



**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

**Associação entre a prevalência da mutação nt821 do gene da  
Miostatina, com características reprodutivas e de eficiência  
em machos da Raça Preta**

Ana Sofia Ferro da Silva Pelicano Dourado

Orientador(es) | Andreia de Jesus Amaral  
Maria do Carmo Mateus da Silva Feliciano

Évora 2023





**Universidade de Évora - Escola de Ciências e Tecnologia**

**Mestrado em Engenharia Zootécnica**

Dissertação

**Associação entre a prevalência da mutação nt821 do gene da  
Miostatina, com características reprodutivas e de eficiência  
em machos da Raça Preta**

Ana Sofia Ferro da Silva Pelicano Dourado

Orientador(es) | Andreia de Jesus Amaral

Maria do Carmo Mateus da Silva Feliciano

Évora 2023

---

---

---

---

---



A dissertação foi objeto de apreciação e discussão pública pelo seguinte júri nomeado pelo Diretor da Escola de Ciências e Tecnologia:

Presidente | José Manuel Martins (Universidade de Évora)

Vogais | Andreia de Jesus Amaral (Universidade de Évora) (Orientador)  
José Pedro Canas Simões (Direção Geral de Alimentação e Veterinária)

## **Agradecimentos**

A realização desta dissertação tornou-se possível com o apoio de muitas pessoas, às quais estarei eternamente grata. O meu percurso académico não teria sido possível sem o seu apoio e contribuição, cuja força e motivação desempenharam um papel fundamental em todo o processo.

À minha orientadora, Professora Andreia Amaral, por ter aceite embarcar comigo na realização desta dissertação, por toda a sabedoria, disponibilidade, apoio, sugestões e revisão da tese.

À minha coorientadora, Professora Carmo Feliciano, por se ter mostrado sempre disponível em todas as ocasiões, sempre com sugestões para a melhoria do meu trabalho e pelas palavras de apoio.

À Associação de Criadores de Bovinos da Raça Preta, mais concretamente à Eng<sup>a</sup> Filomena Ferreira, pela cedência de dados fenotípicos do centro de testagem, sem os quais não seria possível a realização deste trabalho e por toda a disponibilidade e ajuda durante estes meses.

Ao meu Pai, pois sem ele o meu percurso académico não teria sido possível de maneira alguma, por me ter proporcionado todas as oportunidades para conseguir seguir os meus estudos. Por tudo o que representa para mim e na minha vida. Vou estar para sempre grata por a pessoa que é para mim e por tudo o que me ensinou.

À minha Avó Justa, que tem um papel fundamental na minha vida, por todo o apoio e paciência que teve para comigo nestes meses. Obrigada por tudo o que me ensinou e transmitiu contribuindo para a pessoa que sou hoje.

À minha família, em geral, por mostrar sempre apoio em todas as ocasiões sejam boas ou más. Por todo o interesse demonstrado durante todos estes meses e principalmente o apoio que me deram durante todo o percurso.

Às minhas amigas da minha terra natal, que tiveram um papel fundamental em toda a minha vida e na redação desta dissertação. Obrigada por todas as dicas, ajuda, apoio, compreensão e amizade. Sem vocês teria sido muito mais difícil.

Aos meus amigos que levo da Universidade de Évora, pela ajuda e apoio ao longo da redação desta dissertação, por todos os momentos passados juntos e se terem tornado tão importantes ao longo destes cinco anos. São para a vida e levar-vos-ei sempre no meu coração.

A todos os que de uma forma ou outra, contribuíram para que esta dissertação fosse possível.

Quero dedicar esta dissertação à minha Mãe e aos meus Avós que já não estão presentes.

Obrigada por tudo. Estarão para sempre comigo.

# **Identificação de marcadores associados com características produtivas e reprodutivas na Raça Preta**

## **Resumo**

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da mutação nt821 no mérito de fenótipos de eficiência produtiva e de fertilidade masculina em bovinos da raça Preta. Foram analisados dados de machos disponíveis para o período compreendido entre 2003 e 2020 cedidos pela Associação de Criadores de Bovinos da Raça Preta.

Em concordância com estudos noutras raças de bovinos, a presença da mutação nt821 teve efeito significativo no fenótipo, sendo que os animais heterozigóticos apresentaram melhor mérito para a maioria dos fenótipos analisados. Destes destaca-se, o ganho médio diário, o índice de conversão, a motilidade individual e a percentagem de formas anormais. Relativamente à cor e viscosidade do sémen, o tipo de genótipo parece não influenciar o fenótipo observado.

No geral, os animais com genótipo homozigótico para a mutação nt821 apresentaram mérito inferior para a maioria dos fenótipos analisados, sendo necessário mais registos para validar a robustez destas conclusões.

**Palavras-chave:** Genética; Melhoramento; Fenótipo; Genótipo; Marcadores

# **Genome-Wide analysis of genetic markers associated with production and reproductive traits in Portuguese Preta cattle**

## **Abstract**

The present study aimed to evaluate the impact of the nt821 mutation on phenotypes of efficiency and male fertility in “Preta” cattle breed. For this purpose, data from candidate sires collected between 2003 a 2020, provided by the “Preta” Cattle Breeders Association, was analyzed.

In agreement with previous reports in other cattle breeds, the presence of the nt821 mutation had a significant impact in the phenotype. Sires heterozygotes for the mutation had higher merit for most studied phenotypes, especially for average daily gain, feed conversion ratio, sperm motility and for the percentage of abnormalities of sperm morphology. In regard to sperm colour and viscosity, the effect of the mutation was not significant.

Overall, for all the evaluated parameters, the homozygous genotype displayed lower merit for the studied phenotypes. Further records are required to validate the obtained results.

**Keywords:** Genetics; Breeding; Phenotype; Genotype; Markers

# Índice

1. Introdução e Objetivos.....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1. A Raça Preta .....	3
2.1.1. História dos bovinos da Raça Preta .....	4
2.1.2. Características da Raça.....	5
2.2. Hipertrofia Muscular em bovinos.....	8
2.2.1. História .....	10
2.3. Gene da Miostatina.....	11
2.3.1. Mutações do gene da miostatina em bovinos .....	11
2.4. A Mutação nt821 .....	14
2.4.1. Efeito da Mutação nt821 do gene da miostatina no fenótipo .....	14
2.4.1.1. Reprodução Masculina .....	15
2.4.1.2. Reprodução Feminina.....	15
2.4.2. A Mutação nt821 na Raça Preta .....	16
2.5. Caracteres Produtivos Analisados .....	17
2.5.1. Ganho Médio Diário.....	17
2.5.2. Índice de Conversão .....	18
2.6. Exames Andrológicos.....	18
2.6.1. Perímetro Escrotal .....	19
2.6.2. Motilidade Individual .....	19
2.6.3. Morfologia .....	20
2.6.4. Cor e Viscosidade do Sêmen.....	21
3. Materiais e Métodos .....	22
3.1. Informação Fenotípica.....	22
3.2. Análise Estatística .....	23
4. Resultados.....	25

4.1. Parâmetros de Eficiência Produtiva.....	25
4.2. Parâmetros Reprodutivos.....	28
4.2.1. Perímetro Escrotal, Motilidade Individual e Formas Anormais.....	28
4.2.1.1. Tipos de Formas Anormais.....	31
4.2.2. Cor e Viscosidade.....	34
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	43
7. Referências Bibliográficas.....	46

## Índice de Tabelas

Tabela 1: Descrição das mutações no gene da miostatina em diversas raças bovinas .....	13
Tabela 2: Perímetro escrotal de touros de raças para produção de carne criadas em regime extensivo (cm) ( <b>Fonte:</b> Adaptado de Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010).....	19
Tabela 3: Classificação consoante a motilidade individual dos espermatozoides ( <b>Fonte:</b> Adaptado de Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010) .....	20
Tabela 4: Parâmetros para Cor e Viscosidade do sémen ( <b>Fonte:</b> Adaptado de Bravo, 2020) .....	21
Tabela 5: Número de animais de estudo para cada genótipo .....	22
Tabela 6: Apresentação do número de registos para cada parâmetro avaliado .....	23
Tabela 7: Comparação dos parâmetros de eficiência produtiva com os genótipos .....	25
Tabela 8: Teste de Shapiro-Wilk nos parâmetros de eficiência produtiva .....	26
Tabela 9: Teste de Tukey para parâmetros de eficiência produtiva .....	27
Tabela 10: Comparação dos parâmetros reprodutivos com os genótipos .....	28
Tabela 11: Teste de Shapiro-Wilk para os parâmetros reprodutivos.....	29
Tabela 12: Teste de Tukey para parâmetros reprodutivos.....	31
Tabela 13: Número de ocorrências de formas anormais nos genótipos .....	31
Tabela 14: Teste Qui-Quadrado para defeitos de formas anormais .....	33
Tabela 15: Número de dados recolhidos para cor e viscosidade consoante o genótipo .....	34
Tabela 16: Cor do sémen em cada genótipo.....	34
Tabela 17: Número de dados de viscosidade para cada genótipo .....	35
Tabela 18: Teste Qui-Quadrado para cor e viscosidade .....	36

## Índice de Figuras

Figura 1: Distribuição Geográfica dos Criadores de Bovinos da Raça Preta ( <b>Fonte:</b> Adaptado de ACBRP, 2023d).....	3
Figura 2: Raça Preta ( <b>Fonte:</b> Adaptado de DGAV, 1955).....	4
Figura 3: Macho da Raça Preta ( <b>Fonte:</b> Adaptado de ACBRP, 2023f).....	6
Figura 4: Fêmea da Raça Preta e descendente ( <b>Fonte:</b> Adaptado de ACBRP, 2023f).....	6
Figura 5: Gabo bovino da Raça Preta ( <b>Fonte:</b> Adaptado de DGAV, 2023).....	8
Figura 6: Exemplo de um touro homozigótico para o alelo mutante mh ( <b>Fonte:</b> Adaptado de Bellinge et al., 2005).....	9
Figura 7: Gene da miostatina ( <b>Fonte:</b> Adaptado de Dunner et al., 2003).....	12
Figura 8: Raça Preta ( <b>Fonte:</b> Adaptado de ACBRP, 2023f).....	17
Figura 9: Representação do número de animais para cada genótipo.....	23
Figura 10: Verificação dos pressupostos para o Ganho Médio Diário.....	27
Figura 11: Verificação dos pressupostos para o Índice de Conversão.....	27
Figura 12: Verificação dos pressupostos para o Perímetro Escrotal.....	30
Figura 13: Verificação dos pressupostos para a Motilidade Individual.....	30
Figura 14: Verificação dos pressupostos para as Formas Anormais.....	30
Figura 15: Número de ocorrências e tipo de defeitos das formas anormais por genótipo ..	32
Figura 16: Representação das diferentes cores do sémen em cada genótipo.....	35
Figura 17: Representação do tipo de viscosidade do sémen em cada genótipo.....	36

## Índice de Equações

Equação i: Fórmula do Ganho Médio Diário .....	17
Equação ii: Fórmula do Índice de Conversão.....	18
Equação iii: Equação da Regressão Linear Simples.....	24
Equação iv: Equação do Modelo Linear Misto .....	24

## Lista de Abreviaturas

% - Percentagem

+/+ ou *WT/WT* ou *SEL* – *Genótipo selvagem*

A – Adenina

ACBRP – Associação de Criadores de Bovinos da Raça Preta

C – Citosina

DGAV – Direção-Geral da Alimentação e Veterinária

DM - *Double musculing* ou dupla musculatura

DNA – ADN ou Ácido Desoxirribonucleico

FA – Formas Anormais

g – Grama

G – Guanina

GDF-8 – Fator de Crescimento Diferencial-8

GMD – Ganho Médio Diário

HOM – HET – Interação Homozigótico – Heterozigótico

HOM – SEL – Interação Homozigótico – Selvagem

IC – Índice de Conversão

IGF - Fator de Crescimento

kg - Quilograma

LGBRP - Livro Genealógico dos Bovinos de Raça Preta

*mh* – *muscular hypertrophy*

*mh/+* ou *MH/WT* ou *HET* – *Genótipo heterozigótico*

*mh/mh* ou *MH/MH* ou *HOM* – *Genótipo homozigótico*

MI – Motilidade Individual

MLM – Modelo Linear Misto

MRFs - Fatores de Regulação Miogénica

MSTN – Miostatina

N – Animais não portadores da mutação

n – Número de amostras

Nº - Número

pb – Pares de bases

PCR – Proteína C-Reativa

PE – Perímetro Escrotal

QTL – *Quantitative Trait Loci*

RLS – Regressão Linear Simples

SEL – HET – Interação Selvagem – Heterozigótico

SNIRB – Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos

spz - Espermatozoide

T – Timina

TGF- $\beta$  - *Transforming Growth Factor Beta Superfamily* ou Fator de Crescimento Transformante- $\beta$

# 1. Introdução e Objetivos

O aumento da produção e produtividade dos animais representa um desafio significativo na atualidade, face ao crescente aumento da população mundial e conseqüentemente, aumento da necessidade de maior produção de alimentos (O'Sullivan, 2023).

Dia após dia, os consumidores estão a tornar-se cada vez mais exigentes no que toca à qualidade da carne e ao bem-estar animal. Então, é de extrema importância encontrar soluções viáveis e rentáveis, que passam pela implementação de métodos de produção eficientes que permitam rentabilizar e maximizar a produtividade dos efetivos, sendo que, o melhoramento genético animal é uma das soluções (Vicente et al., 2021).

Segundo Gadanho (2014), determinadas mutações podem resultar em características interessantes, as quais, por sua vez podem ser aproveitadas no contexto da seleção animal e no melhoramento genético da raça. Uma dessas alterações ocorre ao nível do gene da miostatina (Fator de Crescimento Diferencial-8, GDF-8), observando-se variações da atividade desta proteína devido às mutações que ocorrem.

A raça Preta é uma raça autóctone portuguesa, utilizada para a produção de carne em extensivo, caracterizando-se pelo facto de que alguns animais desta raça, são portadores de uma das mutações identificadas no gene que codifica a miostatina. Os diferentes genótipos para esta mutação (heterozigótico, homozigótico ou selvagem), vão originar diferenças entre animais para determinadas características fenotípicas. Esta mutação apresenta vantagens como um aumento da massa muscular, carcaças com uma menor percentagem de gordura intramuscular e pesos de nascimento e abate superiores, mas por outro lado, desvantagens, como dificuldades no parto, resistência a doenças e uma menor eficiência reprodutiva (Arnold et al., 2001; Arthur, 1995; Gadanho, 2014; Teixeira & Oliveira, 2007).

Numa exploração pecuária, o papel desempenhado pelo macho é de extrema importância, uma vez que um único indivíduo está responsável pela cobertura de um considerável número de fêmeas. Portanto, a fertilidade, a capacidade reprodutiva e a saúde do macho reprodutor, desempenham um papel fundamental para alcançar uma maior eficiência e sucesso na produção (Ribeiro, 2018).

Decorre desde 1995 um programa de conservação e melhoramento para esta raça, no âmbito do qual são efetuadas avaliações do padrão da raça. Em 1996 iniciaram-se os testes em estação com o propósito de avaliar características de produção e características reprodutivas

com vista à conservação e seleção da raça. Adicionalmente, em 2003, começou a ser realizada a testagem para a mutação para a identificação de animais portadores. Porém, anteriormente a este período, já tinham sido notadas conformações diferentes destes animais em campo, onde mais tarde se confirmou que havia a presença desta mutação. A informação que é obtida no centro de testagem, é ainda complementada com os dados que são obtidos em cada exploração (ACBRP, 2023h).

No âmbito desta tese foi efetuada a digitalização dos dados disponíveis pela Associação de Criadores de Bovinos da Raça Preta (ACBRP) referentes a resultados de testes andrológicos e a características de eficiência produtiva como o ganho médio diário (GMD) e índice de conversão (IC), que têm sido recolhidos desde 2003 com o objetivo de avaliar o impacto da mutação nt821 do gene codificante da proteína miostatina na performance produtiva e reprodutiva dos animais desta raça.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1. A Raça Preta

Os bovinos de raça Preta são conhecidos por serem animais de notável aptidão para a produção de carne em regime extensivo. São utilizados predominantemente em zonas desfavorecidas, devido à sua elevada rusticidade e capacidade para aproveitar alimento proveniente dessas regiões. A sua adaptabilidade a sistemas de produção de baixo impacto ambiental, permitem que enfrentem com sucesso, a escassez de alimento em períodos desfavoráveis, otimizando o uso de recursos limitados (Referido em ACBRP, 2023i; Esteves, 2015).

A dieta destes animais baseia-se no pastoreio, principalmente de pastagens naturais, normalmente sob coberto de montado, restolhos de culturas cerealíferas, bolotas e produtos de desbaste dos montados. Somente em circunstâncias extremas, há necessidade de administração de suplementos alimentares, consistindo estes normalmente em palhas, fenos e muito raramente concentrados (ACBRP, 2023i).

O Livro Genealógico dos bovinos de Raça Preta (LGBRP) atualmente regista cerca de 5000 vacas inscritas, pertencentes a 50 criadores predominantemente distribuídas por explorações nas regiões do Ribatejo, Alto e Baixo Alentejo (ACBRP, 2023e) (Figura 1).

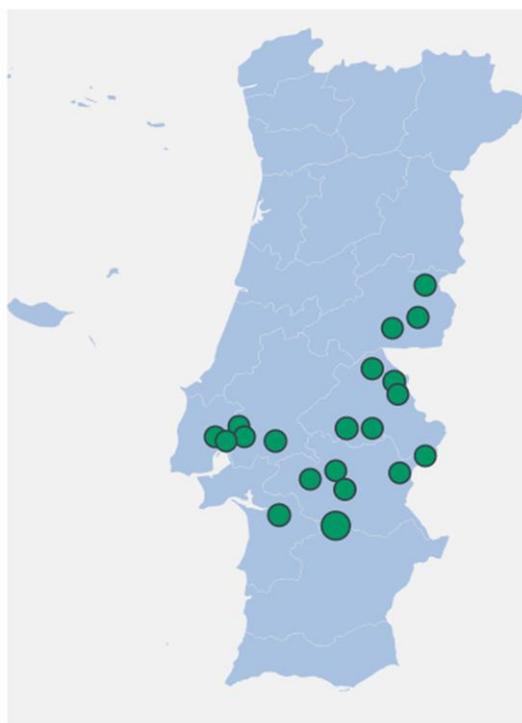


Figura 1: Distribuição Geográfica dos Criadores de Bovinos da Raça Preta (Fonte: Adaptado de ACBRP, 2023d)

O LGBRP tem, até à data, aproximadamente 2465 vacas adultas inscritas. Nos últimos cinco anos, a população adulta tem apresentado oscilações com tendência ao decréscimo de animais em linha pura. Em média, os efetivos são constituídos por 80 reprodutoras, na proporção de um touro para cada 30 vacas (ACBRP, 2023g).

### 2.1.1. História dos bovinos da Raça Preta

A partir de meados do século XIX foi identificada uma população bovina com a designação de “Gado Charnequeiro do Sul do Tejo”. Posteriormente, outras duas designações foram adotadas, nomeadamente “Gado da Terra” e “Gado Preto” (DGAV, 2021).

Contudo, a existência dos fenótipos que constituem hoje a raça Preta é conhecida há bastante tempo. Alguns criadores desta raça fazem referência aos vários “ramos” que têm origem do tronco Preto: o Negro Andaluz, no sul de Espanha e de Portugal; o Negro Ibérico no norte e centro de Espanha e a raça Preta no Alentejo e Ribatejo (Ferreira, 2006).

No início do século passado, os bovinos Pretos eram fundamentalmente utilizados para tração nas explorações agrícolas, dada a sua força física, alta capacidade de adaptação a regimes alimentares desadequados e condições climáticas adversas (Figura 2). A sua aptidão para a produção de carne era praticamente desprezível, mas desempenhavam um papel considerável na fertilização das terras. No entanto, a modernização dos sistemas agrícolas teve um impacto significativo na redução do número destes animais naquela que era a sua principal função, o trabalho dos solos. Este fator foi determinante para a redução drástica do seu efetivo (DGAV, 2021).



Figura 2: Raça Preta (**Fonte:** Adaptado de DGAV, 1955)

O acentuar da utilização de raças exóticas em cruzamento com as raças portuguesas do nosso país, causou uma redução substancial da população de bovinos de raça Preta. Essa tendência de redução geral dos efetivos persistiu por vários anos, ao ponto da raça Preta ter sido considerada em vias de extinção (DGAV, 2021).

Contrariando esta evolução, a sobrevivência de alguns rebanhos de “Pretas” ficou a dever-se a criadores que, seja por motivos de tradição ou por reconhecerem vantagens objetivas, mantiveram núcleos de fêmeas puras para renovação do efetivo reprodutor destinado à produção de cruzamentos (DGAV, 2021).

Com o principal objetivo de preservar a raça, evitar a sua extinção e explorar as suas potencialidades produtivas, surge em 1990, a Associação de Criadores de Bovinos da Raça Negra Ibérica, constituída por um reduzido número de criadores da região de Portalegre, a qual viria mais tarde a adquirir a sua atual designação de Associação de Criadores de Bovinos da Raça Preta (ACBRP, 2023a).

A ACBRP é responsável pela gestão do Livro Genealógico Português de Bovinos da Raça Preta (LGPBRP), um sistema de registos que permite o rigoroso acompanhamento dos rebanhos, a seleção de animais com base na sua genealogia e que constitui a base do programa de melhoramento genético aprovado para a raça em 1995 (Ferreira, 2006).

A carne proveniente dos bovinos da raça Preta, é reconhecida com a Denominação de Origem Protegida (DOP) – Carne da Charneca, desde 2002, embora nos últimos anos a comercialização através desta marca tenha sido irrisória (Carolino et al., 2017).

### 2.1.2. Características da Raça

Conforme estipulado pelo regulamento do Livro Genealógico, a classificação de um animal como pertencente à raça Preta é determinada mediante a observação de critérios que são reconhecidos como padrão definido para a referida raça. Tais critérios englobam características como um formato corporal alongado e amplo, linha superior horizontal, desenvolvimento notável no terço superior do corpo, e membros robustos, que contribuem para a formação de um conjunto globalmente harmonioso (ACBRP, 2023c).

No que diz respeito ao peso, os touros apresentam um peso que varia de 700 kg a 1000 kg (Figura 3), enquanto que as fêmeas normalmente apresentam um peso corporal entre 400 kg a 600 kg (Figura 4). A pelagem tende para ser uniformemente negra, embora ocasionalmente parda, sendo que a preferência é eliminar esta última coloração como melhoramento futuro.

A pele é caracterizada por ser abundante, espessa e com uma pelagem densa, mais ou menos comprida, segundo a época do ano. As mucosas são sempre pigmentadas (ACBRP, 2023c).

A garupa é alongada, com desenvolvimento evidente das massas musculares e moderada projeção dos ângulos ilíacos e isquiáticos. O sistema mamário não é excessivamente desenvolvido, com o úbere protegido por uma pelagem fina e sedosa de cor preta ou preto-acastanhado, misturada com pelos mais grossos e longos, predominantemente pretos que, em períodos de inatividade funcional cobrem os tetos. Quanto ao temperamento, tende a ser dócil (DGAV, 2021).



*Figura 3: Macho da Raça Preta (Fonte: Adaptado de ACBRP, 2023f)*



*Figura 4: Fêmea da Raça Preta e descendente (Fonte: Adaptado de ACBRP, 2023f)*

Os bovinos de raça Preta revelam uma notável resistência ao calor, sendo capazes de suportar as altas temperaturas de Verão nas zonas onde são produzidos. Além disso, têm uma elevada capacidade de locomoção, permitindo-lhes percorrer longas distâncias em busca de água e alimento (ACBRP, 2023b).

A raça Preta destaca-se por a sua facilidade de partos, que está intimamente relacionada com a conformação da raça, refletindo-se numa menor mortalidade de vitelos ao desmame e menor (praticamente nula) necessidade de partos assistidos. Também demonstra uma boa capacidade de produção leiteira, com influência direta no peso dos animais ao desmame (ACBRP, 2023b).

A primeira parição das vacas é em geral por volta dos 27 meses. Em termos de longevidade produtiva poderão ir até aos 10 partos, com intervalos de aproximadamente 12 meses entre os partos, porém muito variável em fêmeas em produção em extensivo, onde os intervalos podem ultrapassar os 12 meses. Ao nascimento, os vitelos de raça Preta apresentam pesos de cerca de 35 kg nos machos e 30 kg nas fêmeas, sendo desmamados por volta dos 6-7 meses, momento em que as fêmeas atingem pesos na ordem dos 160 kg para as fêmeas e 190 kg para os machos (ACBRP, 2023b).

Os animais destinados à engorda são abatidos entre os 16 e os 20 meses, altura em que os rendimentos são mais favoráveis (rendimento de carcaça de 60%), com pesos de carcaça de cerca de 250 kg a 300 kg (ACBRP, 2023b).

Esta raça apresenta boas taxas de fertilidade, excelente capacidade maternal e facilidade de parto, mesmo quando cruzada com raças de maior corpulência. Estas características acabam por ser uma escolha valiosa em programas de melhoramento, pois as suas características reprodutivas e maternais são altamente vantajosas, mesmo ao cruzar com outras raças bovinas (Esteves, 2015) (Figura 5).

Os resultados dos testes de performance em estação, são indicadores de potencial da raça para alcançar bons índices de crescimento com uma eficiência alimentar razoável entre o desmame e o abate (índice de conversão de cerca de 6,2). Na literatura estão reportados, ganhos médios diários (GMD) na ordem dos 1300 g, embora não seja incomum alcançar ganhos de 1500 g (Ferreira, 2006).



Figura 5: Gabo bovino da Raça Preta (Fonte: Adaptado de DGAV, 2023)

## 2.2. Hipertrofia Muscular em bovinos

A designação de “musculatura dupla” apareceu, no início do século XIX, como consequência da exuberância muscular notada em alguns animais de diferentes raças bovinas. Após a descoberta da origem genética deste fenómeno e a determinação do seu carácter recessivo parcial por Kambadur et al. (1997), a nomenclatura mais usual adotada na literatura para identificar um alelo mutante foi de *mh* (*muscular hypertrophy*), de entre uma variedade de símbolos para denominar o alelo responsável pela hipertrofia muscular (Teixeira et al., 2006; Teixeira & Oliveira, 2007).

Atualmente, o fenótipo de hipertrofia muscular, é classificado como parcialmente recessivo, pois os estudos realizados mostram que o fenótipo não é originado a partir de uma única mutação, pois já foram identificadas várias mutações. No entanto, ainda só foi identificado um só *loci*, o gene que codifica a proteína miostatina. Em alguns casos, as mutações do gene são específicas da raça contribuindo para a complexidade genética associada a este fenótipo (Páez & Tovar, 2014).

Os animais que exibem este fenótipo, foram apelidados de animais *Double muscling* ou dupla musculatura (DM), dado o seu aspeto ser associado a uma duplicação do tamanho da massa muscular (Figura 6).

Os animais com dois alelos iguais ou homozigóticos, descrevem-se como *mh/mh* e as características de desenvolvimento muscular são mais expressivas nestes do que nos animais heterozigóticos, só com uma cópia deste alelo, referidos como *mh/+*. Por sua vez, os animais

sem qualquer mutação são denominados de selvagens ou *WT* (*wild type*) e designados pelas siglas +/+.

A hipertrofia é o aumento do tamanho e volume dos músculos, que ocorre principalmente pelo acréscimo de fibras musculares, e de núcleos originados da proliferação e fusão das células satélite. A fusão das células satélite nas células musculares é importante porque provoca um aumento no número de núcleos celulares favorecendo a síntese proteica (Hawke & Garry, 2001).

Numa revisão sobre a condição DM, Arthur (1995) descreveu-a como uma síndrome, comportando alterações físicas, fisiológicas e histológicas. O autor comparou cruzamentos entre animais DM (DM x DM), cruzamentos entre animais que não apresentavam mutação (N x N) e cruzamentos entre animais DM com animais não portadores da mutação (DM x N). O estudo mostrou que em cruzamentos entre animais DM, a dificuldade do parto, a mortalidade-pré-natal e o peso do vitelo ao nascimento era superior. Relativamente a características da carcaça nestes animais, a idade de abate é inferior e o peso de carcaça é mais elevado com maior percentagem de músculo e menor percentagem de gordura. Os animais obtidos de cruzamentos entre animais sem a mutação, apresentaram uma maior percentagem de bezerros nascidos e desmamados, porém com um peso inferior, como consequência uma idade ao abate superior por apresentarem um menor peso. Os animais obtidos de cruzamentos entre animais com mutação e animais sem mutação, apresentaram resultados intermédios, melhorando as características reprodutivas e características da carcaça.



Figura 6: Exemplo de um touro homozigótico para o alelo mutante *mh* (Fonte: Adaptado de Bellinge et al., 2005)

### 2.2.1. História

A história desta mutação pode ser rastreada desde meados do século XVIII e foi documentada pela primeira vez pelo fazendeiro britânico George Culley, no livro *Observations on Live Stock* (Arnold et al., 2001).

De acordo com Bellinge et al. (2005), esta mutação foi inicialmente detalhada por Kalsner (1888) e proposto, posteriormente, por Wriedt (1929) que o fenótipo era monofatorial (constituído por um único gene). No entanto, essa visão foi contestada por Kronacher (1934), que sugeriu que o fenótipo era trifatorial (constituído por 3 genes), em que dois genes determinavam parcialmente a variabilidade da característica, enquanto um terceiro gene controlaria a expressão ou supressão da hipertrofia. Mais tarde, Quesada & Cachafeiro (1971) propuseram um modelo difatorial, no qual a condição DM era controlada por um modelo difatorial, com nove genótipos diferentes expressos em quatro classes fenotípicas distintas.

A partir do momento em que houve a confirmação que a expressão deste fenótipo era causada por uma mutação no gene da miostatina em 1997, em estudos conduzidos por Grobet et al. (1997) e McPherron & Lee (1997), foram identificadas distintas mutações que levam à perda da função desta proteína, afetando a massa muscular (Teixeira et al., 2006).

“A descoberta do gene da miostatina por McPherron & Lee (1997) foi obtida após realização de um ensaio na espécie *mus musculos* (rato comum) que demonstrou que, ao ser bloqueada a atividade do *GDF-8*, existia um aumento significativo na massa muscular dos animais, devido ao aumento do número de fibras musculares, mas sem aumento da quantidade de gordura, contrariamente ao que aconteceu nos animais considerados normais (sem bloqueio da atividade do gene). Para além disso, verificou-se que o peso individual dos músculos dos animais com o bloqueio do gene era o dobro, comparativamente com o peso dos músculos dos animais normais.

Tendo por base este estudo, os mesmos investigadores, compararam o alinhamento da sequência de aminoácidos da miostatina em 10 espécies diferentes, o que permitiu verificar o elevado grau de conservação da sequência entre espécies na região do C-terminal da proteína (terminal carboxilo). Foi, assim possível, concluir que, apesar de se estar perante espécies diferentes, a função biológica é bastante idêntica entre estes, levando, conseqüentemente, a que fossem observadas, também, parecenças fenotípicas entre as espécies.

Com este estudo, foi questionada a possibilidade de as mutações no gene da miostatina estarem ligadas ao aparecimento da musculatura dupla nas raças bovinas” (Gadano, 2014).

### **2.3. Gene da Miostatina**

O gene da miostatina (MSTN), também denominado por Fator de Crescimento Diferencial-8 (GDF-8), é responsável pela síntese da miostatina, membro do fator de transcrição TGF $\beta$  (Fator de Crescimento Transformante-  $\beta$ ). A miostatina é uma proteína que exerce um efeito regulador e inibidor no crescimento e desenvolvimento muscular (Dunner et al., 2003; McPherron & Lee, 1997). Algumas mutações neste gene estão correlacionadas com a desativação funcional desta proteína, com consequente aumento exagerado da massa muscular (Cappucio et al., 1998; Kambadur et al., 1997; McPherron & Lee, 1997).

Na literatura, este gene é caracterizado como parcialmente recessivo, uma vez que a presença de apenas um alelo já tem algum efeito na expressão desta característica. Situa-se no cromossoma 2 dos bovinos e a sua estrutura tem 3 exões e 2 intrões. Durante a embriogénese, a expressão deste gene é observada nos miotubos que estão em fase de desenvolvimento, e em adultos é expresso na célula madura do tecido muscular (Páez & Tovar, 2014).

A miostatina é uma proteína sintetizada no músculo esquelético na forma de pró-peptídeo. Também controla o processo de formação de novas fibras musculares e inibe a hipertrofia das fibras existentes ao reduzir a expressão dos MRFs (Fatores de Regulação Miogénica) (Gadano, 2014).

Estes fenómenos de mudança nas fibras musculares, denominam-se por hiperplasia (aumento do número de fibras) e hipertrofia (aumento do tamanho individual das fibras) (Dunner et al., 2003).

Como membro da família TGF $\beta$ , a miostatina contém também as características de outros membros da superfamília, como um núcleo hidrofóbico de aminoácidos próximo ao N-terminal e resíduos de cisteína na região C-Terminal, que facilitam a formação de uma estrutura conhecida como “nó de cisteína”. A diferença principal entre a miostatina e outros membros da superfamília TGF $\beta$ , é a sequência de nucleótidos do terminal carboxilo ser mais curta do que nos outros membros (Deng et al., 2017).

#### **2.3.1. Mutações do gene da miostatina em bovinos**

À semelhança do que acontece com outras mutações genéticas e devido ao carácter recessivo desta característica, esta apresenta também, diferentes níveis de intensidade. Ou seja, a

expressão da característica pode variar ao nível da sua exuberância, da mutação presente no gene codificante da miostatina (Figura 7) e se o animal possui uma ou duas cópias desse alelo (*mh*), sabendo-se, ainda, que as mutações do gene ocorrem na zona conservada da proteína (McPherron & Lee, 1997).

O fenótipo *mh* exhibe variações na sua intensidade, provavelmente devido a diferenças na pressão de seleção que foram mantidas ao longo de várias gerações, em conformidade com determinadas características que variam de acordo com as necessidades do mercado e as estratégias e requisitos de gestão, o que sugere que poderão existir mutações noutros *loci* com efeito no fenótipo (Dunner et al., 2003). Os autores destacaram a importância e necessidade de investigar a presença de outros QTL (*Quantitative Trait Loci*, que são regiões do genoma responsáveis por influenciar a expressão de características fenotípicas, que possuem distribuição contínua) que pudessem estar envolvidos no processo da regulação da miogénese.

O tipo de mutação e a sua localização no gene da miostatina varia entre as raças. Atualmente, são conhecidas cerca de 9 mutações (Figura 7) que afetam a sequência codificante do gene da miostatina (Bellinge et al., 2005).

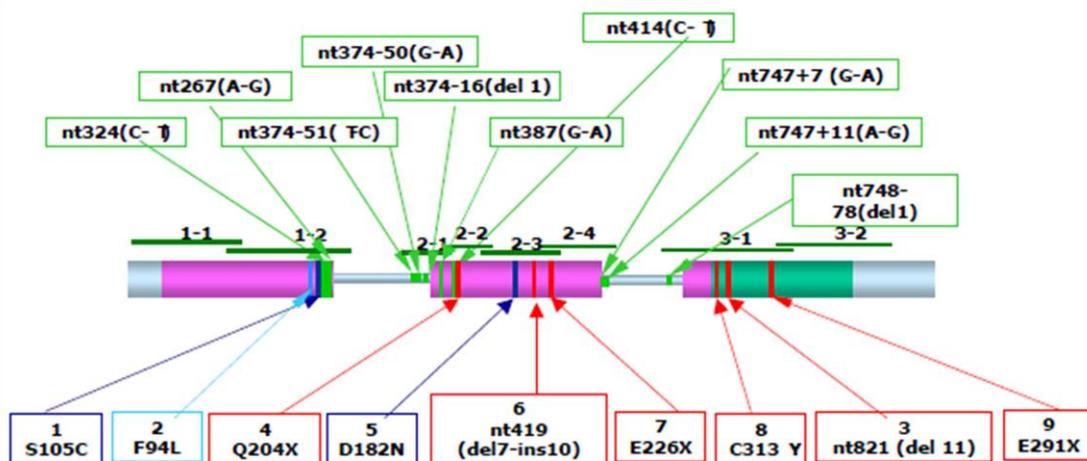


Figura 7: Gene da miostatina (Fonte: Adaptado de Dunner et al., 2003)

Nesta imagem podemos observar os 3 exões do gene da miostatina e as suas diferentes mutações. As mutações silenciosas estão representadas a verde (são mutações que não têm consequências ao nível da sequência de aminoácidos quando o gene é traduzido em proteína); e as mutações não silenciosas que são apresentadas a azul e a vermelho, sendo que as que conduzem à produção de uma proteína não funcional são representadas a vermelho (Dunner et al., 2003)

Apenas as mutações não silenciosas, e que se traduzem na produção de uma proteína não funcional, estão localizadas nos exões 2 e 3, sendo as responsáveis pelo fenótipo da musculatura dupla (Bellinge et al., 2005).

Como podemos ver na Tabela 1, existem diferentes raças bovinas nas quais ocorre incidência das diversas mutações no gene da miostatina, incluindo a nt821 que é objeto de estudo nesta dissertação. Foi feito um resumo de todas as mutações encontradas na bibliografia, para as diversas raças bovinas (Tabela 1).

*Tabela 1: Descrição das mutações no gene da miostatina em diversas raças bovinas*

Descrição	Tipo de Mutação	Raça Afetada	Referência
Deleção de 11 pb no exão 3	Stop Codão Prematuro	Belgian Blue, Piemontês, Asturiana de los Valles, Rubia Gallega, Parthnaise, entre outras	Grobet et al., 1997; McPherron & Lee, 1997, citados por Salviano Teixeira et al., 2006
Inserção de 10 pb e deleção de 7 pb na posição 419	Stop Codão Prematuro	Maine Anjou	Karim et al., 2000, citados por Salviano Teixeira et al., 2006
Transição C→T na posição 610	Sem sentido – terminação prematura	Charolesa, Limousine	Cappucio et al., 1998, citados por Aiello et al., 2018
Transversão G→T na posição 676	Sem sentido – terminação prematura	Maine Anjou, Parthnaise	Karim et al., 2000, citados por Salviano Teixeira et al., 2006
Transição G→A na posição 938	Substituição de Cisteína por Tirosina	Piemontês, Gasconne	Fahrenkrug et al., 1999; Grobet et al., 1997, citados por Salviano Teixeira et al., 2006
Transversão G→T na posição 874 no exão 3	Stop codão no domínio C-terminal bioativo	Marchigiana	Cappucio et al., 1998; Marchitelli et al., 2003, citados por Salviano Teixeira et al., 2006
Transição C→A na posição 433	Substituição de Leucina por Fenilalanina	Limousine	Sellick et al., 2007, citados por Aiello et al., 2018
Inclusão de 41 pb entre exão 2 e 3	Stop Codão Prematuro introduzido numa proteína sem região bioativa	Blonde d' Aquitaine	Bouyer et al., 2014, citados por Aiello et al., 2018
Deleção de 11 pb na posição 821	Truncamento no C-terminal bioativo	Blonde d'Aquitaine, Limousine, Parthnaise, Rubia Gallega	Dunner et al., 2003; Kambadur et al., 1997, citados por Aiello et al., 2018

## **2.4. A Mutação nt821**

Numa fase inicial da investigação das mutações do gene GDF-8, pensou-se que a mutação nt821 poderia ser a causa de todas as outras mutações. Entretanto, com a identificação de diversos polimorfismos neste mesmo locus, sendo alguns associados a raças específicas, descartou essa teoria. Atualmente consideramos que os polimorfismos no gene da miostatina, podem estar presentes na espécie bovina e seus ancestrais há milhões de anos (Dunner et al., 2003).

A mutação nt821 inativa a proteína miostatina, apresentando maior efeito quando comparada com outros polimorfismos descritos, e sendo uma das mutações responsáveis da DM em diversas raças bovinas, nomeadamente a raça Preta (Dunner et al., 2003).

### **2.4.1. Efeito da Mutação nt821 do gene da miostatina no fenótipo**

Os animais que são portadores desta mutação, que resulta na produção de uma proteína não funcional, são caracterizados por terem uma excelente conformação e um rendimento de carcaça extremamente elevado, com um teor de gordura reduzido, o que indica ao consumidor uma carne mais saudável. Na maioria dos casos, as carcaças são classificadas como superiores ou excelentes. O teor de colagénio da carne é menor, o que resulta numa carne mais macia. Estudos recentes indicam que a MSTN desempenha um papel não só na regulação da miogénese, mas também na adipogénese. A inibição da MSTN conduzirá ao aumento da massa muscular e diminuição da massa gorda (Deng et al., 2017).

No entanto, é importante mencionar que a cor e a suculência nem sempre são melhoradas (Aiello et al., 2018; Fiems, 2012). Todavia, a ingestão voluntária de ração é reduzida enquanto que, a eficiência alimentar aumenta, embora as necessidades de manutenção não apresentem uma redução evidente (Fiems, 2012). Quanto à massa óssea e visceral, observa-se uma significativa diminuição quando comparadas a animais que não são portadores da mutação, assim como uma redução na densidade capilar. Estes animais também são mais propensos a doenças respiratórias, stress calórico, distócia, claudicação e degenerescência muscular, exigindo uma atenção redobrada no que toca a acomodação e bem-estar (Fiems, 2012).

É importante adquirir um entendimento preciso do comportamento da mutação, uma vez que algumas doenças genéticas como artrogripose e distonia muscular congénita, manifestam-se com frequência nos animais homocigóticos para a mutação nt821 e devem ser despistadas em animais de reprodução (Fiems, 2012). Um estudo feito por Casas et al. (2004) mostrou

que animais descendentes portadores da mutação, eram mais propensos a morrer antes do desmame, muito provavelmente relacionado com o maior peso dos bezerros à nascença. Demonstrou-se também, que os animais portadores da mutação são mais propensos a mortalidade neonatal.

#### 2.4.1.1. Reprodução Masculina

Num estudo comparativo entre animais portadores da mutação com animais da raça Holstein-Frísia, observou-se que a qualidade do sémen foi significativamente inferior nos touros com a mutação (Fiems, 2012). Vários estudos comprovaram que animais portadores da mutação apresentam baixa fertilidade, défice sexual, atrasos na puberdade e infantilismo genital (Bellinge et al., 2005; Urquiza, 2017). O perímetro escrotal em animais portadores da mutação é inferior, assim como a quantidade de sémen produzido, mas sem afetar a quantidade de espermatozoides (spz) produzidos. Também se verifica que ao comparar animais homozigóticos com heterozigóticos para a mutação, os homozigóticos apresentam um desempenho reprodutivo inferior (Arthur, 1995; Bellinge et al., 2005; Páez & Tovar, 2014; Trufero, 2014; Urquiza, 2017).

No entanto, a pesquisa bibliográfica relativamente ao efeito da mutação na reprodução masculina, revelou que este aspeto tem sido pouco estudado, no que toca à comparação de genótipos de uma raça com caracteres examinados em testes andrológicos.

#### 2.4.1.2. Reprodução Feminina

Os resultados do estudo realizado por Trufero (2014), em bovinos da raça Asturiana dos Vales, indicam que a mutação tem um efeito negativo na idade ao primeiro parto, no intervalo entre partos, no início da atividade ovárica e no peso das vacas adultas. Consequentemente, menor quantidade e qualidade do leite (com uma menor percentagem de gordura e proteína).

O impacto da hipertrofia muscular no crescimento do bezerro é condicionado pelo genótipo e pela fase de desenvolvimento considerada, revelando uma taxa de crescimento inferior em vitelos homozigóticos antes do desmame. Em contrapartida, o crescimento da carcaça por dia de idade foi superior em animais heterozigóticos, enquanto o rendimento da carcaça (relação entre o peso da carcaça e o peso vivo do animal ao abate, em percentagem) foi maior em animais homozigóticos (Feliciano et al., 2020). Apesar do crescimento da carcaça por dia ser superior nos animais heterozigóticos, o rendimento é superior nos homozigóticos para a mutação (*mh/mh*) (Bellinge et al., 2005).

Conforme revisado por Bellinge et al. (2005), Hanset (1991) determinou que o período de gestação é significativamente prolongado em bezerros portadores da mutação, resultando no nascimento de descendentes com um peso ao nascimento consideravelmente superior. Esta condição está associada a um maior número de casos de distócia (dificuldade no parto), o que, por sua vez, se relaciona a taxas elevadas de mortalidade quando os partos não são assistidos. Neste estudo, as fêmeas homozigóticas para a mutação, demonstraram uma fertilidade reduzida em relação às fêmeas não portadoras desta. Consequentemente, foram menos capazes de levar uma prenhez ao fim, resultando num aumento da taxa de mortalidade embrionária (Fiems, 2012).

Os animais que são heterozigóticos para a mutação são maiores do que os de tipo selvagem e não sofrem as mesmas dificuldades de parto que ocorrem nos animais homozigóticos. As fêmeas da raça Belgian Blue, que são homozigóticas para a mutação, requerem na maioria das vezes assistência veterinária durante o parto. Enquanto que as fêmeas heterozigóticas têm menor dificuldade no parto, não requerendo assistência (Bellinge et al., 2005).

Também segundo Trufero (2014), em vacas da raça Asturiana de los Valles e Asturiana de la Montaña, se verificou resultados produtivos inferiores em vacas homozigóticas para a mutação. Observou-se a ocorrência de percentagens mais baixas de ciclicidade, intervalo entre partos mais altos, atrasos mais longos de início de concepção, distócias e uma idade mais tardia para atingir a puberdade. Foram também observados piores resultados nas taxas de mortalidade de bezerros no periparto (incluindo abortos espontâneos e mortes alguns dias após o nascimento).

#### 2.4.2. A Mutação nt821 na Raça Preta

Há alguns anos foram identificados nesta raça, considerada em risco de extinção, animais portadores da mutação nt821(del11). Desde 2003 que foi incluído o teste de genotipagem dos touros candidatos a reprodutores para esta mutação. É necessária uma avaliação dos efeitos da mutação nas várias características, nomeadamente a nível do desempenho reprodutivo para gerar linhas orientadoras para o programa de melhoramento da raça e despistar potenciais anomalias. Desde então, que têm sido realizados testes com objetivo de nomear machos como reprodutores e portadores da mutação, para continuar a linhagem e incluir animais portadores deste alelo nas explorações (Figura 8).



Figura 8: Raça Preta (Fonte: Adaptado de ACBRP, 2023f)

## 2.5. Caracteres Produtivos Analisados

Para o nosso estudo, foram analisados os parâmetros de produção Ganho Médio Diário (GMD) e o Índice de Conversão (IC) dos animais testados e genotipados.

### 2.5.1. Ganho Médio Diário

O ganho médio diário (GMD) é um índice zootécnico que mede o desempenho do animal, e que determina o peso que o animal ganhou durante um certo intervalo de tempo (Coimbra, 2021).

É usada a seguinte fórmula para calcular o GMD:

Equação 1: Fórmula do Ganho Médio Diário

$$GMD = \frac{(\text{peso final do animal} - \text{peso inicial do animal})}{n^{\circ} \text{ de dias entre as 2 pesagens}}$$

O GMD é um indicador crucial de crescimento e, usualmente, os pesos aos 120 dias para as vacas aleitantes e aos 210 dias para a avaliação do potencial do crescimento do bezerro, bem como a sua aptidão para a produção de carne, são utilizados como padrão de referência (Coimbra, 2021). Os valores aproximados de GMD na raça Preta variam ligeiramente entre autores, sendo de 1200 g/dia (Carolino, 2006) e 1300 g/dia (Ferreira, 2006).

### 2.5.2. Índice de Conversão

O Índice de Conversão (IC) é um indicador de eficiência alimentar e consiste na medição da quantidade de alimento necessário, em kg, para que o animal tenha um aumento de 1 kg de peso corporal (Coimbra, 2021).

É usada a seguinte fórmula para calcular o IC:

*Equação ii: Fórmula do Índice de Conversão*

$$IC = \frac{\text{Ingestão diária de alimento}}{\text{Ganho médio diário}}$$

Animais com melhores IC (valores mais baixos), é o desejável, pois indica que o animal em questão ingere uma menor quantidade de alimento para atingir um maior peso.

## 2.6. Exames Andrológicos

Foram usados diferentes estimadores de teste para conseguir fazer um estudo viável e interessante com os dados dos animais que tínhamos à disposição. Este estudo focou-se na andrologia de machos de teste, que foram submetidos a exames andrológicos realizados no centro de testagem da ACBRP.

A realização de exames andrológicos numa exploração é de grande importância, uma vez que possibilita a avaliação do potencial reprodutivo dos machos como futuros reprodutores (Simões, 2008) assim como identificar machos não aptos para monta, inférteis ou sub-férteis, de modo a estimar o potencial reprodutivo dos touros, visando aprimorar os níveis de fertilidade e rentabilidade das explorações (Romão et al., 2012).

O exame andrológico deve ser efetuado anualmente e aproximadamente 60 dias antes do touro entrar à cobrição, e implica a realização de um exame físico de estado geral, avaliação da genitália externa (testículos, pénis, prepúcio), exame de sémen e idealmente a líbido (Bettencourt & Romão, 2009).

Após a realização do exame físico do animal, que abrange a avaliação de fatores como a dificuldade de locomoção, condição corporal, defeitos de aprumos e visão, procede-se à avaliação da genitália por palpação testicular, com o objetivo de identificar lesões, feridas e infeções. Quanto ao exame de sémen, a colheita do mesmo poderá ser efetuada por estimulação elétrica, recorrendo-se a maioria das vezes, a um eletroejaculador (Bettencourt & Romão, 2009).

### 2.6.1. Perímetro Escrotal

O perímetro escrotal (PE) embora não apresente um benefício económico por si só, é uma característica que demonstra correlação com o ganho de peso e com características reprodutivas (volume do testículo e o parênquima), tornando-se por isso, um dos critérios de seleção amplamente utilizado para avaliar a eficiência reprodutivas de bovinos (Siqueira et al., 2013). É de extrema importância efetuar a medição do perímetro escrotal, uma vez que está intimamente relacionado com a capacidade de produção de sémen. No entanto, é relevante notar que esta medida depende da idade, peso e raça do touro em questão (Ribeiro, 2018) (Tabela 2).

*Tabela 2: Perímetro escrotal de touros de raças para produção de carne criadas em regime extensivo (cm) (Fonte: Adaptado de Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010)*

<b>Idade do Reprodutor</b>	<b>Muito Bom</b>	<b>Bom</b>	<b>Medíocre</b>	<b>Mau</b>
<24 meses	>34	32-34	30	<30
24-36 meses	>38	34-38	32	<32
>36 meses	>40	36-40	34	<34

O animal é reprovado se:

- < 30 cm aos 15 meses
- < 32 cm aos 24 meses
- < 34 cm aos 36 meses

Estudos realizados por Waldner et al. (2010) mostraram que fêmeas que foram cobertas por touros com um perímetro escrotal baixo ( $\leq 34$  cm), demoraram mais tempo a ficarem prenhas, independentemente da raça em questão.

### 2.6.2. Motilidade Individual

A motilidade individual é a percentagem de espermatozoides com movimentos progressivos.

Um touro é considerado não apto quando apresenta motilidade individual inferior a 30%, tanto que pode ser imediatamente refogado ou pode ser submetido a um novo teste após 60 dias. A classificação mínima para aprovação tem de ser, no mínimo, o nível Satisfatório (40% a 60% de espermatozoides com motilidade progressiva), porém o facto de um touro ser considerado satisfatório, refere-se apenas ao momento da avaliação e, na maioria das

vezes a informação sobre a libido e a capacidade de monta do animal não é considerada nem avaliada (Bettencourt & Romão, 2009) (Tabela 3).

Tabela 3: Classificação consoante a motilidade individual dos espermatozoides (**Fonte:** Adaptado de Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010)

<b>Características (% com motilidade progressiva)</b>	<b>Classificação</b>
80-100%	Muito Bom
60-80%	Bom
40-60%	Satisfatório
20-40%	Medíocre
0-20%	Mau

### 2.6.3. Morfologia

A morfologia representa-se por a percentagem de espermatozoides com formas normais. As anomalias espermáticas relatadas neste estudo são:

- Defeitos de cabeça (por exemplo, cabeças periformes);
- Defeitos de cauda (por exemplo: defeitos da peça intermédia, caudas enroladas, gota citoplasmática proximal, gota citoplasmática distal);
- Outras células (por exemplo, células redondas).

A classificação mínima recomendada para aprovação exige que mais de 70% dos espermatozoides apresentem morfologia normal (Robalo Silva & Lopes da Costa, 2010). A análise da morfologia espermática é dividida em defeitos maiores e menores, sendo que o número de espermatozoides anormais não pode exceder 20% de defeitos de cabeça e deve ser inferior a 30% no total de anormalidades (Mariano et al., 2015).

Segundo a classificação de Blom (1973), são classificados como defeitos maiores, aqueles que têm um grande efeito na fertilidade de machos, podendo causar prejuízos (Enciso et al., 2011). Estes defeitos ocorrem frequentemente, podem ser hereditários e apresentam uma proporção significativa (10-15%) num ejaculado. Ocorrem durante o processo de espermiogénese, que ocorre nos testículos, sendo alguns deles: a maioria das anormalidades de cabeça e peça intermédia, cabeças periformes, gota citoplasmática proximal e caudas fortemente enroladas ou dobradas (“Dag” defect) (Chenoweth, 2005).

Os defeitos menores, são considerados as anomalias de menor importância em termos de fertilidade, mas podem causar uma diminuição da performance reprodutiva se estiverem presentes em grande número. Estes surgem após os spz terem deixado os testículos, durante a sua passagem pelo epidídimo, durante a ejaculação ou como resultado de manipulação do sémen, sendo alguns deles: gota citoplasmática distal, cauda simplesmente enrolada ou dobrada, cabeça pequena normal, cabeça estreita, células redondas, outras células (Chenoweth, 2005; Enciso et al., 2011; Fonseca et al., 1997; Mariano et al., 2015).

O insucesso reprodutivo pode ser atribuído a uma redução na percentagem de espermatozoides com morfologia normal e, possivelmente, a uma diminuição no número total de espermatozoides presentes no ejaculado (Waldner et al., 2010).

As ocorrências de defeitos espermáticos têm sido correlacionadas com a condição de infertilidade e esterilidade em machos, assim como o desenvolvimento embrionário. Por isso, a sua avaliação constitui um elemento essencial na análise de qualidade do sémen (Enciso et al., 2011; Menon et al., 2011).

#### 2.6.4. Cor e Viscosidade do Sémen

Um sémen é considerado normal quando a sua cor é branco/marfim e a viscosidade é aparentemente cremosa e fina com uma consistência leitosa (Ribeiro, 2018) (Tabela 4).

Tabela 4: Parâmetros para Cor e Viscosidade do sémen (*Fonte: Adaptado de Bravo, 2020*)

<b>Cor</b>	<b>Viscosidade</b>
Transparente/Citrina	Baixa
Translúcido	Ligeiramente fluida
Branco-Sujo	Fluida
Branca	Viscosa
Amarelo	Leitosa
Branco-Amarelo	Aquosa
Clara	Rala

É preciso ter em consideração se o sémen apresenta uma cor avermelhada, que geralmente apresenta contaminação por sangue, ou ainda amarelada ou esverdeada em casos de presença de pus. A cor amarela no sémen de alguns machos, é considerada normal, devido à presença de riboflavina (Silva et al., 1993).

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Informação Fenotípica

Foram utilizados dados fenotípicos fornecidos pela ACBRP que incluem dados referentes a todos os animais que realizaram exame andrológico entre 2003 a 2020, num total de 76 machos.

Todos estes animais foram genotipados para a mutação nt821. Os genótipos são: Homozigótico para a mutação (HOM); Heterozigótico para a mutação (HET) e Selvagem, homozigótico para o alelo dominante (SEL). A frequência dos diferentes genótipos na amostra está apresentada na Tabela 5. Como se pode observar a frequência dos 3 genótipos está balanceada.

*Tabela 5: Número de animais de estudo para cada genótipo*

<b>Genótipo</b>	<b>Animais</b>
Heterozigótico (WT/MH)	25
Homozigótico (MH/MH)	25
Selvagem (WT/WT)	26
<b>Total</b>	<b>76</b>

Todos os animais que constam deste estudo são propriedade de criadores que pertencem à Associação e estão inscritos no LGRBP. Os dados utilizados encontram-se arquivados no programa de gestão de efetivos GenPro®, na licença de utilização da ACBRP.

Dos 76 animais em estudo, 25 animais são heterozigóticos para a mutação (WT/MH), 25 animais são homozigóticos para a mutação (MH/MH) e 26 animais não apresentam a mutação da garupa dupla, correspondendo ao genótipo selvagem (WT/WT) (Figura 9). Desta forma observa-se que o número de animais amostrados em cada genótipo é semelhante.

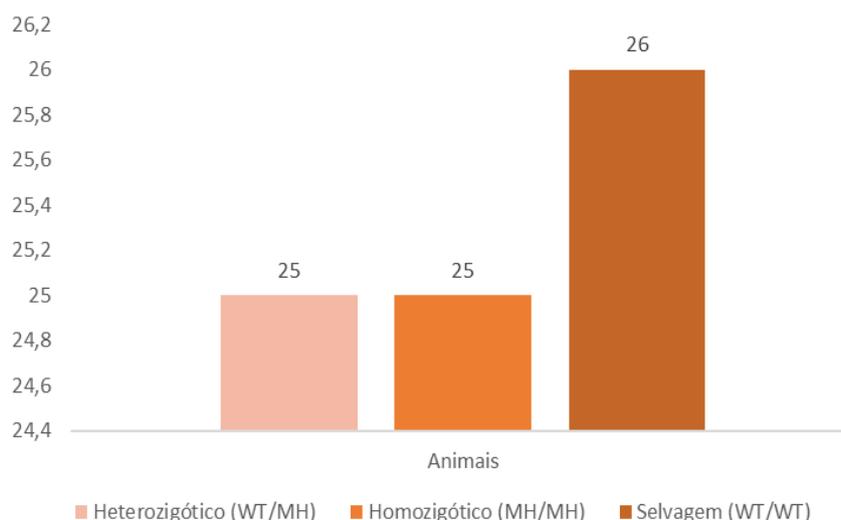


Figura 9: Representação do número de animais para cada genótipo

Foram usados 76 animais para esta análise, porém, nem todos os animais apresentavam todos os parâmetros avaliados nos diferentes testes. Na tabela 6 estão representados o número de todos os dados registados relativos a cada parâmetro avaliado.

Tabela 6: Apresentação do número de registos para cada parâmetro avaliado

Nº de registos					
GMD	73	Cabeças Periformes	4	Defeitos de Cauda	54
IC	73	Defeitos de Cabeça	29	Caudas Enroladas	4
PE	73	Defeito de Peça Intermédia	17	Células Redondas	7
FA	66	Gota Citoplasmática Proximal	34	Cor	62
MI	68	Gota Citoplasmática Distal	13	Viscosidade	66

Siglas: GMD = Ganho Médio Diário, IC = Índice de Conversão, PE = Perímetro Escrotal, FA = Formas Anormais, MI = Motilidade Individual

### 3.2. Análise Estatística

A análise dos resultados, foi realizada com o recurso ao software estatístico IDE RStudio, para determinação de parâmetros estatísticos para descrever e caracterizar os dados disponíveis. Realizaram-se análises de estatística descritiva, inferencial e de associação/independência com o objetivo de testar a significância do efeito da presença da mutação nos diferentes fenótipos estudados.

Procedeu-se à análise de estatística descritiva de acordo com os 3 genótipos segundo uma análise estatística descritiva para medição da tendência central e de dispersão (média e

desvio padrão), no caso das variáveis de tipo quantitativo. O pressuposto de normalidade de distribuição de variáveis foi verificado através do teste de Shapiro-Wilk ( $N \leq 50$ ).

A análise inferencial foi realizada através do modelo de regressão linear simples e o modelo linear misto. Quanto à regressão linear simples, esta é uma técnica de estatística descritiva entre uma variável independente (preditora) e uma variável dependente (resposta), de acordo com a seguinte fórmula:

*Equação iii: Equação da Regressão Linear Simples*

$$y = \beta_0 + \beta_1 * X + \varepsilon$$

y: Representa a variável dependente (resposta)

$\beta_1$ : É o coeficiente de inclinação, representa a taxa de mudança em Y para uma mudança unitária em X.

$\beta_0$ : É o intercepto (ou constante) da linha de regressão, representa o valor de Y quando o X é igual a 0

X: Representa a variável independente (preditora)

$\varepsilon$ : Representa o erro/ resíduo

Quanto ao modelo linear misto, ou modelo de efeitos mistos, é um *Mix Model* que tem como objetivo adicionar o efeito randomizado da variação individual. Neste caso, foi usado o N° SNIRB (Número do Sistema Nacional de Identificação e Registo de Bovinos) dos machos de teste. A equação do modelo, é dada pela seguinte fórmula:

*Equação iv: Equação do Modelo Linear Misto*

$$y_i = X_i\beta + Z_i\gamma + \varepsilon_i$$

$y_i$ : Representa a variável dependente (resposta)

$\beta$ : É a matriz de design para os efeitos fixos

Z: É a matriz de design para os efeitos aleatórios

$\gamma$ : É o vetor de coeficientes dos efeitos aleatórios

$\varepsilon_i$ : Representa o erro/resíduo

Para a comparação de médias entre os 3 genótipos (HET, HOM, SEL) relativamente a uma variável dependente de tipo quantitativo (GMD, IC, PE, MI, FA), foi utilizado o teste paramétrico One-Way ANOVA.

No caso de detecção de diferenças significativas, foi utilizado o teste de comparações múltiplas de Tukey (N>30) para comparar a média entre os genótipos.

Para investigar se os diferentes genótipos da mutação têm diferenças significativas quanto à prevalência de incidência dos diferentes tipos de formas anormais ou quanto a outras características qualitativas do sêmen foi utilizado o teste de ajustamento do Qui-Quadrado.

Nas diferentes análises, um valor de p inferior a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

## 4. Resultados

### 4.1. Parâmetros de Eficiência Produtiva

Foram realizados testes estatísticos no IDE RStudio, nomeadamente a regressão linear simples e o modelo linear misto, quanto ao GMD e ao IC. Foram obtidos os seguintes resultados apresentados na tabela seguinte (Tabela 7).

*Tabela 7: Comparação dos parâmetros de eficiência produtiva com os genótipos*

	HET			HOM			SEL			ANOVA (RLS)	ANOVA (MLM)
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão	p	p
GMD (Kg/dia)	25	1,442	0,224	25	1,199	0,266	26	1,407	0,153	<b>0,0004</b>	0,9287
IC	25	3,898	1,793	25	4,979	2,075	26	4,617	1,564	0,116	0,5078

Siglas: GMD = Ganho Médio Diário, IC = Índice de Conversão, HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem, RLS = Regressão Linear Simples, MLM = Modelo Linear Misto, n = nº de amostras, p = Valor de p

A Tabela 7 mostra que o genótipo onde se verificou um maior ganho médio diário, em média, foi no genótipo heterozigótico, ao registar 1,442 kg/dia. Por outro lado, o genótipo que apresentou uma média mais baixa foi o genótipo homozigótico, registando 1,199 kg/dia. Quanto ao índice de conversão, verificou-se um maior valor médio nos homozigóticos, ao registar 4,979 kg/dia e um menor nos animais heterozigóticos, apresentando uma média de 3,898 kg/dia.

Seguidamente foi efetuada uma regressão linear para modelar a relação entre a variável genótipo (efeito fixo) e os diferentes fenótipos de eficiência (variável resposta). Posteriormente, realizou-se a análise de variância (ANOVA) para testar o efeito dos três

genótipos nos fenótipos estudados. Foi obtido um valor de p de 0,0004 para o GMD e obtido um valor de p de 0,116 para o IC.

Estas análises têm como pressuposto que as variáveis resposta têm distribuição normal, o que foi verificado através do teste Shapiro-Wilk no qual a hipótese nula é que a densidade dos dados segue uma distribuição normal (Tabela 8). Com a leitura da Tabela 8, verifica-se que apenas o parâmetro do GMD seguiu uma distribuição normal, já que o valor de p foi superior a 0,05 e desta forma não se rejeita a hipótese nula. O IC relatou um valor de p inferior a 0,05, ou seja, rejeita-se a hipótese nula e para os dados disponíveis, a distribuição é significativamente diferente da distribuição normal. No entanto, a literatura descreve esta variável como sendo de distribuição normal (Islam et al., 2020; Yi et al., 2018) e desta forma esta variável foi analisada de forma semelhante ao GMD.

*Tabela 8: Teste de Shapiro-Wilk nos parâmetros de eficiência produtiva*

	Estatística	p
GMD	0,9801	<b>0,3024</b>
IC	0,7831	5,205 <sup>-9</sup>

Siglas: GMD = Ganho Médio Diário, IC = Índice de Conversão, p = Valor de p

O valor de p obtido na análise de variância (Tabela 7, RLS) é inferior a 0,05 para o GMD, o que significa que para este fenótipo rejeita-se a hipótese nula (igualdade das médias dos 3 genótipos), o tipo de genótipo tem efeito significativo no mérito deste fenótipo.

Adicionalmente, foi efetuada a modelação de um modelo linear misto, no qual se adicionou o efeito aleatório do N<sup>o</sup> SNIRB de cada animal do estudo. Foram obtidos valores de p com os valores de 0,9287 e 0,5078 para o GMD e IC, respetivamente, verificando-se assim, que a análise não é estatisticamente significativa para nenhum dos parâmetros ( $p > 0,05$ ).

Nas Figuras 10 e 11 à esquerda, podemos observar os gráficos Q-Q para cada parâmetro, que permitem aferir se os resíduos do modelo têm uma distribuição normal. Pode-se então observar que quase todos os pontos se situam na linha da distribuição teórica no caso do GMD. Nas Figuras 10 e 11 à direita, estão representados os valores previstos versus os valores residuais. Esta análise permite avaliar a adequação do modelo proposto para previsão de valores futuros. São úteis para visualizar se o modelo verifica os pressupostos como a homocedasticidade e a aleatoriedade. Neste caso não encontramos um diferente padrão de

dispersão dos resíduos em associação, com os valores dos valores previstos para os três genótipos, no caso do GMD.

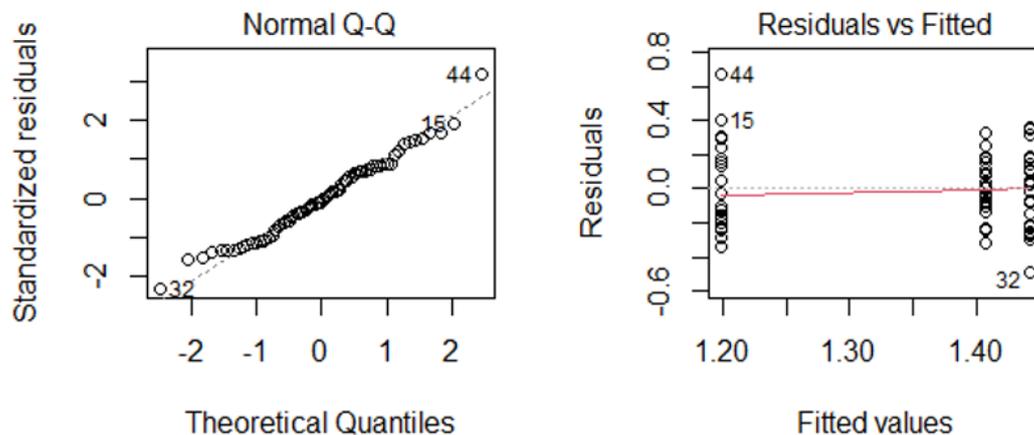


Figura 10: Verificação dos pressupostos para o Ganho Médio Diário

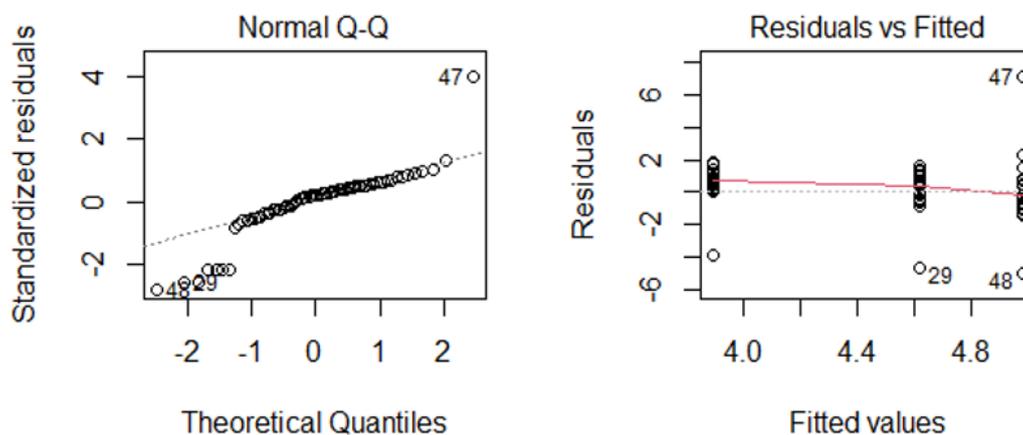


Figura 11: Verificação dos pressupostos para o Índice de Conversão

De seguida, procedeu-se ao teste de Tukey para comparar as médias entre os genótipos e identificar entre quais das combinações as diferenças são significativas. Os valores obtidos estão representados na Tabela 9.

Tabela 9: Teste de Tukey para parâmetros de eficiência produtiva

	HOM-HET	SEL-HET	HOM-SEL
GMD	<b>0,0007</b>	0,8375	<b>0,0042</b>
IC	0,1057	0,3464	0,7705

Siglas: GMD = Ganho Médio Diário, IC = Índice de Conversão, HOM-HET = Interação Homozigótico - Heterozigótico-, SEL-HET = Interação Homozigótico -Heterozigótico, HOM-SEL= Interação Homozigótico - Selvagem

Da análise do teste de Tukey, observaram-se vários tipos de resultados diferentes para cada parâmetro, tendo em conta a associação entre os genótipos.

Quanto ao GMD, os genótipos homozigótico e heterozigótico apresentaram diferenças significativas com um valor de p de 0,0007 ( $p < 0,05$ ), assim como o mesmo genótipo homozigótico com o selvagem, onde foi obtido um valor de p de 0,0042 ( $p < 0,05$ ). Porém, os selvagens com heterozigóticos não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ).

Quando ao IC, não houve nenhum par de genótipos com diferenças significativas, para nenhuma das associações ( $p > 0,05$ ).

## 4.2. Parâmetros Reprodutivos

### 4.2.1. Perímetro Escrotal, Motilidade Individual e Formas Anormais

Quanto aos parâmetros reprodutivos estudados, nomeadamente o perímetro escrotal, a motilidade individual e a percentagem de formas anormais, foram realizados os mesmos testes anteriormente mencionados para os parâmetros produtivos, como podemos observar na Tabela 10.

*Tabela 10: Comparação dos parâmetros reprodutivos com os genótipos*

	HET			HOM			SEL			ANOVA (RLS)	ANOVA (MLM)
	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão	n	Média	Desvio Padrão	p	p
PE (cm)	25	33,56	2,2	25	30,78	2,5	26	34,68	1,95	$2,339^{-7}$	$5,155^{-7}$
MI (%)	25	75	7,42	25	57,14	25,47	26	69,79	15,64	<b>0,005</b>	0,5078
FA (%)	25	15	17,18	25	35,95	25,48	26	18,8	18,22	<b>0,003</b>	0,5078

Siglas: PE = Perímetro Escrotal, MI = Motilidade Individual, FA = Formas Anormais, HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem, RLS = Regressão Linear Simples, MLM = Modelo Linear Misto, n = n° de amostras, p = Valor de p

Quanto ao PE, em centímetros, os animais de genótipo selvagem, foram os que apresentaram, em média, o maior perímetro escrotal, apresentando um valor de 34,68 cm, não sendo muito superior aos heterozigóticos com 33,56 cm. O genótipo homozigótico apresentou o valor mais baixo de 30,78 cm.

Relativamente à qualidade do sémen avaliado, quanto à motilidade individual dos spz destes animais, os que apresentaram uma maior motilidade foram os heterozigóticos com 75%, enquanto que com uma menor motilidade (57,14%), foram os homozigóticos.

Em termos de percentagem de formas anormais apresentadas pelos spz, os heterozigóticos apresentaram o valor mais baixo de 15%, em média, o genótipo selvagem 18,8% e os homozigóticos com 35,95%.

Seguidamente, foi investigado se as diferenças observadas entre as médias destes fenótipos para os diferentes genótipos foram significativas. De forma a avaliar a normalidade da distribuição dos dados, foi realizado o teste de Shapiro-Wilk (Tabela 11), com um nível de significância de 0,05. Não se observou uma distribuição normal para nenhum dos parâmetros (PE, MI, FA) ( $p < 0,05$ ) neste estudo. Porém na literatura, estes parâmetros são considerados como tendo uma distribuição normal (Klinc & Rath, 2007; Menegassi et al., 2019; Menon et al., 2011). Então também foi considerado neste estudo, pois a causa mais provável para não ter demonstrado normalidade no estudo, é o facto da amostragem ser muito pequena.

*Tabela 11: Teste de Shapiro-Wilk para os parâmetros reprodutivos*

	<b>Estatística</b>	<b>p</b>
PE	0,94515	0,003199
MI	0,74815	2,653 <sup>-9</sup>
FA	0,74079	2,653 <sup>-9</sup>

Siglas: PE = Perímetro Escrotal, MI = Motilidade Individual, FA = Formas Anormais, p = Valor de p

Para o modelo da regressão linear simples, foram obtidos valores de p que mostraram que a análise é estatisticamente significativa para todas as características avaliadas ( $p < 0,05$ ). Para o PE, foi obtido um valor de p igual 2,339<sup>-7</sup>, para a MI um valor de p de 0,005 e para as FA um valor de 0,003.

No que diz respeito à análise Anova do modelo linear misto, também com o N° SNIRB como efeito fixo do teste, foi obtido um valor de p estatisticamente significativo ( $p < 0,05$ ) para o perímetro escrotal com o valor de 5,155<sup>-7</sup>. No entanto, para os parâmetros MI e FA, foram obtidos os valores de 0,5078 para ambos, concluindo que a análise não foi estatisticamente significativa ( $p > 0,05$ ).

Podemos observar os gráficos Q-Q e os gráficos de valores previstos de resíduos versus valores residuais para cada parâmetro nas Figuras 12, 13 e 14. Para PE, na Figura 13, à esquerda, pode observar-se que os dados seguem a previsão teórica, embora se observe que não ocorre uma distribuição contínua como seria desejável. Na Figura 12, à direita, pode observar-se que a dispersão dos resíduos é semelhante nos três genótipos. Para os fenótipos

MI e FA, os resultados das Figuras 13 e 14 mostram fortes desvios à linha da distribuição teórica à esquerda e diferente dispersão dos resíduos consoante o genótipo nos gráficos à direita.

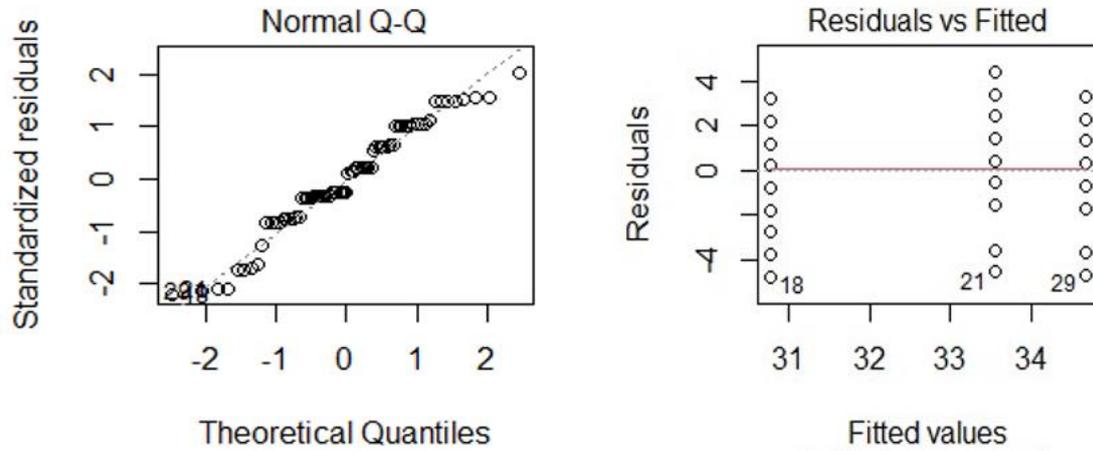


Figura 12: Verificação dos pressupostos para o Perímetro Escrotal

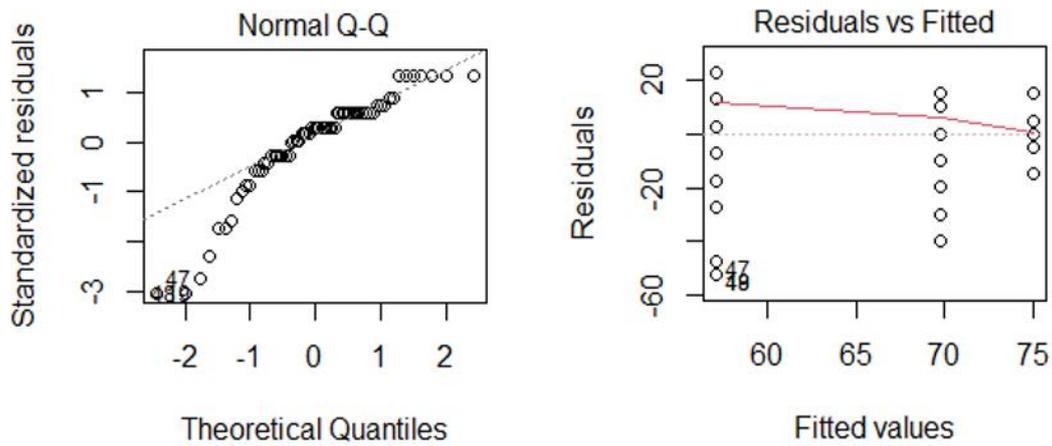


Figura 13: Verificação dos pressupostos para a Motilidade Individual

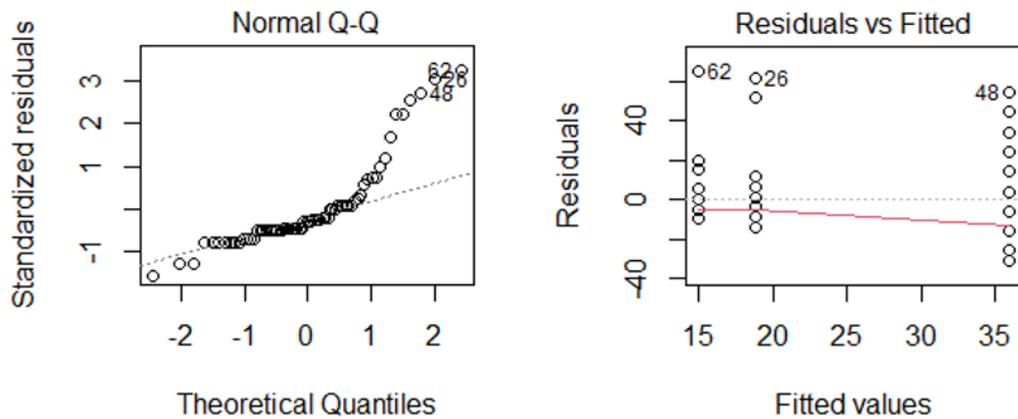


Figura 14: Verificação dos pressupostos para as Formas Anormais

Os valores obtidos no teste de Tukey para os parâmetros estão representados na Tabela 12.

Tabela 12: Teste de Tukey para parâmetros reprodutivos

	HOM-HET	SEL-HET	HOM-SEL
PE	<b>0,0002</b>	0,1864	<b>0,0002</b>
MI	<b>0,0049</b>	0,5886	0,0508
FA	<b>0,0037</b>	0,8008	<b>0,01656</b>

Siglas: PE = Perímetro Escrotal, MI = Motilidade Individual, FA = Formas Anormais, HOM-HET = Interação Homozigótico- Heterozigótico, SE-HET = Interação Homozigótico - Heterozigótico, HOM-SEL – Interação Homozigótico - Selvagem

Da leitura do teste, quanto ao PE, foi observado o mesmo comportamento dos genótipos ao comparar com o GMD, porém com uma significância mais pequena (valor de  $p=0,0002$ ) ( $p<0,05$ ). Os genótipos HOM-HET (Interação homozigótico – heterozigótico) apresentaram diferenças significativas, assim como os genótipos HOM-SEL (Interação homozigótico – selvagem). Porém, os SEL-HET (Interação selvagem – heterozigótico) não apresentaram diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

Relativamente à MI, os genótipos HOM-HET apresentaram diferenças significativas com um valor de  $p$  de 0,0049. Não se observaram diferenças significativas entre o genótipo selvagem com os outros genótipos ( $p>0,05$ ).

Da leitura dos resultados obtidos para as FA, o genótipo homozigótico também apresentou diferenças significativas com os heterozigóticos e selvagens ( $p<0,05$ ). Os genótipos SEL-HET não apresentou diferenças significativas ( $p>0,05$ ).

#### 4.2.1.1. Tipos de Formas Anormais

A incidência da presença de diferentes tipos de formas anormais nos diferentes genótipos foi também analisada. Na Tabela 13 estão representados o tipo e número de ocorrências de acordo com os três genótipos.

Tabela 13: Número de ocorrências de formas anormais nos genótipos

	HET	HOM	SEL	Total
Cabeças Periformes	0	3	0	<b>3</b>
Defeitos de Cabeça	10	8	10	<b>28</b>
Defeito de Peça Intermédia	7	5	5	<b>17</b>
Gota Citoplasmática Proximal	10	16	8	<b>34</b>
Gota Citoplasmática Distal	2	5	6	<b>13</b>
Defeitos de Cauda	18	16	20	<b>54</b>

Caudas Enroladas	2	1	1	4
Células Redondas	4	2	1	7
<b>Total</b>	<b>53</b>	<b>56</b>	<b>51</b>	<b>160</b>

Siglas: HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem

Da leitura da Tabela 13, é notória a discrepância de número de dados entre os defeitos apresentados, pois nem todos os genótipos apresentam o mesmo número e tipo de defeitos. Os defeitos que mais se pronunciaram, em geral, foram os defeitos de cauda, cabeça e ao nível da gota citoplasmática proximal. Por outro lado, os defeitos menos frequentes foram as cabeças periformes, células redondas e caudas enroladas.

Em relação aos HOM, com o maior número de ocorrências (n=56), observaram-se em maior número, defeitos de cauda e defeitos de gota citoplasmática proximal, por outro lado, defeitos de caudas enroladas e células redondas com uma menor incidência de defeitos. Os HET (n=53) apresentaram uma incidência mais elevada de defeitos cauda, cabeça e ao nível de gota citoplasmática proximal, e com menor incidência, defeitos de gota citoplasmática distal e caudas enroladas. O genótipo SEL foi o genótipo que apresentou um menor número de ocorrências (n=51), com uma maior incidência de defeitos de cauda e cabeça, e em menor número, defeitos de células redondas e caudas enroladas. É de notar que somente o genótipo HOM apresentou defeitos de cabeças periformes (Figura 15).

Na Figura 15 pode ser observada a distribuição do número e tipo de defeito presente no sémen dos machos analisados.

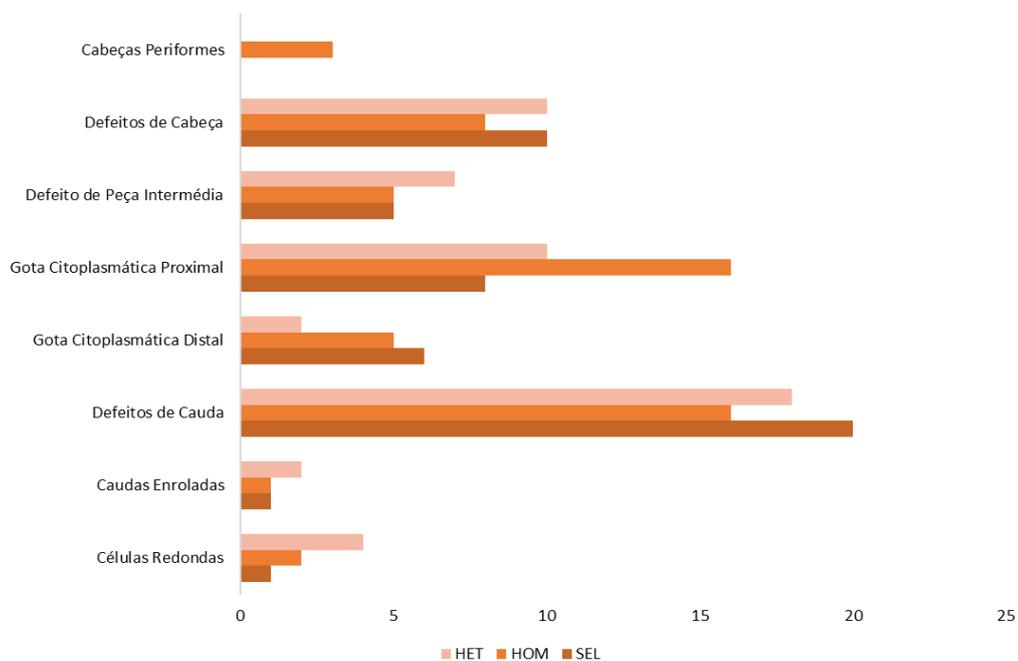


Figura 15: Número de ocorrências e tipo de defeitos das formas anormais por genótipo

Para a análise destes dados, foi realizado o teste do Qui-Quadrado, pois temos o objetivo de testar o efeito da mutação, que é uma variável categórica, na incidência de diferentes tipos de formas anormais observadas no teste andrológico, que são também variáveis categóricas. O objetivo foi analisar se existe um efeito ou associação entre os três genótipos com a ocorrência de diferentes defeitos. Os resultados estão representados na Tabela 14.

Tabela 14: Teste Qui-Quadrado para defeitos de formas anormais

Parâmetro	p
Cabeças Periformes	<b>0,041</b>
Defeitos de Cabeça	0,833
Defeitos de Peça Intermédia	0,710
Gota Cit. Proximal	<b>0,049</b>
Gota Cit. Distal	0,323
Defeitos de Cauda	0,591
Caudas Enroladas	0,756
Células Redondas	0,314

Siglas: p = Valor de p

Da leitura da tabela, podemos verificar que o parâmetro cabeças periformes (valor de  $p=0,041$ ) e defeitos ao nível da gota citoplasmática proximal (valor de  $p=0,049$ ) são estatisticamente significativos ( $p<0,05$ ). Os restantes defeitos não apresentaram resultados significativos para uma associação entre os três genótipos desta análise ( $p>0,05$ ).

O defeito ao nível da gota citoplasmática proximal, está presente em todos os genótipos com uma grande incidência, principalmente no genótipo HOM (Figura 15). Este defeito é considerado um defeito maior, correlacionada com prejuízos na fertilidade (Menon et al., 2011). O facto de ser em maior número nos HOM vai em conformidade com o facto do genótipo HOM apresentar os piores resultados a nível reprodutivo e de qualidade do sémen. Foi verificado anteriormente que o genótipo SEL não apresentava relevância no estudo quanto à MI, por isso, pode haver uma ligação também em relação a não afetar o número de defeitos de formas anormais, correlacionando-se com o facto de ter sido o genótipo com o menor número de ocorrências num dos defeitos com relevância estatística (gota citoplasmática proximal).

Porém, é de alguma importância notar que este genótipo foi o que apresentou o maior número de ocorrências no que toca a defeitos de cauda, que foi o defeito com mais ocorrências neste estudo para todos os genótipos.

O defeito de cabeças periformes, estatisticamente significativo no estudo ( $p < 0,05$ ) só foi observado no genótipo HOM (Figura 15), mesmo com um número pequeno de ocorrências. Este resultado pode ter sido um efeito do acaso, ou pode ter mesmo algum tipo de relação, mas é necessária uma maior amostragem para chegar a uma conclusão.

#### 4.2.2. Cor e Viscosidade

Foi realizado também uma análise quanto à cor e viscosidade do sémen dos machos testados. O número de dados analisados tendo em conta os genótipos, estão representados na Tabela 15.

Tabela 15: Número de dados recolhidos para cor e viscosidade consoante o genótipo

Parâmetro	HET	HOM	SEL
Cor	23	19	20
Viscosidade	22	20	24
<b>Total</b>	<b>45</b>	<b>39</b>	<b>44</b>

Siglas: HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem

Nem todos os animais testados apresentavam informação sobre a cor/viscosidade do sémen, daí haver uma pequena discrepância do número de dados analisados. Para os animais heterozigóticos recolheu-se um total de 23 dados para a cor e 22 para a viscosidade ( $n=45$ ); para homozigóticos recolheu-se 19 dados para a cor e 20 para a viscosidade ( $n=39$ ) e, para o genótipo selvagem, 20 dados para cor e para a viscosidade 24 dados ( $n=44$ ).

Relativamente aos dados analisados quanto à cor, foram avaliadas as diferentes cores que o sémen apresentou, consoante o genótipo (Tabela 16).

Tabela 16: Cor do sémen em cada genótipo

Cor	HET	HOM	SEL
Amarelo	1	0	0
Branca	18	10	18
Branco-Amarelo	0	1	0
Branco-Sujo	1	0	1
Citrina	2	5	0
Clara	1	0	0
Translúcido	0	3	1
<b>Total</b>	<b>23</b>	<b>19</b>	<b>20</b>

Siglas: HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem

Segundo a análise da tabela, pode observar-se que os dados relativos às diferentes cores que cada genótipo pode apresentar, não são homogêneos. Porém, é a cor branca que

apresenta um maior nº de ocorrências nos três genótipos, e por outro lado, a cor branco-amarelo, amarelo e clara com menor relevância.

Podemos observar também, em forma de gráfico, os diferentes dados analisados quanto à cor (Figura 16).

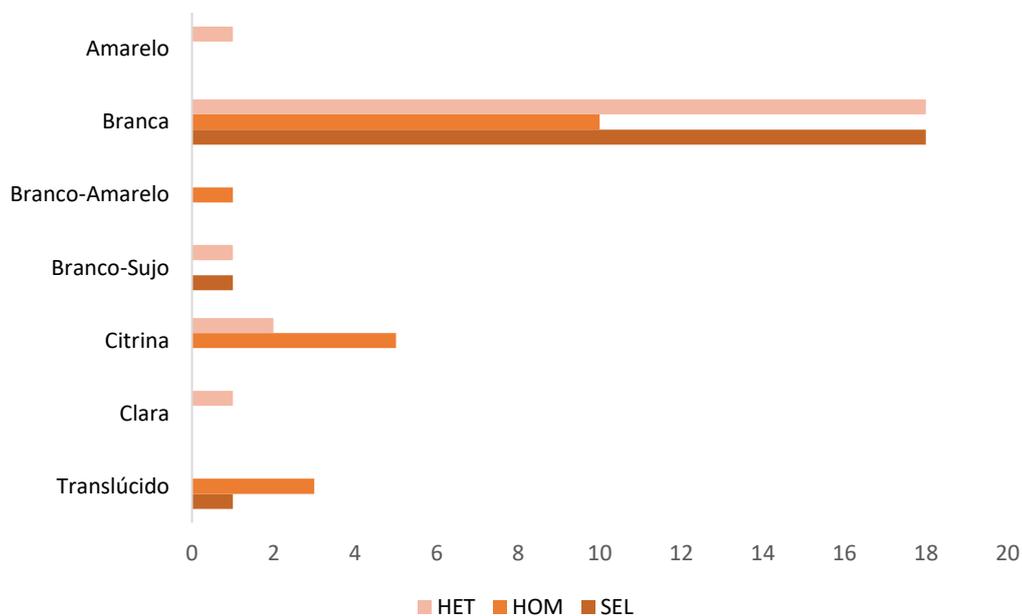


Figura 16: Representação das diferentes cores do sêmen em cada genótipo

O número de dados relativos aos diferentes tipos de viscosidade consoante o genótipo, estão apresentados na tabela seguinte (Tabela 17).

Tabela 17: Número de dados de viscosidade para cada genótipo

Viscosidade	HET	HOM	SEL
Aquosa	19	15	20
Leitosa	1	2	2
Ralo	2	3	2
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>20</b>	<b>24</b>

Siglas: HET = Heterozigótico, HOM = Homozigótico, SEL = Selvagem

Está representado na Figura 17, de forma mais dinâmica e visual, o número de dados analisados relativos à viscosidade para cada genótipo.

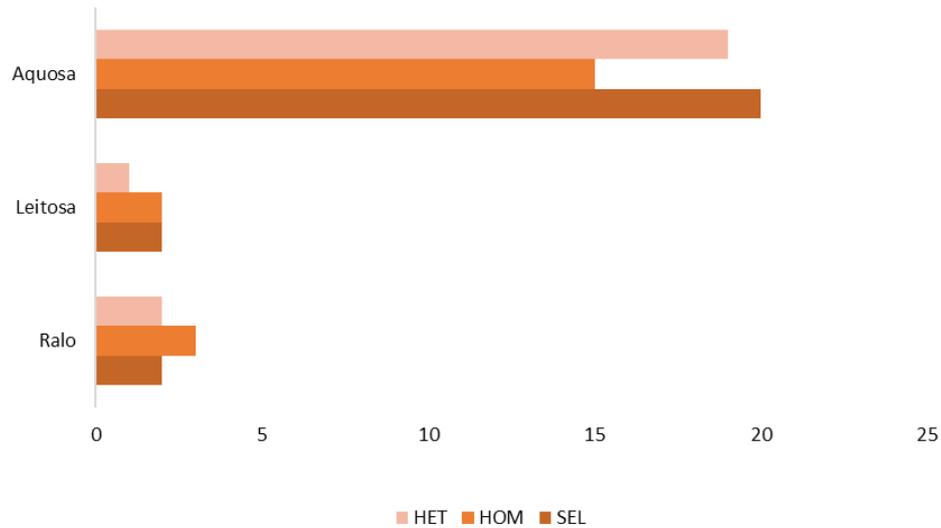


Figura 17: Representação do tipo de viscosidade do sêmen em cada genótipo

Para a análise estatística destas duas características, foi realizado o teste Qui-Quadrado, onde se obteve os resultados que estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Teste Qui-Quadrado para cor e viscosidade

Parâmetro	p
Cor	0,094
Viscosidade	0,887

Síglas: p – Valor de p

Da leitura da tabela, podemos verificar que para as duas características não há evidências estatisticamente significativas para uma associação com os três genótipos, pois apresentam um valor de p de 0,094 e 0,887 para a cor e a viscosidade, respectivamente.

## 5. Discussão

No presente estudo foram analisados dados fornecidos pela ACRBP, de exames andrológicos realizados no centro de testagem, assim como do IC e GMD desses mesmos animais, de teste recolhidos desde 2003 a 2020.

A testagem individual realizada nos centros de testagem, tem como finalidade comparar animais provenientes de diferentes explorações de origem, submetidos a condições ambientais semelhantes (Carolino, 2006). Por isso, é crucial considerar não só as características fenotípicas dos animais, mas também os diversos fatores que podem influenciar o desempenho dos animais (Carolino, 2006).

Foi avaliado a medição do GMD dos animais testados para os três genótipos presentes na raça Preta. Da análise dos dados obtidos, verificou-se que foi o genótipo HET que apresentou o melhor desempenho ( $1,442 \pm 0,224$  kg/dia), de seguida os animais com genótipo SEL ( $1,407 \pm 0,153$  kg/dia), e os HOM apresentaram as piores médias ( $1,199 \pm 0,266$  kg/dia). Este resultado é coerente com a análise efetuada por Vicente et al. (2021), que investigaram o efeito da mutação na raça Preta quanto ao GMD, no intervalo de 2002-2019, sugerindo que o sistema produtivo em regime extensivo poderá não ser o mais indicado para os animais homozigóticos.

Quanto à medição do IC, quanto menor for o IC melhor é o desempenho produtivo, isto significa que o animal está a consumir uma menor quantidade de alimento para aumentar o seu peso vivo. No caso deste estudo, verificou-se que o genótipo HET apresentou um menor IC ( $3,898 \pm 1,793$ ), assim sendo um melhor desempenho produtivo; com o segundo melhor resultado produtivo o genótipo SEL ( $4,617 \pm 1,564$ ) e o genótipo HOM com o pior resultado de IC ( $4,979 \pm 2,075$ ). O IC e o GMD de um modo geral, estão interligados, um depende do outro, então um animal ao ter um maior GMD vai ter um menor IC.

Os dados obtidos para os parâmetros de eficiência produtiva estão em concordância e fazem sentido ao compará-los, apesar da análise só ter sido significativa para o GMD e não para o IC. Isto pode dever-se à amostragem ser muito pequena e nem todos os animais apresentarem o mesmo número de dados tanto para os parâmetros como para o genótipo.

Comprovou-se que só o parâmetro GMD é estatisticamente significativo para a análise, o que é concordante com o teste de Shapiro-Wilk. O IC, apesar de não ter demonstrado uma distribuição normal neste estudo, é reportada na literatura como uma distribuição normal

(Islam et al., 2020; Yi et al., 2018). Isto pode dever-se ao facto de haver animais na base de dados que foram registados com um IC de 0, provocando valores atípicos na distribuição e que deveriam ser excluídos em estudos futuros.

Quanto à análise do modelo linear misto, tendo como efeito randomizado o nº SNIRB dos animais de estudo, esta também não foi significativa nem para o GMD, nem para o IC. A inclusão do efeito aleatório da identificação individual permite, caso se encontre significância, obter um modelo que para qualquer animal amostrado aleatoriamente o resultado possa ser replicado. O facto de que não se ter encontrado significância utilizando um modelo linear misto, sugere que serão precisos mais registos para obter conclusões mais robustas e um melhor modelo de previsão.

Quando se avaliou diferenças significativas entre os genótipos em relação ao GMD, comprovou-se que o genótipo HOM mostrou um GMD estatisticamente inferior em comparação com os HET e SEL, destacando-se como o genótipo com menor mérito. Este resultado tem implicações importantes, principalmente a nível de produção, pois não será aconselhável usar animais homozigóticos para produção de carne, pelo menos sem serem cruzados com raças não portadoras da mutação. No caso da raça Belgian-Blue, num estudo de Konovalova et al. (2021), remetem para a opinião que esta raça pode ser utilizada com a finalidade de melhoria produtiva, mas com atenção ao genótipo homozigótico, devido ao alto risco de problemas reprodutivos, principalmente distócia. Porém, Bellinge et al. (2005) concluíram que o ganho médio diário é superior em animais HET, mas o rendimento da carcaça é superior para HOM. Casas et al. (2004), também evidenciaram a superioridade do genótipo HET, ao cruzar touros da raça Charolesa e Belgian Blue com fêmeas de raças britânicas, assim como (Vinet et al., 2021) ao cruzar touros homozigóticos da raça Blonde d'Aquitaine com fêmeas da raça Holstein-Frísia. Num estudo de (Csürhész et al., 2023) com a raça Charolesa, também verificaram um maior peso em bezerros hetererozigóticos ao desmame.

Quanto aos resultados da eficiência produtiva e tendo em conta os trabalhos publicados ao longo dos anos, é de notar resultados divergentes. Isto pode dever-se a outros fatores para além dos genótipos que possam estar a influenciar os resultados, como, outros genes para além da miostatina (epistasia), fatores ambientais, raças em questão de cada estudo e níveis de exuberância do fenótipo.

Da análise dos resultados para os parâmetros reprodutivos, conclui-se que para todos os parâmetros (PE, MI e FA), foi o genótipo HET que apresentou os melhores resultados do estudo (PE -  $33,56 \pm 2,2$  cm; MI -  $75 \pm 7,42\%$ ; FA -  $15 \pm 17,18\%$ ) e o genótipo HOM com os piores resultados (PE -  $30,78 \pm 2,5$  cm; MI -  $57,14 \pm 25,47\%$ ; FA -  $35,95 \pm 25,48\%$ ). O genótipo SEL apresentou resultados intermédios (PE -  $34,68 \pm 1,95$  cm; MI -  $69,79 \pm 15,64\%$ ; FA -  $18,8 \pm 18,22\%$ ), exceto para o PE, onde foi evidenciado o melhor resultado.

Analisando o valor de significância da análise de variância do modelo linear, conclui-se que para o PE, MI e FA, o tipo de genótipo para a miostatina tem efeito no mérito para o fenótipo ( $p < 0,05$ ).

A leitura dos resultados do teste de Shapiro-Wilk, sugeriu que nenhum dos parâmetros analisados (PE, MI e FA) apresenta uma distribuição normal. Segundo estudos anteriores, estes fenótipos seguem uma distribuição normal, desta forma as análises subsequentes foram realizadas assumindo a distribuição normal destes fenótipos. No entanto, este resultado revela que é importante a continuação de recolha de dados relativos a estes fenótipos nesta raça para que futuras análises possam ser mais robustas (Klinc & Rath, 2007; Menegassi et al., 2019; Menon et al., 2011).

Quanto à análise do modelo linear misto, tendo como efeito randomizado o nº SNIRB dos animais de estudo, não foi significativo para a MI e FA ( $p > 0,05$ ). No entanto, foi significativa para o PE ( $p < 0,05$ ). Este resultado sugere que quanto ao perímetro escrotal, os dados que atualmente já estão disponíveis poderão permitir efetuar previsões de mérito para este fenótipo consoante o genótipo do animal.

Quando se avaliou diferenças significativas entre os genótipos em relação ao PE e às FA observou-se que o genótipo HOM mostrou valores estatisticamente inferiores em relação ao PE e superiores em relação às FA, em comparação com os genótipos HET e SEL, destacando-se como o genótipo com menor mérito. Este resultado sugere que o genótipo HOM apresentou mérito inferior para PE e FA, tendo um impacto direto negativo com a reprodução masculina. Quanto à MI, somente foi apresentado diferenças estatisticamente significativas entre o genótipo heterozigótico e o homozigótico, isto indica que existem variações genéticas e biológicas específicas nestes dois genótipos que afetam a motilidade individual dos spz. Ou seja, os resultados sugerem que a ocorrência da mutação em heterozigotia para esta raça, é a mais benéfica para o MI, pois não se observaram diferenças significativas no genótipo SEL e HOM.

Arthur (1995) relatou que animais com o fenótipo associado à presença desta mutação têm vários problemas reprodutivos (machos e fêmeas), e que o PE está diretamente relacionado com uma baixa fertilidade e comportamento sexual deficiente, principalmente em machos jovens homozigóticos. Os fatores que afetam a reprodução destes animais também se devem ao atraso na puberdade em animais homozigóticos (Bellinge et al., 2005) e infantilismo genital verificado nos machos. Num estudo em búfalos, observou-se uma menor produção de sémen sem afetar a quantidade de spz (Páez & Tovar, 2014).

Foi verificado no estudo de Trufero (2014) que, para vacas da raça Asturiana de Los Valles, também se observou valores reprodutivos inferiores no genótipo HOM. O peso e genótipo do vitelo ao nascimento influenciaram os resultados reprodutivos da mãe, sendo notável que um maior peso ao nascimento correspondeu a um aumento da dificuldade no parto (Trufero, 2014).

É comprovado pela bibliografia existente, que animais homozigóticos para esta mutação, apresentam um pior desempenho reprodutivo, e melhores resultados nos animais heterozigóticos. No entanto, com este estudo nesta raça, foram obtidos valores em concordância com o estudo de Urquiza (2017) em relação ao perímetro escrotal, onde se verificou que animais da raça Senepol heterozigóticos apresentaram valores de PE mais baixos a comparar com animais selvagens, uma vez que animais com genótipo SEL apresentaram 1 cm a mais de PE.

Quanto à análise dos tipos de defeitos de formas anormais, conclui-se que nem todos os genótipos apresentam o mesmo número e tipo de defeitos. No entanto, houve três tipos de defeitos que se destacaram: defeitos de cauda (considerada um defeito menor; defeito ao nível da gota citoplasmática proximal (considerada um defeito maior) e defeitos de cabeça (considerada um defeito maior, pois não foi especificado nos exames andrológicos feitos, o defeito de cabeça específico). Os defeitos de cabeça, cauda e peça intermédia são dos defeitos mais comuns em bovinos, porém é de realçar, segundo a bibliografia, que a raça e idade não afetam a prevalência neste tipo de defeitos (Menon et al., 2011), tal como não afetou neste estudo enquanto genótipo da raça.

Ao avaliar os resultados da leitura do teste Qui-Quadrado, observou-se que somente a ocorrência de gota citoplasmática proximal e de cabeças periformes foram significativas pelo genótipo, ou seja, pela mutação da miostatina ( $p < 0,05$ ). O defeito ao nível da gota citoplasmática proximal, está presente em todos os genótipos com uma grande incidência,

principalmente no genótipo HOM, e menor incidência no genótipo SEL. A ocorrência do defeito de cabeças periformes, só foi observado no genótipo HOM. Estes defeitos são considerados defeitos maiores que ocorrem com frequência, já mencionado anteriormente, que apresentam prejuízos para a fertilidade de machos reprodutores (Chenoweth, 2005). Estes dois tipos de defeitos significativos para o genótipo, mostraram uma maior incidência no genótipo HOM, que mostra novamente que este genótipo é o de menor mérito. Embora o número de registos para estes fenótipos seja ainda baixo, os resultados sugerem que é necessária especial atenção aos animais homozigóticos para a mutação, especialmente se estes forem usados como touros para inseminação artificial.

O facto de o genótipo selvagem ter mostrado um melhor mérito ao nível destes dois defeitos, assim como ter apresentado um melhor mérito quanto ao perímetro escrotal, sugere uma correlação entre estes dois fenótipos. Num estudo de associação genómica para atributos de sémen em bovinos, foi reportado na raça Angus, que um maior perímetro escrotal está fortemente relacionado com a motilidade espermática, ao diminuir o número de anormalidades primárias (Butler et al., 2022).

Sweett et al. (2020), foi o primeiro estudo que utilizou um estudo de associação genómica) para analisar medidas em relação à função testicular, perímetro escrotal e motilidade espermática em animais de carne Canadianos. Este estudo relatou que existem genes identificados com marcadores que têm implicações na fertilidade e reprodução masculina, e também feminina, podendo ser usados como potenciais biomarcadores em machos reprodutores.

Ainda dentro dos parâmetros reprodutivos, foi avaliado e estatisticamente testado, o efeito da mutação na cor do sémen. Foi observado que cor branca é a cor com maior incidência para todos os genótipos do estudo. Nos genótipos HET e SEL observou-se que o número de ocorrências foi o mesmo (n=18) enquanto que nos animais HOM observou-se um menor número de ocorrências (n=10). Como referida na bibliografia anteriormente, a cor branca/marfim é a coloração normal do sémen (Ribeiro, 2018) o que mostra que todos os genótipos cumprem os requisitos.

Porém, houve dados que remeteram para cores não consideradas normais do sémen (por ex, citrina e translúcido), que resulta de uma baixa concentração de sémen. Em colheitas por eletroejaculação, este resultado não tem significado clínico.

A viscosidade do sémen também foi testada em todos os genótipos, com um maior número de ocorrências registradas no genótipo SEL. Foram observados três tipos de viscosidade de sémen nesta raça (Aquosa, Leitosa e Ralo).

A viscosidade que mais se pronunciou em todos os genótipos foi a aquosa, com um maior número de ocorrências no genótipo SEL (n=20) e menor número de ocorrências no genótipo HOM (n=15). No entanto, segundo a bibliografia existente, a viscosidade/consistência normal do sémen é leitosa (Bravo, 2020; Ribeiro, 2018). Verificou-se o mesmo número de ocorrências deste tipo de viscosidade, nos genótipos HOM e SEL (n=2) e somente uma no genótipo HET. É possível que seja um efeito do acaso, dado o número reduzido de observações, sendo por isso necessário, dados de mais animais para se poder obter uma melhor conclusão.

É crucial considerar que não existem dados de referência de parâmetros dos exames andrológicos para a raça Preta, então o considerado “normal” foi baseado em outras raças bovinas testadas e na bibliografia citada.

Por fim, foi realizado o teste Qui-Quadrado para estes dois parâmetros avaliados na colheita de sémen de um exame andrológico (cor e viscosidade), onde se concluiu que nenhum dos parâmetros foi estatisticamente significativo na qualidade dos genótipos ( $p > 0,05$ ). O genótipo da raça pode realmente não ter significância nestas duas características nem uma importância prática, como pode não haver evidência suficiente nos dados para concluir que existe uma associação significativa. Para uma maior precisão, vai ser preciso futuramente uma colheita de amostras maior, para uma conclusão ainda mais fundamentada.

## 6. Conclusão

O presente estudo teve como objetivo avaliar o efeito da mutação nt821 em caracteres produtivos e reprodutivos na raça Preta. Como índices produtivos, foram avaliados o ganho médio diário e o índice de conversão de animais testados em estação. Como índices reprodutivos, avaliados nos exames andrológicos realizados em animais testados em estação, foram avaliados o perímetro escrotal e avaliadores da qualidade do sêmen, como a motilidade individual, percentagem de formas anormais e seu defeitos, cor e viscosidade.

Há muitos anos que é relatado em estudos, principalmente realizados na mutação nt821 com animais da raça Belgian Blue, a dualidade entre produzir animais com a condição DM devido a estarem associados várias desvantagens em relação à eficiência reprodutiva, como a fertilidade reduzida, distócia, dificuldades no parto, atrasos na puberdade e menor quantidade de produção de leite, entre outros. Existem também vantagens, ao nível de qualidade de carcaça e produção de carne, principalmente. Estes animais apresentam uma maior quantidade de músculo com uma menor quantidade de gordura, maior teor de proteína e maior rendimento de carne magra (cli, 2022). Também existem vantagens no que toca à eficiência produtiva, como um maior GMD e menor IC, que foi demonstrado neste estudo para animais heterozigóticos da raça Preta também portadora desta mutação, e num estudo realizado por Vicente et al. (2021).

Concluiu-se que foi o genótipo heterozigótico para esta raça que apresentou os melhores índices produtivos, destacando-se os parâmetros deste estudo, GMD e IC. Deste modo, os animais de produção devem ser animais heterozigóticos terminais, pois são os que apresentam uma melhor conformação sem comprometer as características reprodutivas.

Quanto ao estudo da eficiência reprodutiva, para os parâmetros PE, MI e FA, conclui-se que animais heterozigóticos portadores da mutação, apresentaram os melhores resultados, em relação à MI dos spz e à percentagem de FA. No entanto, quanto ao PE, o genótipo SEL apresentou o melhor resultado, com a diferença de  $\pm 1$  cm. Mesmo assim, mantém-se a conclusão que o genótipo heterozigótico deve ser o genótipo selecionado pelos criadores, pois a sua heterozigotia equilibra a eficiência produtiva e reprodutiva dos animais desta raça. Seria interessante avaliar em estudos futuros o porquê do PE ter sido significativo ao realizar o modelo linear misto, com o efeito randomizado N° SNIRB, pois este resultado demonstra que cada individuo apresenta características individuais que afetam esta característica.

Em relação aos tipos de formas anormais, apenas a gota citoplasmática proximal e as cabeças periformes é que se revelaram estatisticamente significativas para os genótipos. O facto de o genótipo SEL apresentar um menor número de incidências nestes dois tipos de defeitos, assim como apresentar um maior perímetro escrotal, vai em concordância com o estudo de (Butler et al., 2022), concluindo que, que este genótipo tem um melhor mérito para este parâmetro. Assim como, o genótipo HOM ter apresentado o maior número de incidências nestes defeitos, remete para a conclusão que este genótipo apresenta um pior mérito reprodutivo, apesar de as gotas citoplasmáticas proximais estarem associadas a processos que ocorrem no epidídimo, e poderem estar relacionados com a idade e frequência da ejaculação. Será de interesse futuro conseguir chegar a uma conclusão de o porquê de serem estes dois defeitos específicos, tal como os defeitos de cauda serem o defeito com maior número de ocorrências nos genótipos desta raça.

Quanto à cor apresentada no sémen, os resultados vão de encontro ao esperado, apresentando na sua grande maioria a cor branca para todos os genótipos, porém não se chegou a uma conclusão de qual o melhor genótipo entre o heterozigótico e o selvagem, pois a análise também não se mostrou significativa e as cores apresentadas no sémen das análises não têm significado clínico nos animais considerados.

Em relação aos resultados da viscosidade do sémen, não se obtiveram resultados claros para chegar a uma conclusão sobre qual o melhor genótipo para seleccionar futuramente, isto porque a amostragem ainda é muito pequena e nem todos os testes foram estatisticamente significativos. O facto de a viscosidade com um maior número de ocorrências ter sido a aquosa e não a leitosa, deve-se ao efeito do método de colheita, que não apresenta significado clínico nos animais avaliados.

No entanto, é unanime concluir que para todos os parâmetros avaliados, o genótipo homozigótico foi o de menor mérito, apresentando sempre os piores resultados, tanto em termos de eficiência produtiva como de reprodução.

O número de machos reprodutores por ano está próximo dos 100, pois tem havido uma clara diminuição desde o início do séc. XXI, depois de um aumento no final do séc. XX, relacionado com a decisão dos criadores em manter parte do efetivo em cruzamento com raças exóticas, com o objetivo de se obter um produto mais valorizado ao desmame (Carolino et al., 2017). Cada vez tem sido menor o número de nascimentos de animais puros por ano, pois os produtores estão a apostar em animais cruzados e heterozigóticos nas suas

explorações, devido a já ter sido comprovado em estudos, incluindo neste estudo, que animais heterozigóticos apresentam melhores resultados de produção sem afetar a eficiência reprodutiva.

Realizar este estudo pioneiro sobre parâmetros produtivos e reprodutivos na raça Preta foi gratificante e entusiasmante, pois não existiam expectativas de qualquer tipo de resultado por não haver estudos para comparação, ao falar dos parâmetros reprodutivos. A disponibilidade de informação acerca da raça Preta, e particularmente da sua genética, é ainda bastante limitada. Este estudo, ao contribuir para o acréscimo dessa informação, pode representar um passo importante no sentido de estimular investigações futuras que possam fornecer resultados que justifiquem novas práticas adotadas pelos criados e pela Associação.

No entanto, encontrar bibliografia sobre o impacto da mutação nt821 em caracteres reprodutivos de exames andrológicos não foi fácil, pois é muito escassa. Mesmo os estudos genéticos sobre a fertilidade dos touros eram poucos e baseados num número pequeno de animais, tal como este.

No processo de agrupamento de dados fornecidos pela ACBRP, verificou-se que nem todos os animais do teste apresentavam todos os dados requeridos para o estudo. Como sugestão, seria importante a criação de uma lista de requisitos que são avaliados nos exames andrológicos, onde estariam listados todos os parâmetros e dados registos de cada animal, de modo à informação ser mais concisa e ser registada, posteriormente, numa base de dados.

É de total interesse ampliar este conhecimento com a continuação deste tipo de registo de dados, pois foi uma das maiores limitações deste estudo, com vista a uma caracterização mais precisa destes resultados e que, assim, possam ser usados com maior precisão na escolha de futuros reprodutores desta raça. A informação obtida do desempenho dos machos no centro de colheita de sémen, deve ser corroborada com avaliações posteriores, compatíveis com a utilização como reprodutores, de maneira a alcançar conclusões certas sobre a relação entre os genótipos da raça Preta e os parâmetros avaliados.

## 7. Referências Bibliográficas

- ACBRP. (2023a). *A Associação*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=108>
- ACBRP. (2023b). *Características Produtivas e Reprodutivas*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=100>
- ACBRP. (2023c). *Caracterização da Raça*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=98>
- ACBRP. (2023d). *Distribuição Geográfica dos Criadores*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=101>
- ACBRP. (2023e). *Efetivo Atual*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=105>
- ACBRP. (2023f). *Galeria Fotográfica*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=102>
- ACBRP. (2023g). *Livro Genealógico*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=103>
- ACBRP. (2023h). *Plano de Melhoramento*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=106>
- ACBRP. (2023i). *Sistema de Exploração*. <https://www.racapreta.com.pt/conteudo.php?idm=99>
- Aiello, D., Patel, K., & Lasagna, E. (2018). The myostatin gene: an overview of mechanisms of action and its relevance to livestock animals. *Animal Genetics*, 49(6), 505–519.
- Arnold, H., Della-Fera, M. A., & Baile, C. A. (2001). Review of myostatin history, physiology and applications. *International Journal of Research Studies in Biosciences*, 1, 1014–1022.
- Arthur, P. F. (1995). Double muscling in cattle: a review. *Australian Journal of Agricultural Research*, 46(8), 1493–1515.
- Bellinge, R. H. S., Liberles, D. A., Iaschi, S. P. A., O'brien, P. A., & Tay, G. K. (2005). Myostatin and its implications on animal breeding: a review. *Animal Genetics*, 36(1), 1–6.

- Bettencourt, E., & Romão, R. (2009). Exame do touro reprodutor. *Notícias Limousine*, 8, 43–45.
- Blom, E. (1973). The ultrastructure of some characteristic sperm defects and a proposal for a new classification of the bull spermogram. *Nordisk Veterinaermedicin*, 25(7), 383–391.
- Bouyer, C., Forestier, L., Renand, G., & Oulmouden, A. (2014). Deep Intronic Mutation and Pseudo Exon Activation as a Novel Muscular Hypertrophy Modifier in Cattle. *Plos One*, 9(5), 1–8.
- Bravo, F. (2020). *Exame Andrológico em Bovinos*. Relatório de Estágio Curricular, Instituto Politécnico de Portalegre, Escola Superior Agrária de Elvas, 48 pp.
- Butler, M. L., Hartman, A. R., Bormann, J. M., Weaber, R. L., Grieger, D. M., & Rolf, M. M. (2022). Genome-wide association study of beef bull semen attributes. *BMC Genomics*, 23(1), 1–12.
- Cappucio, I., Marchitelli, C., Serracchioli, A., Nardone, A., Filippini, F., Ajmone-Marsan, P., & Valentini, A. (1998). A GT transversion introduces a stop codon at the mh locus in hypertrophic Marchigiana beef subjects. *Animal Genetics*, 29(1), 51.
- Carolino, N. (2006). Estratégias de Seleção na raça bovina Alentejana. Tese de Doutoramento, Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, 408 pp.
- Carolino, N., Santos-Silva, F., Carolino, I., Ferreira, F., & Silveira, M. (2017). *Raça bovina Preta- Caracterização genética por análise demográfica - 2017*. Unidade Estratégica de Investigação e Serviços de Biotecnologia e Recursos Genéticos, Polo de Investigação da Fonte Boa, Instituto Nacional de Invesigação Agrária e Veterinária, I.P, 34 pp.
- Casas, E., Bennett, G. L., Smith, T. P. L., & Cundiff, L. V. (2004). Association of myostatin on early calf mortality, growth, and carcass composition traits in crossbred cattle. *Journal of Animal Science*, 82, 2913–2918.
- Chenoweth, P. J. (2005). Genetic sperm defects. *Theriogenology*, 64(3), 457–468.
- Coimbra, M. (2021). *Estudo do ganho de peso médio diário em vitelos das raças Charolesa e Limousine numa exploração de bovinos de carne*. Dissertação de Mestrado,

Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária, Lisboa, 65 pp.

- Csürhész, T., Szabó, F., Holló, G., Mikó, E., Török, M., & Bene, S. (2023). Relationship between Some Myostatin Variants and Meat Production Related Calving, Weaning and Muscularity Traits in Charolais Cattle. *Animals*, *13*(1895), 1–12.
- Deng, B., Zhang, F., Wen, J., Ye, S., Wang, L., Yang, Y., Gong, P., & Jiang, S. (2017). The function of myostatin in the regulation of fat mass in mammals. *Nutrition & Metabolism*, *14*(1), 1–6.
- DGAV. (1955). *Galeria Bovina Preta*. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/03/95699-1955.jpg>
- DGAV. (2021). *Raça Preta - Informação sobre a raça*. 1–2. [https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/04/Preta\\_GRGA.pdf](https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/04/Preta_GRGA.pdf)
- DGAV. (2023). *Galeria Bovina Preta*. <https://www.dgav.pt/wp-content/uploads/2021/03/DSC04646-scaled.jpg>
- Dunner, S., Miranda, M. E., Amigues, Y., Cañón, J., Georges, M., Hanset, R., Williams, J., & Ménissier, F. (2003). Haplotype diversity of the myostatin gene among beef cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, *35*(1), 103–118.
- Enciso, M., Cisale, H., Johnston, S. D., Sarasa, J., Fernández, J. L., & Gosálvez, J. (2011). Major morphological sperm abnormalities in the bull are related to sperm DNA damage. *Theriogenology*, *76*(1), 23–32.
- Esteves, P. (2015). *Influência do Maneio e dos Efeitos Ambientais na Eficiência Reprodutiva de Bovinos da raça Preta*. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, Escola Universitária Vasco da Gama, 19 pp.
- Fahrenkrug, S. C., Casas, E., Keele, J. W., & Smith, T. P. L. (1999). Direct genotyping of the double-muscling locus (mh) in Piedmontese and Belgian Blue cattle by fluorescent PCR. *Journal of Animal Science*, *77*(8), 2028–2030.
- Feliciano, M. C., Bettencourt, E., Amaral, A., Ferreira, F., & Gama, L. T. (2020). *Growth and reproduction traits in Portuguese Preta cattle carrying the nt821 myostatin-gene mutation*. In: 71º encontro anual da EAAP, Virtual, 1-4 Dezembro, p.25.

- Ferreira, M. F. (2006). *Polimorfismos do gene da miostatina na raça bovina preta*. Relatório do Trabalho de Fim de Curso em Engenharia Agronómica, Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, 72 pp.
- Fiems, L. O. (2012). Double Muscling in Cattle: Genes, Husbandry, Carcasses and Meat. *Animals*, 2, 472–506.
- Fonseca, V. O., Franco, C. S., Bergmann, J. A., Chow, L. A., & Assumpção, T. I. (1997). Potencial reprodutivo de touros da raça Nelore (*Bos taurus indicus*) acasalados com elevado número de vacas. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 49(1), 53–62.
- Gadanhó, A. (2014). *Mutações no gene da miostatina na raça Limousine*. Dissertação de Mestrado em Engenharia Zootécnica/Produção Animal, Universidade de Lisboa. Faculdade de Medicina Veterinária, Instituto Superior de Agronomia, 91 pp.
- Grobet, L., Royo Martin, L. J., Poncelet, D., Pirottin, D., Brouwers, B., Riquet, J., Schoeberlein, A., Dunner, S., Ménéssier, F., & Massabanda, J. (1997). A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nature Genetics*, 17(1), 71–74.
- Hawke, T. J., & Garry, D. J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *Journal of Applied Physiology*, 91(2), 534–551.
- Islam, M. S., Jensen, J., Løvendahl, P., Karlskov-Mortensen, P., & Shirali, M. (2020). Bayesian estimation of genetic variance and response to selection on linear or ratio traits of feed efficiency in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 103(10), 9150–9166.
- Kambadur, R., Sharma, M., Smith, T. P. L., & Bass, J. J. (1997). Mutations in myostatin (GDF8) in double-muscling Belgian Blue and Piedmontese cattle. *Genome Research*, 7(9), 910–915.
- Karim, L., Coppieters, W., Grobet, L., Georges, M., & Valentini, A. (2000). Convenient genotyping of six myostatin mutations causing double-muscling in cattle using a multiplex oligonucleotide ligation assay. *Animal Genetics*, 31(6), 396–399.
- Klinc, P., & Rath, D. (2007). Reduction of oxidative stress in bovine spermatozoa during flow cytometric sorting. *Reproduction in Domestic Animals*, 42(1), 63–67.

- Konovalova, E., Romanenkova, O., Zimina, A., Volkova, V., & Sermyagin, A. (2021). Genetic Variations and Haplotypic Diversity in the Myostatin Gene of Different Cattle Breeds in Russia. *Animals*, *11*(10), 1–13.
- Madula, R. A. (2022). *The impact of myostatin variants in the South African Bonsmara and Drakensberger beef cattle breeds*. Magister Scientiae Agriculturae Animal Science: Animal Breeding and Genetics, Faculty of Natural and Agricultural Sciences, University of Pretoria, Department of Animal Science, 96 pp.
- Marchitelli, C., Savarese, M. C., Crisà, A., Nardone, A., Marsan, P. A., & Valentini, A. (2003). Double muscling in Marchigiana beef breed is caused by a stop codon in the third exon of myostatin gene. *Mammalian Genome*, *14*, 392–395.
- Mariano, R. S. G., Tonetto, H. C., Frari, M. G., Saes, L. M., Tozzetti, D. S., Teixeira, P. P. M., & Vicente, W. R. R. (2015). Exame andrológico em bovinos–revisão de literatura. *Nucleus Animalium*, *7*(1), 4.
- McPherron, A. C., & Lee, S.-J. (1997). Double muscling in cattle due to mutations in the myostatin gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *94*(23), 12457–12461.
- Menegassi, S. R. O., Pereira, G. R., McManus, C., Roso, V. M., Bremm, C., Koetz Jr, C., Lopes, J. F., & Barcellos, J. O. J. (2019). Evaluation and prediction of scrotal circumference in beef bulls. *Theriogenology*, *140*, 25–32.
- Menon, A. G., Barkema, H. W., Wilde, R., Kastelic, J. P., & Thundathil, J. C. (2011). Associations between sperm abnormalities, breed, age, and scrotal circumference in beef bulls. *Canadian Journal of Veterinary Research*, *75*(4), 241–247.
- O’Sullivan, J. N. (2023). Demographic Delusions: World Population Growth Is Exceeding Most Projections and Jeopardising Scenarios for Sustainable Futures. *World*, *4*(3), 545–568.
- Páez, M., & Tovar, N. (2014). *Secuenciación y análisis del gen de la miostatina GDF 8 en búfalos de la raza murreh y sus cruces para determinar la existencia de posibles mutaciones que se expresen en doble musculatura en el departamento de Antioquia*. Trabajo de Grado, Universidad de La Salle, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 49 pp.

- Ribeiro, B. (2018). *Exames Andrológicos em Bovinos*. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Faculdade de Medicina Veterinária, 89 pp.
- Robalo Silva, J., & Lopes da Costa, L. (2010). Avaliação da função reprodutiva do touro para sistemas de produção em extensivo: Componentes da avaliação, protocolos e guia de interpretação. *Revista Portuguesa de Buiatria*, 14(15), 28–41.
- Romão, R., Cargaleiro, K., Martelo, R., Peralta, D., Carolino, N., & Bettencourt, E. M. V. (2012). *Resultados de exames andrológicos em touros de aptidão creatopoiética no sul de Portugal*. In: VII Congresso Ibérico sobre Recursos Genéticos Animais. Évora-Portugal, 13-15 de setembro, p. 29.
- Sellick, G. S., Pitchford, W. S., Morris, C. A., Cullen, N. G., Crawford, A. M., Raadsma, H. W., & Bottema, C. D. K. (2007). Effect of myostatin F94L on carcass yield in cattle. *Animal Genetics*, 38(5), 440–446.
- Silva, A., Dode, M., & Unanian, M. (1993). *Capacidade reprodutiva do touro de corte: funções, anormalidades e fatores que a influenciam: Vol. Documentos, 51*. EMPRAPA-CNPGC.
- Simões, J. (2008). Exame Andrológico de Bovinos. In *DGV.DSPA*. [http://www.bovinoalentejano.com.pt/vetal2008/Exame\\_Andrologico\\_em\\_Bovinos.pdf](http://www.bovinoalentejano.com.pt/vetal2008/Exame_Andrologico_em_Bovinos.pdf)
- Siqueira, J., Guimarães, J., & Pinho, R. (2013). Relação entre perímetro escrotal e características produtivas e reprodutivas em bovinos de corte: uma revisão. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*, 37(1), 3–13.
- Sweatt, H., Fonseca, P. A. S., Suárez-Vega, A., Livernois, A., Miglior, F., & Cánovas, A. (2020). Genome-wide association study to identify genomic regions and positional candidate genes associated with male fertility in beef cattle. *Scientific Reports*, 10(20102), 1–14.
- Teixeira, C., & Oliveira, D. (2007). Frequência do gene Miostatina (GDF-8) em rebanhos brasileiros da raça Marchigiana. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 59, 805–809.
- Teixeira, C., Oliveira, D., & Quirino, C. (2006). Musculatura dupla: II-Determinação genética. *Archivos Latinoamericanos de Producción Animal*, 14, 17–23.

- Trufero, A. (2014). *Efecto del manejo sobre parámetros reproductivos en vacas de las razas Asturiana de los Valles y Asturiana de la Montaña*. Máster en Biología y Tecnología de la Reproducción, Universidad de Oviedo, 28 pp.
- Urquiza, A. (2017). *Avaliação e aplicação de métodos de genotipagem para estudo da síndrome da musculatura dupla em bovinos da raça Senepol*. Dissertação, Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Unidade Universitária de Aquidauana, 69 pp.
- Vicente, A., Sebastião, A., & Ferreira, F. (2021). Efeito do genótipo da miostatina nas características produtivas de bovinos de raça Preta. *Revista Da UI\_IPSantarém. Edição Temática: Ciências Naturais e Do Ambiente*, 9(3), 33–48.
- Vinet, A., Bouyer, C., Forestier, L., Oulmouden, A., Blanquet, V., Picard, B., Cassar-Malek, I., Bonnet, M., Rocha, D., & Renand, G. (2021). The Blonde d'Aquitaine T3811>G3811 mutation in the myostatin gene: association with growth, carcass, and muscle phenotypes in veal calves. *Journal of Animal Science*, 99(2), 1–7.
- Waldner, C. L., Kennedy, R. I., & Palmer, C. W. (2010). A description of the findings from bull breeding soundness evaluations and their association with pregnancy outcomes in a study of western Canadian beef herds. *Theriogenology*, 74(5), 871–883.
- Yi, Z., Li, X., Luo, W., Xu, Z., Ji, C., Zhang, Y., Nie, Q., Zhang, D., & Zhang, X. (2018). Feed conversion ratio, residual feed intake and cholecystokinin type A receptor gene polymorphisms are associated with feed intake and average daily gain in a Chinese local chicken population. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 9, 1–9.