

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO  
ÚNICO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E  
REPRODUTIVAS EM BOVINOS CANCHIM**

**Marcos Eli Buzanskas  
Zootecnista**

**2013**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP  
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO  
ÚNICO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E  
REPRODUTIVAS EM BOVINOS CANCHIM**

**Marcos Eli Buzanskas**

**Orientador: Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar**

**Coorientador: Prof. Dr. Danísio Prado Munari**

**Tese apresentada à Faculdade de  
Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp,  
Câmpus de Jaboticabal, como parte das  
exigências para a obtenção do título de  
Doutor em Genética e Melhoramento  
Animal.**

**2013**

B992a Buzanskas, Marcos Eli  
Associação de polimorfismos de nucleotídeo único com características de crescimento e reprodutivas em bovinos Canchim / Marcos Eli Buzanskas. -- Jaboticabal, 2013  
vii, 111 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2013

Orientador: Maurício Mello de Alencar

Coorientador: Danísio Prado Munari

Banca examinadora: Fernando Sebastián Baldi Rey, Roberto Carvalheiro, Luciana Correia de Almeida Regitano, Nedenia Bonvino Stafuzza

Bibliografia

1. Bovinos de corte. 2. Desequilíbrio de ligação. 3. Seleção genômica. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.2:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

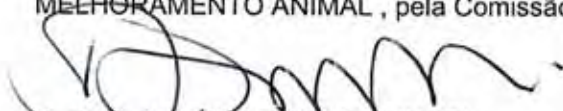
**TÍTULO:** ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E REPRODUTIVAS EM BOVINOS CANCHIM

**AUTOR:** MARCOS ELI BUZANSKAS

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. MAURICIO MELLO DE ALENCAR

**CO-ORIENTADOR:** Prof. Dr. DANÍSIO PRADO MUNARI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. DANÍSIO PRADO MUNARI

Departamento de Ciências Exatas / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



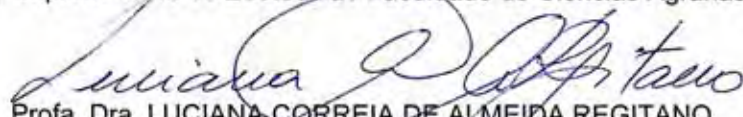
Prof. Dr. FERNANDO SEBASTIÁN BALDI REY

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. ROBERTO CARVALHEIRO

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dra. LUCIANA CORREIA DE ALMEIDA REGITANO

Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária / São Carlos/SP



Prof. Dra. NEDENIA BONVINO STAFUZZA

Pós-Doutoranda / Departamento de Biologia / Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto

Data da realização: 01 de julho de 2013.

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Marcos Eli Buzanskas** – nascido em São Paulo - SP, no dia 5 de fevereiro de 1983, formado em Zootecnia pela Universidade de Marília - SP, em fevereiro de 2007. Em junho de 2009, obteve o título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar e coorientação do Prof. Dr. Danísio Prado Munari. Em agosto de 2009, iniciou o curso de Doutorado pela mesma instituição de ensino, sob orientação do Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar e coorientação do Prof. Dr. Danísio Prado Munari. Em outubro de 2011 participou do XXI Curso Internacional de Mejora Genética pelo Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid, Espanha. Realizou estágio de Doutorado “Sandwich”, sob supervisão do Prof. Dr. Flavio Schramm Schenkel, na University of Guelph - Canadá, no período de janeiro de 2012 a novembro de 2012. Obteve o título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, campus de Jaboticabal, no dia 01 de julho de 2013.

**O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.**

**(José Saramago)**

**Dedico este trabalho aos meus queridos pais,  
Sonia Burd Buzanskas (*in memoriam*) e Isaac  
Buzanskas (*in memoriam*). Vocês fazem falta...**

## Agradecimentos

Ao meu orientador **Prof. Dr. Maurício Mello de Alencar**, pelo auxílio na obtenção dos dados utilizados na tese, por seu apoio e orientação durante o estágio de graduação, mestrado e doutorado.

Ao meu coorientador e amigo **Prof. Dr. Danísio Prado Munari**. *Muito obrigado pelos seis anos de convivência, pelos ensinamentos, pela paciência em ouvir minhas dificuldades e pela ajuda em saná-las e, principalmente, por sua confiança em meu trabalho.*

Ao **Prof. Dr. Flavio Schramm Schenkel** e sua família. *Obrigado por me receberem tão bem em Guelph. Sem o auxílio do professor Flavio este trabalho não teria a qualidade que hoje acredito que tenha.*

À **Dra. Daniela do Amaral Grossi**, amiga e companheira desde o mestrado. *Obrigado pela paciência (ou falta de paciência), por seus ensinamentos e pelo auxílio durante a condução de minhas análises, discussões sobre os trabalhos e pelas pausas para o café.*

Ao amigo **Dr. Ricardo Ventura** e família. *Obrigado pelo auxílio na condução das análises desta tese e também pela ótima convivência em Guelph.*

Ao **Dr. Mehdi Sargolzaei** da University of Ghelph, por ceder os programas computacionais utilizados nesta tese.

À **minha família**...não existem palavras que possam descrever o quanto os amo e o quanto sou grato por vocês existirem em minha vida. *Obrigado Titia Zilda, Ida, Marcia, Rubens, Ariel e Amanda.*

À minha amada **Luciana Diniz Rola**. *Desejo muitas coisas maravilhosas em sua vida e, desejo também, poder compartilhar todas elas ao seu lado por muito tempo.*

À **Embrapa-Genepplus** pela concessão dos dados utilizados na tese.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela concessão da bolsa de estudos (Processo nº: 142053/2010-4).

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)** pela concessão da bolsa de estágio “Sandwich” (Processo nº: 5285-11-9) realizada no período de janeiro a novembro de 2012 na University of Guelph, Canadá.

Ao **Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal** da Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Campus de Jaboticabal.



Aos membros da banca do **Exame Geral de Qualificação** – Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano, Profa. Dra. Claudia Cristina Paro de Paz, Prof. Dr. Fernando Sebastián Baldi Rey e Dr. Rusbel Raul Aspilcueta Borquis. *Obrigado por suas sugestões, conselhos e agradável convívio durante o doutorado.*

**Aos professores** Fernando Sebastián Baldi Rey, Roberto Carvalheiro, Luciana Correia de Almeida Regitano e Nedenia Bonvino Stafuzza, pela disponibilidade em participar da banca examinadora de doutorado.

Aos companheiros da **República Kasa Verde (RKV)** – Claudio Roselli (Krusty), Edson Santos (Mineiro), Ismael Urbinati (Taioba) e Thiago Ribeiro da Silva. *Obrigado por serem a minha família em Jaboticabal e por compartilharem tanto os bons quanto os maus momentos que fazem parte da vida.* Obrigado também à querida **Dona Tereza**, *minha mãe de Jaboticabal.*

**Aos ex-integrantes da RKV** – André Leão, André Rino, Daniel Jordan, Diego Mota, Diércles Cardoso, Estevão Urbinati, Felipe Domingues, Guilherme Venturini, Oscar Boaventura e Thiago Melo.

Aos amigos do **Departamento de Ciências Exatas** e da **Pós-Graduação da FCAV-Unesp** - Beatriz Nunes, Bruno Pires, Camila de Souza, Diego Guidolin, Diércles Cardoso, Fabiana Barichello, Flávio Arantes, Guilherme Nascimento, Guilherme Venturini, Ismael Urbinati, Jaqueline Rosa, Leonardo Seno, Marina Figueiredo, Natália Grupioni, Nicole Tramonte, Priscila Arrigucci, Rodrigo Savegnago, Sabrina Caetano, Salvador Ramos, Sarah Meirelles, Tatiane Chud e Valdecy Cruz. *Obrigado pelo companheirismo e por proporcionarem um excelente ambiente de trabalho.*

**Às minhas ex-orientadas** (desorientadas) de iniciação científica Giovana Vargas e Patrícia Seixas.

Aos professores e funcionários do **Departamento de Ciências Exatas** e do **Departamento de Zootecnia** – Prof. Dr. Antônio Sergio Ferraudo, Prof. Dr. Euclides Braga Malheiros, Prof. Dr. João Ademir de Oliveira, Prof. Dr. José Carlos Barbosa, Prof. Dr. Nelson José Peruzzi, Profa. Dra. Sandra Aidar de Queiroz, Adriana, Norival, Shirley e Zezé.

**To my friends and fraternity colleagues in Guelph** – Alex Matejic, Ananda Fontoura, Anna Neustaeter, Aline Guarini, Carla Domingues, Carla Coelho, Claudia Bertoli, Daniele Reis, Duc Lu, Honghao Li, Janaina Vasconcelos, Jonathan Andrade, Juliano Sangalli, Laila Schenkel, Luiz Brito, Mario Piccoli, Narges Zare, Rafael Sampaio, Vanessa Peripolli. *Thank you all for being part of my life and for providing me such a wonderful experience in Canada.*

**To the Urquhart family.** Thank you Glenn and Gabriela for receiving and taking care of all the Brazilians in Guelph. You guys made us feel like home.

**Aos meus queridos cachorros** Beatriz (*in memoriam*), Geovana, Igor e Pretinha.

## SUMÁRIO

	Página
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. OBJETIVO GERAL .....	3
2.1. Objetivos específicos.....	4
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	4
3.1. Raça Canchim.....	4
3.1.1. Características avaliadas .....	5
3.2. Associação genômica.....	7
3.2.1. Método "Generalized Quasi-Likelihood Score".....	8
3.2.2. Desequilíbrio de ligação .....	9
3.2.3. Fase do desequilíbrio de ligação.....	11
3.3. Controle de qualidade de genótipos.....	11
3.3.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg .....	12
3.3.2. Escore de leitura de genótipos .....	12
3.3.3. Taxa de leitura de genótipos .....	13
3.3.4. Proporção de heterozigotos .....	13
3.3.5. Alelos de menos frequência .....	14
4. REFERÊNCIAS.....	14
<b>CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E DA FASE DE LIGAÇÃO EM BOVINOS DE CORTE DE RAÇA SINTÉTICA</b> .....	<b>24</b>
RESUMO.....	24
1. INTRODUÇÃO .....	25
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
2.1. Animais genotipados .....	26
2.2. Controle de qualidade de genótipos.....	27
2.3. Análise de desequilíbrio de ligação e da fase de desequilíbrio de ligação.....	28
3. RESULTADOS .....	30
4. DISCUSSÃO .....	33
4.1. Desequilíbrio de ligação .....	33
4.2. Fase do desequilíbrio de ligação.....	35
5. CONCLUSÃO.....	36
6. REFERÊNCIAS.....	37

<b>CAPÍTULO 3 – ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM</b> .....	40
RESUMO.....	40
1. INTRODUÇÃO .....	41
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
2.1. Animais genotipados e características estudadas .....	43
2.2. Controle de qualidade de genótipos .....	44
2.3. Análise de associação .....	45
2.4. Correção para múltiplos testes .....	46
2.5. Efeito de substituição alélica ... ..	47
2.6. Identificação e função dos genes ... ..	47
3. RESULTADOS .....	48
4. DISCUSSÃO .....	55
4.1. Peso ao nascimento .....	55
4.2. Peso ao desmame .....	56
4.3. Peso ao sobreano ... ..	57
4.4. Efeito de substituição alélica ... ..	60
5. CONCLUSÃO .....	60
6. REFERÊNCIAS .....	61
<b>CAPÍTULO 4 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM</b> .....	70
RESUMO.....	70
1. INTRODUÇÃO .....	71
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	73
2.1. Animais genotipados e características estudadas .....	73
2.2. Controle de qualidade de genótipos .....	74
2.3. Análise de associação .....	75
2.4. Correção para múltiplos testes .....	76
2.5. Efeito de substituição alélica ... ..	77
2.6. Identificação e função dos genes ... ..	77
3. RESULTADOS .....	78
4. DISCUSSÃO.....	89

4.1. Perímetro escrotal ao desmame ... ..	89
4.2. Perímetro escrotal ao sobreano ... ..	91
4.3. Idade ao primeiro parto ... ..	95
4.4. Idade ao segundo parto ... ..	96
5. CONCLUSÃO.....	98
6. REFERÊNCIAS .....	98

## ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO COM CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO E REPRODUTIVAS EM BOVINOS CANCHIM

**RESUMO** – Recentes avanços tecnológicos possibilitaram a utilização de dados genômicos na avaliação de animais de produção. Os marcadores do tipo SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) estão entre os mais utilizados para estudos do genoma bovino, pois estão presentes em grande quantidade e podem estar associados a regiões do genoma que atuam em características de interesse econômico. Fatores como a redução dos custos de genotipagem e a alta densidade dos painéis de marcadores possibilitaram que esta tecnologia seja utilizada em larga escala. Os objetivos deste trabalho foram avaliar o desequilíbrio de ligação (DL) e a conservação da fase do desequilíbrio de ligação (FDL) entre animais da raça Canchim e do grupo genético MA; e aplicar a metodologia “Generalized Quase-Likelihood Score” para estudo de associações genômica entre SNPs e características de peso corporal ao nascimento (PN), ao desmame (PD) e ao sobreano (PS); perímetro escrotal ao desmame (PED) e ao sobreano (PES); e idade ao primeiro (IPP) e segundo (ISP) parto nestes mesmos animais. Foram utilizados 285 animais da raça Canchim (proporção Charolês-Zebu igual a 62,5 % e 37,5%) e 114 animais do grupo genético MA (proporção aproximada Charolês-Zebu igual a 65,6% e 34,4%) genotipados para o painel de alta densidade BovineHD - Illumina® bead chip (777k). Para o estudo de DL e FDL as informações dos genótipos de alta densidade foram concatenadas com o mapa de genótipos de menor densidade (BovineSNP50 v2 bead chip) que possui aproximadamente 50 mil SNPs (50k), realizando assim a redução da densidade dos marcadores. Foram realizadas análises para animais Canchim, MA e Canchim + MA. O painel de 777k mostrou-se mais eficiente para estudo do DL e FDL quando comparado ao painel de 50k, pois apresentou elevada conservação de FDL (acima de 0,80) entre animais Canchim e MA em ambos os painéis e  $r^2$  médio (medida de desequilíbrio de ligação) igual a 0,38, 0,34 e 0,31 nas distâncias de 0,00 a 0,0025 Mb, 0,0025 a 0,0050 Mb e 0,0050-0,0075 Mb em análise de animais Canchim + MA. Após esta etapa utilizou-se o painel de 777k para realizar análises de associação genômica por meio da metodologia “Generalized Quase-Likelihood Score” (GQLS), que considera a regressão logística para associar informações fenotípicas do indivíduo (tratado como

co-variável) com o genótipo (tratado como variável resposta). Observaram-se associações com PN nos cromossomos 4 e 9; PD nos cromossomos 4, 6 e 11; PS nos cromossomos 7, 22, 25 e 27, PED nos cromossomos 20 e 28; PES nos cromossomos 5, 9, 13, 14, 18 e 21; IPP nos cromossomos 4 e 27; e ISP nos cromossomos 10, 11 e 15. Foram observados 4, 12, 10, 12, 435, 6 e 4 SNPs associados a PN, PD, PS, PED, PES, IPP e ISP, respectivamente. Verificou-se potenciais genes candidatos para as características de crescimento PN e PD (DPP6 - *dipeptidyl-peptidase 6*) e PS (CLEC3B - *C-type lectin domain family 3 member B*). Estes genes atuam no desenvolvimento do sistema nervoso central e na mineralização óssea, respectivamente. Para as características reprodutivas foram verificados possíveis genes candidatos associados a PED (SRD5A1 - *steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1* e NSUN2 - *NOP2/Sun domain family, member 2*), PES (TRHR - *thyrotropin-releasing hormone receptor*; PEX2 - *peroxisomal biogenesis factor 2* e MED30 - *mediator complex subunit 30*) envolvidos em processos hormonais. Os demais genes observados parecem estar relacionados à manutenção celular, transporte de íons e na produção de energia. Após o estudo do DL e FDL pode-se concluir que painéis de alta densidade poderiam ser utilizados em futuros estudos com o objetivo de se aplicar a seleção genômica multirracial nesta população e isto promoveria avanços para o programa de melhoramento genético de bovinos Canchim. A metodologia GQLS foi capaz de identificar regiões cromossômicas associadas às características de crescimento e reprodutivas. As regiões identificadas neste trabalho poderão auxiliar no processo de seleção destas características, já contempladas no programa de avaliação genética da raça Canchim.

**Palavras-chave:** bovinos de corte, desequilíbrio de ligação, raça composta, seleção genômica, SNP

## GENOME WIDE ASSOCIATION STUDY OF GROWTH AND REPRODUCTION TRAITS IN CANCHIM BEEF CATTLE

**ABSTRACT** – Recent technological advances have enabled to use genomic data in livestock evaluation. Single nucleotide polymorphism (SNP) are one of the most widely used genetic markers because they are widely spread along the genome and also could be associated with traits of economic interest. High-throughput panels are becoming interesting for the producers as the cost of genotyping reduces. The objectives of this study were to evaluate the extent of linkage disequilibrium (LD) and the phase of linkage disequilibrium (PLD) between Canchim animals and MA genetic group; and to apply the "Generalized Quasi-Likelihood Score" method to perform a genome wide association study with birth weight (BW), weaning weight (WW), yearling weight (YW), scrotal circumference at weaning (SCW), scrotal circumference at yearling (SCY), age at first calving (AFC), and age at second calving (ASC). Analyses considered 285 Canchim animals (Charolais-Zebu proportion of 62.5% - 37.5%) and 114 animals of the MA genetic group (Charolais-Zebu proportion of 65.6% - 34.4%) genotyped with the BovineHD - Illumina Bead® chip (777k). Two marker densities were used for the LD and PLD analyses; one considered the 777k panel while the other considered a reduced panel which was resulted from a combined information of the high-throughput panel and the BovineSNP50 chip bead v2 map from Illumina®. These analyses were carried out for Canchim, MA, and Canchim + MA animals. PLD conservation was high in both panels, but only the 777k panel had higher mean  $r^2$  (LD measure) equal to 0.38, 0.34, and 0.31 at distances from 0.00 to 0.0025 Mb, 0.0025 to 0.0050 Mb, and 0.0050 to 0.0075 Mb in the Canchim + MA analysis. After this step, genome wide associations were carried out using the Generalized Quasi-Likelihood Score method (GQLS), which considers the logistic regression to associate phenotypic information (treated as a covariate) with the genotype (treated as the response variable). Associations were observed for BW in chromosomes 4 and 9; WW in chromosomes 4, 6, and 11; YW in chromosomes 7, 22, 25, and 27; SCW in chromosomes 20 and 28; SCY in chromosomes 5, 9, 13, 14, 18, and 21; AFC in chromosomes 4 and 27; and ASC in chromosomes 10, 11, and 15. A total of 4, 12, 10, 12, 435, 6, and 4 SNPs were associated with BW, WW, YW, SCW, SCY, AFC, and ASC, respectively. There were observed potential candidate genes for BW and WW (DPP6 - *dipeptidyl-peptidase 6*) and YW (CLEC3B - *C-type*

*lectin domain family member 3 B*). These genes act in the central nervous system development and bone mineralization, respectively. For reproduction traits, there was observed possible candidate genes associated with SCW (*SRD5A1 - Steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1* and *NSUN2 - NOP2/Sun domain family, member 2*) and *SCY (TRHR - thyrotropin-releasing hormone receptor, PEX2 - peroxisomal biogenesis factor 2; and MED30 - Mediator complex subunit 30)* all involved in hormonal processes. The remaining genes appear to be related to the cellular activity maintenance, ion transport and energy production. After studying the LD and PLD we concluded that high-throughput panels could be used in future studies in order to apply a multi-breed genomic selection in this population to promote advances in the breeding program of Canchim breed. The GQLS method was able to identify chromosomal regions associated with reproduction and growth traits. Our findings suggest that the identified regions could assist the selection process applied by the Canchim's genetic evaluation program.

**Keywords:** beef cattle, genomic selection, linkage disequilibrium, SNP, synthetic breed



## **CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS**

### **1. INTRODUÇÃO**

Métodos estatísticos aplicados ao melhoramento genético dos rebanhos de bovinos de corte no Brasil têm contribuído ao longo dos anos para a produtividade de empresas rurais. Além disto, melhorias no manejo nutricional e profilático dos animais auxiliaram na produção de carne de qualidade para o consumo nos mercados nacional e internacional. No entanto, tais ganhos somente foram atingidos devido aos investimentos em ciência e tecnologia.

A aplicação de ferramentas estatísticas como os modelos mistos (método estatístico que considera efeitos fixos e aleatórios para a estimação de parâmetros) e o BLUP (“Best Linear Unbiased Predictor”) por programas de melhoramento genético animal, contribuiu para o processo de seleção e para a identificação de indivíduos geneticamente superiores com base em análises que consideram dados fenotípicos e de parentesco. Desenvolvidas por Henderson (1975a, 1975b), estas metodologias utilizam o modelo infinitesimal descrito por Fisher (1919), ou seja, considera-se que existem infinitos genes de pequeno efeito que atuam na expressão de determinada característica.

Em paralelo, os estudos para detecção de locos associados a características quantitativas (Quantitative Trait Loci – QTL) foram iniciados por Sax (1923) em experimentos com feijões. Os primeiros trabalhos para detecção de QTL em bovinos foram realizados por Neiman-Sorensen e Robertson (1961) que estudaram a associação de diferentes grupos sanguíneos com características produtivas. Estes autores também foram os primeiros a aplicar métodos estatísticos para verificar o efeito dos QTL em uma população. O objetivo da detecção de QTL é o de localizar genes ou conjuntos de genes responsáveis pela variação fenotípica observada nos indivíduos de uma população. De acordo com Smith (1967), a utilização de QTL poderia tornar o processo de seleção mais intenso por selecionar animais em idades mais jovens, e conseqüentemente, reduzir o intervalo de geração. Além disto, características que apresentam baixas estimativas de herdabilidade poderiam ser exploradas de maneira mais eficiente utilizando-se tais ferramentas.

Desde então diversos trabalhos apontaram para a existência de QTL em praticamente todos os 29 pares de autossomos e nos sexuais X e Y (KNEELAND et al., 2004; MCCLURE et al., 2010; PINTOS; CORVA, 2011) associados a características de interesse econômico. Segundo o banco de dados AnimalQTLdb (HU et al., 2013), foram identificados até o momento 7091 QTL para características de produção, reprodução, leite, conformação, saúde e carcaça em bovinos de corte e leite. No entanto, a aplicação de QTL na seleção é limitada devido ao tipo de delineamento experimental utilizado que considera famílias de meio-irmãos ou irmãos completos, logo o QTL descoberto é limitado a estas famílias (GEORGES et al., 1995). Além disto, os QTL são identificados de forma imprecisa com intervalos de confiança que variam em até 50 centimorgans (cM) (GODDARD; HAYES, 2007).

Recentes avanços tecnológicos possibilitaram o sequenciamento completo do genoma bovino resultando em um genoma de aproximadamente 2,89 bilhões de pares de base com o total estimado de 22 mil genes (THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM et al., 2009). Atualmente, o banco de dados do Centro Nacional de Informação Biotecnológico (National Center for Biotechnology Information – NCBI) conta com cerca de 13 milhões de polimorfismos de nucleotídeo único (“Single Nucleotide Polymorphism” - SNP) identificados em bovídeos.

O SNP é tipo mais comum de marcador molecular utilizado em estudos genômicos atualmente devido à sua ampla distribuição ao longo do genoma. Os SNPs são bialélicos, sendo menos polimórficos do que os marcadores do tipo microssatélite e possuem a vantagem de custo-benefício quando comparados aos demais tipos de marcadores (BRUMFIELD et al., 2003). Os SNPs são alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, mutações em nucleotídeos. As mutações mais comuns são as transições, em que ocorrem trocas de uma base purina por outra purina ou de uma base pirimidina por outra pirimidina, porém, menos frequentes são as transversões que ocorrem quando há troca de uma base purina por uma pirimidina, ou vice-versa (VIGNAL et al., 2002). Também pode ser observada a inserção ou deleção de nucleotídeos na molécula de DNA.

Estudos que envolvem associações entre marcadores SNP com determinadas características são conhecidos como estudos de associação

genômica ampla (“Genome Wide Association Studies” – GWAS). Estes estudos são importantes na identificação de mutações causais, compreensão de vias metabólicas envolvidas em processos de manutenção do organismo, assim como para estudos de doenças (FOULKES, 2009). Para o melhoramento genético, o GWAS auxilia na caracterização de genes (ou SNPs) candidatos associados às características de interesse econômico por meio de análises estatísticas que consideram centenas ou milhares de polimorfismos localizados em extensas regiões do genoma. De forma geral, o objetivo destes estudos é o de verificar o efeito de significância destes SNPs para que estudos mais detalhados sejam conduzidos nestas regiões polimórficas.

Outra aplicação para o uso de polimorfismos presentes no genoma aplicado para o melhoramento genético animal foi abordada por Meuwissen; Hayes; Goddard (2001). Estes autores criaram o conceito de “seleção genômica”, em que seria possível estimar “valor genético genômico” com base em efeitos de múltiplos marcadores moleculares que expliquem parte da variação de determinada característica. A seleção genômica leva em consideração o desequilíbrio de ligação (DL) entre pares de marcadores, sendo definida com associações não-aleatórias entre alelos presentes em dois ou mais locos de um mesmo cromossomo (BOHMANOVA; SARGOLZAEI; SCHENKEL, 2010). No entanto, esta ferramenta não substitui os métodos de seleção clássicos que contemplam a colheita de dados fenotípicos e de pedigree dos animais, mas poderia auxiliar no incremento da acurácia das predições e, como consequência, na redução do intervalo de gerações.

## **2. OBJETIVO GERAL**

O objetivo geral deste trabalho foi estudar a associação genômica entre marcadores SNP e as características peso ao nascimento, ao desmame e ao sobreano, perímetro escrotal ao desmame e ao sobreano e idade ao primeiro e segundo parto em animais Canchim e do grupo genético MA para fornecer subsídios para o programa de melhoramento genético da raça Canchim.

## 2.1. Objetivos específicos

- a) Estimar o desequilíbrio de ligação e a fase gamética entre animais da raça Canchim e do grupo genético MA, por meio dos painéis com aproximadamente 50 mil e 777 mil polimorfismos de nucleotídeo único.
- b) Estudar a associação genômica entre SNPs e características de interesse econômico nesta raça sintética.
- c) Identificar regiões em que estes polimorfismos encontrados estão localizados e a respectiva função biológica dos genes presentes.

## 3. REVISÃO DE LITERATURA

### 3.1. Raça Canchim

A raça de bovinos de corte Canchim foi desenvolvida na década de 40 pelo Médico Veterinário e Zootecnista Antônio Teixeira Vianna nas dependências da Fazenda de Criação de São Carlos, atualmente Fazenda Canchim, pertencente à Empresa de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) localizada no município de São Carlos/SP. Foram utilizados, para os primeiros estudos de cruzamentos, animais da raça Charolês importados pelo Ministério da Agricultura em 1922. Estes animais foram trazidos à Fazenda de Criação de São Carlos no ano de 1936. Foram utilizados animais zebuínos como o Nelore, Gir e Indubrasil para os cruzamentos, este último foi utilizado em maior número, pois na época contava com numeroso plantel a preços razoáveis.

A justificativa em se utilizar a raça Charolês foi que estes animais de origem francesa, pertencentes à subespécie *Bos taurus taurus*, são altamente especializados para a produção de carne, além de serem sexualmente precoces. Embora tenham menor porte, as raças zebuínas, provenientes da Índia e pertencentes à subespécie *Bos taurus indicus*, possuem boa adaptabilidade às condições de criação extensiva no Brasil. Os melhores resultados dos esquemas de acasalamentos utilizados para a formação da raça Canchim resultaram em animais com proporção 5/8 Charolês e 3/8 Zebu (ALENCAR, 1988). Desde então outros esquemas de acasalamento foram introduzidos com o objetivo de gerar maior variabilidade genética desta raça. Dos quatro esquemas de acasalamento utilizados pode-se destacar o chamado UEPAE, no qual considera acasalamento entre animais Canchim e zebu,

resultando em animais F1 pertencentes ao grupo genético chamado “A”. Por sua vez, este grupo genético é acasalado com animais da raça Charolesa, gerando o grupo genético “MA” com proporção de 65,6% Charolês e 34,4% Zebu (BARBOSA, 2000).

### *3.1.1. Características avaliadas*

Medidas de peso corporal em bovinos são importantes para a avaliação do crescimento e desenvolvimento dos animais, assim como para a tomada de decisões quanto ao manejo nutricional e profilático nas propriedades rurais. Características de crescimento são normalmente incluídas nos critérios de seleção dos programas de melhoramento genético de bovinos de corte, pois estas estão diretamente relacionadas à produção de carne e apresentam estimativas de herdabilidade de moderada à alta magnitude, indicando que o processo de seleção para estas características é eficiente (FRIZZAS et al., 2009).

A medida peso ao nascimento é comumente utilizada para monitorar o peso dos bezerros. Para esta característica desejam-se animais com pesos abaixo ou próximos à média do rebanho devido sua associação genética com a ocorrência de partos distócicos, principalmente em fêmeas primíparas (MEE, 2008). A estimativa de herdabilidade direta do peso ao nascimento na raça Canchim varia de 0,26 a 0,41 (MELLO et al., 2002; CASTRO-PEREIRA; ALENCAR; BARBOSA, 2007b; ANDRADE et al., 2008), além de existirem ainda componentes de efeitos genético materno e de ambiente permanente materno de baixa magnitude (CASTRO-PEREIRA et al., 2007; BALDI; ALENCAR; ALBUQUERQUE, 2010). Avaliado entre 205 e 240 dias de idade, o peso ao desmame é um dos principais critérios para o descarte de bezerros e possui estimativa de herdabilidade que varia de 0,23 a 0,48 (MELLO et al., 2002; CASTRO-PEREIRA; ALENCAR; BARBOSA, 2007a; ANDRADE et al., 2008). O peso mensurado ao sobreano representa a habilidade do animal em ganhar peso no período pós-desmama. Estimativas de herdabilidade para peso aos 550 dias de idade iguais a 0,41 e 0,28 foram obtidas por Mascioli et al. (1996) e Castro-Pereira; Alencar e Barbosa (2007a), respectivamente.

Buzanskas et al. (2010) obtiveram estimativa de herdabilidade igual a 0,24 para o peso aos 420 dias de idade.

Características reprodutivas chamam a atenção dos produtores há algum tempo devido a sua elevada importância econômica quando comparada às características de crescimento. Além disto, estudos conduzidos por Brumatti et al. (2011), Krupa et al. (2005) e Wolfová et al. (2005) apontaram que características reprodutivas de fêmeas são mais importantes economicamente para o sistema de produção de bovinos do que características reprodutivas de machos. Assim, programas de melhoramento genético têm inserido maiores exigências nos critérios de seleção de novilhas com o objetivo de obter animais mais produtivos e precoces.

Em geral, características mensuradas em fêmeas são de difícil colheita devido ao longo período necessário para sua expressão ou a necessidade de utilização de técnicas invasivas, como por exemplo, colheita de sangue para verificação de concentrações hormonais. Em algumas situações, tais características sofrem elevadas influências dos componentes ambientais como o manejo praticado nas propriedades. Segundo Martin et al. (1992), o desempenho reprodutivo das novilhas depende da idade em que essas fêmeas parem pela primeira vez e estas, parindo precocemente, terão maior vida produtiva do que as fêmeas mais tardias. Este fato foi observado por Buzanskas et al. (2010) em estudo com animais Canchim, em que verificou-se correlação genética favorável entre a idade ao primeiro parto e a habilidade de permanência de fêmeas no rebanho aos 76 meses de idade.

Estudos realizados com animais Canchim evidenciam que as estimativas de herdabilidade para a idade ao primeiro parto possuem baixa magnitude (SILVA et al., 2000; BALDI et al., 2008; BUZANSKAS et al., 2010). Pouco superiores são as estimativas de herdabilidade da idade ao segundo parto (BORBA et al., 2011; GAVIOLLI et al., 2012), característica que indica se a fêmea manteve-se produzindo bezerros. Em machos observa-se situação oposta, pois o perímetro escrotal (característica indicadora do potencial reprodutivo) apresenta estimativas de herdabilidade de moderada a alta magnitude (BORBA et al., 2011; CASTRO-PEREIRA; ALENCAR; BARBOSA, 2007). O tamanho dos testículos está relacionado com a produção e qualidade do espermatozoide e produção de hormônios sexuais (BAKER et al., 1981;

TROCÓNIZ et al., 1991) e é facilmente medido em idades jovens (ao desmame, ao ano e ao sobreano).

As correlações genéticas entre medidas de perímetro escrotal e características reprodutivas de fêmeas são favoráveis em animais da raça Canchim. Buzanskas et al. (2010) verificaram correlação genética entre perímetro escrotal e habilidade de permanência de fêmeas aos 76 meses de idade igual a  $0,45 \pm 0,21$ . Silva et al. (2000) estimaram correlação genética entre perímetro escrotal aos 12 meses de idade e idade ao primeiro parto igual a  $-0,47$ . Correlações genéticas entre perímetro escrotal aos 420 dias de idade e idade ao primeiro e segundo parto foram iguais a  $-0,67 \pm 0,23$  e  $-0,33 \pm 0,29$ , respectivamente (BORBA et al., 2011).

### 3.2. Associação genômica

Estudos de associação genômica buscam verificar a existência de relações entre variações presentes no genoma com variações fenotípicas de determinadas características. No melhoramento genético de bovinos, características de interesse econômico são usualmente consideradas na seleção dos animais e estas irão variar de acordo com o propósito da raça, seja ela para produção de carne, leite ou de dupla aptidão. Em estudo de associações genômicas com características de crescimento, Snelling et al. (2010) utilizaram animais provenientes de diferentes cruzamentos (*Bos taurus taurus*) com aptidão para produção de carne e observaram associações com características de peso corporal localizados, principalmente, no cromossomos 6 e 11. No total, foram observados 786, 172 e 902 SNPs associados ao peso ao nascimento, ao desmame e ao ano após utilizar a correção para múltiplos testes (false discovery rate) a 10%. Os autores observaram SNPs localizados em regiões em que QTL foram anteriormente relatados para as características acima descritas (CASAS et al., 2000; KNEELAND et al., 2004; GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009).

Recentemente, Fortes et al. (2012) observaram associações genômicas para idade à puberdade em machos e fêmeas em animais da raça Brahman. Dos 134 SNPs associados à característica, os de maior significância estavam localizados nos cromossomos 14 e X, próximos a genes que não possuíam

descrições prévias de associações com tal característica. Os autores concluem que os polimorfismos identificados poderiam ser explorados como SNPs (ou genes) candidatos e poderiam auxiliar o processo de seleção de animais Brahman. Hawken et al. (2012) observaram associações genômicas para 22 características em fêmeas Brahman e de raça composta e observaram diferentes SNP significativos para a mesma característica nas duas raças estudadas. Logo, os autores concluem que os resultados de estudos de associação genômica representam a variação intrínseca de cada raça ou população, sendo pouco provável observar que os mesmos SNPs estejam associados a determinada característica em diferentes populações.

### 3.2.1. Método “Generalized Quasi-Likelihood Score”

Desenvolvido por Feng et al. (2011), o método de análise de associação genômica “Generalized Quasi-Likelihood Score” (GQLS) utiliza o modelo de regressão logística para associar os fenótipos de uma característica (tratados como co-variável) aos genótipos (tratados como variável resposta). Este método permite que a distribuição dos valores fenotípicos não seja especificada, sendo possível a análise tanto de variáveis binárias quanto quantitativas. Nesta metodologia considera-se  $X = (X_1, \dots, X_n)'$ , em que  $X_i$  representa os valores fenotípicos para o  $i^{\text{ésimo}}$  animal. Para os dados genotípicos considera-se  $Y = (Y_1, \dots, Y_n)'$  em que  $Y_i = \frac{1}{2} * (\text{número de alelos para o genótipo do animal } i)$ , se o genótipo do animal é codificado como “0”, “1” ou “2”, as respectivas proporções serão 0,  $\frac{1}{2}$  e 1. A frequência alélica esperada do SNP com a característica  $X_i$  é representada por  $\mu$ , em que  $\mu = (\mu_1, \dots, \mu_n)' = E(X | Y)$ , desta forma  $0 < \mu_i < 1$ . É importante ressaltar que a informação utilizada dependerá do tipo de análise desejada, podendo ser utilizado o próprio fenótipo do indivíduo, ou ainda, a diferença esperada na progênie (DEP), valores genéticos (VG) e valores derregredidos da DEP ou do VG. Outro aspecto desta metodologia é que a significância para cada SNP é obtida individualmente.

Para associar  $\mu_i$  com  $X_i$ , a seguinte regressão logística foi definida:



$$\mu_i = E(Y_i | X_i) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}$$

em que  $\beta_0$  é o termo constante e  $\beta_1$  é o coeficiente angular.

O teste de hipótese para avaliar se o SNP está associado à característica considera:

$H_0 : \beta_1 = 0$ , o SNP não está associado com a característica;

$H_1 : \beta_1 \neq 0$ , o SNP está associado com a característica.

Sob a hipótese de nulidade,  $\mu_i$  pode ser interpretado por  $\mu_i = \frac{e^{\beta_0}}{1 + e^{\beta_0}}$ , para todos os  $i = 1, \dots, n$ . O vetor médio de  $Y$  não depende mais de  $X_i$  e torna-se  $\mu = E(Y) = \mu 1$ , onde  $1$  é um vetor de “1’s”. A solução de equação de “quasi-likelihood score” resulta em estimativa para  $\mu$ , sendo esta  $\hat{\mu} = (1' A^{-1} 1)^{-1} 1' A^{-1} Y$ , em que  $A^{-1}$  é a inversa da matriz de parentesco dos indivíduos.

Para se obter o “generalized quasi-likelihood score”, a estatística  $W_G$  pode ser calculada como apresentado a seguir:

$$W_G = \frac{2}{\hat{\mu}(1 - \hat{\mu})} [X' A^{-1} (Y - \hat{\mu} 1)]' [X' A^{-1} X - (X' A^{-1} 1)(1' A^{-1} 1)^{-1} (1' A^{-1} X)]^{-1} \times [X' A^{-1} (Y - \hat{\mu} 1)]$$

De acordo com Heyde (1997), sob a hipótese de nulidade,  $W_G$  segue distribuição qui-quadrado com um grau de liberdade resultando em p-valores para cada SNP.

### 3.2.2. Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação resulta do processo de seleção, migração, mutação e deriva genética, ou ainda, pode ser criado em populações de animais domésticos por meio de cruzamentos entre linhagens ou raças diferentes (ZHAO et al., 2005). O estudo do desequilíbrio de ligação possibilita gerar informações importantes para auxiliar no mapeamento fino de QTL (MEUWISSEN; HAYES; GODDARD, 2001).

As formas de se quantificar o desequilíbrio de ligação se dão por meio do cálculo de  $D$ ,  $D'$ ,  $r^2$  e  $\chi^2$ . Para o cálculo de  $D$  (HILL; ROBERTSON, 1968) são necessárias as frequências dos haplótipos A e B na população, logo:

$$D = f(A_1B_1) * f(A_2B_2) - f(A_1B_2) * f(A_2B_1)$$

em que  $f(A_1B_1)$  é a frequência dos haplótipo  $A_1B_1$  na população, assim como nos demais haplótipos. No entanto, a estatística  $D$  como medida de desequilíbrio de ligação é muito dependente da frequência dos alelos individuais.

Já  $D'$  (LEWONTIN, 1964) é uma medida menos dependente da frequência alélica, representada por:

$$D' = \frac{|D|}{D^{\max}}$$

em que  $|D|$  representa o módulo de  $D$  (descrito anteriormente) e  $D^{\max}$  representa o máximo valor teórico de desequilíbrio de ligação entre um possível par de locus. Logo:

$$D^{\max} = \begin{cases} \min(f(AB), f(a)f(b)), & \text{se } D < 0 \\ \min(f(Ab), f(a)f(B)), & \text{se } D \geq 0 \end{cases}$$

em que o valor de  $D^{\max}$  utilizado é o valor mínimo. Zhao; Nettleton; Dekkers (2007) demonstraram que  $D'$  é altamente inflacionado, pois verificaram alto desequilíbrio de ligação entre marcadores separados por grandes distâncias.

A medida de desequilíbrio de ligação  $r^2$  (HILL; ROBERTSON, 1968) é representada por:

$$r^2 = \frac{D^2}{f(A)f(a)f(B)f(b)}$$

em que  $D = f(AB) - f(A)f(B)$ ,  $f(AB)$ ,  $f(A)$ ,  $f(a)$ ,  $f(B)$  e  $f(b)$  são as frequências observadas do haplótipo  $AB$  e dos alelos  $A$ ,  $a$ ,  $B$ , e  $b$ , respectivamente. Esta medida apresenta menor viés devido à frequência alélica do que as medidas anteriores (ARDLIE; KRUGLYAK; SEIELSTAD, 2002).

Yamazaki (1977) estudou um método alternativo para avaliação multi-alelica que considera o tamanho da amostra ( $N$ ) e o número de alelos em um locus ( $k$ ). Esta fórmula é descrita abaixo.

$$\chi^2 = \frac{2Nr^2}{[2N(k-1)]}$$

A vantagem deste método é que o desequilíbrio de ligação calculado não é viesado por haplótipos faltantes. Segundo Sargolzaei et al. (2008), quando utilizada para estudos com marcadores bialélicos, esta medida é equivalente a  $r^2$ .

### 3.2.3. Fase do desequilíbrio de ligação

Por meio de medidas do desequilíbrio de ligação é possível o estudo da fase do desequilíbrio de ligação (FDL) ou fase gamética entre populações. Logo, é possível avaliar a FDL entre dois cromossomos homólogos (ou seja, cromossomos paterno e materno) e caso exista consistência entre os alelos, pode-se dizer que os alelos estão em fase de acoplamento (representado pelo sinal +), caso contrário, os alelos se encontram em fase de repulsão (representado pelo sinal -).

Esta avaliação é muito importante, pois caso FDL seja consistente ao longo do genoma entre duas ou mais raças, a seleção genômica poderia ser aplicada utilizando-se avaliação multi-raacial, além de se considerar que existe probabilidade de um marcador (ou QTL) ser comum nas populações estudadas (LU et al., 2012). O cálculo da FDL baseia-se em utilizar o sinal (+ ou -) obtido no cálculo da medida de desequilíbrio de ligação  $D$  em conjunto com  $\sqrt{r^2}$  para cada par de marcadores em ambas as populações. Para confrontar as fases é realizada a correlação simples de Pearson entre os marcadores presentes em ambas as populações. De Roos et al. (2008) consideraram FDL acima de 0,80 como sendo de alta consistência.

### 3.3. Controle de qualidade de genótipos

O controle de qualidade de genótipos precede o início dos estudos de associação genômica, pois sem este controle as análises estatísticas ficam comprometidas e podem levar a associações do tipo falso positivo ou falso negativo, diminuindo a confiabilidade dos resultados.

### 3.3.1. Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Em grandes populações com acasalamento ao acaso e sem seleção, mutação ou migração, a frequência de genes e genótipos deve permanecer constante entre as gerações, logo, estas populações estão em Equilíbrio de Hardy-Weinberg (FALCONER; MACKAY, 1996). O teste exato de Fisher é utilizado para o cálculo dos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), em que é construída uma tabela de contingência 2 x 2 para as contagens esperadas dos genótipos AA, AB, BA e BB. Logo; a significância (p-valor) é dada por:

$$EHW_p = \frac{\binom{AA+AB}{AB} \binom{BA+BB}{BB}}{\binom{AA+AB+BA+BB}{AA+BA}} = \frac{(AA+AB)! (BA+BB)! (AA+BA)! (AB+BB)!}{AA! AB! BA! BB! (AA+AB+BA+BB)!}$$

Este teste é realizado para cada SNP e se o valor de  $EHW_p$  for inferior ao limiar estabelecido, este será considerado em desequilíbrio de Hardy-Weinberg e será excluído da análise de associação. O nível de significância verificado na literatura varia entre  $10^{-6}$  e  $10^{-3}$  (BALDING, 2006; LAURIE et al., 2010).

### 3.3.2. Escore de leitura de genótipos

O escore de leitura de genótipo ou “genotype calling score” indica a confiança da leitura de cada SNP no processo de hibridização durante a genotipagem. Programas específicos como o GenomeStudio Data Analysis Software ([http://www.illumina.com/software/genomestudio\\_software.ilmn](http://www.illumina.com/software/genomestudio_software.ilmn)) utilizam algoritmos para realizar o agrupamento de SNP por angulação, dispersão, sobreposição e intensidade de sinal. O valor deste escore varia de 0 a 1. O limiar de 0,15, definido na plataforma de genotipagem Infinium Assay (ILLUMINA®, 2010) é considerado como valor mínimo em estudos de associação genômica. Baixos escores de leitura podem estar associados à

baixa qualidade do DNA das amostras e a falhas durante o processo de hibridização ou durante a genotipagem.

### 3.3.3. Taxa de leitura de genótipos

A eficiência da genotipagem é medida pela taxa de leitura de genótipos ou “call rate”. Esta medida de confiabilidade do genótipo é realizada tanto para as amostras (animais) quanto para os marcadores (SNPs). Quando o “call rate” é baixo (< 0,80) pode-se inferir que a qualidade do DNA utilizado na genotipagem não foi a ideal, ou ainda, que houve falhas no processo de genotipagem (contaminação, por exemplo) (TURNER et al., 2011). Isto pode ocorrer quando são utilizados diferentes tipos de materiais para a extração de DNA e dependem muito das condições nas quais foram armazenados. O limite para se avaliar a qualidade dos genótipos varia entre os estudos. Em bovinos, são encontrados estudos de associação genômica que consideram “call rate” que variam de 0,85 a 1,00 (CHAN; HAWKEN; REVERTER, 2009; MEREDITH et al., 2012; NISHIMURA et al., 2012). Qualquer valor abaixo do limiar especificado deverá ser eliminado do conjunto de dados. O “call rate” pode ser calculado por SNP e, em seguida, por amostra por meio de seguinte fórmula:

$$\text{Call rate} = \frac{\text{Total de SNPs com leitura}}{\text{Total de SNPs}} .$$

### 3.3.4. Proporção de heterozigotos

Desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg podem gerar excesso de heterozigotos (WIGGANS et al., 2009; TURNER et al., 2011) e causar diminuição da variabilidade dentro dos genótipos. É importante a retirada de SNPs nesta condição para maior confiabilidade dos resultados das análises de GWAS. A proporção de heterozigotos pode ser calculada por meio das frequências dos genótipos heterozigotos esperados e observados como exposto abaixo:

$$\text{Proporção de heterozigotos} = \frac{\text{Frequência de heterozigotos esperados}}{\text{Frequência de heterozigotos observados}}$$

O limiar a ser utilizado dependerá muito do objetivo do estudo e, qualquer SNP cujo valor esteja acima deste limiar, poderá ser excluído. Hu et al. (2011) utilizaram o limiar de 0,10 em estudos com humanos. Espigolan et al. (2013) e Wiggans et al. (2009) consideraram o limiar de 0,30 e 0,15 para bovinos de corte e leite, respectivamente.

### 3.3.5. Alelos de menor frequência

A mensuração dos alelos de menor frequência ou “minor allele frequency” (MAF) é de extrema importância para estudos de associação genômica, pois a presença de tais alelos (raros) em uma população com poucos indivíduos genotipados poderia influenciar o poder estatístico aplicado e gerar resultados viesados, ou seja, falsos positivos (TURNER et al., 2011). O cálculo de MAF considera as frequências dos três possíveis genótipos (AA, AB e BB). A frequência alélica então será calculada por  $p + q = 1$ , considerando-se que  $p = [f(AA) + f(AB)/2]$  e  $q = [f(BB) + f(AB)/2]$ . Logo, a menor frequência de  $p$  ou  $q$  representará MAF (ZHANG; DUAN; DOLAN, 2008). Em geral, o limiar para a exclusão de MAF observado na literatura considera valores iguais a 5% (KIM et al., 2011; SNELLING et al., 2010). Em estudos em que o objetivo é avaliar o efeito de alelos raros em características complexas (doenças, por exemplo) de uma população, limiares de MAF inferiores a 5% são necessários, porém, para a correta detecção de efeitos de SNPs em menores frequências, é necessário também maior número de amostras (HIRSCHHORN; DALY, 2005).

## 4. REFERÊNCIAS

ALENCAR, M. M. **Bovino - Raça Canchim: Origem e Desenvolvimento**. 1. ed. Brasília: Embrapa-DPU, 1988. 102p.

ANDRADE, P. C.; GROSSI, D. A; PAZ, C. C. P.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A; MUNARI, D. P. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 5, p. 480–485, 2008.

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews: Genetics**, v. 3, n. 4, p. 299–309, 2002.

BAKER, J. H.; KROPP, J. R.; TURMAN, E. J.; BUCHANAN, D. S. A Comparison of Different Breeds for Growth Rates , Performance Traits and Scrotal Circumference in Young Beef Bulls. **Animal Science Research Report**, p. 15–18, 1981.

BALDI, F.; ALENCAR, M. M.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimativas de parâmetros genéticos para características de crescimento em bovinos da raça Canchim utilizando modelos de dimensão finita. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2409–2417, 2010.

BALDI, F.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R.; BARBOSA, R. T. Parâmetros genéticos para características de tamanho e condição corporal , eficiência reprodutiva e longevidade em fêmeas da raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 247–253, 2008.

BALDING, D. J. A tutorial on statistical methods for population association studies. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, n. 10, p. 781–791, 2006.

BARBOSA, P. F. **O Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste**. Convenção Nacional da Raça Canchim. **Anais...**São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/44905/1/PROCIPFB2000.00028.pdf>> Acesso em: 05 de janeiro de 2013.

BOHMANOVA, J.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S. Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. **BMC Genomics**, v. 11, n. 421, 2010.

BORBA, L. H. F.; REY, F. S. B.; SILVA, L. O. C.; BOLIGON, A. A.; ALENCAR, M. M. Parâmetros genéticos para características de crescimento e reprodução de bovinos da raça Canchim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1570–1578, 2011.

BRUMATTI, R. C.; FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P.; FORMIGONI, I. B. Desenvolvimento de índice de seleção em gado corte sob o enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 230, p. 205–213, 2011.

BRUMFIELD, R. T.; BEERLI, P.; NICKERSON, D. A.; EDWARDS, S. V. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 5, p. 249–256, 2003.

BUZANSKAS, M. E.; GROSSI, D. A.; BALDI, F.; BARROZO, D.; SILVA, L. O. C.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; MUNARI, D. P.; ALENCAR, M. M. Genetic associations between stayability and reproductive and growth traits in Canchim beef cattle. **Livestock Science**, v. 132, p. 107–112, 2010.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASTRO-PEREIRA, V. M.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F. Estimativas de parâmetros genéticos e de ganhos direto e indireto à seleção para características de crescimento de machos e fêmeas da raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1037–1044, 2007.

CASTRO-PEREIRA, V. M.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, R. T. Estimativas de parâmetros genéticos e de ganhos direto e indireto à seleção para características reprodutivas e de crescimento em um rebanho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1029–1036, 2007.

CHAN, E. K. F.; HAWKEN, R.; REVERTER, A. The combined effect of SNP-marker and phenotype attributes in genome-wide association studies. **Animal Genetics**, v. 40, n. 2, p. 149–156, 2009.

DE ROOS, A P. W.; HAYES, B. J.; SPELMAN, R. J.; GODDARD, M. E. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1503–1512, 2008.



ESPIGOLAN, R.; BALDI, F.; BOLIGON, A. A.; SOUZA, F. R. P.; GORDO, D. G. M.; TONUSSI, R. L.; CARDOSO, D. F.; OLIVEIRA, H. N.; TONHATI, H.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; CARVALHEIRO, R.; FERRO, J. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC genomics**, v. 14, p. 305, 2013.

FALCONER, D. S.; MACKAY, T. F. C. **Introduction to quantitative genetics**. 4. ed. Essex, England: Pearson Prentice Hall, 1996. 464p.

FENG, Z.; WONG, W. W. L.; GAO, X.; SCHENKEL, F. Generalized genetic association study with samples of related individuals. **The Annals of Applied Statistics**, v. 5, n. 3, p. 2109–2130, 2011.

FISHER, R. A. The Correlation between Relatives on the Supposition of Mendelian Inheritance. **Transactions of the Royal Society of Edinburgh**, v. 52, n. 2, p. 399–433, 1919.

FORTES, M. R. S.; LEHNERT, S. A.; BOLORMAA, S.; REICH, C.; FORDYCE, G.; CORBET, N. J.; WHAN, V.; HAWKEN, R. J.; REVERTER, A. Finding genes for economically important traits : Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**, v. 52, p. 143–150, 2012.

FOULKES, A. S. **Applied Statistical Genetics with R - For Population-based Association Studies**. 1. ed. London, NY: Springer, 2009. 252p.

FRIZZAS, O. G.; GROSSI, D. A.; BUZANSKAS, M. E.; PAZ, C. C. P.; BEZERRA, L. A. F.; LÔBO, R. B.; OLIVEIRA, J. A.; MUNARI, D. P. Heritability estimates and genetic correlations for body weight and scrotal circumference adjusted to 12 and 18 months of age for male Nellore cattle. **Animal: an international journal of animal bioscience**, v. 3, n. 3, p. 347–351, 2009.

GAVIOLLI, V. R. N.; BUZANSKAS, M. E.; CRUZ, V. A. R.; SAVEGNAGO, R. P.; MUNARI, D. P.; FREITAS, A. R.; ALENCAR, M. M. Genetic associations between weight at maturity and maturation rate with ages and weights at first and second calving in Canchim beef cattle. **Journal of Applied Genetics**, v. 53, n. 3, p. 331–335, 2012.

GEORGES, M.; NIELSEN, D.; MACKINNON, M.; MISHRA, A.; OKIMOTO, R.; PASQUINO, A T.; SARGEANT, L. S.; SORENSEN, A.; STEELE, M. R.; ZHAO, X. Mapping quantitative trait loci controlling milk production in dairy cattle by exploiting progeny testing. **Genetics**, v. 139, n. 2, p. 907–920, 1995.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 6, p. 323–330, 2007.

GUTIÉRREZ-GIL, B.; WILLIAMS, J. L.; HOMER, D.; BURTON, D.; HALEY, C. S.; WIENER, P. Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 24–36, 2009.

HAWKEN, R. J.; ZHANG, Y. D.; FORTES, M. R. S.; COLLIS, E.; BARRIS, W. C.; CORBET, N. J.; WILLIAMS, P. J.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R. G.; WALKLEY, J. R. W.; BARENDSE, W.; JOHNSTON, D. J.; PRAYAGA, K. C.; TIER, B.; REVERTER, A.; LEHNERT, S. A. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1398–1410, 2012.

HENDERSON, C. R. Best Linear Unbiased Estimation and Prediction under a Selection Model. **International Biometric Society**, v. 31, n. 2, p. 423–447, 1975.

HENDERSON, C. R. Rapid Method for Computing the Inverse of a Relationship Matrix. **Journal of Dairy Science**, v. 58, n. 11, p. 1727–1730, 1975.

HEYDE, C. C. **Quasi-Likelihood And Its Application: A General Approach to Optimal Parameter Estimation**. 1. ed. Canberra, Australia: Springer, 1997. 235p.

HILL, W. G. G.; ROBERTSON, A. Linkage Disequilibrium in Finite Populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 38, p. 226–231, 1968.

HIRSCHHORN, J. N.; DALY, M. J. Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. **Nature reviews. Genetics**, v. 6, n. 2, p. 95–108, 2005.

HU, X.; PICKERING, E.; LIU, Y. C.; HALL, S.; FOURNIER, H.; KATZ, E.; DECHAIRO, B.; JOHN, S.; VAN EERDEWEGH, P.; SOARES, H. Meta-analysis for genome-wide association study identifies multiple variants at the BIN1 locus associated with late-onset Alzheimer's disease. **PloS one**, v. 6, n. 2, p. 1–9, 2011.

HU, Z.-L.; PARK, C. A.; WU, X.-L.; REECY, J. M. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 1, p. 871 – 879, 2013.

ILLUMINA ®. **Infinium ® Genotyping Data Analysis**. Disponível em: <[http://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote\\_infinium\\_genotyping\\_data\\_analysis.pdf](http://www.illumina.com/Documents/products/technotes/technote_infinium_genotyping_data_analysis.pdf)>. Acesso em: 05 de janeiro de 2013.

KIM, Y.; RYU, J.; WOO, J.; KIM, J. B.; KIM, C. Y.; LEE, C. Genome-wide association study reveals five nucleotide sequence variants for carcass traits in beef cattle. **Animal Genetics**, v. 42, p. 361–365, 2011.

KNEELAND, J.; LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for growth traits on bovine chromosomes 2 , 6 , 14 , 19 , 21 , and 23 within one commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3405–3414, 2004.

KRUPA, E.; WOLFOVÁ, M.; PEŠKOVIČOVÁ, D.; HUBA, J.; KRUPOVÁ, Z. Economic values of traits for Slovakian Pied cattle under different marketing strategies. **Czech Journal of Animal Science**, v. 50, n. 10, p. 483–492, 2005.

LAURIE, C. C. et al. Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. **Genetic Epidemiology**, v. 34, n. 6, p. 591–602, 2010.

LEWONTIN, R. C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v. 49, n. 1, p. 49–67, 1964.

LU, D.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; LI, C.; VANDER VOORT, G.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S.; MILLER, S. P. Linkage disequilibrium in Angus, Charolais, and Crossbred beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 152, 2012.

MARTIN, L. C.; BRFNKST, J. S.; BOURDONT, R. M.; CUNDIFF, L. V. Genetic Effects on and Subsequent Heifer Puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 4006–4017, 1992.

MASCIOLI, A. S.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; NOVAES, A. P.; OLIVEIRA, M. C. S. Estimativas de parâmetros genéticos e proposição de critérios de seleção para pesos na raça Canchim. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**, v. 25, n. 1, p. 72–82, 1996.

MCCLURE, M. C.; MORSCI, N. S.; SCHNABEL, R. D.; KIM, J. W.; YAO, P.; ROLF, M. M.; MCKAY, S. D.; GREGG, S. J.; CHAPPLE, R. H.; NORTH CUTT, S. L.; TAYLOR, J. F. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 6, p. 597–607, 2010.

MEE, J. F. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: a review. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 93–101, 2008.

MELLO, S. P.; ALENCAR, M. M.; SILVA, L. O. C.; BARBOSA, R. T.; BARBOSA, P. F. Estimativas de (Co) Variâncias e Tendências Genéticas para Pesos em um Rebanho Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1707–1714, 2002.

MEREDITH, B. K.; KEARNEY, F. J.; FINLAY, E. K.; BRADLEY, D. G.; FAHEY, A. G.; BERRY, D. P.; LYNN, D. J. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. **BMC Genetics**, v. 13, n. 21, 2012.

MEUWISSEN, T. H.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1819–1829, 2001.

NEIMAN-SORENSEN, A.; ROBERTSON, A. The association between blood groups and several production characters in three Danish cattle breeds. **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 11, n. 2, p. 163–196, 1961.

NISHIMURA, S.; WATANABE, T.; MIZOSHITA, K.; TATSUDA, K.; FUJITA, T.; WATANABE, N.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the PLAG1-CHCHD7 QTN for stature in Japanese Black cattle. **BMC Genetics**, v. 13, n. 40, 2012.

PINTOS, D.; CORVA, P. M. Association between molecular markers for beef tenderness and growth traits in Argentinian angus cattle. **Animal Genetics**, v. 42, n. 3, p. 329–332, 2011.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; JANSEN, G. B.; SCHAEFFER, L. R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 2106–2017, 2008.

SAX, K. The Association of Size Differences with Seed-Coat Pattern and Pigmentation in PHASEOLUS VULGARIS. **Genetics**, v. 8, n. 6, p. 552–560, 1923.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R.; BARBOSA, R. T.; BARBOSA, P. F.; OLIVEIRA, M. C. S.; CORRÊA, L. A.; NOVAES, A. P.; TULLIO, R. R. Herdabilidades e Correlações Genéticas para Peso e Perímetro Escrotal de Machos e Características Reprodutivas e de Crescimento de Fêmeas, na Raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2223–2230, 2000.

SMITH, C. Improvement of metric traits through specific genetic loci. **Animal Production**, v. 9, n. 3, p. 349–358, 1967.

SNELLING, W. M.; ALLAN, M. F.; KEELE, J. W.; KUEHN, L. A.; MCDANELD, T.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; THALLMAN, R. M.; BENNETT, G. L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 837–848, 2010.

THE BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM; ELSIK, C. G.; TELLAM, R. L.; WORLEY, K. C. The Genome Sequence of Taurine. **Science**, v. 324, p. 522–528, 2009.

TROCÓNIZ, J. F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H.; LARREAL, H.; BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nellore bulls. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 815–826, 1991.

TURNER, S. et al. Quality control procedures for genome-wide association studies. **Current Protocols in Human Genetics**, v. 1, p. 1–23, 2011.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, 2002.

WIGGANS, G. R.; SONSTEGARD, T. S.; VANRADEN, P. M.; MATUKUMALLI, L. K.; SCHNABEL, R. D.; TAYLOR, J. F.; SCHENKEL, F. S.; VAN TASSELL, C. P. Selection of single-nucleotide polymorphisms and quality of genotypes used in genomic evaluation of dairy cattle in the United States and Canada. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 7, p. 3431–3436, 2009.

WOLFOVÁ, M.; WOLF, J.; ZAHŘÁDKOVÁ, R.; PŘIBYL, J.; DAŇO, J.; KRUPA, E.; KICA, J. Breeding objectives for beef cattle used in different production systems. **Livestock Production Science**, v. 95, n. 3, p. 217–230, 2005.

YAMAZAKI, T. The effects of overdominance on linkage in a multilocus system. **Genetics**, v. 86, p. 227–236, 1977.

ZHANG, W.; DUAN, S.; DOLAN, M. E. HapMap filter 1.0: A tool to preprocess the HapMap genotypic data for association studies. **Bioinformatics**, v. 2, n. 8, p. 322–324, 2008.

ZHAO, H.; NETTLETON, D.; DEKKERS, J. C. M. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between single nucleotide polymorphisms. **Genetical Research**, v. 89, p. 1–6, 2007.

ZHAO, H.; NETTLETON, D.; SOLLER, M.; DEKKERS, J. C. M. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. **Genetical Research**, v. 86, n. 1, p. 77–87, 2005.

## CAPÍTULO 2 - ESTUDO DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO E DA FASE DE LIGAÇÃO EM BOVINOS DE CORTE DE RAÇA SINTÉTICA

**RESUMO** – Recentes avanços tecnológicos possibilitaram a utilização de dados genômicos na avaliação de animais de produção. Os marcadores do tipo SNP (“Single Nucleotide Polymorphism”) estão entre os mais utilizados para estudos do genoma bovino, pois estão presentes em grande quantidade e podem estar associados a genes que atuam em características de interesse econômico. O objetivo deste trabalho foi estudar o desequilíbrio de ligação (DL) e a persistência da fase de desequilíbrio de ligação (FDL) na raça Canchim e no grupo genético MA, utilizando painéis de diferentes densidades. Foram utilizados 285 animais da raça Canchim (proporção Charolês-Zebu igual a 62,5% e 37,5%) e 114 animais do grupo genético MA (proporção Charolês-Zebu de aproximadamente 65,6% e 34,4%) genotipados com o painel de alta densidade BovineHD - Illumina® bead chip (777k). As informações dos genótipos de alta densidade foram concatenadas com o mapa de genótipos de menor densidade (BovineSNP50 v2 bead chip) que possui aproximadamente 50 mil SNPs (50k), realizando assim a redução da densidade dos marcadores. Esta redução da densidade se deu com o objetivo de verificar a real necessidade em se utilizar painéis de maior densidade para estudos com a raça Canchim. Rotinas para controle de qualidade de genótipos precederam às análises de DL e FDL e, após isto, foi calculada a medida de desequilíbrio de ligação  $r^2$ . O painel de 777k mostrou-se mais eficiente para estudo do desequilíbrio de ligação e da persistência da fase do desequilíbrio de ligação do que o painel de 50k nestes animais. Verificou-se elevada FDL (acima de 0,80) entre animais Canchim e MA em ambos os painéis, embora tenha sido pouco mais elevada até as distâncias de 0,20 a 0,30 Mb (megabase) no painel de 50k. Na análise de DL, apenas o painel de 777k apresentou valores consistentes de  $r^2$  médio iguais a 0,38, 0,34 e 0,31 nas distâncias de 0,00 a 0,0025 Mb, 0,0025 a 0,0050 Mb e 0,0050-0,0075 Mb. Além disto, este painel mostrou-se mais informativo quando comparado ao de 50k. O painel de 777k mostrou-se mais indicado para ser utilizado na seleção genômica multirracial, pois apresentou maior desequilíbrio de ligação e persistência da fase do desequilíbrio de ligação entre bovinos da raça Canchim e do grupo genético MA. O mapeamento fino na busca por



genes ou mutações causais seria eficiente em ambas as populações devido aos resultados encontrados. Assim, análises genômicas poderão auxiliar no processo de seleção e melhoramento genético da raça Canchim.

**Palavras-chave:** alelos, bovinocultura de corte, QTL, seleção genômica, SNP

## 1. INTRODUÇÃO

Os avanços tecnológicos e a aplicação de novas metodologias estatísticas para a avaliação genômica estão contribuindo para o progresso da pecuária no âmbito mundial. Muitos estudos envolvendo animais de produção estão sendo realizados nesta área e, recentemente, um relatório da rede de pesquisa de bovinos de leite do Canadá (“Canadian Dairy Network – CDN”) mostrou resultados positivos quanto ao progresso genético para o índice de lucro durante a vida útil (“Lifetime Profit Index”) em animais da raça Holandesa utilizando-se touros jovens e aplicando-se a seleção genômica (VAN DOORMAAL, 2012).

Estudos genômicos levam em consideração muitos fatores, sendo um destes a avaliação do desequilíbrio de ligação (DL) entre marcadores genéticos ao longo do genoma. Os marcadores mais utilizados atualmente são os polimorfismos de nucleotídeo único, ou SNPs (“Single Nucleotide Polymorphism”). O desequilíbrio de ligação é a associação não-aleatória de alelos presentes em dois ou mais locos de um mesmo cromossomo. Além disto, para que o DL seja quantificado, é necessário estudar a existência de desvios entre as frequências observadas e esperadas de certos haplótipos ou SNPs (BOHMANOVA; SARGOLZAEI; SCHENKEL, 2010). O estudo do desequilíbrio de ligação possibilita gerar informações importantes para auxiliar no mapeamento fino de QTL (Quantitative Trait Loci) (MEUWISSEN; HAYES; GODDARD, 2001). O DL resulta do processo de seleção, migração, mutação e deriva genética, ou ainda, pode ser criado em populações de animais domésticos por meio de cruzamentos entre linhagens ou raças diferentes (ZHAO et al., 2005).

No Brasil, a utilização de animais de raças sintéticas, desenvolvidas por meio do cruzamento de animais *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, se

tornou muito importante para a indústria da bovinocultura de corte (ALENCAR, 1988), cujo principal objetivo era de unir características produtivas e de qualidade de carne de animais de origem europeia à adaptabilidade dos animais de origem indiana. Um exemplo de raça sintética produzida no Brasil é a raça Canchim, cuja população consiste de animais provenientes de cruzamentos entre animais Charoleses e zebuínos (atualmente, animais Nelore) gerando diferentes grupos genéticos com diferentes proporções Charolês-zebu, até se chegar ao animal Canchim (ALENCAR, 1988; ABCCAN, 2013). Em populações que possuem diferentes grupos genéticos, é de grande importância que seja avaliada a fase de desequilíbrio de ligação (FDL) entre as subpopulações.

A FDL mede a fase de ligação gamética entre dois cromossomos homólogos (ou seja, cromossomos paterno e materno) e caso exista consistência entre os alelos, pode-se dizer que os alelos estão em fase de acoplamento, caso contrário, os alelos se encontram em fase de repulsão. A FDL pode ser avaliada entre diferentes raças, dentro da mesma raça, entre gerações e entre raças localizadas em diferentes países. Se constatado que a FDL é consistente entre as populações, a seleção genômica poderia ser aplicada por meio de avaliação multi-raça, considerando-se que existe grande probabilidade de um marcador (ou QTL) ser comum nas populações avaliadas e espera-se que também haja aumento da acurácia nestas avaliações genômicas (DE ROOS et al., 2008). A existência de inconsistências de FDL pode ocorrer tanto entre animais da mesma raça quanto entre animais da mesma raça provenientes de diferentes países (DE ROOS et al., 2008; GODDARD; HAYES; MEUWISSEN, 2010). O objetivo deste trabalho foi estudar o desequilíbrio de ligação e a consistência da fase de desequilíbrio de ligação entre a raça Canchim e o grupo genético MA, utilizando painéis de 50k e de 777k.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais genotipados**

A raça Canchim é uma raça sintética desenvolvida na década de 40 nas dependências da fazenda Canchim, pertencente à Empresa Brasileira de

Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada no município de São Carlos (SP). O esquema de acasalamento que apresentou resultados satisfatórios para a época considerou animais com proporção 62,5% Charolês e 37,5% Zebu. Desde então, diferentes esquemas de cruzamento foram estudados com o objetivo de produzir animais Canchim com diferentes proporções Charolês-Zebu e para se alcançar maior variabilidade genética na população. Um destes esquemas é utilizado para gerar animais do grupo genético “MA”, que provêm do acasalamento entre animais Canchim e zebu, resultando em animais F1 pertencentes ao grupo genético “A”. Por sua vez, este grupo genético é acasalado com animais da raça Charolesa, gerando o grupo genético “MA” com proporção esperada de 65,6% Charolês e 34,4% Zebu. O acasalamento entre animais “MA” ou entre animais “MA” e Canchim irão gerar animais da raça Canchim (PEREIRA et al., 2005; ANDRADE et al., 2008). Estes esquemas de cruzamentos auxiliaram a expandir a base genética da raça Canchim (BARBOSA, 2000) e mais detalhes sobre a raça podem ser encontrados na literatura (ALENCAR, 1988; BALDI; ALBUQUERQUE; ALENCAR, 2010; BUZANSKAS et al., 2010).

Animais genotipados, por meio do painel de alta densidade (BovineHD - Illumina® bead chip), incluíram 194 machos e 205 fêmeas, sendo 285 animais da raça Canchim e 114 animais do grupo genético MA filhos de 49 touros e 355 vacas. Estes animais nasceram entre 1999 e 2005 e são provenientes de sete fazendas localizadas nos estados de São Paulo e Goiás. A matriz de parentesco destes animais constituiu de 4095 animais. A endogamia média para animais da raça Canchim e do grupo genético MA foram iguais a 0,003 e 0,0002, respectivamente. Para a população, a endogamia média foi igual a 0,02.

## **2.2. Controle de qualidade de genótipos**

A edição dos dados foi realizada utilizando os softwares SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e programas criados em linguagem C++. Genótipos foram identificados de acordo com o número de alelos: AA = “0”, AB = “1” e BB = “2”. Para o controle de qualidade dos genótipos foram excluídos SNPs com escore de leitura

("genotype calling score") inferiores a 0,15; SNPs com desvios significativos ( $P < 0,00001$ ) do equilíbrio de Hardy-Weinberg; SNPs com proporção de heterozigotos ( $> 15\%$ ); SNPs com frequência alélica ("minor allele frequency") inferiores a 5%; e taxa de leitura ("call rate") para SNPs e animais inferiores a 90%. Apenas os cromossomos autossômicos e SNPs com posições conhecidas foram utilizados para o estudo de DL e FDL. Após o controle de qualidade 395 animais permaneceram para a análise de DL e FDL. O controle de qualidade dos genótipos considerou os mesmo SNPs presentes tanto nos genótipos de animais Canchim, quanto nos do grupo genético MA. Assim, foram utilizadas quantidades de SNPs fixas para as análises de LD e FDL.

### **2.3. Análise de desequilíbrio de ligação e da fase de desequilíbrio de ligação**

Dois cenários para análise de DL foram estudados. O primeiro consistiu em avaliar o painel de alta densidade, enquanto que o segundo considerou painel reduzido para menor densidade. Os dados originais de alta densidade consistiam de 786.799 SNPs (777k). Realizou-se a redução da densidade deste painel concatenando-se as localizações destes SNPs com os presentes no painel BovineSNP50 (BovineSNP50 v2 bead chip) que possui 54.609 SNPs. Esta redução resultou em 49.915 SNPs (50k) comuns em ambos os painéis. Os mesmos animais estavam presentes em ambos os painéis estudados.

Desta forma, buscou-se verificar qual painel traria vantagens quanto ao estudo do desequilíbrio de ligação e também se a fase de desequilíbrio de ligação é consistente entre os animais Canchim e do grupo genético MA. Após a aplicação do controle de qualidade dos genótipos, 673.373 SNPs e 38.087 SNPs, respectivamente para os painéis de 777k e de 50k, permaneceram para a análise de DL (Figura 1). O comprimento total dos autossomos foi de 2509,56 Mb (megabase) e 2510,86 Mb nos painéis de 50k e 777k, respectivamente. As posições dos SNPs utilizadas neste estudo pertencem ao mapa montado por Zimin et al. (2009) na Universidade de Maryland, chamado UMD\_3.1 bovine assembly.

O software SNPPLD (SARGOLZAEI et al., 2008) foi utilizado para o estudo do desequilíbrio de ligação e fase do desequilíbrio de ligação.

Utilizaram-se todas as distâncias entre os SNPs para a análise de DL com o painel de 50k, enquanto que para o painel de 777k, utilizaram-se apenas SNPs que estivessem em uma distância máxima de 0,5 Mb. Este limite foi considerado levando-se em consideração que existiriam muitas comparações a serem feitas no painel de alta densidade. Utilizou-se a medida de desequilíbrio de ligação  $r^2$  porque ela quantifica a proporção de informações que podem ser inferidas de um loco ao seguinte (PRITCHARD; PRZEWORSKI, 2001; ZHAO et al., 2005). Portanto,  $r^2$  pode ser utilizado para estimar o número de locos necessários para estudos de análise de associação (KRUGLYAK, 1999; PRITCHARD; PRZEWORSKI, 2001).

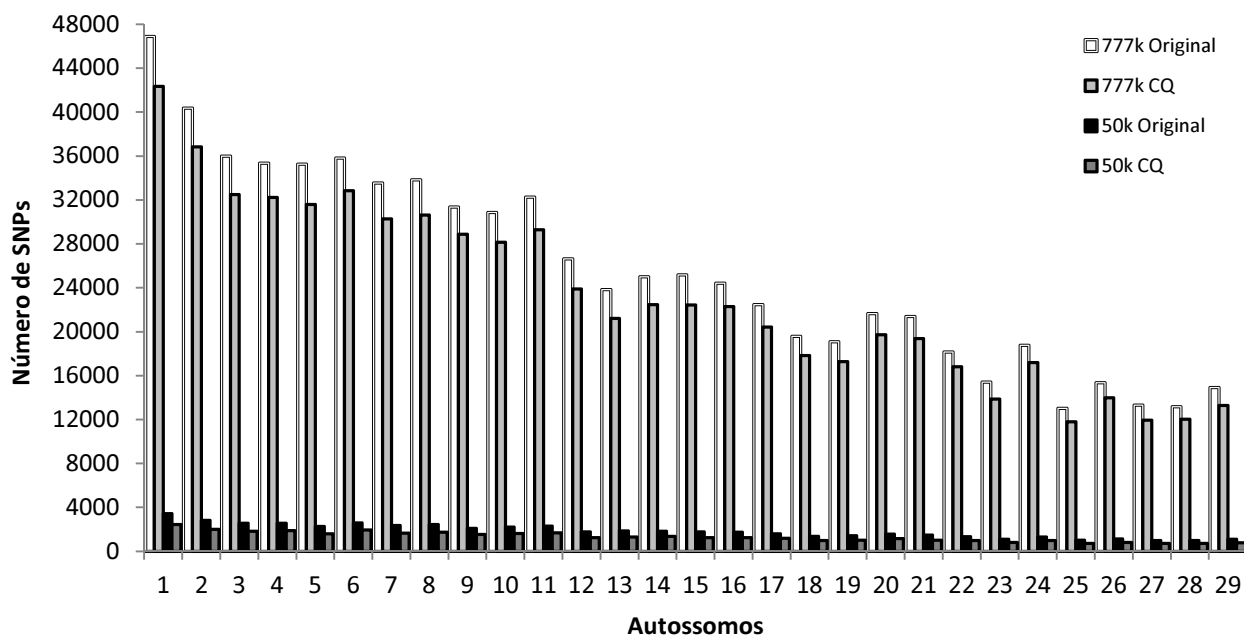


Figura 1. Distribuição dos SNPs ao longo dos autossomos para os dados originais e após o controle de qualidade (CQ) para os painéis de 777k e 50k.

As medidas de desequilíbrio de ligação  $D$  e  $r^2$  foram calculadas como descrito por (HILL; ROBERTSON, 1968):

$$r^2 = \frac{D^2}{f(A)f(a)f(B)f(b)}$$

em que  $D = f(AB) - f(A)f(B)$ ;  $f(AB)$ ,  $f(A)$ ,  $f(a)$ ,  $f(B)$  e  $f(b)$  são as frequências observadas do haplótipo  $AB$  e dos alelos  $A$ ,  $a$ ,  $B$ , e  $b$ , respectivamente. A fase do desequilíbrio de ligação para cada par de marcadores foi calculada pela raiz quadrada do valor de  $r^2$  colocando-se o sinal

baseado nos cálculos do valor de  $D$ . Os dados foram ordenados por cromossomo e pela distância entre os SNP. A correlação de Pearson foi obtida entre os valores de  $\sqrt{r^2}$  com o sinal de  $D$  nos diferentes grupos genéticos (Canchim e MA).

### 3. RESULTADOS

Nas Tabelas 1 e 2 são apresentados o número de pares de SNP,  $r^2$  médio, desvio-padrão e fase do desequilíbrio de ligação para análise de animais Canchim, MA e Canchim+MA, utilizando, respectivamente, os painéis de 50k e 777k. Em todas as análises foi possível verificar que o  $r^2$  médio diminuiu conforme as distâncias genômicas entre os marcadores aumentaram. Para todas as distâncias genômicas observou-se comportamento similar quanto ao  $r^2$  médio nos painéis de 50k e 777k, embora o  $r^2$  médio tenha sido superior no painel de 777k. O número de pares de SNPs variou entre a análise com animais Canchim e MA, principalmente para o painel de 777k. Isto ocorreu devido ao LD em alguns dos genótipos não ter sido corretamente estimado, provavelmente, por erros no posicionamento destes SNPs no genoma.

Nas Figuras 2A e 2B são apresentados o  $r^2$  médio e a FDL, respectivamente, para os painéis de 50k e 777k em animais Canchim, MA e Canchim+MA. A FDL foi maior em distâncias menores e variou de 0,25 a 0,96 no painel de 50k. Na Figura 2B, o decréscimo em  $r^2$  seguiu a mesma tendência observada na Figura 2A, e variou de 0,66 a 0,96. Na maior parte das distâncias genômicas estudadas observou-se  $r^2$  ligeiramente superior para animais Canchim em relação aos animais MA e à análise conjunta de Canchim+MA. No entanto, em maiores distâncias genômicas, pode-se observar na Figura 2A que o DL de animais MA é superior aos demais. A distância média entre SNPs foi igual a 0,0037 Mb e 0,0659 Mb para os painéis de 777k e 50k, respectivamente. O  $r^2$  médio nestas distâncias variou de 0,12 a 0,13 e 0,30 a 0,37 para os painéis de 50k e 777k, respectivamente.

Tabela 1. Número de pares de SNP, desequilíbrio de ligação médio ( $r^2$  médio), desvio-padrão (DP), mediana e fase do desequilíbrio de ligação (FDL) para animais Canchim e grupo genético MA analisados utilizando-se o painel de 50k.

Distância (Mb)	Canchim				MA				Canchim + MA				FDL
	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	
0,00-0,02	554	0,24	0,31	0,09	554	0,23	0,30	0,08	554	0,23	0,31	0,08	0,96
0,02-0,03	4808	0,21	0,25	0,10	4808	0,19	0,24	0,10	4808	0,20	0,25	0,10	0,95
0,03-0,04	7811	0,18	0,23	0,08	7811	0,16	0,22	0,08	7811	0,17	0,22	0,08	0,94
0,04-0,05	6269	0,16	0,22	0,07	6269	0,15	0,21	0,07	6269	0,15	0,21	0,07	0,93
0,05-0,06	6285	0,14	0,20	0,06	6285	0,13	0,19	0,06	6285	0,13	0,19	0,06	0,92
0,06-0,07	6272	0,13	0,19	0,05	6272	0,12	0,18	0,05	6272	0,12	0,18	0,05	0,91
0,07-0,08	6351	0,12	0,17	0,05	6351	0,11	0,16	0,05	6351	0,11	0,17	0,05	0,91
0,08-0,09	6209	0,11	0,16	0,05	6209	0,10	0,15	0,04	6209	0,10	0,15	0,05	0,89
0,09-0,10	6265	0,10	0,15	0,04	6265	0,09	0,14	0,04	6265	0,10	0,15	0,04	0,88
0,10-0,20	61860	0,08	0,13	0,04	61860	0,07	0,12	0,03	61860	0,08	0,12	0,03	0,85
0,20-0,30	60569	0,07	0,10	0,03	60569	0,06	0,09	0,03	60569	0,06	0,09	0,03	0,81
0,30-0,40	60353	0,06	0,09	0,03	60353	0,05	0,08	0,02	60353	0,05	0,08	0,02	0,78
0,40-0,50	60177	0,05	0,08	0,02	60177	0,05	0,07	0,02	60177	0,05	0,07	0,02	0,77
0,50-0,60	59868	0,05	0,07	0,02	59868	0,05	0,07	0,02	59868	0,05	0,07	0,02	0,76
0,60-0,70	59625	0,05	0,07	0,02	59625	0,04	0,07	0,02	59625	0,04	0,06	0,02	0,75
0,70-0,80	59503	0,05	0,07	0,02	59503	0,04	0,06	0,02	59503	0,04	0,06	0,02	0,74
0,80-0,90	59326	0,05	0,07	0,02	59326	0,04	0,06	0,02	59326	0,04	0,06	0,02	0,73
0,90-1,00	59027	0,05	0,07	0,02	59027	0,04	0,06	0,02	59027	0,04	0,06	0,02	0,73
1,00-10,0	4886020	0,03	0,04	0,02	4886010	0,03	0,04	0,02	4886020	0,02	0,04	0,02	0,62
>10,0	22454729	0,01	0,01	0,01	22454696	0,01	0,02	0,01	22454729	0,01	0,01	0,01	0,31

FDL= correlação simples de Pearson utilizando o sinal (+ ou -) de  $D$  com o  $\sqrt{r^2}$  entre animais Canchim e do grupo genético MA.

Tabela 2. Número de pares de SNP, desequilíbrio de ligação médio ( $r^2$  médio), desvio-padrão (DP), mediana e fase do desequilíbrio de ligação (FDL) para animais Canchim e grupo genético MA analisados utilizando-se o painel de 777k.

Distância (Mb)	Canchim				MA				Canchim + MA				FDL
	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	Pares de SNP	$r^2$ médio	DP	Mediana	
<0,0025	407763	0,40	0,38	0,27	401469	0,33	0,33	0,21	409164	0,38	0,36	0,26	0,96
0,0025-0,0050	561174	0,37	0,37	0,23	552492	0,30	0,32	0,18	563114	0,34	0,35	0,22	0,95
0,0050-0,0075	531897	0,34	0,35	0,20	523596	0,27	0,31	0,15	533663	0,31	0,33	0,18	0,95
0,0075-0,01	519006	0,31	0,34	0,18	510908	0,25	0,29	0,13	520759	0,29	0,32	0,16	0,94
0,01-0,02	2007682	0,27	0,32	0,14	1976524	0,22	0,27	0,10	2014438	0,25	0,29	0,13	0,93
0,02-0,03	1946916	0,23	0,29	0,11	1915942	0,18	0,24	0,08	1953735	0,21	0,26	0,10	0,91
0,03-0,04	1912997	0,20	0,26	0,09	1882863	0,16	0,22	0,07	1919643	0,18	0,24	0,08	0,90
0,04-0,05	1893506	0,18	0,25	0,08	1863542	0,14	0,20	0,06	1900075	0,16	0,22	0,07	0,88
0,05-0,06	1878923	0,16	0,23	0,07	1848963	0,13	0,19	0,05	1885467	0,15	0,21	0,06	0,87
0,06-0,07	1866531	0,15	0,22	0,06	1836777	0,11	0,18	0,05	1873058	0,13	0,20	0,06	0,86
0,07-0,08	1857712	0,14	0,21	0,06	1828186	0,11	0,17	0,04	1864285	0,13	0,19	0,05	0,85
0,08-0,09	1852950	0,13	0,20	0,06	1823709	0,10	0,16	0,04	1859564	0,12	0,18	0,05	0,84
0,09-0,10	1848344	0,13	0,19	0,05	1819128	0,09	0,15	0,04	1855025	0,11	0,17	0,05	0,83
0,10-0,20	18280956	0,10	0,17	0,04	17988347	0,07	0,12	0,03	18345281	0,09	0,14	0,04	0,78
0,20-0,30	18079858	0,08	0,14	0,03	17787703	0,06	0,09	0,03	18143163	0,07	0,11	0,03	0,72
0,30-0,40	17964483	0,07	0,13	0,03	17674588	0,05	0,08	0,02	18027967	0,06	0,10	0,02	0,68
0,40-0,50	17862211	0,07	0,12	0,03	17575556	0,05	0,07	0,02	17926215	0,06	0,09	0,02	0,66

FDL= correlação simples de Pearson utilizando o sinal (+ ou -) de  $\sqrt{r^2}$  entre animais Canchim e do grupo genético MA.



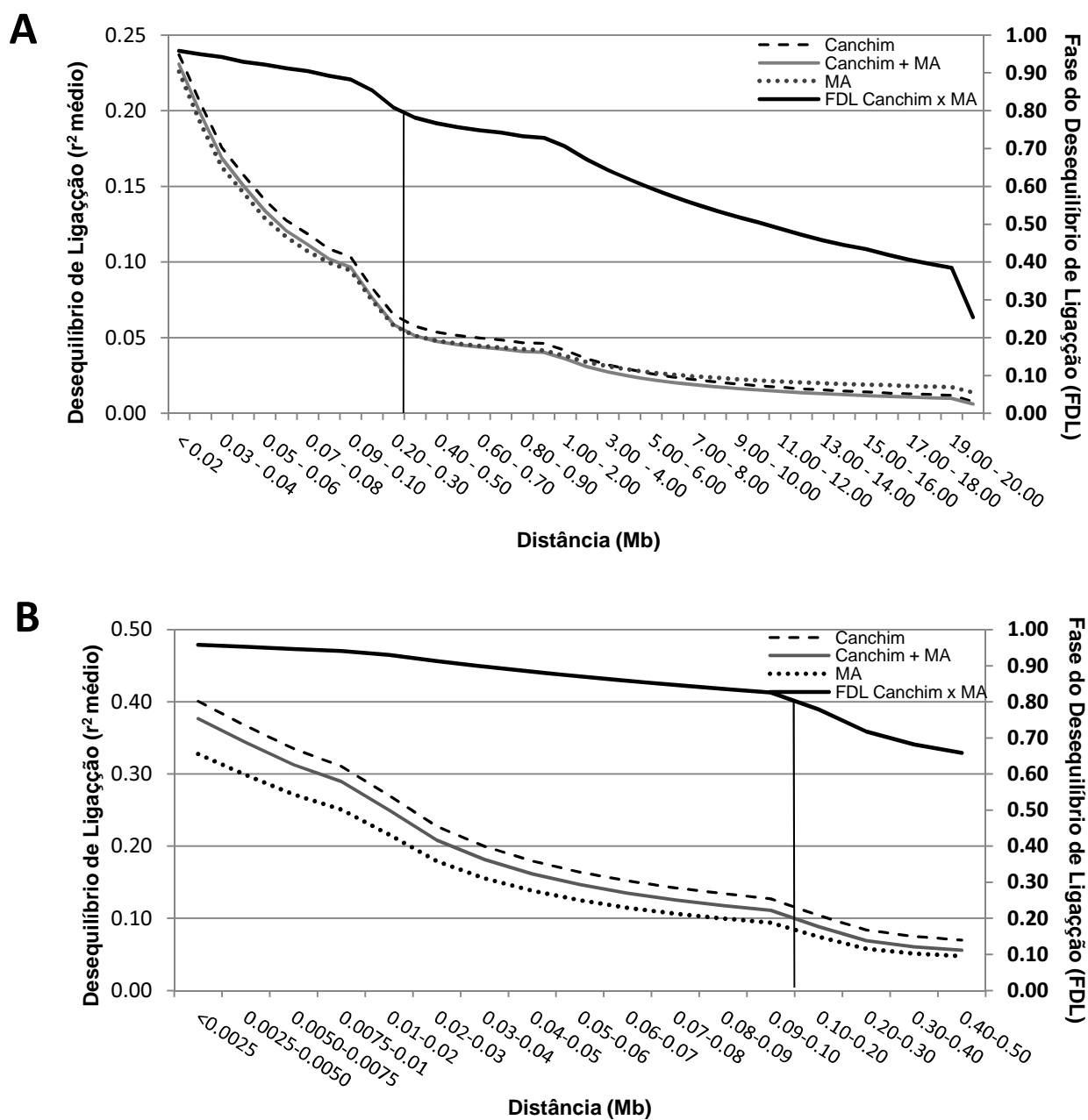


Figura 2. Desequilíbrio de ligação médio ( $r^2$  médio; eixo à esquerda) e fase do desequilíbrio de ligação (FDL; eixo à direita) em função da distância em megabase (Mb) entre os pares de SNP em animais Canchim, MA e Canchim+MA para o painel de 50k (A) e 777k (B). A linha na vertical representa o limiar (0,80) para FDL.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Desequilíbrio de ligação

De acordo com Ardlie; Kruglyak; Seielstad (2002), valores de  $r^2$  médio acima de 0,30 poderiam indicar forte desequilíbrio de ligação e seriam úteis

para o mapeamento de QTL. Valores de  $r^2$  superiores ou iguais ao acima citado foram observados para distâncias inferiores a aproximadamente 0,01 Mb em animais Canchim, 0,0025 Mb em animais MA e 0,0050 Mb para a análise conjunta de Canchim+MA (Tabela 2) quando utilizou-se o painel de 777k. Não foram observados valores de  $r^2$  acima de 0,30 em nenhuma das distâncias estudadas no painel de 50k (Tabela 1).

Espigolan et al. (2013) observaram valores de  $r^2$  acima de 0,30 em distâncias inferiores a 0,04 Mb em bovinos da raça Nelore genotipados com painel de alta densidade (777.962 SNPs). Lu et al. (2012) estudaram o  $r^2$  utilizando o painel de 51.620 SNPs para Angus, Charolês, e animais cruzados Angus-Charolês e verificaram que, em distâncias menores (0,00 – 0,03 Mb, 0,03 – 0,07 Mb e 0,07 – 0,10 Mb) o  $r^2$  foi igual a 0,29, 0,23 e 0,19 em Angus; 0,22, 0,16 e 0,12 em Charolês; e 0,21, 0,15, e 0,11 em animais cruzados. De Roos et al. (2008) utilizaram número variado de SNPs (entre 6 e 9 mil) e obtiveram valores de  $r^2$  iguais a 0,35, 0,25, 0,22, 0,14 e 0,06 para a distância entre marcadores iguais a 0,01, 0,02, 0,04, 0,10 e 1,00 Mb, para touros da raça Holandesa da Alemanha e Austrália, bovinos Angus da Austrália, bovinos da raça Holandesa da Nova Zelândia e vacas da raça Jersey, respectivamente.

Sargolzaei et al. (2008) utilizaram 5.564 SNPs para verificar o DL em bovinos da raça Holandesa na América do Norte e obtiveram  $r^2 = 0,58$  para a distância de 0,00 a 0,10 Mb, no entanto, o  $r^2$  decresceu rapidamente nas distâncias seguintes. Estes autores sugerem que seria preciso um painel de SNP com número denso de marcadores adjacentes para capturar informações úteis para o mapeamento fino do genoma e para a seleção genômica entre raças. Recentemente, Larmer (2012) estudou o  $r^2$  em bovinos Ayrshire, Holandês, Jersey, Pardo-Suíço e Guernsey utilizando o painel de SNPs de 50k; assim como para Ayrshire, Guernsey, e Holandês utilizando o painel de SNP de 777k. Este autor verificou maiores valores de  $r^2$  em todas as distâncias genômicas quando comparados aos resultados deste trabalho.

Deve-se ressaltar que maiores valores médios de  $r^2$  foram obtidos para o painel de alta densidade (777k) que possui SNP muito mais próximos e em menores distâncias quando comparado ao painel de 50k. Logo, a utilização do painel de 777k, que apresentou maior  $r^2$ , seria mais indicado para a seleção genômica do que o painel de 50k. Na Figura 2A e 2B é possível observar que o

$r^2$  em animais Canchim foi superior quando comparado ao de animais do grupo genético MA. Para distâncias superiores a 5,00 Mb (Figura 2A), o  $r^2$  em animais MA começou a sobrepor o  $r^2$  dos animais Canchim e Canchim+MA. Este resultado indicou que em maiores distâncias o  $r^2$  no genoma dos animais MA foi criado pelos cruzamentos entre as raças Canchim x zebu (que resultou em animais F1) e pelo cruzamento do F1 x Charolês (que gerou animais F2, chamado MA). Portanto, devido à recente mistura entre raças, pode-se esperar maior variabilidade dentro do grupo genético MA em relação aos animais Canchim. De acordo com Kim e Kirkpatrick (2009), a endogamia, a mistura recente entre raças e a seleção podem criar  $r^2$  em distâncias genômicas maiores em populações de animais domésticos.

Em geral, espera-se que não exista elevado grau de similaridade dos valores do desequilíbrio de ligação em diferentes raças devido ao próprio delineamento experimental (tamanho de amostras) e densidade dos marcadores utilizados (PRITCHARD; PRZEWORSKI, 2001). Fatores como a pressão de seleção (artificial ou natural) sofrida pelos animais, distância geográfica entre populações e o baixo número efetivo da população podem alterar as frequências alélicas. No entanto, quando determinadas raças proveem de ancestrais comuns ou ainda, quando novas raças são criadas a partir do cruzamento entre raças, é compreensível que exista certa coerência entre os valores de  $r^2$ .

#### **4.2. Fase do desequilíbrio de ligação**

Verificou-se que existe consistência ao longo do genoma para a FDL entre animais Canchim e do grupo genético MA para ambos os painéis estudados. Para o painel de 50k (Figura 2A) a FDL diminui linearmente, em média 1,90 %, ao longo das distâncias genômicas e no último segmento (19,00 Mb em diante) houve uma diminuição de 13,07 % em relação ao segmento anterior. De forma similar, a FDL para o painel de 777k foi elevada e decresceu ao longo do genoma. No entanto, a FDL foi pouco superior para o painel de 50k em relação ao painel de 777k para as mesmas distâncias genômicas. Isto pode ter ocorrido devido ao diferente número de comparações de pares de SNP em ambos os painéis. De acordo com De Roos et al. (2008), valores de FDL acima

do limiar de 0,80 representariam marcadores em alta consistência entre as populações. Pode-se observar que, para os painéis de 50k e 777k, este limiar foi atingido nas distâncias de 0,09 a 0,10 Mb e 0,20 a 0,30 Mb, respectivamente.

Resultados similares foram obtidos por Lu et al. (2012), que obtiveram elevada FDL (0,84, 0,81 e 0,77) em distâncias genômicas inferiores ou iguais a 0,07 Mb e que diminuíram conforme a distância entre os marcadores aumentava. De Roos et al. (2008) obtiveram FDL elevadas para os pares de marcadores em distâncias de até 0,01 Mb, e esta seguiu a mesma tendência de decréscimo à medida em que as distâncias aumentaram. No entanto, Sargolzaei et al. (2008) obtiveram FDL que se manteve entre 0,97 e 1,00 até distâncias de 10,00 Mb em estudo com animais da raça Holandesa provenientes dos Estados Unidos da América e do Canadá. Baseando-se nas elevadas correlações obtidas neste estudo pode-se supor que os SNPs e a fase de ligação em possíveis locos (ou genes) de interesse estejam altamente associados em ambos animais Canchim e MA. Além disto, se os SNPs possuem elevado  $r^2$  com um QTL em uma população (raça pura), a outra população (animais cruzados) possui grande chance de portar o mesmo QTL e seus efeitos (LU et al., 2012).

## 5. CONCLUSÃO

O painel de 777k mostrou-se mais indicado para ser utilizado na seleção genômica multirracial, pois apresentou maior desequilíbrio de ligação e persistência da fase do desequilíbrio de ligação entre bovinos da raça Canchim e do grupo genético MA. O mapeamento fino na busca por genes ou mutações causais seria eficiente em ambas as populações devido aos resultados encontrados. Assim, análises genômicas poderão auxiliar no processo de seleção e melhoramento genético da raça Canchim.

## 6. REFERÊNCIAS

ABCCAN. **Associação Brasileira de Criadores de Canchim**. Disponível em: <<http://www.abccan.com.br/canchim/index.php/a-raca.html>>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

ALENCAR, M. M. **Bovino - Raça Canchim: Origem e Desenvolvimento**. 1. ed. Brasília: Embrapa-DPU, 1988. 102p.

ANDRADE, P. C.; GROSSI, D. A.; PAZ, C. C. P.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; MUNARI, D. P. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 5, p. 480–485, 2008.

ARDLIE, K. G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nature Reviews: Genetics**, v. 3, n. 4, p. 299–309, 2002.

BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L. G.; ALENCAR, M. M. Random regression models on Legendre polynomials to estimate genetic parameters for weights from birth to adult age in Canchim cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 127, n. 4, p. 289–299, 2010.

BARBOSA, P. F. **O Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste**. Convenção Nacional da Raça Canchim. **Anais...**São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/44905/1/PROCIPFB2000.00028.pdf>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

BOHMANOVA, J.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S. Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. **BMC Genomics**, v. 11, n. 421, 2010.

BUZANSKAS, M. E.; GROSSI, D. A.; BALDI, F.; BARROZO, D.; SILVA, L. O. C.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; MUNARI, D. P.; ALENCAR, M. M. Genetic

associations between stayability and reproductive and growth traits in Canchim beef cattle. **Livestock Science**, v. 132, p. 107–112, 2010.

DE ROOS, A P. W.; HAYES, B. J.; SPELMAN, R. J.; GODDARD, M. E. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1503–1512, 2008.

ESPIGOLAN, R.; BALDI, F.; BOLIGON, A. A.; SOUZA, F. R. P.; GORDO, D. G. M.; TONUSSI, R. L.; CARDOSO, D. F.; OLIVEIRA, H. N.; TONHATI, H.; SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; CARVALHEIRO, R.; FERRO, J. A.; ALBUQUERQUE, L. G. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC genomics**, v. 14, p. 305, 2013.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J.; MEUWISSEN, T. H. E. Genomic selection in livestock populations. **Genetics Research**, v. 92, p. 413–421, 2010.

HILL, W. G. G.; ROBERTSON, A. Linkage Disequilibrium in Finite Populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 38, p. 226–231, 1968.

KIM, E. S.; KIRKPATRICK, B. W. Linkage disequilibrium in the North American Holstein population. **Animal Genetics**, v. 40, n. 3, p. 279–288, 2009.

KRUGLYAK, L. Prospects for whole-genome linkage disequilibrium mapping of common disease genes. **Nature Genetics**, v. 22, n. 2, p. 139–144, 1999.

LARMER, S. **Extent of Linkage Disequilibrium, Consistency of Gametic Phase and Imputation Accuracy Within and Across Canadian Dairy Breeds**. Dissertação, University of Guelph, 2012.

LU, D.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; LI, C.; VANDER VOORT, G.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S.; MILLER, S. P. Linkage disequilibrium in Angus, Charolais, and Crossbred beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 3, n. 152, 2012.

MEUWISSEN, T. H.; HAYES, B. J.; GODDARD, M. E. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics**, v. 157, n. 4, p. 1819–1829, 2001.

PEREIRA, A. P.; ALENCAR, M. M.; OLIVEIRA, H. N.; REGITANO, L. C. A. Association of GH and IGF-1 polymorphisms with growth traits in a synthetic beef cattle breed. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 2, p. 230–236, 2005.

PRITCHARD, J. K.; PRZEWORSKI, M. Linkage disequilibrium in humans: models and data. **American Journal of Human Genetics**, v. 69, p. 1–14, 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria, 2011. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

SARGOLZAEI, M.; SCHENKEL, F. S.; JANSEN, G. B.; SCHAEFFER, L. R. Extent of linkage disequilibrium in Holstein cattle in North America. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 5, p. 2106–2117, 2008.

VAN DOORMAAL, B. Increased Rates of Genetic Gain with Genomics. **Canadian Dairy Network**, p. 1–3, 2012.

ZHAO, H.; NETTLETON, D.; SOLLER, M.; DEKKERS, J. C. M. Evaluation of linkage disequilibrium measures between multi-allelic markers as predictors of linkage disequilibrium between markers and QTL. **Genetical Research**, v. 86, n. 1, p. 77–87, 2005.

ZIMIN, A. V.; DELCHER, A. L.; FLOREA, L.; KELLEY, D. R.; SCHATZ, M. C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.; YORKE, J. A.; SALZBERG, S. L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology**, v. 10, n. 4, p. r42, 2009.

### **CAPÍTULO 3 - ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E CARACTERÍSTICAS DE CRESCIMENTO EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM**

**RESUMO** - Estudos de associação genômica têm se tornando uma poderosa ferramenta para a identificação de regiões do genoma associadas a características de interesse econômico. Fatores como a redução dos custos de genotipagem e a alta densidade dos painéis de marcadores do tipo SNP ("Single Nucleotide Polymorphism") possibilitaram que esta tecnologia seja utilizada em larga escala. Assim, as informações geradas nestes estudos poderiam auxiliar nos programas de melhoramento e contribuiria para identificar animais geneticamente superiores em idades jovens e, conseqüentemente, reduziria o intervalo de gerações. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação entre marcadores do tipo SNP com as características de peso corporal ao nascimento (PN), ao desmame (PD) e ao sobreano (PS) em bovinos de raça sintética. Utilizaram-se 285 animais da raça Canchim (proporção 62,50% Charolês - 37,50% Zebu) e 114 animais do grupo genético "MA" (proporção aproximada de 65,60% Charolês - 34,40% Zebu) genotipados com o painel de alta densidade (BovineHD - Illumina® bead chip). Para a análise de associação genômica utilizou-se o método "Generalized Quasi-Likelihood Score" que considera a regressão logística para associar informações fenotípicas do indivíduo (tratado como co-variável) com o genótipo (tratado como variável resposta). Observaram-se associações com PN nos BTA ("Bos taurus chromosomes") 4 e 9; com PD nos BTA 4, 6 e 11; e com PS nos BTA 7, 22, 25 e 27. Foram observados 4, 12 e 10 SNPs associados a PN, PD e PS, respectivamente. Verificou-se que estes 26 SNPs encontram-se em regiões próximas a 26 genes, sendo destacados os genes DPP6 (*dipeptidyl-peptidase 6*, associado ao PN e PD) e CLEC3B (*C-type lectin domain family 3 member B*, associado ao PS) que atuam no desenvolvimento do sistema nervoso central e na mineralização óssea, respectivamente. Os demais genes encontrados parecem estar relacionados à manutenção celular, transporte de íons e na produção de energia. A metodologia utilizada neste trabalho foi capaz de identificar regiões cromossômicas associadas ao PN, PD e PS. As regiões identificadas poderão auxiliar no processo de seleção destas características, já



contempladas no programa de avaliação genética da raça Canchim. Os genes localizados nestas regiões fazem parte de processos biológicos e de funções moleculares importantes na manutenção do organismo e desenvolvimento corporal, sendo genes candidatos para as características estudadas. Estudos de validação poderão confirmar as associações genômicas observadas neste trabalho.

**Palavras-chave:** bovinos de corte, melhoramento genético, SNP, substituição alélica

## 1. INTRODUÇÃO

Medidas de peso corporal em bovinos de corte são importantes para a avaliação do crescimento e desenvolvimento dos animais, assim como para a tomada de decisões quanto ao manejo reprodutivo, nutricional e profilático a serem conduzidos nas propriedades rurais. Características de crescimento são tradicionalmente incluídas nos critérios de seleção dos programas de melhoramento genético de bovinos de corte, pois estas estão diretamente relacionadas à produção de carne e apresentam estimativa de herdabilidade de moderada à alta magnitude, indicando que o processo de seleção para estas características é eficiente (FRIZZAS et al., 2009).

Os exemplos mais comuns de características de crescimento utilizadas para a seleção são mensurações de peso corporal que vão do nascimento do indivíduo até idades mais avançadas, como a idade adulta. A correlação genética existente entre tais características varia de moderada a alta magnitude (BALDI; ALENCAR; ALBUQUERQUE, 2010). Isto indica que genes de ação aditiva que atuam em uma das características podem ser os mesmo que atuam nas demais. Neste contexto é desejável que os indivíduos apresentem elevado potencial para ganho de peso. No entanto, o peso ao nascimento é uma característica utilizada para monitorar o peso dos bezerros e evitar a ocorrência de partos distócicos, principalmente em fêmeas primíparas (MEE, 2008).

A bovinocultura no Brasil conta com diversas raças especializadas na produção de carne, dentre estas, a raça sintética Canchim, oriunda de

cruzamentos entre animais da raça Charolês e zebuínos. Esta raça foi desenvolvida na década de 40 nas dependências da fazenda Canchim, pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada no município de São Carlos, no estado de São Paulo. O esquema de acasalamento que apresentou resultados satisfatórios para a época considerou animais com proporção 62,5% Charolês e 37,5% Zebu (VIANNA; PIMENTEL-GOMES; SANTIAGO, 1978). Desde então, diferentes esquemas de cruzamento foram estudados com o objetivo de produzir animais Canchim com diferentes proporções Charolês-Zebu e para obter maior variabilidade genética na população. Um destes esquemas é utilizado para gerar animais do grupo genético “MA”, que provêm do acasalamento entre animais Canchim e Zebu, resultando em animais F1 pertencentes ao grupo genético “A”. Por sua vez, este grupo genético é acasalado com animais da raça Charolês, gerando o grupo genético “MA” com proporção aproximada de 65,6% Charolês e 34,4% Zebu. O acasalamento entre animais “MA” ou entre animais “MA” e Canchim irão gerar animais da raça Canchim (MACHADO et al., 2003; ANDRADE et al., 2008). Estes esquemas de cruzamentos auxiliaram a expandir a base genética da raça Canchim (BARBOSA, 2000) e maiores detalhes sobre a raça e outros esquemas de acasalamento podem ser encontrados na literatura (ALENCAR, 1988; BALDI; ALBUQUERQUE; ALENCAR, 2010; BUZANSKAS et al., 2010).

Os atuais avanços tecnológicos aliados ao fator custo-benefício possibilitaram a utilização de painéis densos de polimorfismos de nucleotídeo único (“Single Nucleotide Polymorphism” – SNP) para os estudos de associação genômica em grande escala, o que possibilita sua aplicação para auxiliar no melhoramento genético de espécies domésticas (ZHANG et al., 2012). Os SNPs são alterações mais elementares da molécula de DNA, ou seja, são polimorfismos de nucleotídeos únicos da cadeia de bases nitrogenadas espalhadas ao longo do genoma. As mutações mais comuns são as transições, em que ocorrem trocas de uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina, porém, menos frequentes são as transversões que ocorrem quando há troca de uma purina por uma pirimidina, ou vice-versa (VIGNAL et al., 2002). Os estudos de associação genômica buscam combinar informações de genótipos, fenótipos e de pedigree dos

indivíduos para identificar regiões do genoma que influenciam características de interesse.

Snelling et al. (2010) utilizaram animais provenientes de diferentes cruzamentos (*Bos taurus taurus*) com aptidão para produção de carne em estudos de associações genômicas com características de crescimento. Estes autores observaram associações genômicas para peso ao nascimento, ao desmame e ao ano localizados, principalmente, no BTA (“Bos taurus chromosome”) 6 e 11. No BTA6, entre 25 e 53 cM (centimorgan), foram relatados em outros estudos QTL (“Quantitative Trait Loci”) associados ao peso ao nascimento (CASAS et al., 2000; GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009), ganho de peso pré e pós desmame (KNEELAND et al., 2004) e peso ao ano (CASAS et al., 2000). Nesta região também foram descritos QTL para bezerros natimortos (KÜHN et al., 2003) e para dificuldade de parto (SCHROOTEN et al., 2000) em bovinos da raça holandesa, demonstrando novamente que existem associações entre o peso ao nascimento e a ocorrência de partos distócicos e a importância de se monitorar tais características.

Na raça Canchim, Andrade et al. (2008) observaram associação de marcadores microssatélites do gene *insulin-like growth factor 1* (IGF1), localizado no BTA5, com valores genéticos estimados para peso ao nascimento e ao desmame ajustado para 240 dias de idade. Machado et al. (2003) observaram QTL para peso ao nascimento em bovinos Canchim, localizado entre 80,96 e 90,84 cM.

O objetivo deste trabalho foi associar os valores genéticos para as características peso ao nascimento, ao desmame e ao sobreano com os polimorfismos presentes no genoma de animais da raça Canchim e do grupo genético MA genotipados com painel de alta densidade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais genotipados e características estudadas**

Os animais genotipados por meio do painel de alta densidade (BovineHD - Illumina® bead chip) incluíram 194 machos e 205 fêmeas, sendo 285 animais da raça Canchim e 114 animais do grupo genético MA filhos de 49 touros e 355 vacas. Estes animais nasceram entre 1999 e 2005 e são

provenientes de sete fazendas localizadas nos estados de São Paulo e Goiás. A matriz de parentesco dos animais genotipados constituiu-se de 4095 animais. A endogamia média para animais da raça Canchim e do grupo genético MA foram iguais a 0,003 e 0,0002, respectivamente. Para a população, a endogamia média foi igual a 0,02.

Os valores genéticos das características estudadas foram fornecidos pela Associação Brasileira de Criadores de Canchim (ABCCAN) e Embrapa-Geneplus (Programa Embrapa de Melhoramento de Gado de Corte). A avaliação genética considerou a padronização dos pesos ao desmame e sobreano para os 210 e 420 dias de idade, respectivamente (ABCCAN-EMBRAPA-GENEPLUS, 2013). Os valores genéticos para peso ao nascimento (PN), ao desmame (PD) e ao sobreano (PS) foram estimados por meio de análise multi-característica utilizando-se o programa REMLF90 (MISZTAL, 2008), sob modelo animal. Os efeitos fixos considerados na formação dos grupos de contemporâneos para a estimação de valores genéticos foram: sexo, ano e estação de nascimento, fazenda de criação, grupo genético e regime alimentar. A idade da vaca ao parto e idade do animal à mensuração foram utilizadas, quando pertinentes, como co-variáveis. Os valores genéticos utilizados neste estudo foram estimados considerando matriz de parentesco com cerca de 320 mil indivíduos.

## **2.2. Controle de qualidade de genótipos**

A edição dos dados foi realizada utilizando os softwares SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e programas criados em linguagem C++. Genótipos foram identificados de acordo com o número de alelos: AA = "0", AB = "1" e BB = "2". Para o controle de qualidade dos genótipos foram excluídos SNPs com escore de leitura ("genotype calling score") inferiores a 0,15; SNPs com desvios significativos ( $P < 0,00001$ ) do equilíbrio de Hardy-Weinberg; SNPs com proporção de heterozigotos ( $> 15\%$ ); SNPs com frequência alélica ("minor allele frequency") inferiores a 5%; e taxa de leitura ("call rate") para SNPs e animais inferiores a 90%. Apenas os cromossomos autossômicos e SNPs com posições

conhecidas foram utilizados para análises de associação. Após o controle de qualidade, 392 registros de animais permaneceram no arquivo de dados.

### 2.3. Análise de associação

Para a análise de associação foi utilizado o método “Generalized Quasi-Likelihood Score” (GQLS), desenvolvido por Feng et al. (2011) e implementado ao programa SLEUTH pelo Dr. Mehdi Sargolzaei (University of Guelph, Canadá). O método GQLS utiliza o modelo de regressão logística para associar os fenótipos de uma característica (tratados como co-variável) aos genótipos (tratados como variável resposta). Este método permite que a distribuição dos valores fenotípicos não seja especificada, sendo possível a análise tanto de variáveis binárias quanto quantitativas. Nesta metodologia considera-se  $X = (X_1, \dots, X_n)'$ , em que  $X_i$  representa os valores fenotípicos para o  $i^{\text{ésimo}}$  animal. Para os dados genotípicos considera-se  $Y = (Y_1, \dots, Y_n)'$  em que  $Y_i = \frac{1}{2} * (\text{número de alelos para o genótipo do animal } i)$ . O genótipo do animal sendo codificado como “0”, “1” ou “2” suas respectivas proporções serão 0,  $\frac{1}{2}$  e 1. A frequência alélica esperada do SNP com a característica  $X_i$  é representada por  $\mu$ , em que  $\mu = (\mu_1, \dots, \mu_n)' = E(X | Y)$ , desta forma  $0 < \mu_i < 1$ . É importante ressaltar que a informação utilizada dependerá do tipo de análise desejada, podendo ser utilizado o próprio fenótipo do indivíduo, ou ainda, a diferença esperada na progênie (DEP), valores genéticos (VG) e valores derregredidos da DEP ou do VG. Neste trabalho foram utilizadas apenas informações de VG dos animais genotipados, pois a estrutura de dados não permitia a deregressão dos VGs devido às baixas acurácias estimadas. Outro aspecto desta metodologia é que as significâncias para cada SNP são obtidas individualmente.

Para associar  $\mu_i$  com  $X_i$ , a seguinte regressão logística foi definida:

$$\mu_i = E(Y_i | X_i) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}$$

em que  $\beta_0$  é o termo constante e  $\beta_1$  é o coeficiente angular.

O teste de hipótese para avaliar se o SNP está associado à característica considera:

$H_0 : \beta_1 = 0$ , o SNP não está associado com a característica;

$H_1 : \beta_1 \neq 0$ , o SNP está associado com a característica.

Sob a hipótese de nulidade,  $\mu_i$  pode ser interpretado por  $\mu_i = \frac{e^{\beta_0}}{1 + e^{\beta_0}}$ , para todos os  $i = 1, \dots, n$ . O vetor médio de  $Y$  não depende mais de  $X_i$  e torna-se  $\mu = E(Y) = \mu 1$ , em que 1 é um vetor de “1’s”. A solução de equação de “quasi-likelihood score” resulta em estimativa para  $\mu$ , sendo esta  $\hat{\mu} = (1'A^{-1}1)^{-1}1'A^{-1}Y$ , em que  $A^{-1}$  é a inversa da matriz de parentesco dos indivíduos.

Para se obter o “generalized quasi-likelihood scoring”, a estatística  $W_G$  pode ser calculada como apresentado a seguir:

$$W_G = \frac{2}{\hat{\mu}(1-\hat{\mu})} [X'A^{-1}(Y - \hat{\mu}1)] \times [X'A^{-1}X - (X'A^{-1}1)(1'A^{-1}1)^{-1}(1'A^{-1}X)]^{-1} \times [X'A^{-1}(Y - \hat{\mu}1)]$$

De acordo com Heyde (1997), sob a hipótese de nulidade,  $W_G$  segue distribuição qui-quadrado com um grau de liberdade resultando em p-valores para cada SNP. Esta metodologia propõe a correção para o problema da estratificação populacional por considerar a matriz de parentesco nos cálculos da estatística  $W_G$ . Logo, se subpopulações existirem, estas serão corrigidas para sua respectiva matriz de parentesco. As posições dos SNPs utilizadas neste estudo pertencem ao mapa UMD\_3.1 bovine assembly (ZIMIN et al., 2009).

#### 2.4. Correção para testes múltiplos

Para definição dos SNPs significativos, utilizou-se o limiar de 10% corrigido para o número de testes realizados (para cada SNP) por cromossomo, de acordo com o critério da razão de falsas descobertas (false discovery rate - FDR). Para o cálculo da FDR, os p-valores foram ordenados de forma decrescente e, em seguida, aplicou-se a fórmula de ajuste para testes múltiplos (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995):

$$q < mP(i)/i$$

em que  $q$  é o nível de significância desejado,  $m$  é o número total de SNPs,  $P$  é o p-valor do SNP  $i$ . A significância do teste será atingida quando for encontrado SNP com valor de  $mP(i)/i$  inferior ao valor de  $q$ . Estes SNPs e os subsequentes foram considerados significativos ao nível de significância estabelecido em  $q$ .

## 2.5. Efeito de substituição alélica

Para verificar efeito aditivo dos SNPs que foram significativos na análise por meio da metodologia de GQLS, realizou-se a regressão linear simples do número de cópias para um dado alelo sobre os valores genéticos das características estudadas. O modelo utilizado foi:

$$y_{jk} = \mu + \sum_{j=1}^s \beta_j x_j + e_{jk}$$

em que  $y_{jk}$  é o valor genético estimado para cada característica;  $s$  é o número de alelos menos um;  $\mu$  é média dos valores genéticos;  $x$  é o número de cópias para um dado alelo (0, 1 ou 2);  $\beta$  é o coeficiente de regressão linear (efeito de substituição alélica); e  $e$  é o efeito residual. Para se definir quais seriam os alelos desejáveis foram verificadas as médias dos valores genéticos por cada genótipo.

## 2.6. Identificação e função dos genes

A identificação e posicionamento dos SNPs no genoma bovino foram realizadas por meio de pesquisa nas bases de dados “National Center for Biotechnology Information” (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nestas bases de dados foi possível verificar se os SNPs localizavam-se em regiões inter ou intragênica. Verificou-se a presença de genes no intervalo de 0,25 Mb (megabase) para SNPs que estivessem em região intragênica. A classificação dos genes quanto à função biológica foi realizada por meio da base de dados “The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)

v. 6.7” (DAVID - <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) e “Uniprot” (<http://www.uniprot.org/uniprot/>). Para a pesquisa de QTL, foi utilizada a base de dados AnimalQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>).

### 3. RESULTADOS

Na Tabela 1 é apresentada a estatística descritiva dos valores genéticos de PN, PD e PS utilizados para análise de associação genômica. Na Tabela 2 é apresentado o número de SNPs no arquivo original de dados, o tamanho dos autossomos, número de SNPs restantes após o controle de qualidade e número de SNPs significativos ( $FDR \leq 10\%$  por autossomo) após análise pelo método GQLS.

Tabela 1. Estatística descritiva dos valores genéticos (VG) de peso ao nascimento (PN), ao desmame (PD) e ao sobreano (PS) em bovinos da raça Canchim e grupo genético MA.

Característica	Animais	Média	Desvios-Padrão	Valores	
				Mínimo	Máximo
VG_PN (kg)	397	0,20	1,34	-4,32	6,15
VG_PD (kg)	397	1,24	5,67	-14,87	23,12
VG_PS (kg)	397	0,95	8,98	-24,38	29,24

Em média, foram excluídos 9,45% dos SNPs após o controle de qualidade de genótipos, sendo a menor perda no BTA22 e a maior no BTA13. Associações genômicas foram observadas ao longo de cada autossomo para todas as características estudadas. O maior número de SNPs significativos foi observado para PD (12 SNPs), seguidos por PS (10 SNPs) e PN (4 SNPs). No BTA27 não foram observados genes anotados próximos aos SNPs significativamente associados com PS. Nas Tabelas 3, 4 e 5 são apresentados os SNPs e sua significância, genes e o efeito de substituição alélica para PN, PD e PS, respectivamente.

Nas Figuras 1, 2 e 3 são apresentados os gráficos “Manhattan plot” para PN, PD e PS, respectivamente. Nestes gráficos, SNPs significativos encontram-se acima do limiar de significância ( $FDR \leq 10\%$ ). Foram observadas associações genômicas ao longo de cada autossomo para todas as



características estudadas. Não foram observados SNPs significativos ao longo do genoma pelos testes de Bonferroni e FDR.

Tabela 2. Número de polimorfismos de nucleotídeo único no arquivo original de dados (SNP total), tamanho do autossomo (BTA) em unidade de mega base (Mb), número de SNP após o controle de qualidade (SNP CQ) e número de SNP significativos ( $P < 0,00001$ ) considerando-se o “false discovery rate” ( $FDR \leq 10\%$ ) por autossomo para peso ao nascimento (PN), ao desmame (PD) e ao sobreano (PS).

BTA	SNP Total	Tamanho (Mb)	SNP CQ	PN	PD	PS
1	46890	158,31	42331	0	0	0
2	40354	137,01	36802	0	0	0
3	35984	121,39	32464	0	0	0
4	35357	120,63	32187	1	1	0
5	35251	121,18	31541	0	0	0
6	35821	119,42	32799	0	2	0
7	33552	112,60	30247	0	0	2
8	33834	113,35	30611	0	0	0
9	31351	105,67	28856	3	0	0
10	30868	104,28	28134	0	0	0
11	32252	107,27	29252	0	9	0
12	26636	91,12	23880	0	0	0
13	23840	84,21	21206	0	0	0
14	25010	84,03	22441	0	0	0
15	25188	85,23	22408	0	0	0
16	24428	81,69	22284	0	0	0
17	22456	75,15	20390	0	0	0
18	19583	65,98	17803	0	0	0
19	19091	63,96	17246	0	0	0
20	21653	71,95	19697	0	0	0
21	21395	71,57	19360	0	0	0
22	18150	61,29	16807	0	0	2
23	15421	52,46	13848	0	0	0
24	18762	62,54	17182	0	0	0
25	13026	42,82	11795	0	0	1
26	15355	51,64	13957	0	0	0
27	13304	45,40	11938	0	0	5
28	13178	46,24	12032	0	0	0
29	14916	51,18	13280	0	0	0
Total	742906	2509,57	672778	4	12	10

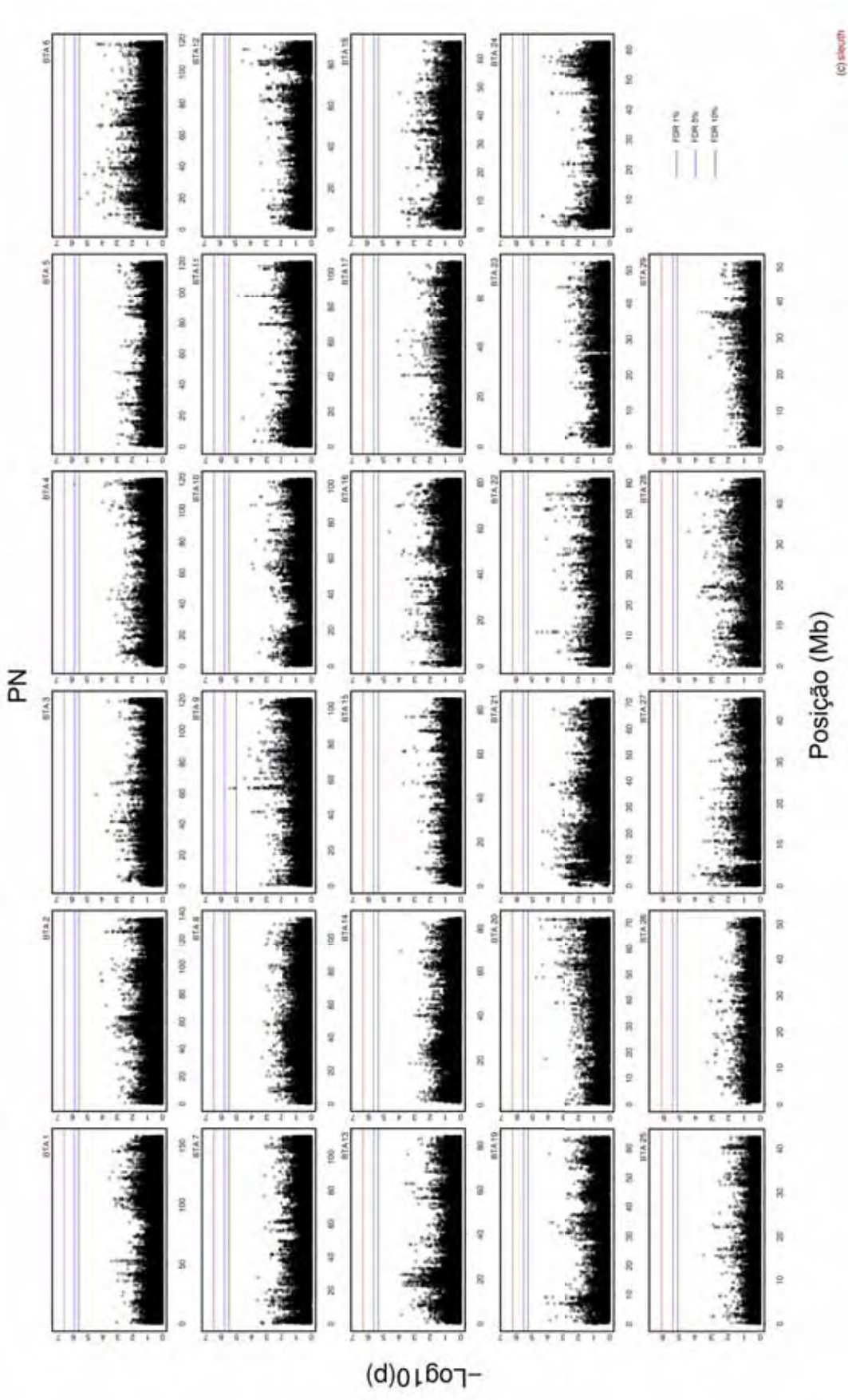


Figura 1. Gráfico de Manhattan utilizando p-valores (p) transformados para  $-\log_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica peso ao nascimento (PN). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 4 e 9).

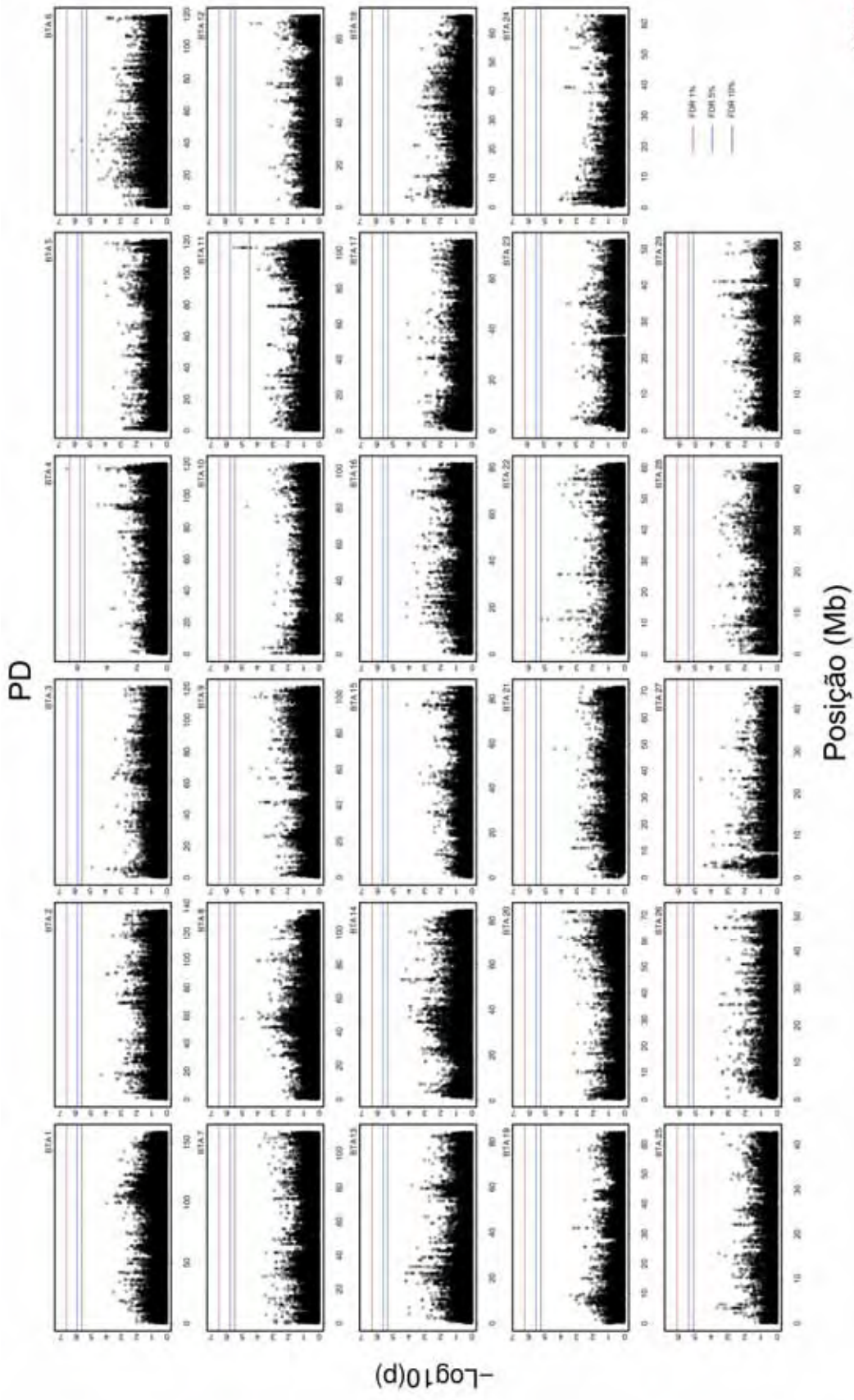


Figura 2. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores (p) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica peso ao desmame (PD). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 4, 6 e 11).

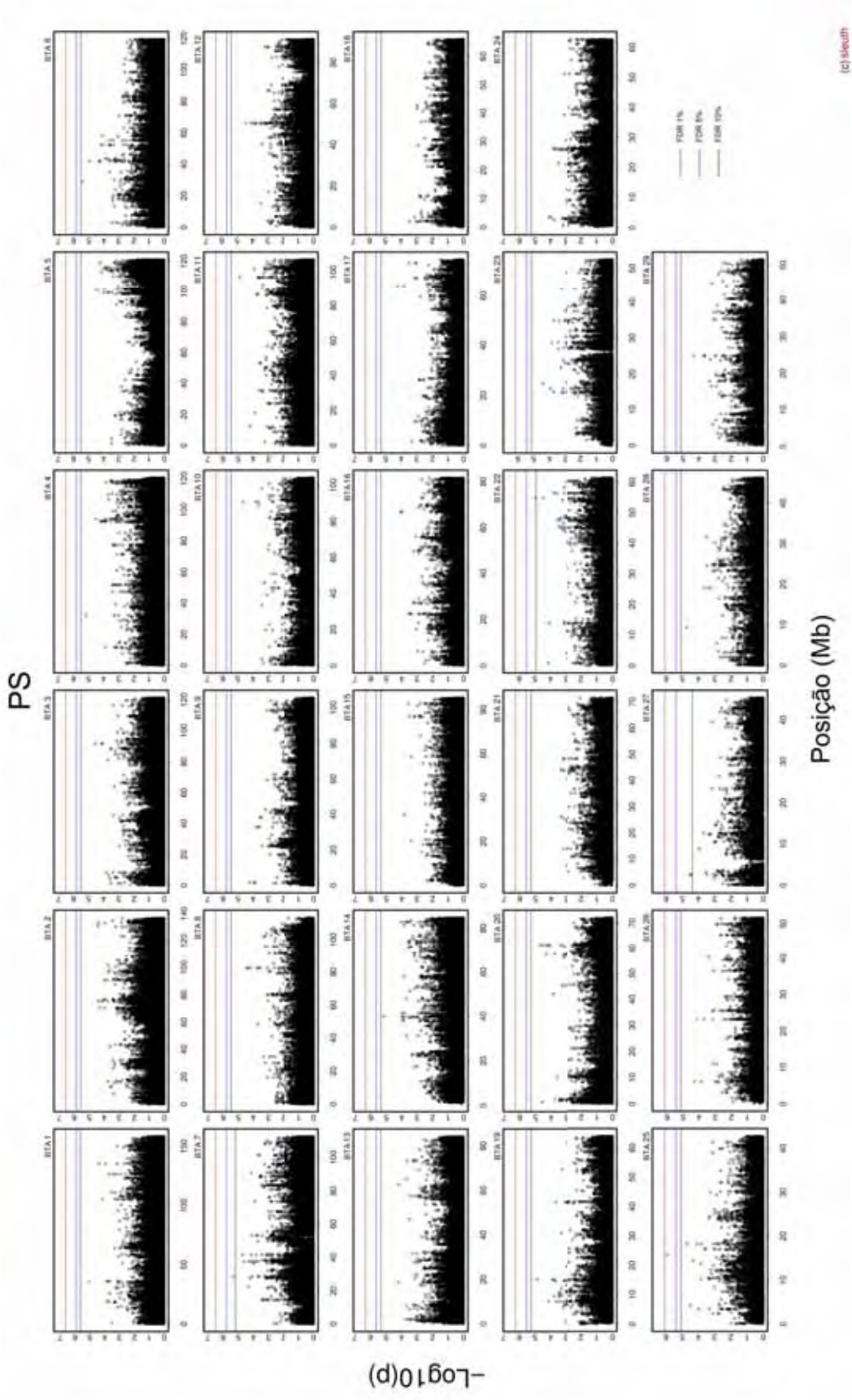


Figura 3. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores (p) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica peso ao sobreano (PS). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 7, 22, 25 e 27).

Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica, por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para peso ao nascimento (PN) em bovinos Canchim e grupo genético MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

GQLS										Regressão simples por loco	
SNP	SNP Referência	BTA	Posição (bp)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (kg)*
BovineHD0400034243	rs43421095	4	117400491	<b>A,C</b>	DPP6	Íntron	392	0,2957	1,39E-06	5%	-0,5929
BovineHD0900015114	rs135754703	9	55075535	<b>A,C</b>	LOC783932, MANEA	Intragênica	389	0,4552	8,22E-06	10%	-0,41612
BovineHD0900015117	rs136146400	9	55078557	<b>A,G</b>	LOC783932, MANEA	Intragênica	387	0,4563	7,23E-06	10%	-0,41976
BovineHD0900015123	rs109313268	9	55103057	<b>C,T</b>	LOC783932, MANEA	Intragênica	390	0,4962	3,98E-06	10%	-0,44946

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; bp = Pares de bases.

Tabela 4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica, por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para peso ao desmame (PD) em bovinos Canchim e grupo genético MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

GQLS										Regressão simples por loco	
SNP	SNP Referência	BTA	Posição (bp)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (kg)*
BovineHD0400034243	rs43421095	4	117400491	<b>A,C</b>	DPP6	Íntron	392	0,2957	1,91E-07	1%	-2,84898
BovineHD0600009740	rs135156506	6	35008291	<b>C,T</b>	FARSB	Promotora	392	0,1582	7,32E-07	5%	-2,17934
BovineHD0600011373	rs135591504	6	41978318	<b>C,T</b>	KCNIP4	Íntron	392	0,2273	2,74E-06	5%	1,55340
BovineHD1100030039	rs136337296	11	103096174	<b>C,T</b>	GTF3C5	Íntron	370	0,365	1,81E-05	10%	1,82227
BovineHD1100030045	rs109348820	11	103154983	<b>C,T</b>	RALGDS	Íntron	389	0,3916	2,02E-05	10%	1,76133
BovineHD1100030046	rs133132366	11	103157389	<b>C,T</b>	RALGDS	Íntron	387	0,4077	1,28E-05	10%	1,81074
BovineHD1100030047	rs134657108	11	103162503	<b>A,G</b>	RALGDS	Íntron	391	0,4177	1,26E-05	10%	1,90613
BovineHD1100030048	rs136054783	11	103167055	<b>A,G</b>	RALGDS	Íntron	388	0,4066	8,40E-06	10%	1,79279
BovineHD1100030049	rs136961684	11	103170500	<b>A,G</b>	RALGDS	Íntron	391	0,4076	1,08E-05	10%	-1,80009
BovineHD1100030050	rs109945520	11	103171584	<b>G,T</b>	RALGDS	Íntron	380	0,4047	1,17E-05	10%	1,80350
BovineHD1100030051	rs109524492	11	103172572	<b>C,T</b>	RALGDS	Íntron	391	0,4099	5,74E-06	10%	1,63200
BovineHD1100030052	rs110048168	11	103174303	<b>A,C</b>	RALGDS	Íntron	391	0,3886	3,05E-06	10%	-1,66682

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; bp = Pares de bases.

Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica, por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para peso ao sobreano (PS) em bovinos Canchim e grupo genético MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

SNP	SNP Referência	BTA	Posição (bp)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Regressão simples por loco	
											Efeito de substituição alélica (kg)*	
BovineHD4100005871	rs29011435	7	28515652	<b>C,T</b>	MARCH3, LMNB1, PHAX, ALDH7A1, C7H5orf48, GRAMD3, MIR2458	Intragênica	392	0,374	4,62E-06	10%	3,59660	
BovineHD0700008047	rs134201365	7	28522539	<b>G,T</b>	MARCH3, LMNB1, PHAX, ALDH7A1, C7H5orf48, GRAMD3, MIR2458	Intragênica	392	0,375	4,62E-06	10%	-3,59660	
BovineHD2200015541	rs109581958	22	54624190	<b>C,T</b>	LARS2, TMEM158, CDCP1, LOC100294787, LOC614114, LOC100295131, ZDHHC3, LOC100847343, LOC100847326, CLEC3B	Intragênica	392	0,2335	1,09E-05	10%	-3,61775	
BovineHD2200015542	rs110246286	22	54625467	<b>C,T</b>	LARS2, TMEM158, CDCP1, LOC100294787, LOC614114, LOC100295131, ZDHHC3, LOC100847343, LOC100847326, CLEC3B	Intragênica	392	0,2348	1,09E-05	10%	-3,61775	
BovineHD2500004433	rs109242147	25	15697543	<b>A,G</b>	XYLT1	Íntron	386	0,1192	1,26E-06	5%	3,24823	
BovineHD2700000854	rs109646351	27	2614991	<b>A,G</b>	-	Não anotados	392	0,4456	3,05E-05	10%	-3,91546	
BovineHD2700000858	rs109822265	27	2619242	<b>A,C</b>	-	Não anotados	392	0,4454	3,05E-05	10%	3,91546	
BovineHD2700000859	rs110603636	27	2620088	<b>A,C</b>	-	Não anotados	392	0,4456	3,05E-05	10%	3,91546	
BovineHD2700000860	rs110994026	27	2620961	<b>C,T</b>	-	Não anotados	392	0,4494	3,46E-05	10%	-3,85715	
BovineHD2700000861	rs134791735	27	2623000	<b>G,T</b>	-	Não anotados	392	0,4443	3,05E-05	10%	3,91546	

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; bp = Pares de bases.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Peso ao nascimento

Foram observadas associações genômicas do SNP rs43421095, localizado no gene DPP6 (*dipeptidyl-peptidase 6*), com PN. Segundo Wada et al. (1992) este gene foi identificado no cérebro de bovinos e ratos e está envolvido no processo biológico de proteólise e também está envolvido nos processos fisiológicos do desenvolvimento do sistema nervoso central. McClure et al. (2010) descreveram QTL localizados entre 107,10 e 119,90 cM e 104,90 e 119,90 cM no BTA4 associado ao peso mensurado aos 365 dias de idade e à facilidade de parto em bovinos da raça Angus. Schrooten et al. (2000) observaram QTL associado ao período de gestação em bovinos leiteiros localizado entre 102,10 e 124,80 cM.

O gene MANEA (*mannosidase, endo-alpha*), localizado no BTA9, possui função molecular de manosidase, atuando como catalisador na hidrólise da manose (carboidrato) (KUKUSHKIN et al., 2012). Para o gene LOC783932 (*small ubiquitin-related modifier 1-like*) não foram observados processos biológicos na literatura consultada. Alexander et al. (2007) identificaram QTL associados ao ganho médio diário pós-desmame, localizado entre 48,73 e 80,26 cM. Casas et al. (2003) e McClure et al. (2010) observaram QTL associados ao escore de marmoreio e perímetro escrotal localizados entre 46,00 e 76,00 cM e 42,48 e 57,08 cM, respectivamente.

Snelling et al. (2010) observaram cinco SNPs associados significativamente ( $FDR \leq 10\%$ ) com peso ao nascimento localizados entre 112474006 e 114565961 bp (pares de base), no BTA4; e três SNPs localizados entre 54832703 a 57515862 bp, no BTA9. Um destes SNPs (rs108988191) encontra-se próximo aos genes MANEA e LOC783932. Para tal comparação, os SNPs verificados por estes autores foram checados (para PN e PD) quanto a mudança de posição devido à atualização da base de dados do genoma bovino.

No BTA5, Machado et al. (2003) observaram QTL associado ao PN em bovinos da raça Canchim. Andrade et al. (2008) verificaram associação entre marcadores moleculares do gene IGF-1 com PN em bovinos da mesma raça. No entanto, neste estudo tais associações não foram observadas no cromossomo 5. Acredita-se que, embora as raças estudadas tenham sido as



mesmas, os trabalhos conduzidos por Machado et al. (2003) e Andrade et al. (2008) consideraram desenhos experimentais diferentes e utilizaram apenas animais da fazenda experimental da Embrapa Pecuária Sudeste, enquanto que animais pertencentes à Embrapa e também a outros criadores do Brasil foram utilizados neste estudo.

Em geral, estes genes parecem desempenhar papel no desenvolvimento do animal após seu nascimento. No entanto, o gene DPP6 pode ser destacado devido às suas funções no desenvolvimento do sistema nervoso. É interessante observar a existência de QTL associados ao período de gestação descrito em outros estudos. Isto corrobora com os resultados de estudos genético-quantitativos em que foram identificadas associações genéticas positivas e de moderada a alta magnitude entre PN e período de gestação (CREWS JR, 2006; MUCARI et al., 2011).

#### **4.2. Peso ao desmame**

Verificou-se efeito pleiotrópico do SNP rs43421095 para PN e PD. A existência deste efeito é compreensível, pois aparentemente, genes que atuam ao nascimento poderiam atuar em idades posteriores. Verificou-se que o SNP rs135156506 encontra-se localizado na região promotora do gene FARSB (*phenylalanyl-tRNA synthetase beta chain*). O SNP observado neste gene poderia ser responsável pela variação fenotípica observada para PD. Este gene possui função molecular no processo de ligação de ATP (adenosina trifosfato), ligação do RNA, ligação do íon magnésio e atividade da ligase fenilalanina-tRNA (RODOVA; ANKILOVA; SAFRO, 1999). McClure et al. (2010) observaram QTL associados com PD localizados entre 8,05 e 43,93 cM.

O gene KCNIP4 (*Kv channel-interacting protein 4*) possui função de transporte e ligação de íons de potássio e cálcio (AN et al., 2000). Nesta região foram relatados QTL associados ao peso aos 365 dias de idade (MCCLURE et al., 2010) localizados entre 46,86 e 53,72 cM. Foram verificados QTL que compreendem a região dos genes FARSB e KCNIP4 associados ao peso ao nascimento (CASAS et al., 2000), peso corporal ao abate (SETOGUCHI et al., 2009), gordura subcutânea (GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009), período de gestação (MALTECCA et al., 2009) e facilidade de parto (MCCLURE et al.,

2010) localizados entre 25 e 58 cM, 21 e 61 cM, 35,39 e 44,98 cM, 26,40 e 83,80 cM e 17,00 e 43,93 cM, respectivamente.

Localizado no BTA11, o gene *RALGDS* (*ral guanine nucleotide dissociation stimulator*) participa do processo biológico da regulação da GTPase, ou seja, participa da ligação e hidrólise da guanosina trifosfato (GTP) servindo de substrato para a síntese de RNA durante o processo da transcrição (HERRMANN et al., 1996). As funções moleculares e biológicas do gene *GTF3C5* (*general transcription factor 3C polypeptide 5*) não foram encontradas na literatura. McClure et al. (2010) observaram QTL associados ao escore de marmoreio localizado entre 92,17 e 126,00 cM.

Snelling et al. (2010) observaram três SNPs significativamente associados ( $FDR \leq 10\%$ ) com PD localizados entre 113506092 e 114302482 bp, no BTA4; cinco SNPs localizados entre 33441527 e 37584088 bp, no BTA6, sendo que os SNPs rs41575451 e rs41606639 encontram-se próximos ao gene *FARSB*; e nove SNPs localizados entre 41178449 e 42609559 bp, no BTA6, sendo que os SNPs rs43457653, rs109411564, rs43459713 e rs43462195 encontram-se localizados no gene *KCNIP4*. SNPs significativamente associados com PD e próximos ao gene *RALGDS* não foram verificados na literatura. Foi descrita na raça Canchim associação entre marcadores moleculares no gene *IGF-1*, localizado no BTA5, com o peso ao desmame (ANDRADE et al., 2008). No entanto, tal associação para este cromossomo não foi verificada neste estudo.

#### 4.3. Peso ao sobreano

Para PS, observaram-se SNPs próximos aos genes *MARCH3* (*membrane-associated ring finger (C3HC4) 3*), *LMNB1* (*lamin B1*), *PHAX* (*phosphorylated adaptor for RNA export*), *ALDH7A1* (*Aldehyde dehydrogenase family 7 member A1*), *C7H5orf48* (*chromosome 7 open reading frame, human C5orf48*) e *GRAMD3* (*GRAM domain containing 3*) e o micro RNA *MIR2458* (*microRNA mir-2458*). Segundo Fukuda; Nakamura e Hirose (2006), o gene *MARCH3* participa do processo biológico da endocitose (absorção de materiais através da membrana celular) e ubiquitinação de proteínas (eliminação de proteínas de má formação). Sua função molecular está relacionada à atividade

da ligase (catalisadoras de ligação entre duas moléculas) e nas ligações do íon zinco. O gene LMNB1 participa das atividades estruturais das moléculas (LIN; WORMAN, 1995). O processo biológico em que o gene PHAX atua é o de transporte de proteínas e de exportação de pequenos RNA nucleares (small nuclear RNA), além disto, este gene possui função molecular no processo de ligação do RNA (OHNO et al., 2000). A função do gene ALDH7A1 é de produção de enzimas multifuncionais que mediam efeitos protetores importantes, dentre estes, proteção das células contra o estresse oxidativo e ação de radicais livres (ambos resultantes do processo de respiração celular). Este gene está envolvido no catabolismo da lisina (processamento do aminoácido da lisina) (SONSTEGARD et al., 2002). Não foram verificadas funções para C7H5orf48, GRAMD3 e MIR2458 na literatura.

No BTA7, Sherman et al. (2009) observaram QTL associados ao consumo alimentar residual localizado entre 11,70 e 48,50 cM em estudo animais da raça Angus, Charolês e diversos tipos de cruzamentos entre bovinos de corte e leite. Hirano et al. (2008) observaram QTL associados ao escore de marmoreio em bovinos da raça Japanese Black localizado entre 20,70 e 39,30 cM. Boichard et al. (2003) observaram QTL associado à profundidade de calcanhar em bovinos leiteiros localizado entre 14 e 120 cM. Foi verificado na literatura QTL associados com período de gestação (MALTECCA et al., 2009) e motilidade espermática (DRUET et al., 2009) localizados entre 16,70 e 39,50 cM e 25 e 71 cM, respectivamente.

No BTA22, foram observados dois SNPs significativos localizados próximos aos genes LARS2 (*leucyl-tRNA synthetase 2, mitochondrial*), TMEM158 (*transmembrane protein 158*), CDCP1 (*CUB domain containing protein 1*), LOC100294787 (*cAMP-regulated phosphoprotein 19 pseudogene*), LOC614114 (*cytochrome c oxidase subunit VIb polypeptide 1 (ubiquitous) pseudogene*), LOC100295131 (*40S ribosomal protein S15-like*), ZDHHC3 (*zinc finger, DHHC-type containing 3*), LOC100847343 (*exosome complex component RRP42-like*), LOC100847326 (*uncharacterized LOC100847326*) e CLEC3B (*C-type lectin domain family 3 member B*) associados ao PS.

Para o gene CDCP1 e TMEM158 e para os genes LOC100294787, LOC100295131, LOC100847326, LOC100847343 e LOC614114 não foram observados na literatura as respectivas funções moleculares ou biológicas. O

gene LARS2 possui função molecular na ligação da ATP, na atividade de terminação de aminoacil-tRNA (enzima que catalisa a reação química de um aminoácido específico em um RNA transportador correspondente) e na atividade da ligase da leucina-tRNA (enzima que ativa a leucina com seu RNA transportador correspondente) (T HART et al., 2005). O gene ZDHHC3 participa da função molecular de ligação dos íons de zinco (PUTILINA; WONG; GENTLEMAN, 1999). O gene CLEC3B participa do processo biológico de mineralização dos ossos, resposta celular para transformação do estímulo do fator de crescimento beta e desenvolvimento do sistema esquelético. A função molecular deste gene é o de ligação dos íons de cálcio, ligação de carboidratos e ligação da heparina (WEWER et al., 1994). Foi observado na literatura QTL associados ao peso da carcaça em bovinos da raça Brahman, Angus e seus cruzamentos localizados entre 54,05 e 82,93 cM (KIM et al., 2003).

O gene XYLT1 (*xylosyltransferase 1*) participa do processo biológico de resposta celular ao calor e participa do processo de produção de glicosaminoglicano biosintético (polissacarídeos heterogêneos de longas cadeias não ramificadas). O gene possui função molecular na atividade do acetil glucosamiltransferase (armazenamento de glicogênio) e na atividade da proteína xilosiltransferase (STOOLMILLER; HORWITZ; DORFMAN, 1972). Observou-se na literatura QTL associados ao peso ao nascimento (entre 14,44 e 31,59 cM), peso ao desmame (entre 14,44 e 22,63 cM) e facilidade de parto (entre 14,44 e 22,63 cM) (MCCLURE et al., 2010). Höglund et al. (2009) observaram QTL associado à taxa de não retorno ao cio localizado entre 7,19 e 22,63 cM. Esta característica reprodutiva é usualmente estudada em bovinos leiteiros, sendo definida como a proporção de vacas que não são cobertas novamente em determinado período de tempo após a inseminação (MIGLIOR; PIZZI; GUAITA, 1997). No BTA27, cinco SNPs significativamente associados a PS encontram-se em região sem anotação de genes. Nesta região não foram observados QTL na literatura consultada.

Snelling et al. (2010) observaram que o SNP rs109544319 está significativamente associado ( $FDR \leq 10\%$ ) com o peso mensurado ao ano e encontra-se localizado no gene C7H5orf48 no BTA7. Os demais SNPs significativos observados por estes autores não estão próximos aos SNPs (ou genes) identificados neste trabalho. Em geral, o conjunto de genes observados

parece estar associado à manutenção das atividades celulares, produção de energia e na imunidade dos animais, o que possibilitaria o melhor desempenho produtivo dos mesmos e o desenvolvimento durante a fase de crescimento. Os genes LARS2, ZDHHC3 e CLEC3B parecem desempenhar importante papel para o crescimento e desenvolvimento de bovinos ao sobreano.

#### **4.4. Efeito de substituição alélica**

O efeito de substituição alélica sobre os valores genéticos de PN, obtidos por meio de regressão linear simples, foram todos de sinal negativo (Tabela 3). Considerando-se que valores genéticos negativos ou próximos de zero seriam os mais indicados para a seleção desta característica, indivíduos portadores de alelos desejáveis poderiam auxiliar para o decréscimo ou manutenção de PN e poderiam contribuir indiretamente para a diminuição da ocorrência de partos distócicos. Para PD e PS, foram observados efeitos de substituição alélica com sinais positivos e negativos (Tabelas 4 e 5). Em ambas as características, a utilização de indivíduos com valores genéticos elevados e positivos seria interessante para melhorar o desempenho produtivo.

### **5. CONCLUSÃO**

A metodologia GQLS identificou regiões cromossômicas associadas com peso ao nascimento, ao desmame e ao sobreano. As regiões identificadas neste estudo poderão auxiliar no processo de seleção destas características, já contempladas no programa de avaliação genética da raça Canchim. Os genes localizados nestas regiões fazem parte de processos biológicos e funções moleculares importantes na manutenção do organismo e desenvolvimento corporal, sendo genes candidatos para as características estudadas. Estudos de validação poderão confirmar as associações genômicas observadas neste trabalho.

## 6. REFERÊNCIAS

'T HART, L. M.; HANSEN, T.; RIETVELD, I.; DEKKER, J. M.; NIJPELS, G.; JANSSEN, G. M. C.; ARP, P. A.; UITTERLINDEN, A. G.; JORGENSEN, T.; BORCH-JOHNSEN, K.; POLS, H. A. P.; PEDERSEN, O.; VAN DUIJN, C. M.; HEINE, R. J.; MAASSEN, J. A. Evidence that the Mitochondrial Leucyl tRNA Synthetase (LARS2) Gene Represents a Novel Type 2 Diabetes Susceptibility Gene. **Diabetes**, v. 54, n. 6, p. 1892–1895, 2005.

ABCCAN-EMBRAPA-GENEPLUS. **Sumário de touros Canchim, MA e Charolês edição Primavera/2012.** Disponível em: <[http://www.cnpqc.embrapa.br/~locs/sumario/canchim/can\\_index.htm](http://www.cnpqc.embrapa.br/~locs/sumario/canchim/can_index.htm)>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

ALENCAR, M. M. **Bovino - Raça Canchim: Origem e Desenvolvimento.** 1. ed. Brasília: Embrapa-DPU, 1988. 102p.

ALEXANDER, L. J.; GEARY, T. W.; SNELLING, W. M.; MACNEIL, M. D. Quantitative trait loci with additive effects on growth and carcass traits in a Wagyu-Limousin F2 population. **Animal Genetics**, v. 38, n. 4, p. 413–416, 2007.

AN, W. F.; BOWLBY, M. R.; BETTY, M.; CAO, J.; LING, H. P.; MENDOZA, G.; HINSON, J. W.; MATTSSON, K. I.; STRASSLE, B. W.; TRIMMER, J. S.; RHODES, K. J. Modulation of A-type potassium channels by a family of calcium sensors. **Nature**, v. 403, n. 6769, p. 553–556, 2000.

ANDRADE, P. C.; GROSSI, D. A.; PAZ, C. C. P.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; MUNARI, D. P. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 5, p. 480–485, 2008.

BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L. G.; ALENCAR, M. M. Random regression models on Legendre polynomials to estimate genetic parameters for weights from birth to adult age in Canchim cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 127, n. 4, p. 289–299, 2010.

BALDI, F.; ALENCAR, M. M.; ALBUQUERQUE, L. G. Estimativas de parâmetros genéticos para características de crescimento em bovinos da raça Canchim utilizando modelos de dimensão finita. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, n. 11, p. 2409–2417, 2010.

BARBOSA, P. F. **O Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste**. Convenção Nacional da Raça Canchim. **Anais...**São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/44905/1/PROCIPFB2000.00028.pdf>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BOICHARD, D.; GROHS, C.; BOURGEOIS, F.; CERQUEIRA, F.; FAUGERAS, R.; NEAU, A.; RUPP, R.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M. Y.; LEVÉZIEL, H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 35, n. 1, p. 77–101, 2003.

BUZANSKAS, M. E.; GROSSI, D. A.; BALDI, F.; BARROZO, D.; SILVA, L. O. C.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; MUNARI, D. P.; ALENCAR, M. M. Genetic associations between stayability and reproductive and growth traits in Canchim beef cattle. **Livestock Science**, v. 132, p. 107–112, 2010.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2976–2983, 2003.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CREWS JR, D. H. Age of dam and sex of calf adjustments and genetic parameters for gestation length in Charolais cattle. **Journal of Animal Science**, v. 84, p. 25–31, 2006.

DRUET, T.; FRITZ, S.; SELLEM, E.; BASSO, B.; GÉRARD, O.; SALAS-CORTES, L.; HUMBLLOT, P.; DRUART, X.; EGGEN, A. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 126, n. 4, p. 269–277, 2009.

FENG, Z.; WONG, W. W. L.; GAO, X.; SCHENKEL, F. Generalized genetic association study with samples of related individuals. **The Annals of Applied Statistics**, v. 5, n. 3, p. 2109–2130, 2011.

FRIZZAS, O. G.; GROSSI, D. A.; BUZANSKAS, M. E.; PAZ, C. C. P.; BEZERRA, L. A. F.; LÔBO, R. B.; OLIVEIRA, J. A.; MUNARI, D. P. Heritability estimates and genetic correlations for body weight and scrotal circumference adjusted to 12 and 18 months of age for male Nelore cattle. **Animal**, v. 3, n. 3, p. 347–351, 2009.

FUKUDA, H.; NAKAMURA, N.; HIROSE, S. MARCH-III Is a novel component of endosomes with properties similar to those of MARCH-II. **Journal of Biochemistry**, v. 139, n. 1, p. 137–145, 2006.

GUTIÉRREZ-GIL, B.; WILLIAMS, J. L.; HOMER, D.; BURTON, D.; HALEY, C. S.; WIENER, P. Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 24–36, 2009.

HERRMANN, C.; HORN, G.; SPAARGAREN, M.; WITTINGHOFER, A. Differential interaction of the ras family GTP-binding proteins H-Ras, Rap1A, and R-Ras with the putative effector molecules Raf kinase and Ral-guanine nucleotide exchange factor. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 12, p. 6794–6800, 1996.



HEYDE, C. C. **Quasi-Likelihood And Its Application: A General Approach to Optimal Parameter Estimation**. 1. ed. Canberra, Australia: Springer, 1997. 235p.

HIRANO, T.; WATANABE, T.; INOUE, K.; SUGIMOTO, Y. Fine-mapping of a marbling trait to a 2.9-cM region on bovine chromosome 7 in Japanese Black cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 1, p. 79–83, 2008.

HÖGLUND, J. K.; GULDBRANDTSEN, B.; SU, G.; THOMSEN, B.; LUND, M. S. Genome scan detects quantitative trait loci affecting female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2136–2143, 2009.

KIM, J. J.; FARNIR, F.; SAVELL, J.; TAYLOR, J. F. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* ( Angus ) and *Bos indicus* ( Brahman ) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1933–1942, 2003.

KNEELAND, J.; LI, C.; BASARAB, J.; SNELLING, W. M.; BENKEL, B.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S. S. Identification and fine mapping of quantitative trait loci for growth traits on bovine chromosomes 2 , 6 , 14 , 19 , 21 , and 23 within one commercial line of *Bos taurus*. **Journal of Animal Science**, v. 82, p. 3405–3414, 2004.

KÜHN, C. et al. Quantitative trait loci mapping of functional traits in the German Holstein cattle population. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 360–368, 2003.

KUKUSHKIN, N. V.; EASTHOPE, I. S.; ALONZI, D. S.; BUTTERS, T. D. Restricted processing of glycans by endomannosidase in mammalian cells. **Glycobiology**, v. 22, n. 10, p. 1282–1288, 2012.

LIN, F.; WORMAN, H. J. Structural Organization of the Human Gene (LMNB1) Encoding Nuclear Lamin B1. **Genomics**, v. 27, n. 2, p. 230–236, 1995.

MACHADO, M. B. B.; ALENCAR, M. M.; PEREIRA, A. P.; OLIVEIRA, H. N.; CASAS, E.; COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. QTL affecting body weight in a candidate region of cattle chromosome 5. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 3, p. 259–265, 2003.

MALTECCA, C.; WEIGEL, K. A.; KHATIB, H.; COWAN, M.; BAGNATO, A. Whole-genome scan for quantitative trait loci associated with birth weight, gestation length and passive immune transfer in a Holstein x Jersey crossbred population. **Animal Genetics**, v. 40, n. 1, p. 27–34, 2009.

MCCLURE, M. C.; MORSCI, N. S.; SCHNABEL, R. D.; KIM, J. W.; YAO, P.; ROLF, M. M.; MCKAY, S. D.; GREGG, S. J.; CHAPPLE, R. H.; NORTHCUTT, S. L.; TAYLOR, J. F. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 6, p. 597–607, 2010.

MEE, J. F. Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: a review. **Veterinary Journal**, v. 176, n. 1, p. 93–101, 2008.

MIGLIOR, F.; PIZZI, F.; GUAITA, N. Effect of environmental factors on Non Return Rate in Italian Holstein-Friesians. **Interbull. Bulletin**, v. 27, p. 106–108, 1997.

MISZTAL, I. Reliable computing in estimation of variance components. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 125, n. 6, p. 363–370, 2008.

MUCARI, T. B.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, P. F.; BARBOSA, T. Análise genética do período de gestação em animais de um rebanho Canchim: estimação de parâmetros genéticos e escolha entre modelos animais alternativos. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 40, n. 6, p. 1211–1216, 2011.

OHNO, M.; SEGREF, A.; BACHI, A.; WILM, M.; MATTAJ, I. W. PHAX, a mediator of U snRNA nuclear export whose activity is regulated by phosphorylation. **Cell**, v. 101, n. 2, p. 187–198, 2000.

PUTILINA, T.; WONG, P.; GENTLEMAN, S. The DHHC domain: a new highly conserved cysteine-rich motif. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 195, p. 219–226, 1999.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria, 2011. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

RODOVA, M.; ANKILOVA, V.; SAFRO, M. G. Human phenylalanyl-tRNA synthetase: cloning, characterization of the deduced amino acid sequences in terms of the structural domains and coordinately regulated expression of the alpha and beta subunits in chronic myeloid leukemia cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255, n. 3, p. 765–773, 1999.

SCHROOTEN, C.; BOVENHUIS, H.; COPPIETERS, W.; VAN ARENDONK, J. A. Whole genome scan to detect quantitative trait loci for conformation and functional traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 4, p. 795–806, 2000.

SETOGUCHI, K.; FURUTA, M.; HIRANO, T.; NAGAO, T.; WATANABE, T.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. Cross-breed comparisons identified a critical 591-kb region for bovine carcass weight QTL (CW-2) on chromosome 6 and the Ile-442-Met substitution in NCAPG as a positional candidate. **BMC Genetics**, v. 10, n. 43, 2009.

SHERMAN, E. L.; NKRUMAH, J. D.; LI, C.; BARTUSIAK, R.; MURDOCH, B.; MOORE, S. S. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 37–45, 2009.

SNELLING, W. M.; ALLAN, M. F.; KEELE, J. W.; KUEHN, L. A.; MCDANELD, T.; SMITH, T. P. L.; SONSTEGARD, T. S.; THALLMAN, R. M.; BENNETT, G. L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 3, p. 837–848, 2010.

SONSTEGARD, T. S.; CAPUCO, A. V.; WHITE, J.; VAN TASSELL, C. P.; CONNOR, E. E.; CHO, J.; SULTANA, R.; SHADE, L.; WRAY, J. E.; WELLS, K. D.; QUACKENBUSH, J. Analysis of bovine mammary gland EST and functional annotation of the *Bos taurus* gene index. **Mammalian genome**, v. 13, n. 7, p. 373–379, 2002.

STOOLMILLER, A. C.; HORWITZ, A. L.; DORFMAN, A. Biosynthesis of the Chondroitin Sulfate Proteoglycan. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 11, p. 3525–3532, 1972.

VIANNA, A. T.; PIMENTEL-GOMES, F.; SANTIAGO, M. **Formação do Gado Canchim pelo Cruzamento Charolês-Zebu**. 2. ed. São Paulo-SP: Nobel. 193p.

VIGNAL, A.; MILAN, D.; SANCRISTOBAL, M.; EGGEN, A. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 34, n. 3, p. 275–305, 2002.

WADA, K.; YOKOTANI, N.; HUNTER, C.; DOI, K.; WENTHOLD, R. J.; SHIMASAKI, S. Differential expression of two distinct forms of mRNA encoding members of a dipeptidyl aminopeptidase family. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 1, p. 197–201, 1992.

WEWER, U. M.; IBARAKI, K.; SCHJØRRING, P.; DURKIN, M. E.; YOUNG, M. F.; ALBRECHTSEN, R. A potential role for tetranectin in mineralization during osteogenesis. **The Journal of Cell Biology**, v. 127, n. 6, p. 1767–1775, 1994.

ZHANG, H.; WANG, Z.; WANG, S.; LI, H. Progress of genome wide association study in domestic animals. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 3, n. 26, 2012.

ZIMIN, A. V.; DELCHER, A. L.; FLOREA, L.; KELLEY, D. R.; SCHATZ, M. C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.;

YORKE, J. A; SALZBERG, S. L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology**, v. 10, n. 4, p. r42, 2009.

## CAPÍTULO 4 - ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO ENTRE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO E CARACTERÍSTICAS REPRODUTIVAS EM BOVINOS DA RAÇA CANCHIM.

**RESUMO** – Recentemente, programas de melhoramento genético de bovinos de corte têm dado maior ênfase para características reprodutivas de machos e fêmeas devido à sua importância econômica para o sistema de produção. A utilização de ferramentas genômicas poderia auxiliar na detecção de polimorfismos ao longo do genoma associados às características de interesse. O objetivo deste trabalho foi estudar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (“Single Nucleotide Polimorphysm” - SNP) com as características perímetro escrotal ao desmame (PED) e ao sobreano (PES) e idade ao primeiro (IPP) e segundo (ISP) parto, utilizando a metodologia “Generalized Quasi-Likelihood Score”, em bovinos de corte de raça sintética. Neste estudo foram utilizados 285 animais da raça Canchim e 114 animais do grupo genético MA (utilizados na formação da raça Canchim), genotipados com o painel de alta densidade (786.799 SNPs). Após o controle de qualidade de informações (genótipos e fenótipos) restaram 672.778 SNPs e 392 animais. Foram observadas associações para PED nos autossomos (BTA) 20 e 28; para PES nos BTA 5, 9, 13, 14, 18 e 21; para IPP nos BTA 4 e 27; e para ISP nos BTA 10, 11 e 15. Após a correção para múltiplos testes (“false discovery rate”) ao nível de 10%, 12, 435, 6 e 4 SNPs foram significativamente associados, ao longo do cromossomo, com PED, PES, IPP e ISP, respectivamente. Devido à grande quantidade de SNPs observados para PES, apenas os que se apresentavam em regiões intragênicas foram discutidos. Novos e promissores genes associados com características reprodutivas foram identificados, como o gene *SRD5A1* (*steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1*; para PED), *NSUN2* (*NOP2/Sun domain family, member 2*, para PED), *LOC100297493* (*Odorant-binding protein-like*, para PED), *PLCG1* (*phospholipase C, gamma 1*; para PES), *PEX2* (*peroxisomal biogenesis factor 2*; para PES), *MED30* (*mediator complex subunit 30*; para PES), *TRHR* (*thyrotropin-releasing hormone receptor*; para PES), *SLC8A1* (*solute carrier family 8, member 1*; para ISP) e *UBQLN3* (*ubiquilin 3*; para ISP). Com base nas análises de associação entre SNPs e as características PED, PES, IPP e ISP,

verificou-se que os SNPs observados como significativos poderiam ser utilizados na seleção genômica da raça Canchim. As regiões polimórficas identificadas apresentaram funções moleculares e processos biológicos que podem estar envolvidos na manutenção do organismo e no desempenho reprodutivo. Genes associados à processos hormonais (SRD5A1, NSUN2, TRHR, PEX2 e MED30) poderiam ser utilizados como genes candidatos para a melhoria do desempenho em machos e fêmeas. A validação destes resultados em outra população de bovinos Canchim deve ser conduzida futuramente para confirmação das associações genômicas.

**Palavras-chave:** bovinos de corte, melhoramento genético, polimorfismos, seleção genômica, substituição alélica

## 1. INTRODUÇÃO

Programas de melhoramento genético no Brasil têm dado maior ênfase no estudo e seleção de características reprodutivas devido à sua importância econômica. Em machos, medidas de perímetro escrotal são utilizadas com o objetivo de melhorar as eficiências produtiva e reprodutiva do rebanho, sendo estas mensuradas ao desmame, ao ano e sobreano (BARROZO et al., 2012). Esta característica é indicadora do potencial reprodutivo, pois o tamanho dos testículos está associado com a produção e qualidade do esperma e produção de hormônios sexuais (BAKER et al., 1981; TROCÓNIZ et al., 1991). Outro fator positivo desta característica é que sua estimativa de herdabilidade varia de moderada a alta magnitude, indicando que sua seleção é eficiente (CASTRO-PEREIRA; ALENCAR; BARBOSA, 2007; BORBA et al., 2011).

Em geral, características reprodutivas de fêmeas são de difícil mensuração e, em alguns casos, altamente influenciadas pelos componentes ambientais. Segundo Martin et al. (1992), o desempenho reprodutivo das novilhas dependerá da idade em que essas fêmeas irão parir pela primeira vez e estas, parindo mais cedo, têm maior vida produtiva do que as fêmeas mais tardias. A resposta à seleção para estas características seria lenta devido às estimativas de herdabilidade de baixas magnitudes (TALHARI et al., 2003; BALDI et al., 2008; BUZANSKAS et al., 2010). Apesar das diferenças quanto à

estimativa de herdabilidade de características reprodutivas de machos e fêmeas, estas possuem estimativas de correlação genética favorável (MARTIN et al., 1992; BURNS et al., 2011; FORTES et al., 2012), indicando que a seleção para perímetro escrotal traria benefícios para características reprodutivas de fêmeas.

Estudos conduzidos por Brumatti et al. (2011), Krupa et al. (2005) e Wolfová et al. (2005) apontaram que características reprodutivas de fêmeas são mais importantes economicamente para o sistema de produção de bovinos do que características reprodutivas de machos. Neste aspecto, programas de seleção que utilizem informações e ferramentas em genética molecular poderiam alcançar maiores ganhos. Sahana et al. (2010) apontam que estudos para identificação de locos de características quantitativas (QTL) para características de fertilidade trariam benefícios para o processo de seleção. Porém, estudos de QTL associados à características reprodutivas não foram expressivos sendo pouco utilizados de forma prática e, em muitos casos, foram reportados QTL identificados dentro de famílias, não sendo de grande utilidade para utilização em larga escala (HÖGLUND et al., 2009). Além disto, os QTL são identificados de forma imprecisa com intervalos de confiança que variam em até 50 centimorgans (cM) (GODDARD; HAYES, 2007).

Estudos de associações genômicas de fenótipos reprodutivos com polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) seriam uma interessante alternativa para identificação de genes candidatos ou polimorfismos candidatos (SAHANA et al., 2010). No entanto, características com estimativas de baixa herdabilidade, número reduzido de animais genotipados e reduzido tamanho efetivo da população são fatores que podem afetar a acurácia de predições genômicas (GODDARD, 2009), devendo-se atentar para tais fatores durante a condução dos estudos. Recentemente, Fortes et al. (2012) observaram associações genômicas para idade à puberdade em machos e fêmeas em animais da raça Brahman. Estes autores observaram que SNPs localizados nos cromossomos 14 e X, próximos a genes que não possuíam descrições prévias de associações com tais características, poderiam ser explorados como genes (ou polimorfismos) candidatos e poderiam auxiliar o processo de seleção de animais Brahman. Hawken et al. (2012) observaram associações genômicas para 22 características em fêmeas Brahman e de raça composta. Estes autores



observaram diferentes SNPs significativos para cada uma das raças estudadas, concluindo que a associação genômica é intrínseca para cada raça.

O objetivo deste trabalho foi associar os valores genéticos para as características de perímetro escrotal ao desmame e ao sobreano e idade ao primeiro e segundo parto com os polimorfismos presentes no genoma de animais da raça Canchim e do grupo genético MA, genotipados com o painel de alta densidade.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. Animais genotipados e características estudadas**

A raça Canchim é uma raça sintética desenvolvida na década de 40 nas dependências da fazenda Canchim, pertencente à Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), localizada no município de São Carlos (SP). O esquema de acasalamento que apresentou resultados satisfatórios para a época considerou animais com proporção 62,5% Charolês e 37,5% Zebu (VIANNA; PIMENTEL-GOMES; SANTIAGO, 1978). Desde então, diferentes esquemas de cruzamento foram estudados com o objetivo de produzir animais Canchim com diferentes proporções Charolês-Zebu e para se alcançar maior variabilidade genética na população. Um destes esquemas é utilizado para gerar animais do grupo genético “MA”, que provêm do acasalamento entre animais Canchim e zebu, resultando em animais F1 pertencentes ao grupo genético “A”. Por sua vez, este grupo genético é acasalado com animais da raça Charolês, gerando o grupo genético “MA” com proporção aproximada de 65,6% Charolês e 34,4% zebu. O acasalamento entre animais “MA” ou entre animais “MA” e Canchim irão gerar animais da raça Canchim (ANDRADE et al., 2008). Estes esquemas de cruzamentos auxiliaram a expandir a base genética da raça Canchim (BARBOSA, 2000) e maiores detalhes sobre a raça e outros esquemas de acasalamento podem ser encontrados na literatura (ALENCAR, 1988; BALDI; ALBUQUERQUE; ALENCAR, 2010; BUZANSKAS et al., 2010).

Animais genotipados, por meio do painel de alta densidade (BovineHD - Illumina® bead chip), incluíram 194 machos e 205 fêmeas, sendo 285 animais da raça Canchim e 114 animais do grupo genético MA filhos de 49 touros e 355

vacas. Estes animais nasceram entre 1999 e 2005 e são provenientes de sete fazendas localizadas nos estados de São Paulo e Goiás. A matriz de parentesco dos animais genotipados constituiu-se de 4095 animais. A endogamia média para animais da raça Canchim e do grupo genético MA foram iguais a 0,003 e 0,0002, respectivamente. Para a população, a endogamia média foi igual a 0,02.

Os perímetros escrotais ao desmame e sobreano foram padronizados para os 210 dias de idade e 420 dias de idade, respectivamente (ABCCAN-EMBRAPA-GENEPLUS, 2013). Os valores genéticos para perímetro escrotal ao desmame (PED) e ao sobreano (PES) e idade ao primeiro (IPP) e ao segundo (ISP) parto, foram estimados por meio de análise multi-característica utilizando-se o programa REMLF90 (MISZTAL, 2008), sob modelo animal. Estes dados foram cedidos pela Associação Brasileira de Criadores de Canchim (ABCCAN) e Embrapa-Geneplus (Programa Embrapa de Melhoramento de Gado de Corte). Os efeitos fixos considerados na formação dos grupos de contemporâneos para a estimação de valores genéticos foram: ano e estação de nascimento, fazenda de criação, grupo genético e regime alimentar. A idade da vaca ao parto e idade do animal à mensuração foram utilizadas, quando pertinentes, como co-variáveis. Os valores genéticos utilizados neste estudo foram estimados considerando matriz de parentesco com cerca de 320 mil indivíduos.

## **2.2. Controle de qualidade de genótipos**

A edição dos dados foi realizada utilizando os softwares SAS (SAS 9.1, SAS Institute, Cary, NC, USA), R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e programas criados em linguagem C++. Genótipos foram identificados de acordo com o número de alelos: AA = "0", AB = "1" e BB = "2". Para o controle de qualidade dos genótipos foram excluídos SNPs com escore de leitura ("genotype calling score") inferiores a 0,15; SNPs com desvios significativos ( $P < 0,00001$ ) do equilíbrio de Hardy-Weinberg; SNPs com proporção de heterozigotos ( $> 15\%$ ); SNPs com frequência alélica ("minor allele frequency") inferiores a 5%; e taxa de leitura ("call rate") para SNPs e animais inferiores a 90%. Apenas os cromossomos autossômicos e SNPs com posições

conhecidas foram utilizados para análises de associação. Após o controle de qualidade, 392 registros de animais permaneceram no arquivo de dados.

### 2.3. Análise de associação

Para a análise de associação foi utilizado o método “Generalized Quasi-Likelihood Score” (GQLS), desenvolvido por Feng et al. (2011) e implementado ao programa SLEUTH pelo Dr. Mehdi Sargolzaei (University of Guelph, Canadá). O método GQLS utiliza o modelo de regressão logística para associar os fenótipos de uma característica (tratados como co-variável) aos genótipos (tratados como variável resposta). Este método permite que a distribuição dos valores fenotípicos não seja especificada, sendo possível a análise tanto de variáveis binárias quanto quantitativas. Nesta metodologia considera-se  $X = (X_1, \dots, X_n)'$ , em que  $X_i$  representa os valores fenotípicos para o  $i^{\text{ésimo}}$  animal. Para os dados genotípicos considera-se  $Y = (Y_1, \dots, Y_n)'$  em que  $Y_i = \frac{1}{2} * (\text{número de alelos para o genótipo do animal } i)$ . O genótipo do animal sendo codificado como “0”, “1” ou “2” suas respectivas proporções serão 0,  $\frac{1}{2}$  e 1. A frequência alélica esperada do SNP com a característica  $X_i$  é representada por  $\mu$ , em que  $\mu = (\mu_1, \dots, \mu_n) = E(X | Y)$ , desta forma  $0 < \mu_i < 1$ . É importante ressaltar que a informação utilizada dependerá do tipo de análise desejada, podendo ser utilizado o próprio fenótipo do indivíduo, ou ainda, a diferença esperada na progênie (DEP), valores genéticos (VG) e valores derregredidos da DEP ou do VG. Neste trabalho foram utilizadas apenas informações de VG dos animais genotipados, pois a estrutura de dados não permitia a deregressão dos VGs devido às baixas acurácias estimadas. Outro aspecto desta metodologia é que as significâncias para cada SNP são obtidos individualmente.

Para associar  $\mu_i$  com  $X_i$ , a seguinte regressão logística foi definida:

$$\mu_i = E(Y_i | X_i) = \frac{e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}{1 + e^{\beta_0 + \beta_1 X_i}}$$

em que  $\beta_0$  é o termo constante e  $\beta_1$  é o coeficiente angular.

O teste de hipótese para avaliar se o SNP está associado à característica considera:

$H_0 : \beta_1 = 0$ , o SNP não está associado com a característica;

$H_1 : \beta_1 \neq 0$ , o SNP está associado com a característica.

Sob a hipótese de nulidade,  $\mu_i$  pode ser interpretado por  $\mu_i = \frac{e^{\beta_0}}{1 + e^{\beta_0}}$ , para todos os  $i = 1, \dots, n$ . O vetor médio de  $Y$  não depende mais de  $X_i$  e torna-se  $\mu = E(Y) = \mu 1$ , em que 1 é um vetor de “1’s”. A solução de equação de “quasi-likelihood score” resulta em estimativa para  $\mu$ , sendo esta  $\hat{\mu} = (1'A^{-1}1)^{-1}1'A^{-1}Y$ , em que  $A^{-1}$  é a inversa da matriz de parentesco dos indivíduos.

Para se obter o “generalized quasi-likelihood scoring”, a estatística  $W_G$  pode ser calculada como apresentado a seguir:

$$W_G = \frac{2}{\hat{\mu}(1 - \hat{\mu})} [X'A^{-1}(Y - \hat{\mu}1)] \times [X'A^{-1}X - (X'A^{-1}1)(1'A^{-1}1)^{-1}(1'A^{-1}X)]^{-1} \times [X'A^{-1}(Y - \hat{\mu}1)]$$

De acordo com Heyde (1997), sob a hipótese de nulidade,  $W_G$  segue distribuição qui-quadrado com um grau de liberdade resultando em p-valores para cada SNP. Esta metodologia propõe a correção para o problema da estratificação populacional por considerar a matriz de parentesco nos cálculos da estatística  $W_G$ . Logo, se subpopulações existirem, estas serão corrigidas para sua respectiva matriz de parentesco. As posições dos SNPs utilizadas neste estudo pertencem ao mapa UMD\_3.1 bovine assembly (ZIMIN et al., 2009).

#### 2.4. Correção para testes múltiplos

Para definição dos SNPs significativos, utilizou-se o limiar de 10% corrigido para o número de testes realizados (para cada SNP) por cromossomo, de acordo com o critério da razão de falsas descobertas (false discovery rate - FDR). Para o cálculo da FDR, os p-valores foram ordenados de forma decrescente e, em seguida, aplicou-se a fórmula de ajuste para testes múltiplos (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995):

$$q < mP(i) / i$$

em que  $q$  é o nível de significância desejado,  $m$  é o número total de SNPs,  $P$  é o p-valor do SNP  $i$ . A significância do teste será atingida quando for encontrado SNP com valor de  $mP(i)/i$  inferior ao valor de  $q$ . Estes SNPs e os subsequentes foram considerados significativos ao nível de significância estabelecido em  $q$ .

## 2.5. Efeito de substituição alélica

Para verificar efeito aditivo dos SNPs que foram significativos na análise por meio da metodologia de GQLS, realizou-se a regressão linear simples do número de cópias para um dado alelo sobre os valores genéticos das características estudadas. O modelo utilizado foi:

$$y_{jk} = \mu + \sum_{j=1}^s \beta_j x_j + e_{jk}$$

em que  $y_{jk}$  é o valor genético estimado para cada característica;  $s$  é o número de alelos menos um;  $\mu$  é média dos valores genéticos;  $x$  é o número de cópias para um dado alelo (0, 1 ou 2);  $\beta$  é o coeficiente de regressão linear (efeito de substituição alélica); e  $e$  é o efeito residual.

## 2.6. Identificação e função dos genes

A identificação e posicionamento dos SNPs no genoma bovino foram realizadas por meio de pesquisa nas bases de dados “National Center for Biotechnology Information” (NCBI - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nestas bases de dados foi possível verificar se os SNPs localizavam-se em regiões inter ou intragênica. Verificou-se a presença de genes no intervalo de 0,25 Mb (megabase) para SNPs que estivessem em região intragênica. A classificação dos genes quanto à função biológica foi realizada por meio da base de dados “The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v. 6.7” (DAVID - <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) e “Uniprot”

([http://www.uniprot.org/ uniprot/](http://www.uniprot.org/)). Para a pesquisa de QTL, foi utilizada a base de dados AnimalQTLdb (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/index>).

### 3. RESULTADOS

Na Tabela 1 é apresentada a estatística descritiva dos valores genéticos de PED, PES, IPP e ISP utilizados para análise de associação genômica. É importante ressaltar que valores genéticos de sinal positivo são desejáveis para PES e PED, enquanto que para IPP e ISP, valores genéticos negativos são os mais indicados na seleção destas características. Na Tabela 2, são apresentados o número de SNPs no arquivo original de dados, o tamanho dos autossomos, número de SNPs restantes após o controle de qualidade e número de SNPs significativos ( $FDR \leq 10\%$ , por autossomo) após análise pelo método GQLS.

Tabela 1. Estatística descritiva dos valores genéticos (VG) de perímetro escrotal ao desmame (PED) e ao sobreano (PES) e idade ao primeiro (IPP) e segundo (ISP) parto em bovinos da raça Canchim e grupo genético MA.

Característica	Animais	Média	Desvios-Padrão	Valores	
				Mínimo	Máximo
VG_PED (mm)	397	1,44	3,88	-8,76	12,47
VG_PES (mm)	397	2,07	7,12	-17,41	21,80
VG_IPP (dias)	397	-4,34	14,58	-50,89	44,64
VG_ISP (dias)	397	-1,23	13,97	-42,46	44,60

Em média, foram excluídos 9,45% dos SNPs após o controle de qualidade de genótipos, sendo a menor perda localizada no BTA22 e a maior no BTA13. O maior número de SNPs significativos foi observado para PES (435 SNPs), seguido por PED (12 SNPs), IPP (6 SNPs) e ISP (4 SNPs). Nas Tabelas 3, 4, 5 e 6 são apresentados os SNPs e sua significância, os genes identificados e o efeito de substituição alélica para PED, PES, IPP e ISP, respectivamente. Na Tabela 4 são apresentados apenas os SNPs localizados em regiões intragênicas, totalizando 30 SNPs.

Nas Figuras 1, 2, 3 e 4 são apresentados os gráficos “Manhattan plot” para PED, PES, IPP e ISP, respectivamente. Nestes gráficos, SNPs

significativos encontram-se acima do limiar de significância ( $FDR \leq 10\%$ ). Foram observadas associações significativas ao longo de cada autossomo para todas as características estudadas após a correção para múltiplos testes (FDR). Apenas PES apresentou associação ao longo do genoma, após correção para múltiplos testes e não será apresentada no trabalho.

Tabela 2. Número de polimorfismos de nucleotídeo único no arquivo original de dados (SNP total), tamanho do autossomo (BTA) em unidade de mega base (Mb), número de SNPs após o controle de qualidade (SNP CQ) e número de SNPs significativos ( $P < 0,00001$ ) considerando-se o “false discovery rate” ( $FDR \leq 10\%$ ) por autossomo para perímetro escrotal ao desmame (PED) e ao sobreano (PES) e idade ao primeiro (IPP) e segundo (ISP) parto.

BTA	SNP Total	Tamanho (Mb)	SNP CQ	PED	PES	IPP	ISP
1	46890	158,31	42331	0	0	0	0
2	40354	137,01	36802	0	0	0	0
3	35984	121,39	32464	0	0	0	0
4	35357	120,63	32187	0	0	2	0
5	35251	121,18	31541	0	132	0	0
6	35821	119,42	32799	0	0	0	0
7	33552	112,60	30247	0	0	0	0
8	33834	113,35	30611	0	0	0	0
9	31351	105,67	28856	0	11	0	0
10	30868	104,28	28134	0	0	0	1
11	32252	107,27	29252	0	0	0	2
12	26636	91,12	23880	0	0	0	0
13	23840	84,21	21206	0	5	0	0
14	25010	84,03	22441	0	272	0	0
15	25188	85,23	22408	0	0	0	1
16	24428	81,69	22284	0	0	0	0
17	22456	75,15	20390	0	0	0	0
18	19583	65,98	17803	0	11	0	0
19	19091	63,96	17246	0	0	0	0
20	21653	71,95	19697	5	0	0	0
21	21395	71,57	19360	0	4	0	0
22	18150	61,29	16807	0	0	0	0
23	15421	52,46	13848	0	0	0	0
24	18762	62,54	17182	0	0	0	0
25	13026	42,82	11795	0	0	0	0
26	15355	51,64	13957	0	0	0	0
27	13304	45,40	11938	0	0	4	0
28	13178	46,24	12032	7	0	0	0
29	14916	51,18	13280	0	0	0	0
Total	742906	2509,57	672778	12	435	6	4



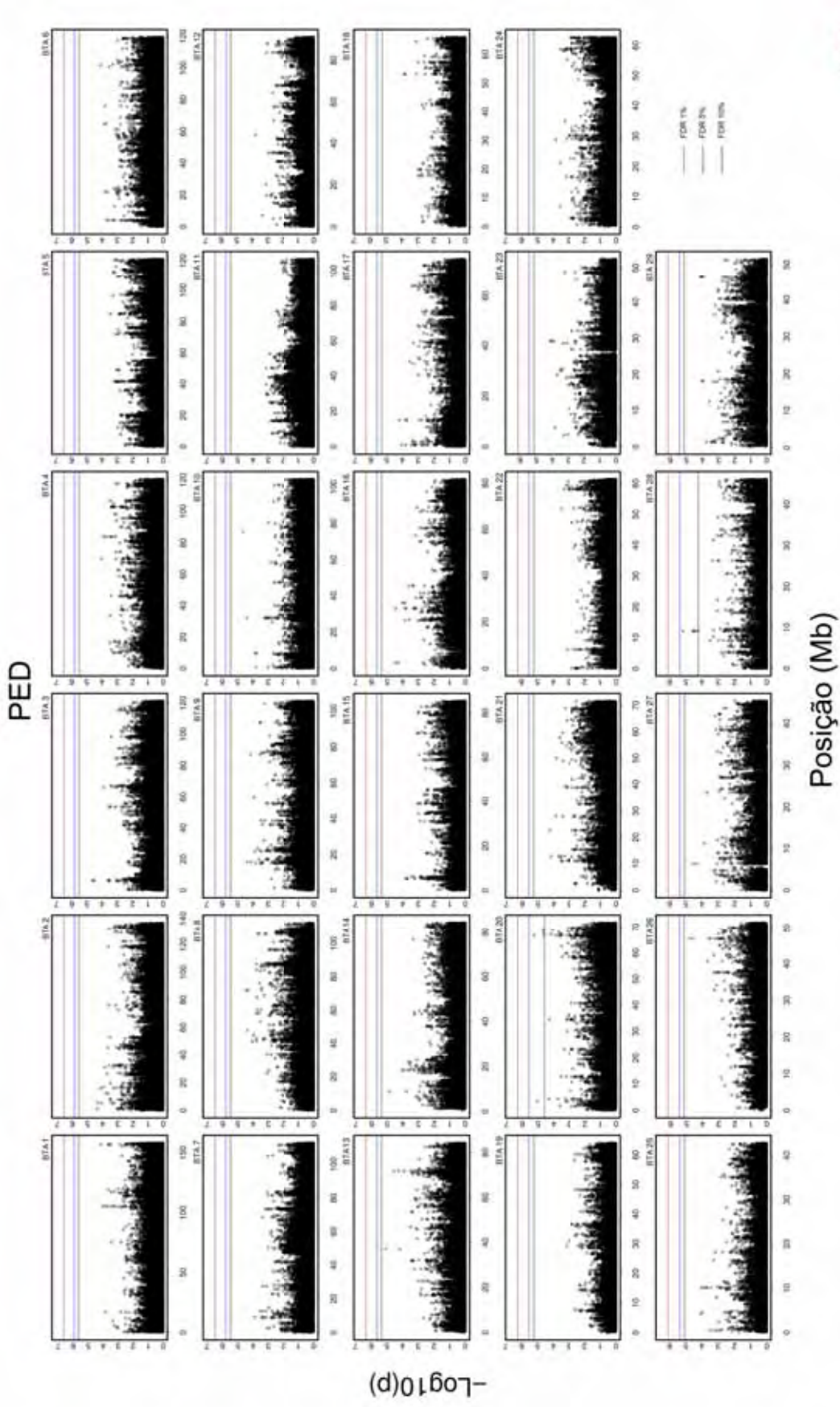


Figura 1. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores (p) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica perímetro escrotal ao desmame (PED). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 20 e 28).

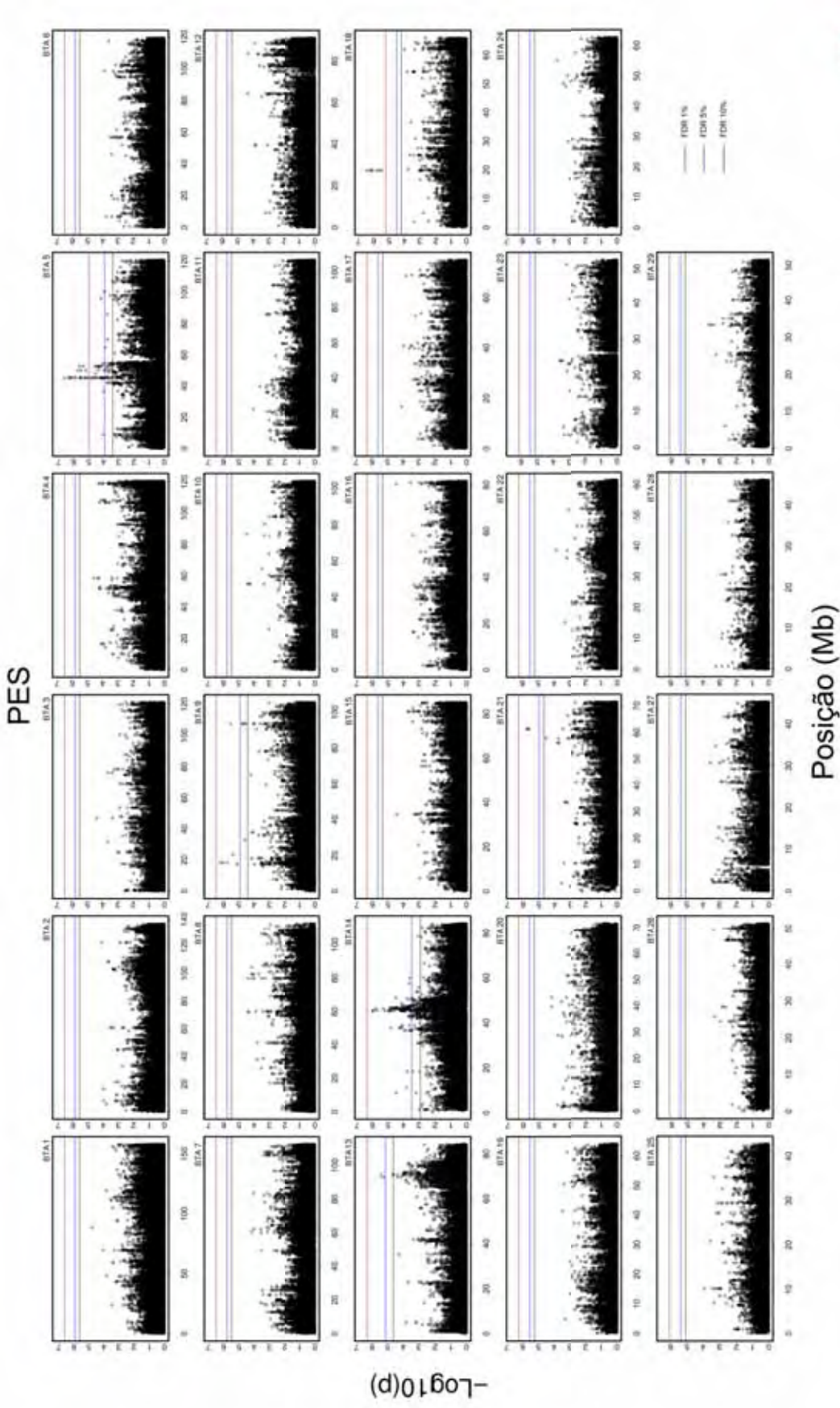


Figura 2. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores (p) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica perímetro escrotal ao sobreano (PES). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 5, 9, 13, 14, 18 e 21).

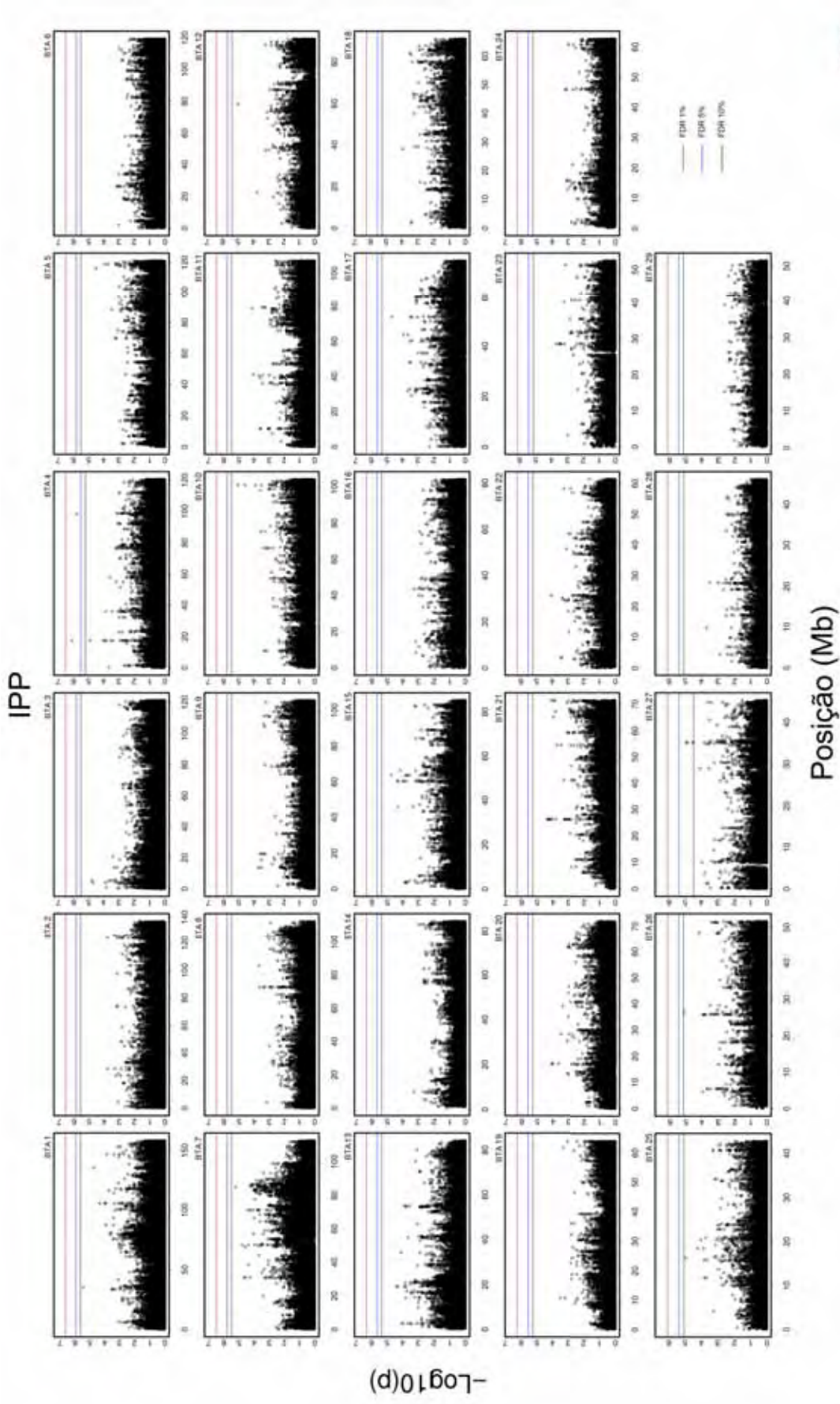


Figura 3. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores (p) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo y). A distância genômica (eixo x) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica idade ao primeiro parto (IPP). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 4 e 27).

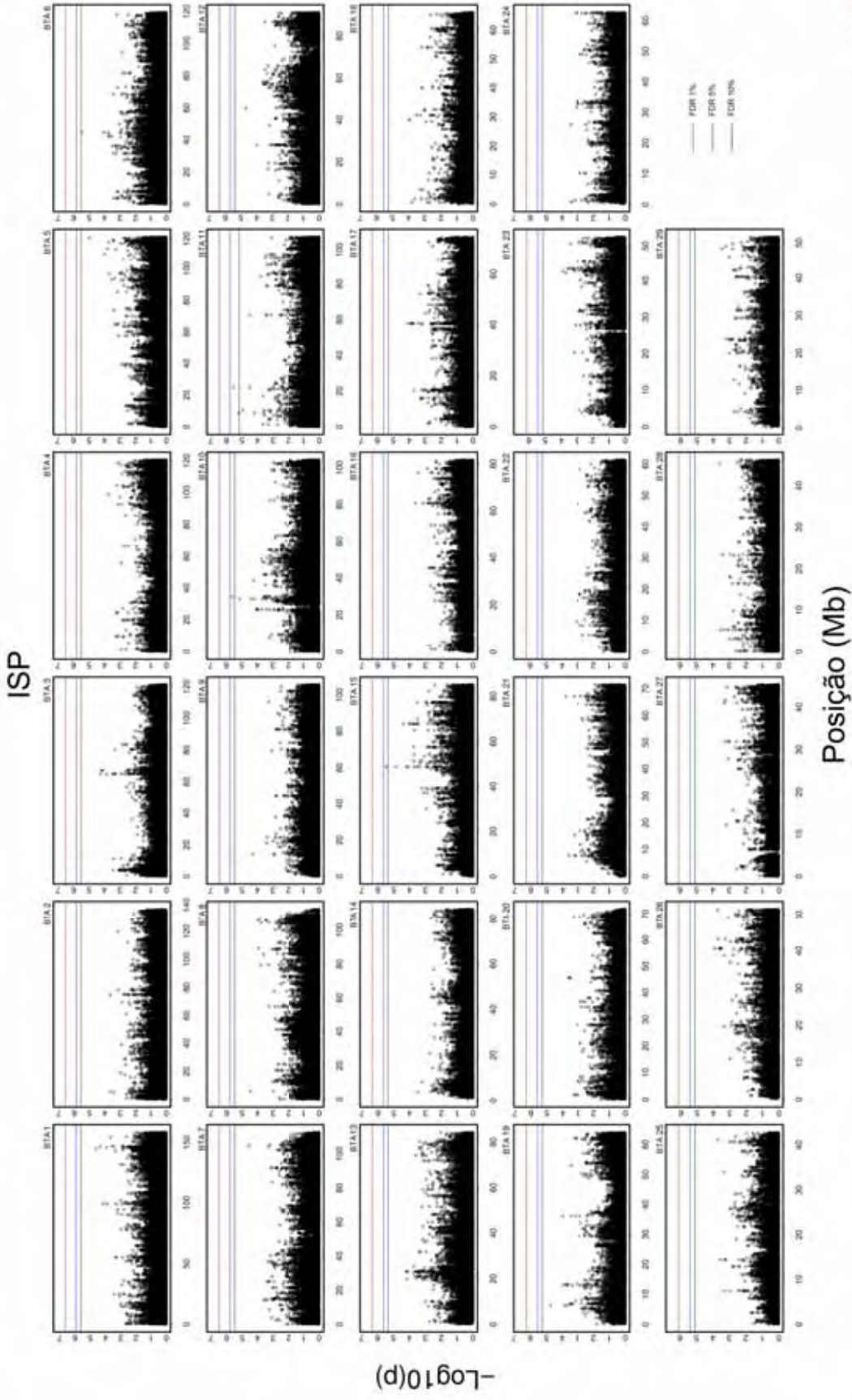


Figura 4. Gráfico “Manhattan plot” utilizando p-valores ( $p$ ) transformados para  $-\text{Log}_{10}$  (eixo  $y$ ). A distância genômica (eixo  $x$ ) é apresentada em mega base (Mb) para cada autossomo (BTA) para a característica idade ao segundo parto (ISP). A correção para testes múltiplos (false discovery rate - FDR) considerou o nível de significância de 1% (linha vermelha), 5% (linha azul) e 10% (linha preta) para SNPs significativos (BTA 10, 11 e 15).

Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica obtidos por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para perímetro escrotal ao desmame (PED) em bovinos Canchim e MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

SNP	GQLS										Regressão simples por locos	
	SNP Referência	BTA	Posição (pb)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (mm)*	
BovineHD2000001142	rs135355728	20	3483717	<b>A,C</b>	FBXW11, LOC533234	Intragênica	392	0,2873	8,96E-06	10%	1,65458	
BovineHD2000019203	rs137042056	20	66520145	<b>C,T</b>	SRD5A1, NSUN2, PAPD7, LOC100297493	Intragênica	392	0,2792	2,32E-05	10%	-2,19887	
BovineHD2000019208	rs136276163	20	66530108	<b>A,G</b>	SRD5A1, NSUN2, PAPD7, LOC100297493	Intragênica	387	0,2641	5,85E-06	10%	-2,29442	
Hapmap47030-BTA-51214	rs41582170	20	67819983	<b>A,G</b>	LOC782502	Íntron	392	0,1797	2,13E-05	10%	-2,22381	
BovineHD2000020108	rs136535499	20	69053812	<b>A,G</b>	IRX1	Intragênica	376	0,1737	2,13E-05	10%	-2,63139	
BovineHD2800002776	rs110746860	28	9146572	<b>A,G</b>	EDARADD	Íntron	392	0,4899	3,52E-05	10%	-1,33305	
BovineHD2800002777	rs110371081	28	9147929	<b>A,G</b>	EDARADD	Íntron	392	0,4633	3,14E-05	10%	1,49484	
BovineHD2800002778	rs109902875	28	9148828	<b>C,T</b>	EDARADD	Íntron	392	0,4609	3,58E-05	10%	1,50835	
BovineHD2800002780	rs110870694	28	9150564	<b>G,T</b>	EDARADD	Íntron	376	0,4894	6,71E-06	10%	1,59649	
BovineHD2800002782	rs110610232	28	9152595	<b>C,T</b>	EDARADD	Íntron	392	0,4848	2,64E-05	10%	1,35829	
BovineHD2800002785	rs134356559	28	9159102	<b>C,T</b>	EDARADD	Íntron	392	0,4544	5,76E-05	10%	1,45500	
BovineHD2800002786	rs137379228	28	9160211	<b>A,G</b>	-	Não anotados	392	0,4545	5,76E-05	10%	-1,45500	

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; pb = Pares de base.

Tabela 4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica obtidos por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para perímetro escrotal ao sobreano (PES) em bovinos Canchim e MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

GQLS											Regressão simples por loco	
SNP	SNP Referência	BTA	Posição (pb)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (mm)*	
BovineHD0500013016	rs136466664	5	45247118	<b>C,T</b>	SLC35E3	3' UTR	392	0,3835	2,91E-04	10%	-3,02539	
BovineHD0500013028	rs110291739	5	45267821	<b>A,G</b>	SLC35E3	Promotora	392	0,1797	6,37E-05	5%	-2,09256	
BovineHD0500013029	rs110572792	5	45274417	<b>G,T</b>	NUP107	Terminadora	392	0,1785	6,37E-05	5%	3,47722	
BovineHD0500013032	rs134370690	5	45283704	<b>C,T</b>	NUP107 / SNORA38	Íntron / Terminadora	392	0,2879	9,24E-05	5%	3,47722	
BovineHD0500013033	rs109284796	5	45289852	<b>A,G</b>	NUP107 / SNORA38	Íntron / Promotora	384	0,3041	5,66E-06	1%	-2,70836	
BovineHD0500013034	rs110852214	5	45293077	<b>C,T</b>	NUP107 / SNORA38	Íntron / Promotora	392	0,1561	3,89E-04	10%	2,57453	
BovineHD0500013049	rs133990240	5	45352128	<b>A,G</b>	RAP1B	Terminadora	392	0,3291	1,42E-06	1%	-2,57453	
BovineHD0500013051	rs110261691	5	45354729	<b>A,G</b>	RAP1B	Terminadora	392	0,3287	1,42E-06	1%	-3,55504	
BovineHD1300020124	rs133273718	13	70485807	<b>C,T</b>	PLCG1	Promotora	392	0,2336	2,11E-05	10%	-2,34770	
BovineHD1400011956	rs42142739	14	41985381	<b>A,G</b>	ZFH4	Promotora	392	0,3519	1,19E-03	10%	2,42542	
BovineHD1400012053	rs137442228	14	42330263	<b>A,G</b>	PEX2	5' UTR	392	0,2101	8,39E-04	10%	2,42542	
BovineHD1400012766	rs132803686	14	45122378	<b>A,G</b>	HEY1	Terminadora	391	0,2843	2,95E-04	5%	3,12839	
BovineHD1400012768	rs136891270	14	45127916	<b>A,G</b>	HEY1	Terminadora	392	0,2843	2,83E-04	5%	-2,42783	
BovineHD1400012870	rs134553723	14	45495995	<b>A,G</b>	MRPS28 / TPD52	Terminadora / Promotora	392	0,3684	1,21E-04	5%	-3,05657	
BovineHD1400012871	rs136546448	14	45498366	<b>A,G</b>	TPD52	Terminadora	392	0,368	1,21E-04	5%	-3,02539	
BovineHD1400012883	rs110246732	14	45534903	<b>C,T</b>	TPD52	Promotora	391	0,3924	1,82E-05	5%	3,40234	
BovineHD1400013088	rs137291182	14	46332532	<b>C,T</b>	PAG1	Terminadora	392	0,2253	1,64E-06	5%	2,70203	
BovineHD1400013194	rs133930486	14	46643037	<b>A,G</b>	FABP5	Promotora	388	0,2092	3,72E-04	10%	2,23368	
BovineHD1400013198	rs137684819	14	46653900	<b>G,T</b>	FABP5	Terminadora	391	0,2468	1,33E-04	5%	2,03196	
BovineHD1400013271	rs43765465	14	46896298	<b>A,G</b>	FABP12	Promotora	392	0,4773	7,68E-05	5%	2,57453	
BovineHD1400013300	rs135988903	14	47006975	<b>A,G</b>	NOV	Terminadora	391	0,1949	1,60E-04	5%	-2,75494	
BovineHD1400013415	rs133657412	14	47435978	<b>A,G</b>	TNFRSF11B / SNORA42	Íntron / Promotora	392	0,3089	2,27E-04	5%	-3,33510	
BovineHD1400013416	rs137422799	14	47441598	<b>A,G</b>	TNFRSF11B / SNORA42	Íntron / Terminadora	392	0,3089	2,27E-04	5%	-2,50322	

Tabela 4. Continuação...

GQLS										Regressão simples por loco	
SNP	SNP Referência	BTA	Posição (pb)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (mm)*
BovineHD1400013417	rs136481210	14	47444099	A,C	TNFRSF11B / SNORA42	Íntron / Terminadora	392	0,3071	2,27E-04	5%	2,42542
BovineHD1400013935	rs135065691	14	48936058	A,G	MED30	Terminadora	392	0,1992	8,27E-04	10%	-3,13577
BovineHD1400014233	rs134994711	14	50166203	A,G	LOC789021	Terminadora	392	0,2754	4,85E-04	10%	-1,96124
BovineHD1400014370	rs137450084	14	50605946	A,G	LOC781434	Terminadora	390	0,1891	1,73E-04	5%	-1,84324
BovineHD4100011639	rs133457508	14	57524221	A,G	TRHR	Promotora	391	0,4404	2,27E-04	5%	1,76621
BovineHD1400016619	rs136790655	14	59969985	A,G	ABRA	Promotora	390	0,1594	2,52E-04	5%	2,72255
BovineHD1400022035	rs134287222	14	78593987	A,G	FAM82B	Terminadora	391	0,3274	8,74E-04	10%	2,85054

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; pb = Pares de base.

Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica obtidos por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para idade ao primeiro parto (IPP) em bovinos Canchim e MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

GQLS										Regressão simples por loco	
SNP	SNP Referência	BTA	Posição (pb)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (dias)*
BovineHD0400005174	rs133411648	4	17463569	A,G	U1	Promotora	392	0,4127	8,26E-07	5%	4,78832
BovineHD0400027522	rs110606254	4	98314933	A,G	EXOC4	Íntron	392	0,4342	1,74E-06	5%	5,63898
BovineHD2700009951	rs134390082	27	35192949	C,T	ZMAT4	Intragênica	391	0,3071	3,18E-05	10%	-3,86290
BovineHD2700009955	rs137553882	27	35208391	A,G	ZMAT4	Intragênica	392	0,2785	1,23E-05	10%	-5,26989
BovineHD2700009956	rs133519327	27	35209954	C,T	ZMAT4	Intragênica	392	0,3152	2,90E-05	10%	4,58873
BovineHD2700009958	rs135481346	27	35211933	C,T	ZMAT4	Intragênica	392	0,2797	1,35E-05	10%	-5,25068

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; pb = Pares de base.

Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) significativos em análise de associação genômica obtidos por meio da metodologia Generalized Quasi-Likelihood Score (GQLS) e análise de regressão simples dos valores genéticos para idade ao segundo parto (ISP) em bovinos Canchim e MA. Em negrito são apresentados os alelos desejáveis para a característica estudada.

SNP	GQLS										Regressão simples por loco	
	SNP Referência	BTA	Posição (pb)	Alelos	Genes	Região	Indivíduos	MAF	p-valor	FDR	Efeito de substituição alélica (dias)*	
BovineHD100009845	rs134100268	10	29881412	<b>C,T</b>	FMN1	Íntron	371	0,3302	2,43E-06	10%	-4,99482	
BovineHD1100002864	rs43661848	11	7691109	A, <b>G</b>	TMEM182	Intragênica	385	0,376	6,29E-06	10%	-5,44031	
BovineHD1100006730	rs136610615	11	22296104	<b>A,G</b>	TMEM178, THUMP2, LOC790871, SLC8A1	Intragênica	391	0,3899	2,77E-06	10%	4,49053	
BovineHD1500014030	rs43031470	15	48708463	<b>C,T</b>	UBQLN3	Éxon	392	0,2134	3,39E-06	10%	-7,23323	

\* Coeficiente de regressão ( $P < 0,001$ )

FDR = False discovery rate; MAF = Minor allele frequency; pb = Pares de base.



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1. Perímetro escrotal ao desmame

Cinco SNPs estão localizados em região intragênica no BTA20, nos genes FBXW11 (*F-box and WD repeat domain containing 11*), LOC533234 (*pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 3-like*), SRD5A1 (*steroid-5-alpha-reductase, alpha polypeptide 1*), NSUN2 (*NOP2/Sun domain family, member 2*), PAPD7 (*PAP associated domain containing 7*), LOC100297493 (*Odorant-binding protein-like*) e IRX1 (*iroquois homeobox 1*). As funções moleculares ou processos biológicos para os genes FBXW11 e LOC533234 não foram observadas na literatura ou em bases de dados consultados. Na região em que estes dois genes estão localizados, Holmberg e Andersson-Eklund (2006) observaram QTL no BTA20 para animais da raça Swedish Red e Swedish Holstein, localizado desde o início do cromossomo até 19,14 cM, associado à taxa de não retorno ao cio. Esta é uma característica reprodutiva usualmente estudada em bovinos leiteiros, sendo definida como a proporção de vacas que não são cobertas novamente em determinado período de tempo após a inseminação (MIGLIOR; PIZZI; GUAITA, 1997). Casas et al. (2004) e McClure et al. (2010) observaram QTL associados ao peso ao nascimento e peso de carcaça, localizados entre 0,63 e 19,144 cM e 0,00 e 8,238 cM, respectivamente. Estes autores utilizaram, respectivamente, animais cruzados (raças Brahman e Angus) e animais da raça Angus.

Em humanos, o gene SRD5A1 participa do processo biológico de diferenciação celular e sexual e na biossíntese de andrógenos (ELLIS et al., 2005). Além disto, este gene atua na conversão da testosterona em andrógeno mais potente, a dihidrotestosterona (FAROOK AL-AZZAWI, 2009). A função molecular do gene NSUN2 é a de participar da atividade da enzima tRNA (citosina-5-)-metiltransferase. Em camundongos, este gene mostrou-se essencial para a diferenciação em células germinativas nos testículos (HUSSAIN et al., 2013). O gene PAPD7 participa do processo biológico de resposta a medicamentos e função molecular na atividade da nucleotidiltransferase (reparação do DNA danificado durante o ciclo celular) (OGAMI; CHO; HOSHINO, 2013). Wang et al. (2012) observaram a existência de um agrupamento que compreende os genes SRD5A1, NSUN2, PAPD7 e ADCY2 (*adenylate cyclase 2*) conservado em diferentes espécies. A função

molecular do gene LOC100297493 refere-se à atividade transportadora de substâncias (moléculas ou íons), no meio intra ou extracelular; e também função de estimulação do sentido do olfato (ZIMIN et al., 2009). O gene IRX1 participa nas atividades moleculares de ligação no DNA e no desenvolvimento embrionário de camundongos (BOSSE et al., 1997). Apenas um SNP foi localizado no íntron do gene LOC782502 (*uncharacterized LOC782502*) no BTA20 e não foram observadas as funções moleculares e processos biológicos deste gene nas bases de dados acessadas. Foram observados na literatura apenas QTL associados características de carcaça na região que compreende os genes acima descritos (CASAS et al., 2003; MCCLURE et al., 2010).

No BTA28, observaram-se seis SNPs associados à PED e localizados no gene EDARADD (*EDAR-associated death domain*). Este gene participa dos processos biológicos de diferenciação celular, desenvolvimento de folículo capilar, odontogênese, transdução de sinal e desenvolvimento da glândula da traqueia. Segundo Gargani; Valentini e Pariset (2011), mutações neste gene podem causar a displasia ectodérmica anidrótica ligada ao cromossomo X. Esta doença é caracterizada pelo desenvolvimento anormal de tecidos e órgãos de origem ectodérmica. Não foram verificados genes anotados na região em que o SNP rs137379228 está localizado. Foram observados nesta região QTL associados a características de carcaça (MCCLURE et al., 2010). Boichard et al. (2003) observaram QTL nesta região associados à taxa de prenhez, localizado entre 0,00 e 17 cM.

Em geral, a maior parte dos genes identificados como associados com PED parecem desempenhar o papel de manutenção do organismo e nos processos de crescimento. Os genes SRD5A1, NSUN2 e LOC100297493 podem ser destacados, pois os dois primeiros parecem atuar no crescimento corporal; desenvolvimento do sistema reprodutivo de machos devido à produção de hormônios andrógenos e espermatogênese; enquanto que o último atua no sistema olfativo. Uma vez que o comportamento sexual de touros está ligado aos sistemas visual e olfativo, este último assume importância por estar relacionado à detecção de feromônios na urina de fêmeas (CHENOWETH, 1983). Em fêmeas, o sistema olfativo poderia estar relacionado à detecção de feromônios que poderiam influenciar na função ovariana, promovendo a maturidade reprodutiva (JOHNS, 1980).

A produção hormonal e o desenvolvimento das gônadas, ambos responsáveis pelo desenvolvimento do sistema reprodutivo, têm seu início durante a fase embrionária (HAFEZ; HAFEZ, 2004). No entanto, tal sistema encontra-se em estágio funcional quando o animal atinge a puberdade. A idade em que esta ocorre dependerá da espécie ou raça, além de ser altamente influenciada pelo manejo e por fatores ambientais e genéticos (VANDEMARK, 1956). Os genes identificados para PED (estudado em idade padronizada de 205 dias) podem contribuir para o início dos processos biológicos que levam à puberdade em machos da raça Canchim e do grupo genético MA. Lunstra e Echterkamp (1982) estudaram animais da raça Hereford, Angus, Red Poll, Pardo Suíço, cruzados Hereford x Angus e cruzados Angus x Hereford e observaram idade à puberdade igual a 326, 295, 283, 264, 300 e 296 dias, respectivamente. Barber e Almquist (1975) observaram idade à puberdade em bovinos da raça Charolês igual a 41 semanas (307 dias de idade aproximadamente).

#### **4.2. Perímetro escrotal ao sobreano**

Para PES, foram observados SNPs localizados nos genes SLC35E3 (*solute carrier family 35, member E3*), NUP107 (*nucleoporin 107kDa*), SNORA38 (*small nucleolar RNA, H/ACA box 38*), RAP1B (*RAP1B, member of RAS oncogene family*), PLCG1 (*phospholipase C, gamma 1*), ZFX4 (*zinc finger homeobox 4*), PEX2 (*peroxisomal biogenesis factor 2*), HEY1 (*hairy/enhancer-of-split related with YRPW motif 1*), MRPS28 (*mitochondrial ribosomal protein S28*), TPD52 (*tumor protein D52*), PAG1 (*pregnancy-associated glycoprotein 1*), FABP5 (*fatty acid binding protein 5*), FABP12 (*fatty acid binding protein 12*), NOV (*nephroblastoma overexpressed gene*), SNORA42 (*small nucleolar RNA, H/ACA box 42*), TNFRSF11B (*tumor necrosis factor receptor superfamily*), MED30 (*mediator complex subunit 30*), LOC789021 (*chromosome 7 open reading frame, human C19orf79 pseudogene*), LOC781434 (*histone cluster 1, H4i-like*), TRHR (*thyrotropin-releasing hormone receptor*), ABRA (*actin-binding Rho activating protein*) e FAM82B (*family with sequence similarity 82, member B*).

O gene SLC35E3 não possui funções biológica ou processos biológicos descritos para bovinos na literatura e bases de dados consultadas. Foi observado na base de dados Ensembl que os SNPs rs134370690, rs109284796 e rs110852214 encontram-se localizados no gene NUP107 e no snoRNA (small nucleolar RNA) SNORA38. O gene NUP107 participa do processo biológico de exportação do mRNA do núcleo e sua função biológica é a de atividade de transporte nucleocitoplasmático. Valour et al. (2013) observaram que este gene atua na maquinaria celular. Informações a respeito do snoRNA SNORA38 em bovinos não foram observadas na literatura. O gene RAP1B participa de processo biológico de proliferação celular, regulação e estabelecimento da polaridade celular. Em ratos, as funções moleculares observadas para este gene são ligação da guanosina 5'-difosfato (GDP) e da guanosina triphosphate (GTP) e na atividade da GTPase (aumento da atividade da reação química da GTP) (SCHWAMBORN; PÜSCHEL, 2004). Nesta região foram descritos QTL associados a características de carcaça (CASAS et al., 2000; CASAS et al., 2003) e crescimento (CASAS et al., 2003; KIM et al., 2003; BUITENHUIS et al., 2007).

No BTA13, foram observados SNPs localizados no gene PLCG1. Este gene participa do processo biológico de resposta celular ao estímulo do fator de crescimento epidérmico, desenvolvimento embrionário no útero, regulação positiva da migração de células epiteliais e processo catabólico de fosfolípidios (JI et al., 1997). A função molecular deste gene é a de ligação de metais e fosfolípidios e na atividade da fosfatidilinositol fosfolipase C (KIM et al., 1990). Foram observados QTL na região em que o gene PLCG1 está localizado, alguns destes QTL estão associados características de carcaça (MCCLURE et al., 2010) e taxa de conversão alimentar (SHERMAN et al., 2009).

No BTA14, o gene ZFH4 possui função molecular de ligação do DNA e do íon zinco. Fortes et al. (2011) observaram que este gene atua como importante fator de transcrição, sendo um dos genes responsáveis pela regulação molecular da puberdade em bovinos de corte. Kolbehdari et al. (2009) observaram SNP no gene ZFH4 associados com características de produção de leite e porcentagem de gordura em bovinos da raça Holandês. O gene PEX2 participa dos processos biológicos de biossíntese de ácidos na bile, homeostasia do colesterol, beta-oxidação de ácidos graxos, regulação do

processo de biossíntese de colesterol e regulação negativa da proliferação de células epiteliais e fibroblastos (VAN VELDHoven, 2010). Este gene ainda possui função molecular de ligação de íons de metais e zinco (BIERMANN; GÄRTNER, 2000). Dentre os vários processos biológicos desempenhados pelo gene HEY1, pode-se destacar que o mesmo participa do processo de angiogênese (formação de vasos sanguíneos), desenvolvimento arterial e desenvolvimento de osteoblastos (FISCHER et al., 2007). As funções moleculares deste gene são: atividade no fator de ligação de proteínas e ligação de sequências específicas do DNA. Foi observado na base de dados Ensembl que o SNP rs134553723 encontra-se localizado tanto no gene MRPS28 quanto no gene TPD52. O gene MRPS28 possui função molecular de ligação do RNA (KOC et al., 2000). Segundo Nourse et al. (1998), o gene TPD52 pode desempenhar funções associadas de regulação da proliferação celular.

O gene PAG1 participa do processo biológico de proteólise e possui função molecular na atividade da pepsina A (enzima digestiva que atua sobre proteínas) e peptidase (quebra de ligações peptídicas entre os aminoácidos das proteínas) (SZAFRANSKA et al., 2001). Este gene é detectado no soro sanguíneo materno logo após a implantação do embrião (XIE et al., 1995). O gene FABP5 participa do processo biológico de transporte e na função molecular de metabolismos de lipídios e homeostase de adipócitos (MICHAL et al., 2006). A função molecular do gene FABP12 é a de ligação de lipídios e na atividade transportadora (LIU; LI; GODBOUT, 2008). O gene NOV participa do processo biológico de regulação do crescimento celular (PERBAL, 2001). Foi observado na base de dados Ensembl que os SNPs rs133657412, rs137422799 e rs136481210 encontram-se localizados no gene TNFRSF11B e snoRNA (small nucleolar RNA) SNORA42. O gene TNFRSF11B participa do processo biológico de organização de matriz extracelular, processo de apoptose e regulação negativa da odontogênese. Em humanos este gene parece ter importante papel na densidade mineral óssea, sendo que alterações quanto à funcionalidade deste gene podem estar associadas à osteoporose (VIDAL; BRINCAT; XUEREBA ANASTASI, 2006). Informações sobre o snoRNA SNORA42 em bovinos não foram encontradas na literatura consultada.

O gene MED30 participa do processo biológico sinalização da via metabólica de receptores de andrógenos, manutenção de células-tronco e regulação positiva da transcrição (WANG et al., 2002). Este gene possui função molecular na atividade celular e como cofator na atividade da RNA polimerase II (CASAMASSIMI; NAPOLI, 2007). As funções dos genes LOC789021 e LOC781434 não foram encontradas na literatura e nas bases de dados consultadas. O gene TRHR possui função molecular na atividade receptora do hormônio liberador de tirotropina (estimulação da liberação de hormônios da tireoide) (TAKATA et al., 1998). Em humanos, o gene ABRA atua na arteriogênese e participa dos processos biológicos de regulação positiva na transdução do sinal da proteína Rho, da transcrição a partir do promotor RNA polimerase II e na importação de proteínas para o interior do núcleo (TROIDL et al., 2009). A função molecular deste gene é de coativador da transcrição. Funções moleculares e processos biológicos do gene FAM82B não foram encontrados na literatura.

Na região de 41985381 a 48936058 pb no BTA14, foram observados por Mcclure et al. (2010) e Casas et al. (2003) QTL associados a características de carcaça. Maltecca et al. (2009) observaram QTL associados a características de crescimento e reprodutiva (período de gestação) em estudo com animais Holandeses e animais cruzados (Holandês e Jersey). Na região entre 50166203 a 59969985 pb, foram observados QTL associados a características de carcaça (CASAS et al., 2003; MCCLURE et al., 2010), crescimento (MALTECCA et al., 2009) e reprodutivas (número de inseminações por concepção) (SCHULMAN et al., 2011). Daetwyler et al. (2008) observaram associações de SNPs com idade à puberdade na região de 54 cM. Na região do SNP rs134287222 (78593987 pb) foram observados QTL associados a característica de carcaça (CASAS et al., 2003), crescimento (MALTECCA et al., 2009) e reprodutivas (taxa de ovulação) (GONDA et al., 2004). Mcclure et al. (2010) observaram QTL localizados entre 95,13 e 103,90 cM associado ao perímetro escrotal.

Fortes et al. (2012) observaram importantes associações genômicas para perímetro escrotal localizadas no BTA14, demonstrando que, como observado neste trabalho, este cromossomo apresenta regiões de interesse que poderiam ser exploradas com o objetivo de se identificar indivíduos

sexualmente precoces que poderiam ser utilizados para melhorar o desempenho reprodutivo de machos. Estes autores determinaram idade de aproximadamente 525 dias, cuja medida de perímetro escrotal na idade foi ajustada para 26 cm, como sendo a idade à puberdade em machos da raça Brahman.

Como observado nas demais características estudadas, a maior parte dos genes associados ao PES são responsáveis pela manutenção do organismo, transporte íons e crescimento celular. Devido às funções observadas para o gene *PLCG1*, este poderia ser explorado em trabalhos futuros objetivando melhorias em características reprodutivas, uma vez que este parece auxiliar no desenvolvimento do bezerro durante a gestação. Os genes *FABP5*, *FABP12* e *PEX2* parecem atuar na digestão de lipídeos e, conseqüente, na produção de energia para o organismo.

O colesterol é um dos precursores da produção de hormônios esteroides, como por exemplo, a testosterona (RESENDE et al., 2010). Portanto, o gene *PEX2*, que atua na homeostasia e biossíntese de colesterol, pode estar envolvido na produção destes hormônios, sendo de grande importância para características reprodutivas e no desenvolvimento corporal. Os genes *MED30* e *TRHR* também participam do desencadeamento de processos hormonais, que estão associados ao crescimento. Estudos com animais e seres humanos indicaram que o hormônio da tireoide desempenha importante papel no desenvolvimento e função dos sistemas cardiovascular, nervoso, imune e reprodutivo (CHOKSI et al., 2003; KRASSAS, 2007).

#### **4.3. Idade ao primeiro parto**

Foram observados seis SNPs associados a IPP. Um SNP está localizado na região promotora do snRNA (small nuclear ribonucleoprotein) U1. Este snRNA participa do processo biológico de montagem do spliceossomo snRNP (small nuclear ribonucleoproteins) cuja principal função é a agregação, organização e ligação de uma ou mais snRNA e à múltiplos componentes proteicos para formar um complexo de ribonucleoproteínas (HOFFMAN; GRABOWSKI, 1992). O spliceossomo têm como uma das principais funções a retirada de íntrons do pré RNA mensageiro. A função molecular deste gene é a

de ligação dos íons de zinco e do RNA de fita simples. Na região em que este SNP está localizado foram observados na literatura QTL associados a características de carcaça (CASAS et al., 2001; ASHWELL et al., 2005) e de crescimento (MCCLURE et al., 2010). Blaschek et al. (2011) observaram SNP (rs110984522) associado à fertilidade de machos da raça Holandesa e localizado na posição 17284846 pb.

O gene EXOC4 (*exocyst complex component 4*), localizado no BTA4, participa do processo biológico de transporte de proteínas e exocitose (BARKEFORS et al., 2011). Mcclure et al. (2010) e Alexander et al. (2007) observaram QTL associados a características de carcaça e crescimento, respectivamente. O gene ZMAT4 (*Zinc finger matrin-type protein 4*), localizado no BTA27, possui função molecular de ligação do DNA e do íon de zinco (RAMOS et al., 2011). Casas et al. (2000) e Mcclure et al. (2010) observaram nesta região QTL associados a características de carcaça. Foram observados em regiões próximas aos SNPs rs134390082, rs137553882, rs133519327 e rs135481346 QTL associados à facilidade de parto (MCCLURE et al., 2010), motilidade espermática e porcentagem de espermatozoides vivos após descongelamento (DRUET et al., 2009) localizados entre 45,25 e 64,09 cM, 46,00 e 58,00 cM e 49,00 e 58,00 cM. Os genes identificados para IPP parecem desempenhar importante papel na manutenção do organismo e no transporte de íons e proteínas.

#### **4.4. Idade ao segundo parto**

Para ISP foram observados SNPs localizados em regiões intra ou intragênica aos genes FMN1 (*formin 1*), TMEM182 (*transmembrane protein 182*), TMEM178 (*transmembrane protein 178*), THUMPD2 (*THUMP domain containing 2*), LOC790871 (*hsc70-interacting protein-like*), SLC8A1 (*solute carrier family 8, member 1*) e UBQLN3 (*ubiquilin 3*).

O gene FMN1, localizado no BTA10, participa do processo biológico de organização do citoesqueleto de actina, sendo de grande importância para os movimentos celulares e musculares (ZHOU; LEDER; MARTIN, 2006). Nesta região estão descritos QTL associados a facilidade de parto, localizado entre 24,01 e 59,51 cM (MCCLURE et al., 2010). Gutiérrez-Gil et al. (2009)



observaram QTL associados à gordura subcutânea, localizados entre 24,01 e 43,65 cM, em animais cruzados entre as raças Charolês e Holandês. Schrooten; Bink e Bovenhuis (2004) observaram QTL associados ao comprimento do teto e inserção do úbere localizados entre 24,70 e 127,20 cM.

No BTA11, o TMEM182 é um gene integrante de membrana celular. Próximos a este gene estão descritos QTL associados ao peso corporal ao nascimento e perímetro escrotal (MCCLURE et al., 2010) localizados entre 1,00 e 21,08 cM. Na literatura consultada não foram observadas as funções dos genes TMEM178, THUMPD2 e LOC790871. Em camundongos, o gene SLC8A1 atua no processo biológico de comunicação celular, regulação do transporte dos íons cálcio e sódio, regulação da força de contração do coração, desenvolvimento de fibras musculares, desenvolvimento da placenta e desenvolvimento embrionário (KOO et al., 2012). Sua função molecular é a de ligação de íons de metais e na catálise da atividade de entrada e saída de cálcio ou sódio da membrana celular. Na região que compreende os genes TMEM178, THUMPD2, LOC790871 e SLC8A1 foram observados QTL associados a características de carcaça e perímetro escrotal (MCCLURE et al., 2010); taxa de conversão alimentar, consumo alimentar residual (SHERMAN et al., 2009); gordura subcutânea (GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009); motilidade espermática (DRUET et al., 2009) e peso ao desmame (KIM et al., 2003) localizados entre 21,08 e 40,48 cM, 21,08 e 30,00 cM, 13,30 e 44,10 cM, 9,20 e 31,80 cM, 19,44 e 35,09 cM, 11,00 e 58,00 cM e 19,44 e 46,098 cM.

Em seres humanos e em ratos foi verificado que o gene UBQLN3 é expresso no testículo e atua na espermatogênese (CONKLIN et al., 2000), sendo conservado em mamíferos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Canis lupus familiaris* e *Bos taurus*). Mcclure et al. (2010) observaram QTL associados ao peso da carcaça, área de olho de lombo e altura à idade adulta, localizados entre 37,96 e 54,29 cM, na região onde está localizado o gene UBQLN3. Ashwell et al. (2004) identificaram QTL associados à estatura, inserção e profundidade do úbere, localizados entre 48,216 e 54,28 cM.

Com respeito ao gene UBQLN3, pode-se inferir que fêmeas selecionadas para menor idade ao segundo parto contribuiriam geneticamente no desempenho reprodutivo de machos (em suas progênies). O gene SLC8A1

parece desempenhar importante papel durante a gestação de bovinos de corte. Seria interessante a utilização destas informações para a seleção de animais jovens, pois ISP é mensurada em idades avançadas. Estes resultados parecem corroborar aos obtidos em trabalhos genético-quantitativos em que foi observada associação genética favorável entre perímetro escrotal e ISP (SILVA et al., 2000) em bovinos da raça Canchim.

## 5. CONCLUSÃO

Com base nas análises de associação entre SNPs e as características perímetro escrotal ao desmame e ao sobreano e idade ao primeiro e segundo parto, verificou-se que os SNPs observados como significativos poderiam ser utilizados na seleção genômica da raça Canchim. As regiões polimórficas identificadas apresentaram funções moleculares e processos biológicos que podem estar envolvidos na manutenção do organismo e no desempenho reprodutivo. Genes associados à processos hormonais (SRD5A1, NSUN2, TRHR, PEX2 e MED30) poderiam ser utilizados como genes candidatos para a melhoria do desempenho em machos e fêmeas. No entanto, a validação destes resultados em outra população de bovinos Canchim deve ser conduzida futuramente para confirmação das associações genômicas.

## 6. REFERÊNCIAS

ABCCAN-EMBRAPA-GENEPLUS. **Sumário de touros Canchim, MA e Charolês edição Primavera/2012.** Disponível em: <[http://www.cnpqg.embrapa.br/~locs/sumario/canchim/can\\_index.htm](http://www.cnpqg.embrapa.br/~locs/sumario/canchim/can_index.htm)>. Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

ALENCAR, M. M. **Bovino - Raça Canchim: Origem e Desenvolvimento.** 1. ed. Brasília: Embrapa-DPU, 1988. 102p.

ALEXANDER, L. J.; GEARY, T. W.; SNELLING, W. M.; MACNEIL, M. D. Quantitative trait loci with additive effects on growth and carcass traits in a

Wagyu-Limousin F2 population. **Animal Genetics**, v. 38, n. 4, p. 413–416, 2007.

ANDRADE, P. C.; GROSSI, D. A.; PAZ, C. C. P.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; MUNARI, D. P. Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics**, v. 39, n. 5, p. 480–485, 2008.

ASHWELL, M. S.; HEYEN, D. W.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P.; DA, Y.; VANRADEN, P. M.; RON, M.; WELLER, J. I.; LEWIN, H. A. Detection of quantitative trait loci affecting milk production, health, and reproductive traits in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 2, p. 468–475, 2004.

ASHWELL, M. S.; HEYEN, D. W.; WELLER, J. I.; RON, M.; SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P.; LEWIN, H. A. Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and calving ease in Holstein-Friesian cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 88, n. 11, p. 4111–4119, 2005.

BAKER, J. H.; KROPP, J. R.; TURMAN, E. J.; BUCHANAN, D. S. A Comparison of Different Breeds for Growth Rates , Performance Traits and Scrotal Circumference in Young Beef Bulls. **Animal Science Research Report**, p. 15–18, 1981.

BALDI, F.; ALBUQUERQUE, L. G.; ALENCAR, M. M. Random regression models on Legendre polynomials to estimate genetic parameters for weights from birth to adult age in Canchim cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 127, n. 4, p. 289–299, 2010.

BALDI, F.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R.; BARBOSA, R. T. Parâmetros genéticos para características de tamanho e condição corporal , eficiência reprodutiva e longevidade em fêmeas da raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 2, p. 247–253, 2008.

BARBER, K. A.; ALMQUIST, J. O. Growth and Feed Efficiency and Their Relationship to Puberal Traits of Charolais Bulls. **Journal of Animal Science**, v. 40, p. 288–301, 1975.

BARBOSA, P. F. **O Canchim na Embrapa Pecuária Sudeste**. Convenção Nacional da Raça Canchim. **Anais...**São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2000. Disponível em: <<http://www.alice.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/44905/1/PROCIPFB2000.00028.pdf>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

BARKEFORS, I.; FUCHS, P. F.; HELDIN, J.; BERGSTRÖM, T.; FORSBERG-NILSSON, K.; KREUGER, J. Exocyst complex component 3-like 2 (EXOC3L2) associates with the exocyst complex and mediates directional migration of endothelial cells. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 27, p. 24189–24199, 2011.

BARROZO, D.; BUZANSKAS, M. E.; OLIVEIRA, J. A.; MUNARI, D. P.; NEVES, H. H. R.; QUEIROZ, S. A. Genetic parameters and environmental effects on temperament score and reproductive traits of Nellore cattle. **Animal**, v. 6, n. 1, p. 36–40, 2012.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the False Discovery Rate A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 57, n. 1, p. 289–300, 1995.

BIERMANN, M.; GÄRTNER, J. Genomic organization and characterization of human PEX2 encoding a 35-kDa peroxisomal membrane protein. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 273, n. 3, p. 985–990, 2000.

BLASCHEK, M.; KAYA, A.; ZWALD, N.; MEMILI, E.; KIRKPATRICK, B. W. A whole-genome association analysis of noncompensatory fertility in Holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 9, p. 4695–4699, 2011.

BOICHARD, D.; GROHS, C.; BOURGEOIS, F.; CERQUEIRA, F.; FAUGERAS, R.; NEAU, A.; RUPP, R.; AMIGUES, Y.; BOSCHER, M. Y.; LEVÉZIEL, H. Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 35, n. 1, p. 77–101, 2003.

BORBA, L. H. F.; REY, F. S. B.; SILVA, L. O. C.; BOLIGON, A. A.; ALENCAR, M. M. Parâmetros genéticos para características de crescimento e reprodução

de bovinos da raça Canchim. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 46, n. 11, p. 1570–1578, 2011.

BOSSE, A.; ZÜLCH, A.; BECKER, M. B.; TORRES, M.; GÓMEZ-SKARMETA, J. L.; MODOLELL, J.; GRUSS, P. Identification of the vertebrate Iroquois homeobox gene family with overlapping expression during early development of the nervous system. **Mechanisms of Development**, v. 69, p. 169–181, 1997.

BRUMATTI, R. C.; FERRAZ, J. B. S.; ELER, J. P.; FORMIGONI, I. B. Desenvolvimento de índice de seleção em gado corte sob o enfoque de um modelo bioeconômico. **Archivos de Zootecnia**, v. 60, n. 230, p. 205–213, 2011.

BUITENHUIS, A. J.; LUND, M. S.; THOMASEN, J. R.; THOMSEN, B.; NIELSEN, V. H.; BENDIXEN, C.; GULDBRANDTSEN, B. Detection of quantitative trait loci affecting lameness and leg conformation traits in Danish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 90, n. 1, p. 472–481, 2007.

BURNS, B. M.; GAZZOLA, C.; HOLROYD, R. G.; CRISP, J.; MCGOWAN, M. R. Male reproductive traits and their relationship to reproductive traits in their female progeny: a systematic review. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 46, n. 3, p. 534–553, 2011.

BUZANSKAS, M. E.; GROSSI, D. A.; BALDI, F.; BARROZO, D.; SILVA, L. O. C.; TORRES JÚNIOR, R. A. A.; MUNARI, D. P.; ALENCAR, M. M. Genetic associations between stayability and reproductive and growth traits in Canchim beef cattle. **Livestock Science**, v. 132, p. 107–112, 2010.

CASAMASSIMI, A.; NAPOLI, C. Mediator complexes and eukaryotic transcription regulation: an overview. **Biochimie**, v. 89, n. 12, p. 1439–1446, 2007.

CASAS, E.; KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D.; KOOHMARAIE, M.; STONE, R. T. Identification of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Animal Genetics**, v. 35, n. 1, p. 2–6, 2004.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T. P. L.; STONE, R. T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 2976–2983, 2003.

CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J. W.; STONE, R. T.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **Journal of Animal Science**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E.; STONE, R. T.; KEELE, J. W.; SHACKELFORD, S. D.; KAPPES, S. M.; KOOHMARAIE, M. A comprehensive search for quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternative forms of the myostatin gene. **Journal of Animal Science**, v. 79, p. 854–860, 2001.

CASTRO-PEREIRA, V. M.; ALENCAR, M. M.; BARBOSA, R. T. Estimativas de parâmetros genéticos e de ganhos direto e indireto à seleção para características reprodutivas e de crescimento em um rebanho. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1029–1036, 2007.

CHENOWETH, P. J. Sexual behavior of the bull: a review. **Journal of Dairy Science**, v. 66, n. 1, p. 173–179, 1983.

CHOKSI, N. Y.; JAHNKE, G. D.; ST HILAIRE, C.; SHELBY, M. Role of thyroid hormones in human and laboratory animal reproductive health. **Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology**, v. 68, n. 6, p. 479–491, 2003.

CONKLIN, D.; HOLDERMAN, S.; WHITMORE, T. E.; MAURER, M.; FELDHAUS, A. L. Molecular cloning, chromosome mapping and characterization of UBQLN3 a testis-specific gene that contains an ubiquitin-like domain. **Gene**, v. 249, p. 91–98, 2000.

DAETWYLER, H. D.; SCHENKEL, F. S.; SARGOLZAEI, M.; ROBINSON, J. A. B. A genome scan to detect quantitative trait loci for economically important traits in Holstein cattle using two methods and a dense single nucleotide polymorphism map. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 8, p. 3225–3236, 2008.

DRUET, T.; FRITZ, S.; SELLEM, E.; BASSO, B.; GÉRARD, O.; SALAS-CORTES, L.; HUMBLLOT, P.; DRUART, X.; EGGEN, A. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 126, n. 4, p. 269–277, 2009.

ELLIS, J. A.; PANAGIOTOPOULOS, S.; AKDENIZ, A.; JERUMS, G.; HARRAP, S. B. Androgenic correlates of genetic variation in the gene encoding 5alpha-reductase type 1. **Journal of Human Genetics**, v. 50, n. 10, p. 534–537, 2005.

FAROOK AL-AZZAWI, J. L. Mechanism of androgen receptor action. **Maturitas**, v. 63, n. 2, p. 142–148, 2009.

FENG, Z.; WONG, W. W. L.; GAO, X.; SCHENKEL, F. Generalized genetic association study with samples of related individuals. **The Annals of Applied Statistics**, v. 5, n. 3, p. 2109–2130, 2011.

FISCHER, A.; STEIDL, C.; WAGNER, T. U.; LANG, E.; JAKOB, P. M.; FRIEDL, P.; KNOBELOCH, K.-P.; GESSLER, M. Combined loss of Hey1 and HeyL causes congenital heart defects because of impaired epithelial to mesenchymal transition. **Circulation Research**, v. 100, n. 6, p. 856–863, 2007.

FORTES, M. R. S.; LEHNERT, S. A.; BOLORMAA, S.; REICH, C.; FORDYCE, G.; CORBET, N. J.; WHAN, V.; HAWKEN, R. J.; REVERTER, A. Finding genes for economically important traits : Brahman cattle puberty. **Animal Production Science**, v. 52, p. 143–150, 2012.

FORTES, M. R. S.; REVERTER, A.; NAGARAJ, S. H.; ZHANG, Y.; JONSSON, N. N.; BARRIS, W.; LEHNERT, S.; BOE-HANSEN, G. B.; HAWKEN, R. J. A single nucleotide polymorphism-derived regulatory gene network underlying puberty in 2 tropical breeds of beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 89, n. 6, p. 1669–1683, 2011.

GARGANI, M.; VALENTINI, A.; PARISET, L. A novel point mutation within the EDA gene causes an exon dropping in mature RNA in Holstein Friesian cattle

breed affected by X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia. **BMC Veterinary Research**, v. 7, n. 35, 2011.

GODDARD, M. Genomic selection: prediction of accuracy and maximisation of long term response. **Genetica**, v. 136, n. 2, p. 245–257, 2009.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Genomic selection. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 6, p. 323–330, 2007.

GONDA, M. G.; ARIAS, J. A.; SHOOK, G. E.; KIRKPATRICK, B. W. Identification of an ovulation rate QTL in cattle on BTA14 using selective DNA pooling and interval mapping. **Animal Genetics**, v. 35, n. 4, p. 298–304, 2004.

GUTIÉRREZ-GIL, B.; WILLIAMS, J. L.; HOMER, D.; BURTON, D.; HALEY, C. S.; WIENER, P. Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, p. 24–36, 2009.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. **Reprodução Animal**. 7. ed. Manole, 2004. 513p.

HAWKEN, R. J.; ZHANG, Y. D.; FORTES, M. R. S.; COLLIS, E.; BARRIS, W. C.; CORBET, N. J.; WILLIAMS, P. J.; FORDYCE, G.; HOLROYD, R. G.; WALKLEY, J. R. W.; BARENDSE, W.; JOHNSTON, D. J.; PRAYAGA, K. C.; TIER, B.; REVERTER, A.; LEHNERT, S. A. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1398–1410, 2012.

HEYDE, C. C. **Quasi-Likelihood And Its Application: A General Approach to Optimal Parameter Estimation**. 1. ed. Canberra, Australia: Springer, 1997. 235p.

HOFFMAN, B. E.; GRABOWSKI, P. J. U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. **Genes & Development**, v. 6, p. 2554–2568, 1992.

HÖGLUND, J. K.; GULDBRANDTSEN, B.; SU, G.; THOMSEN, B.; LUND, M. S. Genome scan detects quantitative trait loci affecting female fertility traits in



Danish and Swedish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 5, p. 2136–2143, 2009.

HOLMBERG, M.; ANDERSSON-EKLUND, L. Quantitative trait loci affecting fertility and calving traits in Swedish dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 9, p. 3664–3671, 2006.

HUSSAIN, S.; TUORTO, F.; MENON, S.; BLANCO, S.; COX, C.; FLORES, J. V.; WATT, S.; KUDO, N. R.; LYKO, F.; FRYE, M. The mouse cytosine-5 RNA methyltransferase NSun2 is a component of the chromatoid body and required for testis differentiation. **Molecular and Cellular Biology**, v. 33, n. 8, p. 1561–1570, 2013.

JI, Q. S.; WINNIER, G. E.; NISWENDER, K. D.; HORSTMAN, D.; WISDOM, R.; MAGNUSON, M. A.; CARPENTER, G. Essential role of the tyrosine kinase substrate phospholipase C-gamma1 in mammalian growth and development. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 7, p. 2999–3003, 1997.

JOHNS, M. A. The role of vomeronasal system in mammalian reproductive physiology. In: MULLER-SCHWARZ; D., SILVERSTEIN, R. M. (Eds.). **Chemical Signals, Vertebrates and Aquatic Invertebrates**. New York: Plenum Press, 1980. p. 341–364.

KIM, J. J.; FARNIR, F.; SAVELL, J.; TAYLOR, J. F. Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* ( Angus ) and *Bos indicus* ( Brahman ) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, p. 1933–1942, 2003.

KIM, J. W.; SIM, S. S.; KIM, U. H.; NISHIBE, S.; WAHL, M. I.; CARPENTER, G.; RHEE, S. G. Tyrosine Residues in Bovine Phospholipase C-γ Phosphorylated by the Epidermal Growth Factor Receptor in Vitro. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 7, p. 3940–3943, 1990.

KOC, E. C.; BURKHART, W.; BLACKBURN, K.; MOSELEY, A.; KOC, H.; SPREMULLI, L. L. A proteomics approach to the identification of mammalian

mitochondrial small subunit ribosomal proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 42, p. 32585–32591, 2000.

KOLBEHDARI, D.; WANG, Z.; GRANT, J. R.; MURDOCH, B.; PRASAD, A.; XIU, Z.; MARQUES, E.; STOTHARD, P.; MOORE, S. S. A whole genome scan to map QTL for milk production traits and somatic cell score in Canadian Holstein bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 126, n. 3, p. 216–227, 2009.

KOO, T.-H.; YANG, H.; AN, B.-S.; CHOI, K.-C.; HYUN, S.-H.; JEUNG, E.-B. Calcium transport genes are differently regulated in maternal and fetal placenta in the knockout mice of calbindin-D(9k) and -D(28k). **Molecular Reproduction and Development**, v. 79, n. 5, p. 346–355, 2012.

KRASSAS, G. E. Thyroid disease and female reproduction. **Clinical Endocrinology**, v. 66, n. 3, p. 309–321, 2007.

KRUPA, E.; WOLFOVÁ, M.; PEŠKOVIČOVÁ, D.; HUBA, J.; KRUPOVÁ, Z. Economic values of traits for Slovakian Pied cattle under different marketing strategies. **Czech Journal of Animal Science**, v. 50, n. 10, p. 483–492, 2005.

LIU, R. Z.; LI, X.; GODBOUT, R. A novel fatty acid-binding protein (FABP) gene resulting from tandem gene duplication in mammals: transcription in rat retina and testis. **Genomics**, v. 92, n. 6, p. 436–445, 2008.

LUNSTRA, D. . D. .; ECHTERNKAMP, S. . E. . Puberty in Beef Bulls: Acrosome Morphology and Semen Quality in Bulls of Different Breeds. **Journal of Animal Science**, v. 55, p. 638–648, 1982.

MALTECCA, C.; WEIGEL, K. A; KHATIB, H.; COWAN, M.; BAGNATO, A. Whole-genome scan for quantitative trait loci associated with birth weight, gestation length and passive immune transfer in a Holstein x Jersey crossbred population. **Animal Genetics**, v. 40, n. 1, p. 27–34, 2009.

MARTIN, L. C.; BRFNKST, J. S.; BOURDONT, R. M.; CUNDIFF, L. V. Genetic Effects on and Subsequent Heifer Puberty. **Journal of Animal Science**, v. 70, p. 4006–4017, 1992.

MCCLURE, M. C.; MORSCI, N. S.; SCHNABEL, R. D.; KIM, J. W.; YAO, P.; ROLF, M. M.; MCKAY, S. D.; GREGG, S. J.; CHAPPLE, R. H.; NORTHCUTT, S. L.; TAYLOR, J. F. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 6, p. 597–607, 2010.

MICHAL, J. J.; ZHANG, Z. W.; GASKINS, C. T.; JIANG, Z. The bovine fatty acid binding protein 4 gene is significantly associated with marbling and subcutaneous fat depth in Wagyu x Limousin F2 crosses. **Animal Genetics**, v. 37, n. 4, p. 400–402, 2006.

MIGLIOR, F.; PIZZI, F.; GUAITA, N. Effect of environmental factors on Non Return Rate in Italian Holstein-Friesians. **Interbull. Bulletin**, v. 27, p. 106–108, 1997.

MISZTAL, I. Reliable computing in estimation of variance components. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 125, n. 6, p. 363–370, 2008.

NOURSE, C. R.; MATTEI, M. G.; GUNNING, P.; BYRNE, J. A. Cloning of a third member of the D52 gene family indicates alternative coding sequence usage in D52-like transcripts. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1443, p. 155–168, 1998.

OGAMI, K.; CHO, R.; HOSHINO, S.-I. Molecular cloning and characterization of a novel isoform of the non-canonical poly(A) polymerase PAPD7. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 432, n. 1, p. 135–140, 2013.

PERBAL, B. NOV (nephroblastoma overexpressed) and the CCN family of genes: structural and functional issues. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, p. 57–79, 2001.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing.** R Foundation for Statistical Computing Vienna, Austria, 2011. Disponível em: <<http://www.r-project.org/>> Acesso em: 05 de fevereiro de 2013.

RAMOS, E.; CHEN, G.; SHRINER, D.; DOUMATEY, A.; GERRY, N. P.; HERBERT, A.; HUANG, H.; ZHOU, J.; CHRISTMAN, M. F.; ADEYEMO, A.; ROTIMI, C. Replication of genome-wide association studies (GWAS) loci for fasting plasma glucose in African-Americans. **Diabetologia**, v. 54, n. 4, p. 783–788, 2011.

RESENDE, L. O. T.; REIS, R. M.; FERRIANI, R. A.; VIREQUE, A. A.; SANTANA, L. F.; SILVA, A. C. J. S. R.; MARTINS, W. D. P. Concentração dos hormônios esteroides no fluido folicular de folículos ovarianos maduros e imaturos de pacientes com síndrome dos ovários policísticos submetidas à fertilização in vitro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 32, n. 9, p. 447–453, 2010.

SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; BENDIXEN, C.; LUND, M. S. Genome-wide association mapping for female fertility traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Animal Genetics**, v. 41, n. 6, p. 579–588, 2010.

SCHROOTEN, C.; BINK, M. C. A. M.; BOVENHUIS, H. Whole genome scan to detect chromosomal regions affecting multiple traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 10, p. 3550–3560, 2004.

SCHULMAN, N. F.; SAHANA, G.; ISO-TOURU, T.; MCKAY, S. D.; SCHNABEL, R. D.; LUND, M. S.; TAYLOR, J. F.; VIRTA, J.; VILKKI, J. H. Mapping of fertility traits in Finnish Ayrshire by genome-wide association analysis. **Animal Genetics**, v. 42, n. 3, p. 263–269, 2011.

SCHWAMBORN, J. C.; PÜSCHEL, A. W. The sequential activity of the GTPases Rap1B and Cdc42 determines neuronal polarity. **Nature Neuroscience**, v. 7, n. 9, p. 923–929, 2004.

SHERMAN, E. L.; NKUMAH, J. D.; LI, C.; BARTUSIAK, R.; MURDOCH, B.; MOORE, S. S. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 37–45, 2009.

SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; FREITAS, A. R.; BARBOSA, R. T.; BARBOSA, P. F.; OLIVEIRA, M. C. S.; CORRÊA, L. A.; NOVAES, A. P.; TULLIO, R. R. Herdabilidades e Correlações Genéticas para Peso e Perímetro Escrotal de Machos e Características Reprodutivas e de Crescimento de Fêmeas, na Raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 29, n. 6, p. 2223–2230, 2000.

SZAFRANSKA, B.; MIURA, R.; GHOSH, D.; EZASHI, T.; XIE, S.; ROBERTS, R. M.; GREEN, J. A. Gene for porcine pregnancy-associated glycoprotein 2 (poPAG2): its structural organization and analysis of its promoter. **Molecular Reproduction and Development**, v. 60, n. 2, p. 137–146, 2001.

TAKATA, M.; SHIMADA, Y.; IKEDA, A.; SEKIKAWA, K. Molecular cloning of bovine thyrotropin-releasing hormone receptor gene. **The Journal of Veterinary Medical Science**, v. 60, n. 1, p. 123–127, 1998.

TALHARI, F. M.; ALENCAR, M. M.; MASCIOLI, A. S.; SILVA, A. M.; BARBOSA, P. F. Correlações Genéticas entre Características Produtivas de Fêmeas em um Rebanho da Raça Canchim. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 32, n. 4, p. 880–886, 2003.

TROCÓNIZ, J. F.; BELTRÁN, J.; BASTIDAS, H.; LARREAL, H.; BASTIDAS, P. Testicular development, body weight changes, puberty and semen traits of growing Guzerat and Nellore bulls. **Theriogenology**, v. 35, n. 4, p. 815–826, 1991.

TROIDL, K.; RÜDING, I.; CAI, W.-J.; MÜCKE, Y.; GROSSEKETTLER, L.; PIOTROWSKA, I.; APFELBECK, H.; SCHIERLING, W.; VOLGER, O. L.; HORREVOETS, A. J.; GROTE, K.; SCHMITZ-RIXEN, T.; SCHAPER, W.; TROIDL, C. Actin-binding rho activating protein (Abra) is essential for fluid shear stress-induced arteriogenesis. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 29, n. 12, p. 2093–2101, 2009.

VALOUR, D.; HUE, I.; DEGRELLE, S.; DÉJEAN, S.; MAROT, G.; DUBOIS, O.; GERMAIN, G.; HUMBLOT, P.; PONTER, A.; CHARPIGNY, G.; GRIMARD, B. Pre- and Post-Partum Mild Underfeeding Influences Gene Expression in the Reproductive Tract of Cyclic Dairy Cows. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, n. 3, p. 484–499, 2013.

VAN VELDHOVEN, P. P. Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. **Journal of Lipid Research**, v. 51, n. 10, p. 2863–2895, 2010.

VANDEMARK, N. L. **Quantitative aspects of semen production in bulls**. In: III International Congress of Animal Reproduction. **Anais...**Cambridge: 1956

VIANNA, A. T.; PIMENTEL-GOMES, F.; SANTIAGO, M. **Formação do Gado Canchim pelo Cruzamento Charolês-Zebu**. 2. ed., Nobel, São Paulo-SP, 193p.

VIDAL, C.; BRINCAT, M.; XUEREB ANASTASI, A. TNFRSF11B gene variants and bone mineral density in postmenopausal women in Malta. **Maturitas**, v. 53, n. 4, p. 386–395, 2006.

WANG, D.; ZHANG, Y.; FAN, Z.; LIU, G.; YU, J. LCGbase: A Comprehensive Database for Lineage-Based Co-regulated Genes. **Evolutionary Bioinformatics**, v. 8, p. 39–46, 2012.

WANG, Q.; SHARMA, D.; REN, Y.; FONDELL, J. D. A coregulatory role for the TRAP-mediator complex in androgen receptor-mediated gene expression. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 45, p. 42852–42858, 2002.

WOLFOVÁ, M.; WOLF, J.; ZHRÁDKOVÁ, R.; PŘIBYL, J.; DAŇO, J.; KRUPA, E.; KICA, J. Breeding objectives for beef cattle used in different production systems. **Livestock Production Science**, v. 95, n. 3, p. 217–230, 2005.

XIE, S.; GREEN, J.; BECKERS, J. F.; ROBERTS, R. M. The gene encoding bovine pregnancy-associated glycoprotein-1, an inactive member of the aspartic proteinase family. **Gene**, v. 159, n. 2, p. 193–197, 1995.

ZHOU, F.; LEDER, P.; MARTIN, S. S. Formin-1 protein associates with microtubules through a peptide domain encoded by exon-2. **Experimental Cell Research**, v. 312, n. 7, p. 1119–1126, 2006.

ZIMIN, A. V.; DELCHER, A. L.; FLOREA, L.; KELLEY, D. R.; SCHATZ, M. C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; VAN TASSELL, C. P.; SONSTEGARD, T. S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.; YORKE, J. A.; SALZBERG, S. L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology**, v. 10, n. 4, p. r42, 2009.