro escrotal, comparativamente ao mtDNA *taurus*. Esses resultados nos permitem propor a possibilidade de que o polimorfismo descrito no mtDNA possa se tornar um marcador de precocidade sexual em condições tropicais.

Observamos durante a puberdade, a ocorrência de uma redução nas concentrações de testosterona plasmática no meio do dia em relação ao início da manhã. O peso corporal, o perímetro escrotal, as concentrações plasmáticas de testosterona e as concentrações plasmáticas de IGF-1 aumentam progressivamente com a idade e apresentam fortes correlações entre si.

O conjunto de resultados nos fez propor o esquema a seguir, que indica a atuação do mtDNA na regulação do processo de instalação da puberdade.



Papel do mtDNA na instalação da puberdade em bovinos machos.

# REFERÊNCIAS

### VIII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS TE, DALEY CA, ADAMS BM, and SAKURAI H. Testis Function and Feedlot Performance of Bulls Actively Immunized Against Gonadotropin-Releasing Hormone: Effect of Implants Containing Progesterone and Estradiol Benzoate. Journal Animal Science, 71v, 811-817p, 1993.

AKSOY H, AKSOY Y, ÖZBEY I, ALTUNTAS I & AKÇAY F. The relationship between varicocele and semen nitric oxide concentrations. Urology Research. 28v, 357-359p, 2000.

ALBUQUERQUE LG and MEYER K. Estimates of covariance functions for growth from birth to 630 days of age in Nelore cattle. Journal Animal Science. 79v, 2776–2789p, 2001.

ALLEN JA & COOMBS MM. Covalent binding of polycyclic aromatic compounds to mitochondrial and nuclear DNA. Nature. 1980. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, 138p, 1999.

ANDERSON S, BANKER AT, BARREL BG et al. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 1981. in: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado: Ribeirão Preto, 138p, 1999.

ARAVINDAKSHAN JP, HONARAMOOZ A, BARTLEWSKI PM, BEARD AP, PEARSON RA and RAWLINGS NC. Pattern of Gonadotropin Secretion and Ultrasonographic

Evaluation of Developmental Changes in the Testis of Early and Late Maturing Bull Calves. Theriogenology, 54v, 339-354p, 2000.

ATTARDI G. Animal mitochondrial DNA: na extreme exemple of genetic economy. Int. Ver. Cytol. 1985. In: Meirelles F.V. Herança Mitocondrial do Zebu. Tese de Doutorado. Ribeirão Preto, 138p, 1999.

AUCHTUNG TL, BUCHANAN DS, LENTS CA, BARAO SM, and DAHL GE Growth hormone response to growth hormone-releasing hormone in beef cows divergently selected for milk production, Journal Animal Science, 79v:1295–1300p, 2001a.

AUCHTUNG TL, CONNOR EE, BARAO SM, DOUGLASS LW and DAHL GE. Use of growth hormone response to growth hormone-releasing hormone to determine growth potential in beef heifers. Journal Animal Science, 79v:1566–1572p, 2001b.

BALASUBRAMANIAN K; LAVOIE HA; GARMEY JC; STOCCO DM & VELDHUIS JD. Regulation of Porcine Granulosa Cell Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) by Insulin-Like Growth Factor I: Synergism with Follicle-Stimulating Hormone or Protein Kinase A Agonist. Endocrinology, 138v (1), 433-439p, 1997.

BAKER J, HARDY MP, ZHOU J, BONDY C, LUPU F, BELLVÉ AR & EFSTRATIADIS A. Effects of an IGF-1 Gene Null Mutation on mouse reproduction. Molecular Endocrinology, 10v, 903-918p, 1996.

BAKER JF, VANN RC and NEVILLE JR WE. Evaluations of genotype×environment interactions of beef bulls performance-tested in feedlot or pasture. Journal Animal Science, 80v, 1716–1724p, 2002.

BAKER M. Hydroxysteroid dehydrogenases: ancient and modern regulators of adrenal and sex steroid action. Molecular and Cellular Endocrinology, 175v, 1-4p, 2001.

BARASH H, AHARONI Y, BROSH A and HOLZER Z. Effects of Low Energy Diets Followed by a Compensatory Diet on Body Weight Gain and Plasma Hormone Concentrations in Bull Calves. Journal Dairy Science, 81v, 250–254p, 1998.

BARTHÉLÉMY C, DE BAULNY HO and LOMBÈS A. D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? Human Genetics, 110v 479–487p, 2002.

BASINI G & TAMANINI C. Selenium stimulates estradiol production in bovine granulosa cells: possible involvement of nitric oxide. Domestic Animal Endocrinology, 18v, 1–17p, 2000

BASTIAS MC; KAMIJO H & PAVLOU SN. Sperm motion parameters after suppression of spermatogenesis with a gonadotropin-releasing hormone antagonist plus testosterone supplementation. Fertility and Sterility, 59v, 6n, 1261-1265p, 1993.

BATTAGLIA C, GIULINI S, REGNANI G, DI GIROLAMO R, PAGANELLI S, FACHINETTI F and VOLPE A. Seminal plasma nitrite/nitrate and intratesticular Doppler flow in fertility and infertility subjects. Human Reproduction, 15v, 12n, 2554-2558p, 2000.

BAUMGARD LH, WEBER WJ, KAZMER GW, ZINN SA, HANSEN L B, CHESTER-JONES H, and CROOKER B A. Effects of Selection for Milk Yield on Growth Hormone Response to Growth Hormone Releasing Factor in Growing Holstein Calves. Journal Dairy Science. 85v, 2529–2540p, 2002.

BELL BR, MCDANIEL BT & ROBINSON OW. Effects of cytoplasmic inheritance on production traits in dairy cattle. J. Dairy Sci. 1985. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p., 1999.

BERRY SD, MCFADDENA TB, PEARSON RE & AKERSB RM. A local increase in the mammary IGF-1: IGFBP-3 ratio mediates the mammogenic effects of estrogen and growth hormone. Domestic Animal Endocrinology, 21v, 39–53p, 2001.

BIBB MJ, Van ETTEN RA, WRIGHT CT, WALBERG MW & CLAYTON DA. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. Cell. 1981. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

BOGENHAGEN D & CLAYTON DA. Mouse L cell mitochondrial DNA molecules are selected randomly for replication throughout the cell cycle. Cell. 1977. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

BOETTCHER PJ, FREEMAN AE, JOHNSTON SD, SMITH RK, BEITZ DC, & MCDANIEL BT. Relationships Between Polymorphism for Mitochondrial

Deoxyribonucleic Acid and Yield Traits of Holstein Cows. Journal Dairy Science, 79v, 647-654p, 1996.

BOLDEN A, NOY GP & WEISSBACH A. DNA polymerase of mitochondria is a gamma-polymerase. J. Biol. Chem. 1977. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

BORG KE, ESBENSHADE KL & JOHNSON BH. Cortisol, Growth Hormone, and Testosterone concentrations during mating behavior in the Bull and Boar. Journal Animal Science, 69v, 3230-3240p, 1991.

BROWN MW, PRAGER A, WANG A & WILSON AC. mit DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. J. Mol. Biol. 1982. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

BRUN JM, THEAU-CLÉMENT M & BOLET G. The relationship between rabbit semen characteristics and reproductive performance after artificial insemination. Animal Reproduction Science, 70v, 139-149p, 2002.

BUSKIRK DD, FAULKNER DB, HURLEY WL, KESLER DJ, IRELAND FA, NASH TG, CASTREE JC, & VICINI JL. Growth, Reproductive Performance, Mammary Development, and Milk Production of Beef Heifers as Influenced by Prepubertal Dietary Energy and Administration of Bovine Somatotropin. Journal Animal Science. 74v, 2649-2662p, 1996.

CALDAS MCS. Esteroidogênese e hormônio luteinizante na reprodução de Éguas: Um estudo cronobiológico *in vivo* e em células da granulosa *in vitro*. Tese de Doutorado, Apresentada na Área de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1996.

CARREAU S. Germ cells: a new source of estrogens in the male gonad. Molecular and Cellular Endocrinology, 178v, 65-72p, 2001.

CASTELLINI C, LATTAIOLI P, MORONI M & MINELLI A. Effect of seminal plasma on the characteristics and fertility of rabbit spermatozoa. Animal Reproduction Science, 63v, 275-282p, 2000.

CHAMPION ZJ, VICKERS MH, GRAVANCE CG, BREIER BH & CASEY PJ. Growth hormone or insulin-like growth factor extends longevity of equine spermatozoa in vitro. Theriogenology, 57v, 1793-1800p, 2002.

CHANDRASHEKAR V & BARTKE A. The role of Growth Hormone in the control of Gonadotropin Secretion in Adult Male Rats. Endocrinology. 139v, 3n, 1067-1074, 1998. BARLTLETT, J. M. S.; CHARLTON, H. M.; ROBINSON, I. C. A. F. & NIESCHLAG, E. Pubertal development and testicular function in the male growth hormone-deficient rat. Journal of Endocrinology, 126v, 193-201p, 1990.

CHOWEN JA, GARCÍA-SEGURA M, GONZÁLEZ-PARRA S & ARGENTE J. Sex steroid effect on the development and functioning of the growth hormone axis. Cellular and Molecular Neurobiology, 16v, 297-310p, 1996.

CIERESZKO A, OTTOBRE JS & GLOGOWSKI J. Effects of season and breed on sperm acrosin activity and semen quality of boars. Animal Reproduction Science, 64v, 89-96p, 2000.

CLAYTON DA, DODA JN & FRIEDBERG EC. Absence of a pyrimidine dimmer repair mechanism for mitochondrial DNA in mouse and human cells. Basic Life Sciences. 1975. In: Meirelles F.V. Herança Mitocondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

CLERMONT Y; OKO R & HERMO L. (1993) Cell biology of mammalian spermiogenesis. In: CUMMINS, J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Reviews of Reproduction, 3v, 172-182p, 1998.

CONNOR EE, BARAO SM, KIMREY AS, PARLIER AB, DOUGLASS LW & DAHL GE. Predicting growth in Angus bulls: The use of GHRH challenge, insulin-like growth factor-I, and insulin-like growth factor binding proteins Journal Animal Science, 78v, 2913-2918p, 2000.

CORDANO P, HAMMON HM, MOREL C, ZURBRIGGEN A & BLUM JW. mRNA of insulin-like growth factor (IGF) quantification and presence of IGF binding proteins, and receptors for growth hormone, IGF-1 and insulin, determined by reverse transcribed

polymerase chain reaction, in the liver of growing and mature male cattle. Domestic Animal Endocrinology, 19v, 191-208p, 2000.

COSTA, MFO. Precocidade Sexual em Bovinos da Raça Nelore. IGF-1, Testosterona e Motilidade Espermática. Dissertação de Mestrado. Apresentada na Área de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 1999.

COUTANT R, DE CASSON FB, ROULEAU S, DOUAY O, MATHIEU E, AUDRAN M, & LIMAL JM. Body Composition, Fasting Leptin, and Sex Steroid Administration Determine GH Sensitivity in Peripubertal Short Children Journal Clinical Endocrinology and Metabolism, 86v, 12n, 5805–5812p, 2001.

CREWS S, OJALA D, POSAKONY J, NISHIGUCHI J & ATTARDI G. Nucleotide sequence of a region of human mitochondrial DNA containing the precisely identified origin of replication. *Nature*. 1979. In: Meirelles F.V. Herança Mitocondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

CUMMINS J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Reviews of Reproduction, 3v, 172-182p, 1998.

DAUGHADAY WH & ROTWEIN P. Insulin-Like Growth Factors I and II. Peptide, Messenger Ribonucleic Acid and Gene Structures, Serum, and Tissue Concentrations. Endocrine Reviews, 10v (1), 68-91p, 1989.

DAVIS ME, Bishop MD, Parks NH & SIMMEN RCM. Divergent Selection for Blood Serum Insulin-Like Growth Factor I Concentration in Beef Cattle: I. Nongenetic Effects. Journal Animal Science. 1995. 73:1927-1932

DAVIS ME & SIMMEN RCM. Genetic parameter estimates for serum insulin-like growth factor-I concentration and carcass traits in Angus beef cattle. Journal Animal Science, 78v, 2305–2313p, 2000.

De PAUW IMC, Van SOOM A, MINTIENS K, VERBERCKMOES S & KRUIF A. In vitro Survival of bovine spermatozoa stored at room temperature under epididymal conditions. Theriogenology, 59v, 1093-1107p, 2003.

DÍAZ-GUERRA GM, HAWKINS F, RAPADO A, RUIZ DÍAZ MA & DÍAZ -CURIEL M. Hormonal and Anthropometric Predictors of Bone Mass in Healthy Elderly Men: Major

Effect of Sex Hormone Binding Globulin, Parathyroid Hormone and Body Weight. Osteoporosis International, 12v, 178–184p, 2001.

DING DC, HUANG YC, LIU JY & WU GJ. Comparison of nitric oxide production and motion characteristics after 3-layer percoll and IxaPrep preparation methods of human sperm. Archives of Gynecology and Obstetric, 266v, 210–213p, 2002.

DUNCAN, W. W.; GLEW, M. J.; WANG, X.J.; FLABERTY, S. P. & MATTHEWS, C. D. Prediction of in vitro fertilization rates from semen variables. Fertility and Sterility, 59v, 6n, 1233-1238p, 1993.

EISENBACH, M. Sperm chemotaxis. Reviews of Reproduction 4v, 56-66p, 1999.

ELGÜN S, KAÇMAZ M, SEN I & DURAK I. Seminal arginase activity in infertility Urology Research, 28v, 20-23p, 2000.

FITZPATRICK LA, FORDYCE G, MCGOWAN MR, BERTRAM JD, DOOGANE VJ, De FAVERIF J, MILLER RG & HOLROYD RG. Bull selection and use in northern Australia Part 2. Semen traits. Animal Reproduction Science, 71v, 39–49p, 2002.

FUJISAWA M, TATSUMI N, FUJIOKA H, KANZAKI M, OKUDA Y, ARAKAWA S & KAMIDOMO S. Nitric oxide productin of rat Leydig abd Sertoli cells is stimulated by round spermatid factor(s). Molecular and Cellular Endocrinology, 160v, 99-105p, 2000.

GABOR G, SASSER RG, KASTELIC JP, COULTER GH, FALKAY GY, MEZES M, BOZO S, VÖLGYI-CSÍK J, BARANY I, SZASZ JR F. Morphologic, endocrine and thermographic measurements of testicles in comparison with semen characteristics in mature Holstein–Friesian breeding bulls. Animal Reproduction Science, 51v, 215–224p, 1998.

GLANDER HJ; KRATZSCH J, WEISBRICH CH & BIRKENMEIER G. Insulin-like growth factor-I and  $\alpha_2$ -macroglobulin in seminal plasma correlate with semen quality. Human Reproduction, 11v (11), 2454-2460p, 1996.

GYLLESTEN UB, WHARTON D & WILSON AC. Maternal inheritance of mitochondrial DNA durind backcrossing of two species of mice. J. Heredity. 1985. In: Meirelles F.V. Herança Mitocondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

HALL PF. Testicular Steroid Synthesis: Organization and Regulation in: KNOBIL, E. & NEILL, J. D. The Physiology of Reproduction, 1335-1362p, 2thed, Raven Press: New York, 1994.

HAN YM, KIM SJ, PARK JS, PARK IY, KANG YK, LEE CS, KOO DB, LEE TH, YU DY, KIM YH, LEE KJ & Lee KK. Blastocyst viability and generation of transgenic cattle following freezing of in vitro produced, DNA-injected embryos. Animal Reproduction Science, 63v, 53-63p, 2000.

HAUSWIRTH WW & LAIPIS PJ. Mitochondrial DNA polymorphism in a maternal lineage of Holstein cows. PNAS USA. 1982. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

HECHT N. (1995) The making of a spermatozoon: a molecular perspective. In: CUMMINS, J. Mitochondrial DNA in mammalian reproduction. Reviews of Reproduction, 3v, 172-182p, 1998.

HENNEY SR, KILLIAN GJ & DEEVER DR. Libido, Hormone Concentrations in Blood Plasma and Semen Characteristics in Holstein Bulls. Journal Animal Science, 68v, 2784-2792p, 1990.

HIXSON JE, WONG TW & CLAYTON DA. Both the conserved stem-loop and divergent 5'-flanking sequences are required for initiation at the human mitochondrial origin of light-strand DNA replication. J. Biol. Chem. 1986. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

HOEFLICH A, REICHENBACH HD, SCHWARTZ J, GRUPP T, WEBER MM, FÖLL J & WOLF E. Insulin-like growth factors and IGF-binding proteins in bovine seminal plasma Domestic Animal Endocrinology, 17v, 39-51p, 1999.

HOLROYD RG, DOOGAN VJ, DE FAVERI J, FORDYCE G, MCGOWAN MR, BERTRAM JD, VANKAN DM, FITZPATRICK LA, JAYAWARDHANA GA & MILLER RG. Bull selection and use in northern Australia 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. Animal Reproduction Science, 71v, 67-79p, 2002.

HOLYOAKE AJ, McHUGH P, WU M, O'CARROLL S, BENNY P, SIN IL & SIN FYT. High incidence of single nucleotide substitutions in the mitochondrial genome is

associated with poor semen parameters in men. International Journal of Andrology, 24v, 175-182p, 2001.

HOLZER Z, AHARONI Y, BROSH A, ORLOV A and BUONOMO F. The influence of recombinant bovine somatotropin on dietary energy level related growth of Holstein-Friesian bull calves. Journal Animal Science, 78v, 621–628p, 2000.

HOLZER Z, AHARONI Y, BROSH A, ORLOV A, VEENHUIZEN JJ & KASSER TR. The Effects of Long-Term Administration of Recombinant Bovine Somatotropin (Posilac) and Synovex on Performance, Plasma Hormone and Amino Acid Concentration, and Muscle and Subcutaneous Fat Fatty Acid Composition in Holstein-Friesian Bull Calves. Journal Animal Science, 77v, 1422–1430p, 1999.

HORNICK JL, EENAEME CV, GÉRARD O, DUFRASNE I & ISTASSE L. Mechanisms of reduced and compensatory growth. Domestic Animal Endocrinology, 19v, 121-132p, 2000.

HUIZINGA HA, KORVER S, McDANIEL BT, POLITIEK RD. Maternal effects due to cytoplasmic inheritance in dairy cattle. Influence on milk production and reproduction traits. Livest. Prod. Sci., 15v, 11-26p, 1986.

HUNT DW, HENRICKS DM, SKELLEY GC & GRIMES LW. Use of Trenbolone Acetate and Estradiol in Intact and Castrate Male Cattle: Effects on Growth, Serum Hormones, and Carcass Characteristics. Journal Animal Science, 69v, 2452-2462p, 1991.

HUXSOLL CC, PRICE EO & ADAMS TE. Testis Function, Carcass Traits, and Aggressive Behavior of Beef Bulls Actively Immunized Against Gonadotropin-Releasing Hormone. Journal Animal Science, 76v, 1760–1766p, 1998.

IMWALLE DB, DAXENBERGER A & SCHILLO KK. Effects of melengestrol acetate on reproductive behavior and concentrations of LH and testosterone in bulls. Journal Animal Science, 80v, 1059–1067p, 2002.

JAGO JG, COX NR, BASS JJ & MATTHEWS LR. The Effect of Prepubertal Immunization Against Gonadotropin-Releasing Hormone on the Development of Sexual and Social Behavior of Bulls1 Journal Animal Science, 75v, 2609–2619p, 1997.

JENUTH JP, PETERSON AC, FU K & SHOUBRIDGE EA. Random genetic drift in the female germ line explains the rapid segregation of mammalian mtDNA. *Nat. Genet.* 1996. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

JONES SJ, JOHNSON RD, CALKINS CR & DIKEMAN ME. Effects of Trenbolone Acetate on Carcass Characteristics and Serum Testosterone and Cortisol Concentrations in Bulls and Steers on Different Management and Implant Schemes. Journal Animal Science, 69v, 1363-1369p, 1991.

KANEKO H, NOGUCHI J, KIKUCHI K, AKAGI S, SHIMADA A, TAYA K, WATANABE G, & HASEGAWA Y. Production and Endocrine Role of Inhibin During the Early Development of Bull Calves. Biology of Reproduction, 65v, 209–215p, 2001.

KEIGHTLEY PD & EYRE-WALKER A. Deleterious Mutations and the Evolution of Sex Science, 290v, 331-333p, 2000.

KOEHLER CM, LINDERBERG GL, BROWN DR, BEITZ DC, FREEMAN AE, MAYFIELD JE & MEYERS AM. Replacement of bovine mitochondrial DNA by sequence variant within one generation. *Genetics*. 1991. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

LECHNIAK D, MACHNIK G, SZYDLOWSKI M & SWITONSKI M. Growth Hormone Gene Polymorphism and Reproductive Performance of AI Bulls. Theriogenology, 52v, 1145-1152p, 1999.

LUFF R. The development of mitochondrial medicine. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1994. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

MAGNABOSCO CU; CORDEIRO CMT; TROVO JBF; MARIANTE AS; LOBO RB. Catálogo de Linhagens do Germoplasma Zebuino: Raça Nelore. JOSAHKIAN, L. A.: EMBRAPA-CENARGEN, Brasília, 52p, 1997.

MANNEN H, KOJIMA T, OYAMA K, MUKAI F, ISHIDA T & TSUJI S. Effect of Mitochondrial DNA Variation on Carcass Traits of Japanese Black Cattle. Journal Animal Science, 76v, 36–41p, 1998.

MATSUZAKI S, IENOYAMA Y, OKUDA K, WATANABE G, KITAMURA N, TAYA K, CRUZANA MBC & YAMADA J. Prepubertal changes in Immunoreactive Inhibin Concentration in Blood Serum Testicular Tissue in Holstein Bull Calves. Journal Veterinary Medical Science, 63v, 1303-1307p, 2001.

McGOWAN MR, BERTRAM JD, FORDYCE G, FITZPATRICK LA, MILLER RG, JAYAWARDHANA GA, DOOGANG VJ, De FAVERI J, HOLROYD RG. Bull selection and use in northern Australia 1. Physical traits. Animal Reproduction Science, 71v, 25–37p, 2002.

MEIRELLES FV. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

MEIRELLES FV, SMITH LC. Mitochondrial genotype segregation in a mouse heteroplasmic lineage produced by embryonic karyoplast transplantation. Genetics, v.145, p.445-451, 1997.

MEIRELLES FV, ROSA AJM, LÔBO RB, GARCIA JM, SMITH LC & DUARTE FAM. Is the American Zebu really *Bos indicus*? Genetics and Molecular Biology, 22v, 543-546p, 1999.

MERCADANTE MEZ, PACKER IU, RAZOOK AG, CYRILLO JNSG, & FIGUEIREDO LA. Direct and correlated responses to selection for yearling weight on reproductive performance of Nelore cows. Journal Animal Science, 81v, 376–384p, 2003.

MIALON MM, RENAND G, KRAUSS D & MENISSIER F. Genetic relationship between cyclic ovarian activity in heifers and cows and beef traits in males. Genet. Sel. Evol. 33v, 273-287p, 2001.

MIDDENDORF R, MÜLLER D, WICHERS S, HOLSTEIN A F & DAVIDOFF M S. Evidence for production and functional activity of Nitric Oxide in seminiferous tubules and blood vessels of the human testis. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 82v, 4154-4161p, 1997.

MOORE FL. & REIJO-PERA RA. Male Sperm Motility Dictated by Mother's mtDNA American Journal Human Genetic, 67v, 543–548p, 2000.

MORLEY JE, KAISER F, RAUM WJ, PERRY HM, FLOOD JF, JENSEN J, SILVER AJ, & ROBERTS E. Potentially predictive and manipulable blood serum correlates of aging in the healthy human male: Progressive decreases in bioavailable testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and the ratio of insulin-like growth factor 1 to growth hormone. Proc. Natl. Acad. Sci., 94v, 7537–7542p, 1997.

MOSER DW, BERTRAND JK, BENYSHEK LL, MCCANN MA & KISER TE. Effects of Selection for Scrotal Circumference in Limousin Bulls on Reproductive and Growth Traits of Progeny, Journal Animal Science, 74v, 2052–2057p, 1996.

MOURA AA & ERICKSON BH. Testicular Development, Histology, and Hormone Profiles in Three Yearling Angus Bulls with Spermatogenic Arrest. Theriogenology, 55v, 1469-1488p, 2001.

MURRAY J.D. Genetic modification of animals in the next Century. Theriogenology, 51v, 149-159p, 1999.

NAGAO Y; TOTSUKAM Y; ATOMI Y; YONEKAWA H; TAKAHASHI S; IMAI H. Mitochondrial DNA affects the phenotype difference in the mice. (subm.). 1997.

NANCARROW CD, MARSHALL JTA, CLARKSON JL, MURRAY JD, MILLARD RM et al. Expression and physiology of performance regulating genes in transgenic sheep. J. Reprod Fert. 1991. in: Murray J.D. Genetic modification of animals in the next Century. Theriogenology, 51v, 149-159p, 1999.

NISHIMURA S, OKANO K, YASUKOUSCHI K, GOTOH T, TABATA S & IWAMOTO H. Testis development and puberty in male Tokara (Japanese native) goat. Animal Reproduction Science, 64v, 127-131p, 2000.

NOLAN CJ, NEUENDORFF DA, GODFREY RW, HARMS PG, WELSH-JR TH, McARTHUR NH & RANDE RD. Influence of Dietary Energy Intake on Prepubertal Development of Brahman Bulls. Journal Animal Science, 68v, 1087-1096p, 1990.

NORTTLE MB, NAGASHIMA H, VERMA PJ, DU ZT, GRUPEN CG, MCILFATRICK SM, ASHMAN RJ, et al. Production and analysis of transgenic pigs containing a metallothionein porcine growth hormone gene construct. In: Murray J.D. Genetic modification of animals in the next Century. Theriogenology, 51v, 149-159p, 1999.

OJEDA SR & URBANSKI HF. Puberty in the Rat. In: KNOBIL, E. & NEILL, J. D. The Physiology of Reproduction, 363-410p, 2nd, Raven Press: New York, 1994.

O'BRYAN MK, ZINI A, CHENG CY & SHCLEGEL PN. Human sperm endothelial nitric oxide synthase expression: correlation with sperm motility. Fertility and Sterility, 70v, 6n, 1143-1147p, 1998.

OYEDIPE EO, KUMI-DIAKA J, OSERI DIK. Determination of Onset of Puberty in Zebu Bulls Under Tropical Conditions of Northern Nigeria. Theriogenology, 16v, 419-432p, 1981

PERRARD-SAPORI MH; CHATELAIN P; VALLIER P & SAEZ JM. In vitro interactions between Sertoli cells and Steroidogenic cells. Biochemical and Biophysical Research Communications, 134v, 2n, 957-962p, 1986.

PICARD-HAGEN N, SOURBE O, LYAZRHI F, COUPET H, HENNEQUIN M, JACOB H & BERTHELOT X. Effect of precocious collection on semen output and quality in young Holstein bulls. Theriogenology, 57v, 1511-1522p, 2002.

PIKO L & TAYLOR KD. Amounts of mitochondrial DNA and abundance of some mitochondrial gene transcripts in early mouse embryos. Develop. Biol. 1987. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

RATNASOORIYA WD & DHARMASHIRI MG. L-arginine, the substrate of nitric oxide synthase, inhibits fertility of male rats. Asian Journal of Andrology, 3v, 97-103p, 2001.

REED PD, VAN VLECK LD. Lack of evidence of cytoplasmic inheritance in milk production traits of dairy cattle. Journal Dairy Science. v.70, p.837-841, 1987.

RENAVILLE R, VAN EENAEME C, BREIER BH, VLEURICK L, BERTOZZI C, GENGLER N, HORNICK JL, PARMENTIER I, ISTASSE L, HAEZEBROECK V, MASSART S, PORTETELLE D. Feed restriction in young bulls alters the onset of puberty in relationship with plasma insulin-like growth factor-I (IGF-I) and IGF-binding proteins. Domestic Animal Endocrinology, 18v, 165-176p, 2000.

REVELLI A, BERGANDI L, MASSOBRIO M, LINDBLOM B, BOSIA A, & GHIGO D. The concentration of nitrite in seminal plasma does not correlate with sperm concentration,

sperm motility, leukocytospermia, or sperm culture Fertility And Sterility, 76v, 3n, 496-500p, 2001.

ROSA E SILVA AAM. Padronização e validação do método de Radioimunoensaio para dosagem da testosterona no plasma, no testículo e no fluido seminal. Ars Veterinaria, 15v (2), p.74-78, 1999.

ROSER JF. Endocrine and paracrine control of sperm production in stallions. Animal Reproduction Science, 68v, 139-151p, 2001.

ROUDEBUSH WE, PURNELL ET & DAVIS ME. Impact of blood serum insulin-like growth factor I on platelet-activating factor in bull spermatozoa. Domestic Animal Endocrinology, 20v, 1-7p, 2001.

RUIZ-PESINI E, LAPEÑA AC, DÍEZ-SANCHEZ C, PÉREZ-MARTOS AC, MONTOYA J, ALVAREZ E, DÍAZ M, URRIÉS A, MONTORO S, LÓPEZ-PÉREZ MJ & ENRÍQUEZ JA. Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. American Journal Human Genetetics, 67v, 682-696p, 2000.

SAEZ JM. Leydig Cells: Endocrine, Paracrine, and Autocrine Regulation. Endocrine Reviews, 15v (5), 574-626p, 1994.

SANTOS RL, SILVA CM, RIBEIRO AFC, VASCONCELOS AC, PESQUERO JL, COLEHO SG, SERAKIDES R & REIS SR. Effect of Growth Hormone and Induced IGF-1 Release on Germ Cell Population and Apoptosis in the Bovine Testis. Theriogenology, 51v, 975-984p, 1999.

SAPOLSKY RM & SPENCER EM. Insulin like growth factor I is suppressed in socially subordinate male baboons. American Journal Physiology. 273v, R1346-R1351p, 1997.

SCHANBACHER BD. Pituitary and Testicular Responses of Beef Bulls to Active Immunization Against Inhibin Alpha. Journal Animal Science, 69v, 252-257p, 1991.

SCHOONMAKER JP, LOERCH SC, FLUHARTY FL, TURNER TB, MOELLER SJ, ROSSI JE, DAYTON WR, HATHAWAY MR & WULF DM. Effect of an accelerated finishing program on performance, carcass characteristics, and circulating insulin-like growth factor I concentration of early-weaned bulls and steers. Journal Animal Science, 80v, 900-910p, 2002.

SCHUTZ MM, FREEMAN AE, LINDBERG GL, BEITZ DC. Effects of maternal lineages grouped by mitochondrial genotypes on milk yield and composition. J. Dairy. Sci., v.76, p.621-629, 1993.

SCHAISSON G, YOUNG J, PHOLSENA M, NAHOUL K & COUZINET B. Failure of Combined Follicle-Stimulating Hormone-Testosterone Administration to Initiate and/or Maintain Spermatogenesis in Men with Hypogonadotropic Hypogonadism. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 77v, 1545-1549p, 1993.

SEO BB, KIM CH, YAMANOUCHI K, TAKAHASHI M, SAWASAKI T, TACHI C & TOJO H. Co-Injection of restriction enzyme with foreign DNA into the pronucleus for elevating production efficiencies of transgenic animals. Animal Reproduction Science., 63v, 113-122p, 2000.

SHARPE RM, BARTLETT JMS. & ALLENBY G. Evidence for the control of testicular interstitial fluid volume in the rat by specific germ cell types. Journal of Endocrinology, 128, 359-367p, 1991.

SHARPE RM, MADDOCKS S & KERR JB. Cell-cell Interactions in the Control of Spermatogenesis as Studied Using Leydig Cell Destruction and Testosterone Replacement. The American Journal of Anatomy, 188v, 3-20p, 1990.

SILVA AEDF, DODE MAN, PORTO JA & ABREU UGP. Estacionalidade na atividade sexual de machos bovinos Nelore e mestiços Fleckvieh x Nelore e Chianina x Nelore. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 26v, 10n, 1751-1760p, 1991.

SILVA AEDF, DODE MAN. & UNANIAN MM. The establishment of puberty in Zebu bulls of the Nelore breed raised in Central Brazil. In: WORLD CONGRESS ON SHEEP AND BEEF CATTLE BREEDING, 3, 1988, Paris. Proceedings... Paris: INRA, 2v, 613-616p, 1988.

SILVA-MENA C, AKÉ-LÓPEZ R & DELGADO-LÉON R. Sexual Behavior and pregnancy rate of Bos indicus Bulls. Theriogenology, 53v, 991-1002p, 2000.

SIMONETTI S, CHEN X, DIMAURO S & SCHON EA. Accumulation of deletions in human mitochondrial DNA during normal aging: Analysis by quantitative PCR. Biochim.

Biophys. Acta Mol. Basis Dis. 1992. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

SMITH LC, BORDINGNON V, GARCIA JM & MEIRELLES FV. Mitochondrial Genotype segregation and effects during mammalian development:: Applications to biotechnology. Theriogenology, 53v, 35-46p, 2000.

SMITH JM, Van AMBURG ME, DÍAZ MC, LUCY MC & BAUMAN DE. Effect of nutrient intake on the development of the somatotropic axis and its responsiveness to GH in Holstein bull calves. Journal Animal Science, 80v, 1528–1537p, 2002.

SOSA JM, SENGER PL & REEVES JJ. Evaluation of American Wagyu sires for scrotal circumference by age and body weight. Journal Animal Science, 80v, 19–22p, 2002.

SPITERI-GRECH J, BARTLETT JMS & NIESCHLAG E. Regulation of testicular insulin-like growth factor-I in pubertal growth hormone-deficient male rats. Journal of Endocrinology, 131v, 279-285p, 1991.

STROBL JS & THOMAS MJ. Human Growth Hormone. Pharmacological Reviews, 46v (1), 1-34p, 1994.

STOCCO DM. A StAR rearch: Implications in controllig steroidogenesis. Biology of Reproduction 56: 328-336,1997.

SUTARNO, CUMMINS JM, GREEFF J & LYMBERY AJ. Mitochondrial NA polymorphisms and fertility in beef cattle. Theriogenology, 57v, 1603-1610p, 2002.

SUTOVSKY P, MORENO RD, RAMALHO-SANTOS J, DOMINKO T, SIMERLY C & SCHATTEN G. Ubiquitinated Sperm Mitochondria, Selective Proteolysis, and the Regulation of Mitochondrial Inheritance in Mammalian Embryos. Biology of Reproduction, 63v, 582–590p, 2000.

TESS MW & MacNEILT MD. Evaluation of Cytoplasmic Genetic Effects in Miles City Line Hereford Cattle Journal Animal Science, 72v, 851-856p, 1994.

THOMAS MG, ENNS RM, HALLFORD DM, KEISLER DH, OBEIDAT BS, MORRISON CD, HERNANDEZ JA, BRYANT WD, FLORES R, LOPEZ R & NARRO L. Relationships of metabolic hormones and serum glucose to growth and reproductive development in

performance-tested Angus, Brangus, and Brahman bulls, Journal Animal Science, 80v, 757–767p, 2002.

TOMÉ AR, SILVA JCR, SOUZA AAA, MATTOS JPV, VALE MR & RAO VSN. Possible involvement of nitric oxide in pilocarpine induced seminal emission in rats. General Pharmacology, 33v, 479-485p, 1999.

ZINI A, O'BRYAN MK & SCHLEGEL PN. Nitric oxide synthase activity in human seminal plasma. Urology, 58v, 85-89p, 2001.

WALLACE DC. Mitochondrial disease in man and mouse. Science. 1999. In: Meirelles F.V. Herança Mitochondrial do Zebu. Tese de Doutorado, Ribeirão Preto, 138p, 1999.

WANG C, LEE, GS, LEUNG A, SURREY ES & CHAN SYW. Human sperm hyperactivation and acrosome reaction and their relationships to human in vitro fertilization. Fertility and Sterility, 59v, 6n, 1221-1227p, 1993.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)