

## Evaluación de factores ambientales y genómicos asociados a características de fertilidad de toros Brahman élite en la Orinoquia colombiana

### Evaluation of environmental and genomic factors associated to fertility traits of elite Brahman bulls in the Colombian Orinoquia

Guillermo Andrés Torres Leyva<sup>1</sup>, Liliana Chacón Jaramillo<sup>1,2</sup>, Ariosto Ardila Silva<sup>1</sup>, William Burgos-Paz<sup>3,4</sup>

#### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de factores ambientales en la fertilidad de toros Brahman élite, así como polimorfismos con asociación significativa a estas características. Dieciocho toros con evaluación de la salud reproductiva (BSE) satisfactoria fueron monitoreados reproductivamente en dos temporadas de monta en lotes con 50 hembras aptas para la reproducción. Se colectaron muestra de sangre a los toros para la extracción de ADN y genotipificación de 26 151 SNPs con el chip GGP-LD (Geneseek). Se analizaron los efectos ambientales y los genotipos de los SNPs sobre las características de fertilidad. La temporada de monta y el estado reproductivo incidieron significativamente ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de espermatozoides normales y la concentración de espermatozoides. El análisis genómico reveló una región en el cromosoma BTA9 (55.7-55.9 Mb) asociada con el aumento en el porcentaje de espermatozoides normales y una región en el cromosoma BTA4 asociada con un incremento de 2.25 veces

<sup>1</sup> Grupo de investigación en Reproducción y Mejoramiento Genético en Animales Tropicales (REMEAT), Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

<sup>2</sup> Dirección de Posgrados, Universidad de La Salle, Bogotá, Colombia

<sup>3</sup> Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria – AGROSAVIA, Centro de Investigación Tibaitatá, Bogotá, Colombia

<sup>4</sup> E-mail: [wburgos@agrosavia.co](mailto:wburgos@agrosavia.co)

Recibido: 7 de febrero de 2021

Aceptado para publicación: 14 de enero de 2022

Publicado: 25 de febrero de 2022

©Los autores. Este artículo es publicado por la Rev Inv Vet Perú de la Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la licencia Creative Commons Atribución 4.0 Internacional (CC BY 4.0) [<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.es>] que permite el uso, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citada de su fuente original

la concentración espermática. Esta última, contiene genes directamente implicados en rutas metabólicas de la síntesis de esteroides producidos en las células de Leydig y requeridos en la espermatogénesis. Las señales de asociación identificadas en este estudio coincidieron con regiones que albergan genes de gran relevancia en la reproducción.

**Palabras clave:** cebú, espermatozoides, fertilidad, SNPs

## ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the effect of environmental factors on the fertility of elite Brahman bulls, as well as polymorphisms with significant association with these characteristics. Eighteen bulls with satisfactory Breeding Soundness Examination (BSE) were reproductively monitored in two breeding seasons in herds with 50 females suitable for reproduction. Blood samples were collected from the bulls for DNA extraction and genotyping of 26 151 SNPs with the GGP-LD chip (Geneseek). The environmental effects and genotypes of SNPs on fertility characteristics were analyzed. The mating season and the reproductive status had a significant impact ( $p < 0.05$ ) on the percentage of normal sperm and the concentration of sperm. Genomic analysis revealed a region on the BTA9 chromosome (55.7-55.9 Mb) associated with an increase in the percentage of normal sperm and a region on the BTA4 chromosome associated with a 2.25-fold increase in sperm concentration. The latter contains genes directly involved in metabolic pathways for the synthesis of steroids produced in Leydig cells and required in spermatogenesis. The association signals identified in this study coincided with regions that harbor genes of great relevance in reproduction.

**Keywords:** fertility, SNPs, sperm, zebu

## INTRODUCCIÓN

La población de ganado bovino en Colombia en 2019 fue de 28 245 262 cabezas (ICA, 2020), de los cuales cerca del 50% corresponden a bovinos *Bos indicus* concentrados en regiones de amplia tradición ganadera en el país como Casanare y Meta que cuentan con el segundo y cuarto lugar del inventario bovino, respectivamente (FEDEGAN, 2019). Dadas las condiciones ambientales donde se desarrolla la ganadería de carne en Colombia, los bovinos tipo cebú son un excelente recurso genético por su grado de adaptación a los sistemas productivos en el trópico. Sin embargo, pese al incremento de este tipo de animales (Utsunomiya *et al.*, 2019), los toros *Bos indicus* no superan

las cualidades reproductivas de los toros *Bos taurus* (Aponte *et al.*, 2005), como el rápido desarrollo testicular y la pubertad temprana, habiendo reportes donde los machos Brahman (*Bos indicus*) alcanzaron la pubertad entre los 16 y 17 meses de edad (Silva-Mena, 1997); sin embargo, la moderada a alta heredabilidad de las características testiculares (Evans *et al.*, 1999) abre la posibilidad de realizar una efectiva selección en los toros reproductores.

De hecho, la correcta selección de los toros reproductores puede aportar el 85% de la eficiencia reproductiva del hato (Menegassi *et al.*, 2011). Entonces es fundamental aplicar metodologías adecuadas para evaluar y mejorar el desempeño de los toros bajo condiciones de monta natural, a fin de lograr que un toro establezca la preñez en más de 25

hembras sanas en una temporada de reproducción de 65 a 70 días, pues toros no seleccionados pueden llegar a presentar entre 20 y 40% de fertilidad reducida (Kastelic *et al.*, 2012). Por lo tanto, los toros deben seleccionarse para producir un alto número de terneros (Holroyd *et al.*, 2002), y para esto, deben exhibir actividad sexual intensa durante un periodo corto (por ejemplo, 30 horas).

Uno de los parámetros más asociados a la fertilidad es la circunferencia escrotal. Además, es un indicador consistente de la pubertad (Vargas *et al.*, 1998), y tiene correlación con otras variables de fertilidad como el porcentaje de espermatozoides normales y la concentración espermática (Siddiqui *et al.*, 2008; Fortes *et al.*, 2012b). Además, existen prácticas más eficientes para evaluar la fertilidad del toro como la evaluación de la salud reproductiva (*Breeding Soundness Examination – BSE*) (Chacon *et al.*, 1999; Chenoweth, 2002; Garcia-Paloma, 2015).

La evaluación del potencial reproductivo del toro se puede acompañar con la generación de indicadores de selección de toros fértiles (Boligon *et al.*, 2010; Corbet *et al.*, 2013). La limitada generación de información sobre la fertilidad puede afectar la estimación de valores genéticos como criterio de selección; sin embargo, las actuales herramientas genéticas permiten identificar regiones genómicas asociadas con rasgos involucrados a las características reproductivas en el toro (Hawken *et al.*, 2012; Fortes *et al.*, 2013) y emplearlas como criterios de selección, inclusive desde el primer mes de vida (Fortes *et al.*, 2012a). Ante esto, el objetivo del estudio fue evaluar variables asociadas a la fertilidad de toros Brahman durante un año en dos temporadas de monta e identificar genes asociados a estas características que pudieran ser empleadas como criterio de selección.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Localización

El estudio se realizó en nueve fincas de los departamentos de Meta y Casanare, pertenecientes a la Orinoquia de Colombia. La zona presenta temperaturas entre 23 y 37 °C, humedad relativa de 76% y de carácter monomodal, con una época de lluvias de abril a noviembre y una época seca de diciembre a abril ([www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)). La topografía de la región es plana con suelos tipo arcillosos y pobres en minerales. La región se encuentra clasificada como de clima ecuatorial monsoon (Kotteck *et al.*, 2006).

### Selección y Manejo de Animales

Se seleccionaron 18 toros Brahman, entre 5 y 8 años de edad, nacidos y criados en la región. Estos animales, clasificados como élite por contar con registro de pureza expedido por la asociación de la raza en Colombia. Se incluyeron en el estudio por tener un excelente historial reproductivo (registros reproductivos de los hatos) y mostrar un temperamento dócil durante la colecta de material seminal en las fincas. El sistema de alimentación fue al pastoreo con praderas de *Brachiaria decumbens* y *B. humidicola*, con acceso a sal mineralizada y agua a voluntad.

Se evaluaron 4852 vacas *Bos indicus* a través de la condición corporal y la medición de las estructuras ováricas (tamaño de los folículos), las cuales debían superar 9.6 mm de diámetro para asegurar que las vacas no se encontraban en anestro (Ruiz-Cortés y Olivera-Angel, 1999), seleccionándose 1800 vacas. Estas se manejaron en lotes de monta con relación toro:vaca 1:50 durante tres meses, seguida de dos meses de descanso. La relación toro:vaca y los tiempos de monta y

descanso son superiores a los empleados en la región con relaciones toro vaca que oscilan entre 1:25 a 1:30, dos meses de monta y un mes de descanso.

La primera temporada de monta se realizó entre abril y junio, época caracterizada por un aumento en las precipitaciones (434 mm y 76% de humedad relativa) ([www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)), seguida de una temporada de descanso de dos meses. La segunda temporada de monta fue entre septiembre y noviembre, con 268 mm de precipitación y 55% de humedad relativa. La precipitación fue de 21 mm y la humedad relativa de 32% en el último periodo de descanso ([www.ideam.gov.co](http://www.ideam.gov.co)).

### **Evaluación de la Salud Reproductiva**

A cada toro se le realizó la evaluación de la salud reproductiva (BSE), siguiendo las normas de la Sociedad de Teriogenología (Chenoweth *et al.*, 1992). La primera evaluación BSE permitió la selección de los animales, y luego a los toros seleccionados se les hizo el BSE antes del primer y segundo periodo de monta, así como al finalizar el segundo periodo de descanso.

En cada BSE se examinaron los testículos, los epidídimos (cabeza, cuerpo y cola) y el cordón espermático mediante palpación. En los casos que se determinaba presencia de líquido o de material diferente a la textura testicular se realizó ecografía testicular. La circunferencia escrotal (CE) se cuantificó con cinta métrica escrotal en la parte más ancha del diámetro testicular (Higdon *et al.*, 2000).

En cuanto a la evaluación de la calidad seminal incluida en el BSE, se realizó una colecta de semen a cada toro por visita y temporada. En cada colecta se evaluó la presencia de contaminantes en el semen, aunque la respuesta de los toros y su temperamento permitió obtener un semen de alta calidad en todas las colectas. Los toros se inmovilizaron en un brete ganadero y el semen fue colectado mediante electroeyaculación (Ideal®

ElectroJac®6, Neogen Animal Safety, USA). Se generó un estímulo intermitente que iba en aumento hasta que se logró la eyaculación (Palmer, 2005; Whitlock *et al.*, 2012). Se midió el volumen seminal y la concentración de espermatozoides en el eyaculado se cuantificó con un fotómetro (Photometer SDM 1, Minitube, Alemania).

El semen fue observado con un microscopio binocular con contraste de fase (Olympus BX, Japón) y plancha térmica a 37 °C para determinar la motilidad progresiva individual y masal, morfología espermática, así como el vigor y viabilidad espermática. Para la motilidad progresiva individual, se colocó una gota de semen de 3-4 mm de diámetro en un portaobjetos temperado (35-37 °C) y cubierta con un cubreobjetos. La muestra se observó con el microscopio de contraste de fase 400x y se estimó el porcentaje de células con movimientos progresivos, el cual debe estar por encima del 30% (Kastelic *et al.*, 2012). Para la motilidad masal se analizó en una gota de semen de 5 a 10 mm de diámetro, colocada sobre un portaobjeto (35-37 °C) sin cubreobjeto. Se observó la concentración, el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo y la velocidad de movimiento de los espermatozoides y se cuantificó el movimiento ondulatorio del semen (Alexander, 2008).

La evaluación de las anomalías morfológicas y la viabilidad espermática se realizaron mediante la coloración con eosin-nigrosina y se expresaron en porcentaje. Las anomalías mayores no deben sobrepasar del 15-20% de los defectos observados. El vigor espermático se evaluó en una escala de 0 a 5, con una puntuación de 5 cuando se observan movimientos rápidos y vigorosos de los espermatozoides, y 0 cuando no se observa movimiento (Kastelic *et al.*, 2012).

Con la información obtenida del BSE y la evaluación del semen se generó la clasificación andrológica por puntos (CAP) para cada toro (Fonseca *et al.*, 1997). Las características que se incluyeron en el CAP fue-

ron vigor, motilidad progresiva individual, anomalías mayores y la circunferencia escrotal (Lopes *et al.*, 2009). En este trabajo se tomaron en cuenta las cinco libertades de los animales del Farm Animal Welfare Council (1992) y del principio de las 3Rs de Rusel y Burch (1959).

### Análisis Molecular

Se colectaron muestras de sangre de los toros mediante punción en la vena coccígea para la extracción de ADN con kits comerciales y el genotipado con el chip comercial Genomic Profiler Bovine LD GGP-LD (GeneSeek®) en el Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Investigación Tibaitatá de AGROSAVIA, Colombia ([www.agrosavia.co](http://www.agrosavia.co)). La base de datos genómica contenía la información de 26 151 polimorfismos de nucleótido simple (SNPs), pero únicamente se consideraron aquellos con posición conocida en autosomas en la versión del genoma bovino UMD3.1. disponible en Ensembl ([https://oct2018.archive.ensembl.org/Bos\\_taurus/Info/Annotation](https://oct2018.archive.ensembl.org/Bos_taurus/Info/Annotation)). Adicionalmente, se consideraron SNPs donde el alelo de menor frecuencia (MAF) superior a 0.05 y *call rate* mayor de 95% y que se alejaron del equilibrio Hardy Weinberg ( $p < 0.0001$ ). Finalmente, se generó una base de datos con 19 790 SNPs. La depuración de la base de datos se realizó con el programa PLINK (Purcell *et al.*, 2007).

### Análisis Estadístico

Luego de evaluar la información respecto a la presencia de datos atípicos, se aplicaron modelos lineales de medidas repetidas para determinar la incidencia del efecto aleatorio de individuo y los efectos fijos de temporada (lluvia, seca) y estado reproductivo (monta, descanso) en las variables circunferencia escrotal (CE), clasificación andrológica por puntos (CAP), porcentaje de espermatozoides normales (EspNorm), concentración espermática (ConcEsper) y motilidad espermática (MotEsper).

El modelo empleado fue  $y_{ijk} = m + a_i + b_j + t_k + e_{ijk}$  donde,  $y_{ijk}$  corresponde a las medidas de las variables CE, CAP, EspNorm, ConcEsper y MotEsper en los individuos;  $m$  corresponde a la media general;  $a$  y  $b$  hacen referencia a los efectos temporada y estado reproductivo;  $t_k$  es el efecto aleatorio del individuo y  $e_{ijk}$  es el error experimental.

Las medias mínimo-cuadráticas de las variables según el efecto fueron comparadas con la prueba Tukey-Kramer con el paquete *Lsmeans* del programa R (R Core Team, 2018). Posteriormente, se aplicó un modelo lineal que incluyó los efectos fijos significativos para la variable correspondiente y el efecto de los genotipos observados en cada SNP para identificar posibles variantes del genoma que pudieran incidir en las características evaluadas y que estuvieran relacionadas con la ubicación de genes de interés. Considerando la muestra de 18 toros con genotipo, se evaluó la estructura y diferenciación genética de los individuos mediante un análisis de componentes principales, aunque aspectos como el desequilibrio de ligamiento que mostró una tendencia plana y las frecuencias alélicas limitaron la detección de variantes raras. Luego de realizar los análisis de regresión, se emplearon las pruebas de comparación múltiple de Bonferroni ( $BF = 0.05/19\ 789 = 2.53 \times 10^{-6}$ ) y False Discovery Rate (FDR) para determinar la significancia de los SNP y buscar menor presencia de falsos positivos. Además, se realizaron representaciones gráficas de la significancia de los SNP acorde a su posición en el genoma (manhatan plot).

La implementación del modelo lineal, las pruebas de comparación múltiple y los gráficos se realizaron con el programa R (R Core Team, 2018). Por último, con la anotación del genoma bovino disponible en *Ensembl* ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)) se identificaron los genes ubicados en un área de 200 kb alrededor (*upstream* y *downstream*) de los SNPs con significancia estadística. Se buscaron las funciones biológicas de los genes mediante análisis de ontologías ([www.geneontology.org](http://www.geneontology.org)) y se revisó su participación en rutas metabólicas.

Cuadro 1. Estadísticos descriptivos para las cinco variables reproductivas analizadas medida en toros Brahman y su relación con la temporada y el estado reproductivo

Variable	Media	DE	Min	Max	CV	Temporada		Estado Reproductivo	
						Seca	Lluvia	Monta	Descanso
CE	41.32	2.47	37.5	48	5.98	41.31± 0.53 <sup>a</sup>	41.33± 0.41 <sup>a</sup>	41.25± 0.53 <sup>a</sup>	41.36± 0.33 <sup>a</sup>
CAP	80.32	11.12	40	99	13.84	81.64± 2.40 <sup>a</sup>	78.28± 1.86 <sup>a</sup>	78.97± 2.40 <sup>a</sup>	81.24± 1.52 <sup>a</sup>
EspNormal	83.33	8.72	54	100	10.47	84.81± 1.43 <sup>a</sup>	81.11± 1.43 <sup>b</sup>	84.08± 1.88 <sup>a</sup>	82.83± 1.19 <sup>a</sup>
ConcEsper	5.98E+08	4.07E+08	0.00E+00	1.61E+09	68.08	592 ± 8.8x10 <sup>6a</sup>	606± 6.8x10 <sup>6a</sup>	477± 8.5 x10 <sup>6a</sup>	677± 5.4 x10 <sup>6b</sup>
MotEsper	75.44	19.66	0	95	26.07	77.96± 4.20 <sup>a</sup>	71.66± 3.25 <sup>a</sup>	73.75± 4.24 <sup>a</sup>	76.57± 2.68 <sup>a</sup>

CE: circunferencia escrotal (cm), CAP: capacidad andrológica por puntos, EspNormal: espermatozoides normales (%), ConcEsper: concentración espermática (Espz/ml), MotEsper: motilidad individual progresiva (%), DE=Desviación Estándar; CV= coeficiente de variación.

<sup>ab</sup> letras diferentes indican diferencia estadística significativa  $p<0.05$

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados descriptivos de las variables en estudio se presentan en el Cuadro 1. Solo los niveles de los efectos temporada (clima) y el estado reproductivo (monta o descanso) generaron diferencias estadísticas significativas ( $p<0.05$ ) en las variables espermatozoides normales y concentración de espermatozoides, respectivamente. La circunferencia escrotal mayor de 37.5 cm observada en este estudio clasifica a los toros como muy buenos según la clasificación del Colegio Brasileiro de Reproducción Animal (CBRA, 2013), y con medidas similares a las reportadas por Céspedes (2013). Esta medida no presentó cambios importantes en el tiempo (CV=5.98) que pudieran ser asociados a condiciones ambientales o de manejo por las temporadas de monta (Cuadro 1).

La medida de la capacidad andrológica por puntos (CAP = 80.32 ± 11.12) correspondió a una clasificación de muy bueno (Fonseca *et al.*, 1997), siendo valores menos homogéneos que los presentados con la circunferencia escrotal (CV= 13.84). No obstante, es importante correlacionar esta medida con la tasa de preñez debido a que se ha reportado que no hay influencia del valor del CAP con respecto a la tasa de preñez (Lopes *et al.*, 2009).

El porcentaje de espermatozoides normales es adecuado dentro del CAP y superior al requerido como indicador de la calidad seminal (CBRA 2013), aunque el valor mínimo se encuentra por debajo de lo aceptable (Cuadro 1). La concentración de espermatozoides superó los 250 y 350 millones de espermatozoides por mililitro reportado por Kastelic *et al.* (2012) y la CBRA (2013), res-

pectivamente. Sin embargo, hay una alta heterogeneidad en los valores de la variable (CV= 68.08) causada por el estado reproductivo del animal (descanso o monta), al grado de observar azoospermia (Cuadro 1). Evaluar la concentración espermática permitiría identificar si el toro requiere recuperación para los próximos BSE, causada por el exceso de servicio sexual y las condiciones ambientales (Vejarano *et al.*, 2005; Ruíz-Sesma *et al.*, 2010).

A pesar de que los factores ambientales como la reducción de las lluvias o la temperatura juegan un papel relevante en los parámetros espermáticos (Igna *et al.*, 2010), la respuesta individual al estrés térmico puede ser diferente; por ejemplo, Staalhammar *et al.* (1989) reportaron una concentración más alta y mayor número de espermatozoides durante la época de verano, mientras que Mathevon *et al.* (1998) los encontraron en invierno. En este estudio, la concentración espermática fue más afectada por el estado reproductivo que por la temporada (Cuadro 1), similar a lo observado en otros reportes (Brito *et al.*, 2002). La producción de espermatozoides y la calidad del semen en ambientes tropicales disminuyen durante la temporada de calor en toros *Bos taurus* y mestizos en comparación con toros *Bos indicus* (Fields *et al.*, 1979; Kumi-Diaka *et al.*, 1981). Las condiciones de verano (mayor temperatura ambiental, la humedad relativa y radiación solar) aumentan la carga térmica en los animales y causan una disminución significativa en el potencial de producción, pudiendo incluso ser perjudiciales para la salud del animal (Majic Balic *et al.*, 2012).

El efecto perjudicial de la alta temperatura ambiental sobre la calidad del semen y la fertilidad del macho puede atribuirse a las vías hipotálamo-hipofisarias o al efecto directo de la temperatura sobre la función testicular y epididimaria (Pineda, 2003). La temperatura ambiental elevada durante el verano puede aumentar la temperatura testicular, la tasa metabólica y los requerimientos de oxígeno

(Gadea *et al.*, 2004). Si el metabolismo intensificado no es seguido por un flujo sanguíneo mejorado, el tejido testicular se vuelve hipóxico, lo que resulta en una producción excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y peroxidación lipídica, estrés oxidativo y disminución de la motilidad de los espermatozoides (Nichi *et al.*, 2006).

No se identificaron relaciones genéticas entre los individuos ni agrupamientos por su región de origen a partir del análisis de componentes principales (Figura 1). Sin embargo, el análisis reveló una estrecha relación entre los toros T6, T15 y T17, que al evaluar el pedigrí se identificó una relación de parentesco en los abuelos de T6 y T15. No se contó con genealogía para el individuo T17 que pudiera aportar pistas sobre una posible relación cercana con los otros toros. La inclusión del efecto de estructura poblacional no incidió ( $p > 0.05$ ) en la media fenotípica observada en este estudio.

Los análisis de asociación genómica se realizaron para cada una de las variables incluidas en este estudio, pero como se esperaba por el análisis previo (Cuadro 1), las variables circunferencia escrotal y motilidad espermática no presentaron señales de asociación. Para la variable CAP, el SNP Hapmap48689-BTA-23260 presentó la mayor significancia estadística ( $p = 6.174 \times 10^{-5}$ ), aunque no superó el umbral de significancia después de la corrección de Bonferroni ( $2.53 \times 10^{-6}$ ) y presentó un FDR de 0.72. En cambio, para las variables concentración espermática y espermatozoides normales se encontraron cuatro regiones del genoma con señales de asociación (Cuadro 2, Figura 2), aunque solo una región en cada variable cumplió con los umbrales para comparación múltiple.

La utilización de modelos de medidas longitudinales (medidas repetidas) mejora notablemente el poder de detección de variantes alélicas asociadas a los fenotipos respecto a un modelo que emplea la media

Cuadro 2. Descripción de los cuatro SNPs más significativos del análisis de asociación genómica para concentración de espermatozoides y los espermatozoides normales

Variable	SNP	Cromosoma	Posición	<i>p</i> value	FDR
ConcEsper	BTA-98685-no-rs	4	116666797	2.70E-06	0.053
	BovineHD1600007195	16	25885965	5.02E-05	0.346
	BovineHD2300001781	23	7072206	5.38E-05	0.346
	BovineHD1900018886	19	33398790	6.98E-05	0.346
EspNormal	BovineHD0900015955	9	58338016	6.50E-06	0.084
	BovineHD0900015295	9	55714053	1.23E-05	0.084
	BovineHD1500025734	15	36415245	1.55E-05	0.084
	BTB-01601529	6	66209350	1.70E-05	0.084

FDR: False Discovery Rate; EspNormal: espermatozoides normales, ConcEsper: concentración espermática,  
No.sig= $p > 0,05$ ; Sig= $p < 0,05$

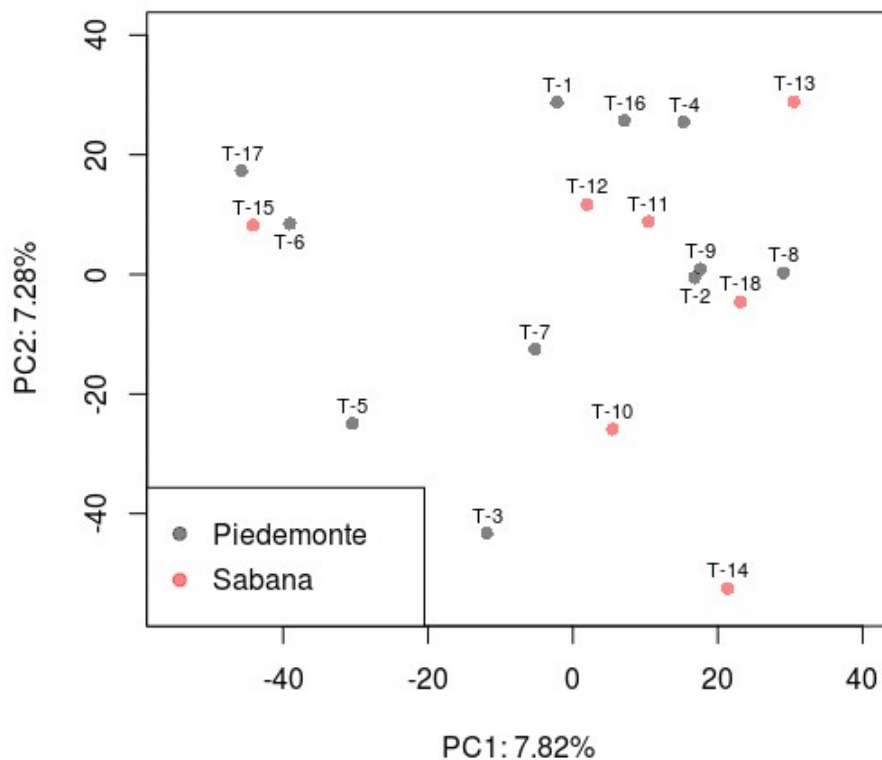


Figura 1. Análisis de componentes principales con 19 789 SNPs en 18 toros Brahman de la Orinoquia de Colombia



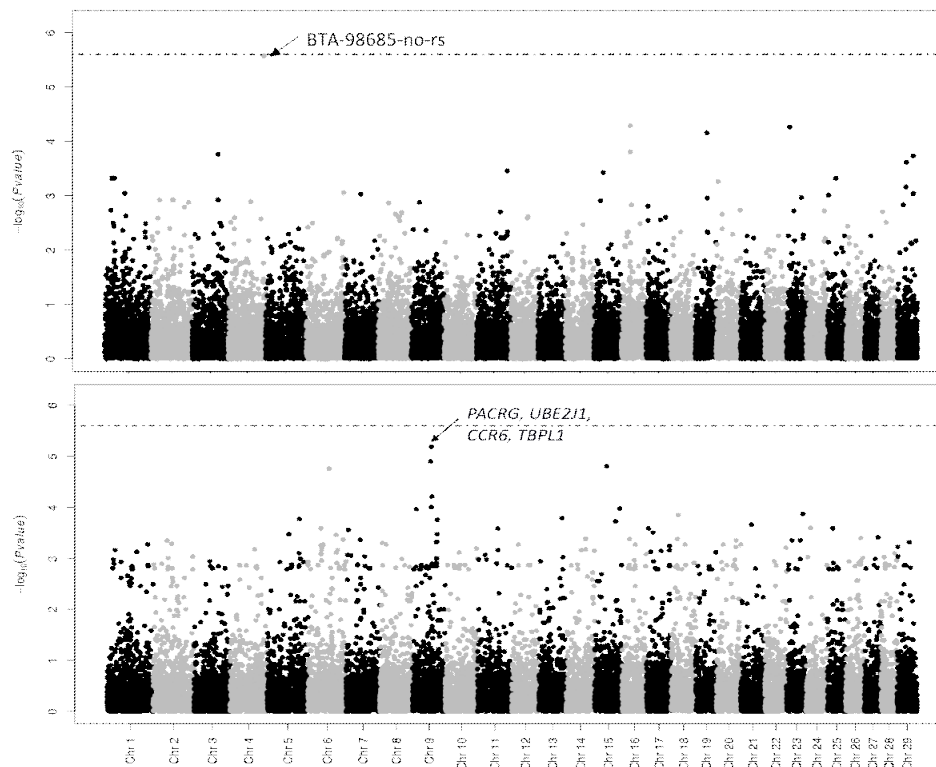


Figura 2. Manhattan plot de los resultados del análisis de asociación genómica para concentración espermática (arriba) donde se destaca el SNP BTA-98685-no-rs ubicado en el BTA4 y el porcentaje de espermatozoides normales (abajo) con los SNP's BovineHD0900015955 y BovineHD0900015295 ubicados en el cromosoma BTAU9

fenotípica observada en los individuos (Rönnegård *et al.*, 2016) dado que permite modelar las estructuras de (co)varianza de las observaciones fenotípicas en el tiempo y el genotipo de los individuos. De hecho, se ha observado que no considerar la estructura de correlación entre el tiempo y el fenotipo incrementa el número de falsos positivos (Ghosh y Fardo, 2018).

Este tipo de modelos puede ser favorable cuando el tamaño de muestra es limitado, dado que en un escenario de análisis con fenotipos medidos en un tiempo específico, se pierde poder en la estimación de asociaciones verdaderas y no resalta los factores genéticos y epigenéticos que se destacan al considerar los efectos de ambiente permanente (Rönnegård *et al.*, 2016).

### Concentración Espermática

El análisis de asociación para la concentración espermática permitió identificar el SNP BTA-98685-no-rs ubicado en el BTA4 con un FDR 0.053 (Figura 2), el cual mostró un efecto de sustitución alélica aditivo y donde los individuos con dos copias del alelo de menor frecuencia (AA) presentaron una concentración espermática 2.25 veces superior a la observada en individuos con el genotipo GG (Cuadro 3). La región del BTA4 con señal de asociación contiene algunos genes relacionados con la síntesis y metabolismo de esteroides. Particularmente, los genes *INSIG1* y *PAXIP1* forman parte de rutas metabólicas de síntesis de esteroides, los cuales son producidos en las células de Leydig de los machos y se requieren para la esper-

Cuadro 3. Frecuencia genotípica y concentración espermática para los genotipos del SNP BTA-98685-no-rs

Genotipo	Frecuencia genotípica	Concentración espermática (Espz/ml)
GG	0.38	466.83x10 <sup>6</sup> ± 63.0x10 <sup>6</sup>
AG	0.38	674.28x10 <sup>6</sup> ± 79.4x10 <sup>6</sup>
AA	0.22	1052,79x10 <sup>6</sup> ± 93.1x10 <sup>6</sup>

Espz/ml: espermatozoides por mililitro

matogénesis y, por ende, en la concentración espermática (Eacker *et al.*, 2008).

*INSIG1* (*Insulin Induced Gene 1*) codifica una proteína que bloquea la activación proteolítica de las proteínas de unión al elemento regulador de esteroides, que son factores de transcripción que activan los genes que regulan el metabolismo del colesterol, los ácidos grasos y la glucosa (Sun *et al.*, 2012) y en el control de retroalimentación de la síntesis de lípidos (Sever *et al.*, 2004). La relación a nivel bioquímico y fisiológico de *INSIG1* es relevante para la reproducción. Por ejemplo, la síntesis de colesterol y otros lípidos de membrana en las células de los mamíferos está regulada por proteínas de unión a elementos reguladores de esteroides (SREBPs) del retículo endoplásmico (ER) para el complejo Golgi y son un factor de transcripción en la membrana que activan genes asociados a la síntesis de lípidos (Brown *et al.*, 2000). El colesterol es el precursor esencial de todas las hormonas esteroideas y que para los machos es un proceso altamente regulado en las células de Leydig para mantener la homeostasis adecuada del colesterol (Eacker *et al.*, 2008). Esta misma región fue identificada por una señal de asociación genómica cuando se evaluó la hipoplasia testicular en el ganado Nelore (Neves *et al.*, 2019). Por la relación de las variables observadas *INSIG1* puede considerarse un excelente gen candi-

dato para la evaluación reproductiva de toros cebú, y determinar la presencia de variantes en las secuencias asociadas con cambios en el patrón de expresión.

Posteriormente, se analizó una región de 200Kb que rodea el SNP BTA-98685-no-rs, la cual contiene 24 genes- Al realizar el análisis de ontologías no se observó una sobrerrepresentación significativa ( $p > 0.05$ ) de procesos biológicos.

#### Porcentaje de Espermatozoides Normales

Los SNPs con mayor significancia fueron el BovineHD0900015955 y BovineHD0900015295. El FDR para la significancia de estos SNPS fue BH=0.084, los cuales se ubican en el cromosoma BTAU9 (Figura 2). Se encontró un efecto de sustitución alélica aditivo en el SNP donde las copias de los alelos de mayor frecuencia AA mostraron un aumento en el porcentaje de espermatozoides normales con respecto a las copias diferentes (Cuadro 4).

El análisis de ontologías para los genes ubicados a 200 kb a cada lado del SNP incluyeron aspectos metabólicos como el desarrollo y la diferenciación de las espermáticas ( $p\text{-value}=7.07E-08$ ,  $FDR=9.32E-04$ ), del cual se destacaron cuatro genes: *PACRG*, *UBE2J1*, *CCR6* y *TBPL1*.

Cuadro 4. Frecuencia genotípica y porcentaje de espermatozoides normales en toros Brahman para los genotipos de los SNPs con señal de asociación en el BTA9

SNP	Genotipo	Frecuencia genotípica	Espermatozoides normales
BovineHD0900015955	AA	0.50	84.53 ± 1.41
	AG	0.44	79.35 ± 1.55
	GG	0.05	64.37 ± 3.38
BovineHD0900015295	AA	0.66	83.69 ± 1.31
	AG	0.27	78.25 ± 1.71
	GG	0.05	64.37 ± 3.35

La ausencia de expresión del gen *PACRG* (*Parkin co regulated gene*) puede causar la ausencia de la estructura de la cola del espermatozoide y generar defectos en la estructura principal, como cabezas redondas o desprendidas (Li *et al.*, 2015). *PACRG* interactúa con el gen de meiosis expresada 1 (*MEIG1*) y junto con el antígeno 16 asociado al espermatozoide que codifica un axonema central del aparato proteico (Lehti y Sironen, 2017).

El gen *UBE2J1* (*ubiquitin conjugating enzyme*) juega un papel importante en la degradación de proteínas en el retículo endoplasmático. En ratones, se observó su relación con la esterilidad en el macho debido a defectos en el flagelo y la función del acrosoma y una eliminación defectuosa del citoplasma de los espermatozoides alargados (Koenig *et al.*, 2014). En la fase de espermiación el citoplasma es eliminado de la espermátida, puentes citoplasmáticos intercelular entre las espermátidas son interrumpidos y la fuerte adhesión entre espermátidas y células de Sertoli son removidos para facilitar su liberación dentro de los túbulos seminíferos. Las espermátidas en estos pasos de diferenciación son en gran parte transcripcionales inactivas, lo que im-

plica que las transcripciones se transcriben antes, y que la traducción de *Ube2j1* (y presumiblemente otro) y las transcripciones se descomprimen en espermátidas alargadas. Por lo tanto, es probable que se requiera *UBE2J1* en un momento crítico dentro de la espermátida que se alarga para completar con éxito los pasos finales de diferenciación y espermiación (Koenig *et al.*, 2014).

El gen *CCR6* (*Chemokine receptor 6*), se ubica en la pieza principal y la región basal (cuello) del espermatozoide. Antes de la fertilización el espermatozoide debe recibir y procesar señales del ambiente para localizar el ovocito (Kelly, 1995). El plasma seminal contiene altas concentraciones de citoquinas y quimioquinas y otros compuestos biológicos que ejercen un potente efecto sobre el sistema inmune de la hembra. Se ha demostrado que el semen induce una aguda inflamación en la mucosa genital de la hembra después del coito. La interacción del espermatozoide con esas quimios atrayentes primarios influencia el movimiento del espermatozoide direccionándolo al sitio de la fertilización (Robertson, 2007). El *CCR6* mRNA es expresado en el testículo y la proteína se localiza sobre el plasma de membrana del espermatozoide; hay presencia de *CCR6* sobre la

superficie del espermatozoide; esta región está involucrada en la motilidad e hiperactivación, un patrón de motilidad especializado asociado con la capacitación (Caballero-Campo *et al.*, 2014).

El gen *TBPL1* (*Tata Box Binding Protein like 1*) interviene en la regulación de la transcripción en la espermátida. Este gen codifica un miembro de la familia de proteínas de unión a caja TATA y tienen un papel crítico en la transcripción por la ARN polimerasa II como componentes del complejo de factor de transcripción IID (TFIID) (Isogai *et al.*, 2016). Igualmente, desempeña un papel importante en la espermatogénesis y los polimorfismos de un solo nucleótido, y pueden estar asociados con la infertilidad masculina. Además, se involucra en la organización de la cromatina, y es requerido para la apropiada formación y mantenimiento del cromocentro (Catena *et al.*, 2006). La mutación de *TBPL1* produce una arquitectura anormal de la cromatina y puede causar una falla de la posición de los centrómeros y se exhiben múltiples cromocentros. Así, los defectos en las espermátidas redondas guían a una amplia apoptosis en las espermátidas alargadas con poca producción de espermatozoides (Berkovits y Wolgemuth, 2011).

## CONCLUSIONES

- La temporada (seca y lluvia) incidió sobre el porcentaje de espermatozoides normales observados mientras que el estado reproductivo (monta o descanso) tuvo relación con la concentración espermática en bovinos Brahman.
- Los genes *INSIG1* y *PAXIP1* identificados alrededor de la señal de asociación en el BTAU4 (BTA-98685-no-rs) podrían estar relacionados con la concentración espermática en Brahman, Es necesario validar este resultado en una muestra de mayor tamaño así como con un mayor número de marcadores.

- La señal de asociación en BTA9 se ubica junto a los genes *PACRG*, *UBE2J1*, *CCR6* y *TBPL1*, los cuales hacen parte del desarrollo y diferenciación espermática e influyen en la morfología de los espermatozoides. Estos genes podrían ser objetivo de análisis para la evaluación de anomalías de espermatozoides.

## Agradecimientos

Este trabajo fue apoyado por la Universidad de La Salle, convocatoria VRIT (Vicerrectoría de investigación y transferencia). Los autores agradecen a los ganaderos y personas que trabajan (mayordomos y vaqueros) en cada uno de los predios en los que se realizó el trabajo. Igualmente agradecen a la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria-AGROSAVIA adscrita al Ministerio de Agricultura de Desarrollo Rural de Colombia-MADR por el apoyo en el procesamiento e interpretación de la información molecular.

## LITERATURA CITADA

1. **Alexander J. 2008.** Bull breeding soundness evaluation: a practitioner's perspective. *Theriogenology* 70: 469-472. doi: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.030
2. **Aponte PM, de Rooij DG, Bastidas P. 2005.** Testicular development in Brahman bulls. *Theriogenology* 64: 1440-1455. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.03.016
3. **Berkovits BD, Wolgemuth DJ. 2011.** The first bromodomain of the testis-specific double bromodomain protein Brdt is required for chromocenter organization that is modulated by genetic background. *Dev Biol* 360: 358-368. doi: 10.1016/j.ydbio.2011.10.005
4. **Boligon AA, Silva JAV, Sesana RC, Sesana JC, Junqueira JB, Albuquerque LG. 2010.** Estimation of genetic

- parameters for body weights, scrotal circumference, and testicular volume measured at different ages in Nellore cattle. *J Anim Sci* 88: 1215-1219. doi: 10.2527/jas.2008-1719
5. **Brito LFC, Silva AEDF, Rodrigues LH, Vieira FV, Deragon LAG, Kastelic JP. 2002.** Effects of environmental factors, age and genotype on sperm production and semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* AI Bulls in Brazil. *Anim Reprod Sci* 70: 181-190. doi: 10.1016/S0378-4320(02)00009-x
  6. **Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL. 2000.** Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* 100: 391-398. doi: 10.1016/S0092-8674(00)80675-3
  7. **Caballero-Campo P, Buffone M, Benencia F, Conejo-Gracia J, Rinaudo P, Gerton G. 2014.** A role for the chemokine receptor CCR6 in mammalian sperm motility and chemotaxis. *J Cell Physiol* 229: 68-78. doi: 10.1002/jcp.24418
  8. **Catena R, Ronfani L, Sassone-Corsi P, Davidson I. 2006.** Changes in intranuclear chromatin architecture induce bipolar nuclear localization of histone variant H1T2 in male haploid spermatids. *Dev Biol* 296: 231-238. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.04.458
  9. **[CBRA] Colégio Brasileiro de Reprodução Animal. 2013.** Manual para exame andrológico e avaliação de sêmen animal. 3° ed. Belo Horizonte, Brasil: CBRA. 52 p.
  10. **Céspedes C. 2013.** Hallazgos al examen ultrasonográfico del contenido escrotal durante la evaluación andrológica en toros manejados extensivamente en Costa Rica. Tesis de Médico Veterinario. Heredia, Costa Rica: Univ. Nacional de Costa Rica. 30 p.
  11. **Chacon J, Perez E, Müller E, Söderquist L, Rodríguez-Martínez H. 1999.** Breeding soundness evaluation of extensively managed bulls in Costa Rica. *Theriogenology* 52: 221-231. doi: 10.1016/S0093-691X(99)00124-7
  12. **Chenoweth PJ. 2002.** Bull breeding soundness exams and beyond. In: Proc Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle Workshop. Manhattan, KS, USA.
  13. **Chenoweth PJ, Spitzer JS, Hopkins FM. 1992.** A new bull breeding soundness evaluation norm. In: Proc Annual Meeting for the Society of Theriogenology. San Antonio, Texas, USA.
  14. **Corbet NJ, Burns BM, Johnston DJ, Wolcott ML, Corbet DH, Venus BK, Li Y, et al. 2013.** Male traits and herd reproductive capability in tropical beef cattle. 2. Genetic parameters of bull traits. *Anim Prod Sci* 53: 101-113. doi: 10.1071/AN12163
  15. **Eacker SM, Agrawal N, Qian K, Dichek HL, Gong EY, Lee K, Braun RE. 2008.** Hormonal regulation of testicular steroid and cholesterol homeostasis. *Mol Endocrinol* 22: 623-635. doi: 10.1210/me.2006-0534
  16. **Evans JL, Golden BL, Bourdon RM, Long KL. 1999.** Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Hereford cattle. *J Anim Sci* 77: 2621-2628. doi: 10.2527/1999.77102621x
  17. **[FAWC] Farm Animal Welfare Council. 1992.** Updates the five freedoms. *Vet Rec* 17: 357.
  18. **[FEDEGAN] Federación Colombiana de Ganaderos. 2019.** Estadísticas. [Internet]. Disponible en: <https://www.fedegan.org.co/estadisticas/inventario-ganadero>
  19. **Fields MJ, Burns WC, Warnick AC. 1979.** Age, season and breed effects on testicular volume and semen traits in young beef bulls. *J Anim Sci* 48: 1299-1304. doi: 10.2527/jas1979.4861299x
  20. **Fonseca VO, Santos NR, Malinski PR. 1997.** Classificação andrológica de touros zebus (*Bos taurus indicus*) com

- base no perímetro escrotal e características morfo-físicas do sêmen. *Rev Bras Reprod Anim* 21: 36-39.
21. **Fortes MR, Deatley KL, Lehnert SA, Burns BM, Reverter A, Hawken RJ. 2013.** Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high density chips and beyond. *Anim Reprod Sci* 141: 1-19. doi: 10.1016/j.anireprosci.2013.07.002
  22. **Fortes MRS, Lehnert SA, Bolormaa S, Reich C, Fordyce G, Corbet NJ, Whan V, et al. 2012a.** Finding genes for economically important traits: Brahman cattle puberty. *Anim Prod Sci* 52: 143-150. doi: 10.1071/AN11165
  23. **Fortes MRS, Reverter A, Hawken RJ, Bolormaa S, Lehnert SA. 2012b.** Candidate genes associated with testicular development, sperm quality, and hormone levels of inhibin, luteinizing hormone, and insulin-like growth factor 1 in Brahman bulls. *Biol Reprod* 87: 58. doi: 10.1095/biolreprod.112.101089
  24. **Gadea J, Sellés E, Marco MA, Coy P, Matás C, Romar R. 2004.** Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. *Theriogenology* 62: 690-701. doi: 10.1016/j.theriogenology.2003.11.013
  25. **Garcia-Paloma JA. 2015.** A bull breeding soundness evaluation system with greater emphasis on scrotal circumference. *Pesq Vet Bras* 35: 817-821. doi: 10.1590/S0100-736X2015000-900008
  26. **Ghosh S, Fardo DW. 2018.** Association analyses of repeated measures on triglyceride and high-density lipoprotein levels: insights from GAW20. *BMC Genet* 19: 73. doi 10.1186-s12863-018-0651-6
  27. **Hawken RJ, Zhang YD, Fortes MR, Collis E, Barris WC, Corbet NJ, Williams PJ, et al. 2012.** Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *J Anim Sci* 90: 1398-1410. doi: 10.2527/jas.2011-4410
  28. **Higdon HL, Spitzer JC, Hopkins FM, Bridges WC. 2000.** Outcomes of breeding soundness evaluation of 2898 yearling bulls subjected to different classification systems. *Theriogenology* 53: 1321-1332. doi: 10.1016/S0093-691X(00)00275-2
  29. **Holroyd RG, Doogan W, De Faveri J, Fordyce G, McGowan MR, Bertram JD, Vankan DM, et al. 2002.** Bull selection and use in northern Australia. 4. Calf output and predictors of fertility of bulls in multiple-sire herds. *Anim Reprod Sci* 71: 67-79. doi: 10.1016/S0378-4320(02)00026-x
  30. **[ICA] Instituto Colombiano Agropecuario. 2020.** Censo pecuario nacional. [Internet]. Disponible en: <https://www.ica.gov.co/areas/pecuaria/servicios/epidemiologia-veterinaria/censos-2016/censo-2018>
  31. **Igna V, Moje A, Mircu C, Roman M, Ghiurca C, Casalean D, Cernescu H. 2010.** The influence of some environmental factors and age on semen production of Fleckvieh Bulls. *Lucrari Sti Med Vet* 43: 56-63.
  32. **Isogai M, Suzuki H, Maeda R, Tamura TA. 2016.** Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of TBP-like protein is prevented by direct binding of TFIIA. *Genes Cells* 21: 1223-1232. doi: 10.1111/gtc.12441
  33. **Kastelic J, Thundathil J, Brito L. 2012.** Bull BSE and semen analysis for predicting bull fertility. In: *Proco f the Society for Theriogenology Annual Conference*. Baltimore, MD, USA.
  34. **Kelly RW. 1995.** Immunosuppressive mechanisms in semen: implications for contraception. *Hum Reprod* 10: 1686-1693. doi: 10.1093/oxfordjour.nals.-humrep.a136156
  35. **Koenig PA, Nicholls PK, Schmidt FI, Hagiwara M, Maruyama T, Frydman GH, Watson N, et al. 2014.** The E2 ubiquitin-conjugating enzyme UBE2J1 is

- required for spermiogenesis in mice. *J Biol Chem* 289: 34490-34502. doi: 10.1074/jbc.M114.604132
36. **Kottek M, Grieser J, Beck Ch, Rudolf B, Rubel F. 2006.** World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Meteorol Z* 15: 259-263. Doi: 10.1127/0941-2948/2006/0130
  37. **Kumi-Diaka J, Nagaratnam V, Rwuuan JS. 1981.** Seasonal and age-related changes in semen quality and testicular morphology of bulls in a tropical environment. *Vet Rec* 108: 13-15. doi: 10.1136/vr.108.1.13
  38. **Lehti M, Sironen A. 2017.** Formation and function of sperm tail structures in association with sperm motility defects. *Biol Reprod* 97: 522-536. doi: 10.1093/biolre/iox096
  39. **Li W, Tang W, Teves ME, Zhang Z, Zhang L, Li H, Archer KJ, et al. 2015.** A MEIG1/PACRG complex in the manchette is essential for building the sperm flagella. *Development* 142: 921-930. doi: 10.1242/dev.119834
  40. **Lopes F, Guimarães J, da Costa EP, de Carvalho R, Neto T. 2009.** Avaliação andrológica por pontos e comportamento sexual em touros da raça Nelore. *Rev Bras Zootecn* 38: 1018-1025. doi: 10.1590/S1516-35982009000600007
  41. **Majic Balic I, Milinkovic-Tur S, Samardžijab S, Vinceb S. 2012.** Effect of age and environmental factors on semen quality, glutathione peroxidase activity and oxidative parameters in Simmental bulls. *Theriogenology* 78: 423-431. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.02.022
  42. **Mathevon M, Buhr MM, Ekkers JC. 1998.** Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. *J Dairy Sci* 81: 3321-3330. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(98)75898-9
  43. **Menegassi SRO, Barcellos JOJ, Lampert V, do N. Borges JBS, Peripolli V. 2011.** Bioeconomic impact of bull breeding soundness examination in cow-calf systems. *Rev Bras Zootecn* 40: 441-447. doi: 10.1590/S1516-359820110-00200028
  44. **Neves HHR, Vargas G, Brito LF, Schenkel, FS, Albuquerque LG, Carneiro R. 2019.** Genetic and genomic analyses of testicular hypoplasia in Nelore cattle. *Plos One* 14: e0211159. doi: 10.1371/journal.pone.0211159.
  45. **Nichi M, Bols PE, Zuge RM, Barnabe VH. 2006.** Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. *Theriogenology* 66: 822-828. doi: 10.1016/j.theriogenology.2006.01.056
  46. **Palmer CW. 2005.** Welfare aspects of theriogenology: investigating alternatives to electroejaculation of bulls. *Theriogenology* 64: 469-479. doi: 10.1016/j.theriogenology.2005.05.032
  47. **Pineda MH. 2003.** Male reproductive system. In: Pineda MH, Dooley MP (eds). *McDonalds veterinary endocrinology and reproduction*. Iowa, USA. p 239-282.
  48. **Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, et al. 2007.** PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Human Genet* 81: 559-575. doi: 10.1086/519795
  49. **R Development Core Team. 2018.** R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org>
  50. **Robertson SA. 2007.** Seminal fluid signaling in the female reproductive tract: lessons from rodents and pigs. *J Anim Sci* 85(Suppl 13): E36-E44. doi: 10.2527/jas.2006-578
  51. **Rönnegård L, McFarlane SE, Husby A, Kawakami T, Ellegren H, Qvarnström A. 2016.** Increasing the power of genome wide association studies in natural populations using repeated measures—evaluation and implementation. *Methods Ecol Evol* 7: 792-799. doi: 10.1111/2041-210X.12535

52. **Ruiz-Cortes ZT, Olivera-Angel M. 1999.** Ovarian follicular dynamics in suckled zebu (*Bos indicus*) cows monitored by real time ultrasonography. *Anim Reprod Sci* 29: 211-220. doi: 10.1016/s0378-4320(98)00152-3
53. **Ruiz-Sesma B, Ruiz-Hernández H, Mendoza-Nazar P, Oliva-Llaven MA, Gutiérrez-Miceli FA, Rojas-Martínez RI, Rojas RI, et al. 2010.** Caracterización reproductiva de toros *Bos taurus* y *Bos indicus* y sus cruzas en un sistema de monta natural y sin reposo sexual en el trópico mexicano. *UDO Agrícola* 10: 94102.
54. **Rusel WMS, Burch RL. 1959.** The principles of humane experimental technique. Methuen, London, UK.
55. **Sever N, Lee PCW, Song BL, Rawson RB, DeBose-Boyd RA. 2004.** Isolation of mutant cells lacking Insig-1 through selection with SR-12813, an agent that stimulates degradation of 3-Hydroxy-3 methylglutarylcoenzyme a reductase. *J Biol Chem* 279: 43136-43147. doi: 10.1074/jbc.M406406200
56. **Siddiqui MA, Bhattacharjee J, Das ZC, Islam MM, Islam MA, Haque MA, Parrish JJ, Shamsuddin M. 2008** Crossbred bull selection for bigger scrotum and shorter age at puberty with potentials for better quality semen. *Reprod Domest Anim* 43: 74-79. doi: 10.1111/j.1439-0531.2007.00857.x
57. **Silva-Mena C. 1997.** Peripubertal traits of Brahman bulls in Yucatan. *Theriogenology* 48: 675-685. doi: 10.1016/s0093-691x(97)00283-5
58. **Staalhammar EM, Janson L, Philipsson J. 1989.** Genetic studies on fertility in AI bulls, 1: Age, season, and genetic effects on semen characteristic in young bulls. *Anim Reprod Sci* 19: 1-17. doi: 10.1016/0378-4320(89)90042-0
59. **Sun J, Gao Y, Liu D, Ma W, Xue J, Zhang C, Lan X, Lei C, Chen H. 2012.** Haplotype combination of the bovine INSIG1 gene sequence variants and association with growth traits in Nanyang cattle. *Genome* 55: 429-436. doi: 10.1139/g2012-029
60. **Utsunomiya YT, Milanese M, Fortes MRS, Porto-Neto LR, Utsunomiya ATH, Silva MVGB, Garcia JF, et al. 2019.** Genomic clues of the evolutionary history of *Bos indicus* cattle. *Anim Genet* 50: 557-568. doi: 10.1111/age.12836
61. **Vargas CA, Elzo MA, Chase CC Jr, Chenoweth PJ, Olson TA. 1998.** Estimation of genetic parameters for scrotal circumference, age at puberty in heifers, and hip height in Brahman cattle. *J Anim Sci* 76: 2536-2541. doi: 10.2527/1998.76102536x
62. **Vejarano OA, Sanabria L, Trujillo GA. 2005.** Diagnóstico de la capacidad reproductiva de toros en ganaderías de tres municipios del alto magdalena. *Rev MVZ Córdoba* 10: 648-662.
63. **Whitlock BK, Coffman EA, Coetzee JF, Daniel JA. 2012.** Electroejaculation increased vocalization and plasma concentrations of cortisol and progesterone, but not substance P, in beef bulls. *Theriogenology* 78: 737-746. doi: 10.1016/j.theriogenology.2012.03.020