RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 31/03/2025.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA E ANÁLISE FUNCIONAL COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO PARA HIPOPLASIA TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO DE PERNAS E PÉS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Thales de Lima Silva
Médico Veterinário

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA E ANÁLISE FUNCIONAL COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO PARA HIPOPLASIA TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO DE PERNAS E PÉS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

Thales de Lima Silva

Orientador: **Dr. Roberto Carvalheiro**

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

2023

S586e

Silva, Thales de Lima
Estudo de associação genômica ampla e análise funcional com dados de sequenciamento completo para hipoplasia testicular e características de conformação de pernas e pés em bovinos da raça Nelore / Thales de Lima Silva. -- Jaboticabal, 2023
108 p. : il., tabs.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: Roberto Carvalheiro

1. Bovinos de corte Melhoramento Genético. 2. Nelore (Bovino). 3. Genômica. 4. SNPs. 5. Malformações congênitas. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA E ANÁLISE FUNCIONAL COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO PARA HIPOPLASIA TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO DE PERNAS E PÉS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

AUTOR: THALES DE LIMA SILVA

ORIENTADOR: ROBERTO CARVALHEIRO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

Pesquisador Dr. ROBERTO CARVALHEIRO (Participaçao Presencial)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. CEDRIC GONDRO (Participaçao Virtual)
Michigan State University / Michigan/EUA

Prof. Dr. DANISIO PRADO MUNARI (Participaçao Presencial)
Departamento de Engenharia e Ciencias Exatas DECEx / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dr. DELVAN ALVES DA SILVA (Participaçao Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Viçosa

gov.br Documento assinado digitalmente
DELVAN ALVES DA SILVA
Data: 19/04/2023 06:22:57-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA (Participaçao Presencial)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Data: 19/04/2023 10:58:51-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Jaboticabal, 31 de março de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Thales de Lima Silva – Nasceu em Brumado, Bahia em 05 de março de 1981, filho de Aparecido Souza Silva e Deuza de Lima Silva. Em agosto de 2007 iniciou o curso de Medicina Veterinária na Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais em Betim como bolsista do Programa Universidade para Todos – PROUNI, do governo federal, graduando-se em julho de 2012. Entre fevereiro de 2013 e julho de 2015 cursou MBA em Agronegócios pela Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – ESALQ/USP, tendo seu trabalho de conclusão de curso "Estatística como ferramenta para mitigar o risco de preço sobre o hedge de boi gordo" publicado na Revista iPecege em abril de 2016. Em março de 2017 iniciou o mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – UESB como bolsista CAPES, dedicando-se ao estudo da interação genótipo-ambiente na análise da variabilidade genética de características reprodutivas na raça Nelore, sob a orientação do professor Dr. Carlos Henrique Mendes Malhado, recebendo o título de mestre em Fevereiro de 2019. No mesmo ano iniciou o doutorado no Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da UNESP – Campus de Jaboticabal, sob a orientação do pesquisador Dr. Roberto Carvalheiro, sendo bolsista CAPES. Entre dezembro de 2021 e novembro de 2022 realizou doutorado sanduíche na Michigan State Univesity, EUA, sob orientação do prof. Dr. Cedric Gondro e com apoio financeiro do Programa Institucional de Internacionalização - PRINT, da CAPES.

“O conhecimento não é predeterminado pela hereditariedade; não é predeterminado nas coisas que nos rodeiam - em conhecer as coisas ao seu redor, o sujeito sempre acrescenta algo a elas.”

Jean Piaget

DEDICO

A todos aqueles que têm a coragem de sonhar e correr o risco de viver seus sonhos, mesmo que tenham que pagar um alto preço por isso.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Deuza e Aparecido pelo seu amor incondicional e pelo sacrifício e dedicação para que eu e meus irmãos tivéssemos uma educação de excelência.

Aos meus irmãos – Moab, Naiara e Bruno, aos meus sobrinhos – Heitor e Júlia, ao Rafael, Anayara e Aline, por todo apoio, confiança e respeito. Amo todos vocês!

Ao meu orientador Dr. Roberto Carvalheiro por acreditar no meu potencial e pela serenidade e profissionalismo com que me orientou apesar das adversidades que enfrentamos durante os anos da realização deste doutorado.

Ao Prof. Dr. Cedric Gondro e sua esposa Simone, pelo acolhimento, gentileza e ensinamentos durante minha estadia em Michigan e pela humanidade com que me trataram durante o momento mais difícil deste doutorado. Serei eternamente grato!

Aos Profs. Drs. Lúcia Galvão de Albuquerque, Danísio Prado Munari e Henrique Nunes de Oliveria e ao Diego Mafra (STPG), pelo exemplo de paciência, atenção, suporte, e colaboração.

Aos Drs. Delvan Silva, Gabriel Campos, Giovana Vargas, Pablo Fonseca e Haroldo Neves pelos valiosos ensinamentos e colaboração tanto na fase de análise dos dados quanto na redação desta tese.

Aos amigos da UNESP – Ivan, Caio, Willian, Larissa, Baltasar, Gabi, Patrícia, Bruna, Rafael e Diego, e da MSU – Lee, Rodrigo S., Hanna, Lautaro, Fei, Ken, Bayode, Yasir, Gabriel, Bia e Junjie, pelo companheirismo, apoio e cumplicidade.

Aos meus colegas da república MK2.0 – Rabera, David, Dodô, Hugo, Thallison, Bernardo e Andrus. E aos meus *roommates* no Spartan Village – Luiz, Piush e Luyando. Conviver com vocês foi a melhor parte desta jornada.

Aos amigos que fiz ao longo do caminho e que quero levar para a vida toda – Marcos, Viviane, Dan Winter, Thomas McCurdy, Hélio & Hyllana, Maiyara, Rodrigo C., Tiago, Eduardo & Sabrina, Bia & Bernard, Simone & Cris, Thainá, Leo Ziccardi, Leo Volp & Bella, Amanda S. & Juliano S., João, Alisson, Rod Friesen, Terry, Mylena, Amanda & Juliano G., Ricardo & Vanessa, Paulo C., Pedro.

À FCAV/UNESP e à Michigan State University pela oportunidade de desenvolver este trabalho.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP – processos nº 2015/25449-6 e 2017/03331-9), pelo apoio financeiro.

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA E ANÁLISE FUNCIONAL COM DADOS DE SEQUENCIAMENTO COMPLETO PARA HIPOPLASIA TESTICULAR E CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO DE PERNAS E PÉS EM BOVINOS DA RAÇA NELORE

RESUMO – A Hipoplasia Testicular (TH) e a Malformação de Pernas e Pés (FLM) estão entre os principais problemas funcionais observados em gado de corte devido à importância da correlação da medidas testiculares com características relacionadas a fertilidade, bem como o bem-estar animal, desempenho e longevidade associados à má formação das pernas e pés. Através de estudos de associação genômica ampla (GWAS) é possível encontrar segmentos do genoma que expliquem uma parte substancial da variação em doenças ou características de interesse econômico. Quando realizados com dados de sequenciamento completo (WGS) espera-se alcançar um refinamento na caracterização de variantes causais possibilitando uma predição de valores genômicos mais precisos. Os objetivos deste estudo foram: i) Estimar parâmetros e tendências genéticas para TH e FLM na raça Nelore; ii) investigar possíveis genes funcionais e vias metabólicas associadas à TH e FLM; iii) compreender a arquitetura genética destas características. Foram utilizados os fenótipos de 1.036.960 animais da raça Nelore e genótipos imputados para HD (~777.000 SNPs) e sequência tendo como referência 151 animais provenientes da base de dados Aliança Nelore. A herdabilidade estimada para TH (0,16) e FLM (0,19) na raça Nelore concorda com valores já relatados na literatura e sugere uma redução da incidência destas malformações por meio da seleção. A tendência fenotípica evidencia a importância de se intensificar esta seleção, apesar do ganho genético anual favorável (TH = -0.12; FLM = -0.25) no período avaliado. Dados de HD e sequencia passibilitaram a identificação de diferentes regiões cromossômicas associadas principalmente à espermatogênese, síntese de esteróides, metabolismo lipídico e esqueletogênese. Novos estudos podem vir a investigar o conjunto de variantes genéticas significativas aqui relatadas, buscando melhorar as decisões de seleção e acasalamento para reduzir a incidência destas em bovinos da raça Nelore.

Palavras chave: acurácia de predição, *Bos indicus*, característica funcional, genes candidatos, tendência genética.

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY AND FUNCTIONAL ANALYSIS WITH WHOLE-GENOME SEQUENCING DATA FOR TESTICULAR HYPOPLASIA AND FEET AND LEG MALFORMATION TRAITS IN NELORE CATTLE

ABSTRACT – Testicular Hypoplasia (TH) and Feet and Legs Malformation (FLM) are important functional problems observed in beef cattle because of the correlated testicular measurements with fertility-related traits, as well as welfare, performance and longevity related to healthy feet and legs. Through Genomic-Wide Association Studies (GWAS), it is possible to find genomic fragments that explain a significant portion of variation in diseases or traits of economic interest. Improvements in the characterization of causal variants are expected when we use Whole-Genome sequencing (WGS) data to predict genomic values more accurately. The objectives of this study were: i) to estimate the genetic parameters and trends of TH and FLM in the Nellore cattle; ii) to investigate possible functional genes and pathways associated with TH and FLM; iii) to understand the genetic architecture of these traits. We used phenotypes of 1,036,960 Nellore animals and genotypes imputed for HD (~777,000 SNPs) and WGS using as reference 151 sequenced animals from the Aliança Nelore database. Estimated heritability for TH (0.16) and FLM (0.19) in the Nellore breed was consistent with values previously reported in the literature, suggesting a reduction in the incidence of these malformations by selection. Phenotypic trend indicated the importance of reinforcing this selection, despite a favorable annual genetic gain over the study period (TH = -0.12; FLM = -0.25). Sequence and HD data allowed identification of distinct chromosomal regions primarily associated with spermatogenesis, synthesis of steroids, lipid metabolism, and skeletogenesis. New research may examine the important genetic variants reported here with the aim of improving selection and mating decisions to reduce their incidence in Nellore cattle.

Key words: *Bos indicus*, functional trait, candidate genes, genetic trend, prediction accuracy.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

1.1. Introdução

De acordo com dados da FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations) o Brasil possuía o maior rebanho bovino do mundo em 2020 com 217 milhões de cabeças, representando 14,3% do rebanho mundial. Neste mesmo ano, o país também passou a ocupar o posto de maior exportador de carne bovina 14,4% do mercado internacional, ou 2,2 milhões de toneladas. Entretanto, o país ocupa apenas a terceira colocação em valor (US$ 7 bilhões), sendo superado pela Austrália (US$ 8.5 bilhões) e EUA (US$ 8.1 bilhões) (Aragão & Contini, 2021). Desta forma, o Brasil ainda tem muito a explorar neste mercado em termos de valor. Isto será possíel dando um maior enfoque na qualidade da carne bovina produzida no país.

Para melhorar a qualidade da carne bovina exportada, de modo a alcançar mercados mais exigentes, o rebanho brasileiro precisa ser melhorado geneticamente. Entretanto, o método de monta natural ainda é extensamente utilizado nos rebanhos comerciais, e o país ainda não consegue produzir touros geneticamente superiores em número suficiente para atender sua demanda de reposição anual. Na raça Nelore, que corresponde a 80% do rebanho nacional, mesmo que fossem utilizados todos os machos à desmama dos programas de seleção, com controle de genealogia e todos os touros portadores de CEIP (Certificado Especial de Identificação e Produção), ainda haveria um déficit de cerca de 48% de touros para reposição (Rosa et al., 2021).

O CEIP permite que animais geneticamente superiores sejam certificados como melhoradores (MAPA, 2006). O que é necessário para que animais não registrados possam ser inscritos como doadores de sêmen e garantir benefícios fiscais na comercialização. Touros com CEIP são fontes de receita e importantes ferramentas para melhorar a eficiência de produção dos rebanhos que os utilizam. Entre 20% e 30% dos melhores animais de cada safra são candidatos a receber a certificação, mas alguns acabam não recebendo devido a problemas morfológicos identificados na inspeção final. Esse déficit de touros melhoradores no país é agravado pelas perdas devido a características desclassificantes.

Dois dos principais problemas funcionais observados em gado de corte nos programas CEIP são a hipoplasia testicular (Testicular Hypoplasia - TH) e a malformação de pernas e pés (Feet and Legs Malformation - FLM). Os animais

acometidos geralmente são descartados por contribuírem para a diminuição da eficiência em sistemas de produção de carne pela sua incapacidade de desempenhar satisfatoriamente funções produtivas e reprodutivas. Estudos recentes relacionados a estes atributos morfológicos/funcionais mencionam a ocorrência de perdas econômicas consideráveis na raça Nelore (Neves et al., 2019; Vargas et al., 2017), e indicam a possibilidade de melhorias por meio da seleção de reprodutores.

Os Estudos de Associação Genômica Amplos (Genome-Wide Association Study – GWAS) e as análises funcionais podem ajudar a identificar quais genes chave reguladores, ou subjacentes, e processos biológicos estão envolvidos com a ocorrência destas malformações contribuido para o processo de seleção. Dados o aumento considerável do número de animais genotipados nas bases de dados da raça Nelore a recente atualização no mapa de referência genômica da espécie bovina, se faz necessário trazer novas considerações para o conhecimento destas características objetivando animais com um maior potencial genético produtivo e uma menor incidência de problema funcionais.

4.5. Conclusions

In summary, the risk of TH or FLM is driven by a large number of small-effect variants, potentially implicating most of the regulatory variants that are active in tissues relevant to these malformations. The observation that the heritability of these disqualifying traits is widely distributed across the genome seems to contradict the expectation that their causal variants are concentrated in specific biologically relevant pathways and specific genes. SNPs significantly associated with Testicular Hypoplasia and Feet and Legs Malformation are associated with QTL for reproductive traits, meat and carcass and exterior conformation. The genes identified as potentially associated are involved in reproductive aspects of bovines and short stature, respectively. Key roles of biological pathways and processes related to spermatogenesis, macrophage-mediated inflammation and control of tumor cell development were detected.

4.6. References

Benjamini, Y., Hochberg, Y., 1995. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J. R. Stat. Soc. Ser. B 57, 289–300. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x

Boyle, E.A., Li, Y.I., Pritchard, J.K., 2017. An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. Cell. https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.038

Chakravarti, A., Turner, T.N., 2016. Revealing rate-limiting steps in complex disease biology: The crucial importance of studying rare, extreme-phenotype families. BioEssays 38, 578–586. https://doi.org/10.1002/bies.201500203

Chang, C.C., Chow, C.C., Tellier, L.C.A.M., Vattikuti, S., Purcell, S.M., Lee, J.J., 2015. Second-generation PLINK: Rising to the challenge of larger and richer datasets. Gigascience 4, 7. https://doi.org/10.1186/s13742-015-0047-8

Chen, J., Bardes, E.E., Aronow, B.J., Jegga, A.G., 2009. ToppGene Suite for gene list enrichment analysis and candidate gene prioritization. Nucleic Acids Res. 37, 305–311. https://doi.org/10.1093/nar/gkp427

Dang, Y., Li, S., Zhao, P., Xiao, L., Wang, L., Shi, Y., Luo, L., Wang, S., Wang, H., Zhang, K., 2022. The lysine deacetylase activity of histone deacetylases 1 and 2 is required to safeguard zygotic genome activation in mice and cattle. Development 149. https://doi.org/10.1242/dev.200854

Fonseca, P.A. de S., dos Santos, F.C., Lam, S., Suárez-Vega, A., Miglior, F., Schenkel, F.S., Diniz, L. de A.F., Id-Lahoucine, S., Carvalho, M.R.S., Cánovas, A., 2018. Genetic mechanisms underlying spermatic and testicular traits within and among cattle breeds: systematic review and prioritization of GWAS results. J. Anim. Sci. 96, 4978–4999. https://doi.org/10.1093/jas/sky382

Fonseca, P.A.S., Suárez-Vega, A., Marras, G., Cánovas, Á., 2020. GALLO: An R package for genomic annotation and integration of multiple data sources in livestock for positional candidate loci. Gigascience 9. https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa149

Fritz, S., Capitan, A., Djari, A., Rodriguez, S.C., Barbat, A., Baur, A., Grohs, C., Weiss, B., Boussaha, M., Esquerré, D., Klopp, C., Rocha, D., Boichard, D., 2013. Detection of Haplotypes Associated with Prenatal Death in Dairy Cattle and Identification of Deleterious Mutations in GART, SHBG and SLC37A2. PLoS One 8, e65550. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065550

GenSys, C.A.S.L., 2019. Aliança Nelore: Sumário de avaliação de reprodutores [WWW Document]. URL https://gensys.com.br/sumario/sumario-alianca-nelore-2019-2020/ (accessed 10.18.19).

Giroto, A.B., Fontes, P.K., Franchi, F.F., dos Santos, P.H., Razza, E.M., Nogueira, M.F.G., Maioli, M.A., Nogueira, G.P., Nunes, G.B., Mingoti, G.Z., Mareco, E.A., Castilho, A.C.S., 2019. Use of pregnancy-associated plasma protein-A during oocyte in vitro maturation increases IGF-1 and affects the transcriptional profile of cumulus cells and embryos from Nelore cows. Mol. Reprod. Dev. 86, 1694–1704. https://doi.org/10.1002/mrd.23259

Gur, Y., Breitbart, H., Lax, Y., Rubinstein, S., Zamir, N., 1998. Angiotensin II induces acrosomal exocytosis in bovine spermatozoa. Am. J. Physiol. - Endocrinol. Metab. 275. https://doi.org/10.1152/ajpendo.1998.275.1.e87

Hu, Z.-L., Park, C.A., Reecy, J.M., 2022. Bringing the Animal QTLdb and CorrDB into the future: meeting new challenges and providing updated services. Nucleic Acids Res. 50, D956–D961. https://doi.org/10.1093/nar/gkab1116

Hu, Z.-L., Park, C.A., Wu, X.-L., Reecy, J.M., 2013. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. Nucleic Acids Res. 41, D871–D879. https://doi.org/10.1093/nar/gks1150

Jääskeläinen, M., Nieminen, A., Pökkylä, R.M., Kauppinen, M., Liakka, A., Heikinheimo, M., Vaskivuo, T.E., Klefström, J., Tapanainen, J.S., 2010. Regulation of cell death in human fetal and adult ovaries-Role of Bok and Bcl-XL. Mol. Cell. Endocrinol. 330, 17–24. https://doi.org/10.1016/j.mce.2010.07.020

Kim, D., Langmead, B., Salzberg, S.L., 2015. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. Nat. Methods 2015 124 12, 357–360. https://doi.org/10.1038/nmeth.3317

Krumm, N., Turner, T.N., Baker, C., Vives, L., Mohajeri, K., Witherspoon, K., Raja, A., Coe, B.P., Stessman, H.A., He, Z.X., Leal, S.M., Bernier, R., Eichler, E.E., 2015. Excess of rare, inherited truncating mutations in autism. Nat. Genet. 47, 582–588. https://doi.org/10.1038/ng.3303

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., Durbin, R., 2009. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics 25, 2078–2079. https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTP352

Marouli, E., Graff, M., Medina-Gomez, C. et al., 2017. Rare and low-frequency coding variants alter human adult height. Nat. 2017 5427640 542, 186–190. https://doi.org/10.1038/nature21039

Neves, H.H.R., Vargas, G., Brito, L.F., Schenkel, F.S., Albuquerque, L.G., Carvalheiro, R., 2019. Genetic and genomic analyses of testicular hypoplasia in Nellore cattle. PLoS One 14, e0211159. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211159

Park, J.W., Lee, S.J., 2021. Foveal hypoplasia in short stature with optic atrophy and Pelger-Huët anomaly syndrome with neuroblastoma-amplified sequence (NBAS) gene mutation, in: Journal of AAPOS. Mosby, pp. 257-259.e2. https://doi.org/10.1016/j.jaapos.2016.09.030

Pereira, G.L., Rosa, K.O., Curi, R.A., Reginato, L.C.A., Mota, M.D.S., 2013. Estado da arte do sequenciamento genômico na pecuária. Ars Veterinaria 29, 190–199. https://doi.org/10.15361/2175-0106.2013v29n3p190-199

Price, A.L., Helgason, A., Thorleifsson, G., McCarroll, S.A., Kong, A., Stefansson, K., 2011. Single-tissue and cross-tissue heritability of gene expression via identity-by-descent in related or unrelated individuals. PLoS Genet. 7, e1001317. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001317

Pru, J.K., Austin, K.J., Haas, A.L., Hansen, T.R., 2001. Pregnancy and interferon-τ upregulate gene expression of members of the 1-8 family in the bovine uterus. Biol. Reprod. 65, 1471–1480. https://doi.org/10.1095/biolreprod65.5.1471

R Development Core Team, 2017. R: A language and environment for statistical computing.

Roso, V.M., Schenkel, F.S., 2006. AMC-a computer program to assess the degree of connectedness among contemporary groups, in: Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, 13-18 August, 2006. Instituto Prociência, pp. 26–27.

Sandor, C., Li, W., Coppieters, W., Druet, T., Charlier, C., Georges, M., 2012. Genetic variants in REC8, RNF212, and PRDM9 influence male recombination in cattle. PLoS Genet. 8. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002854

Sargolzaei, M., Chesnais, J.P., Schenkel, F.S., 2014. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. BMC Genomics 15, 478. https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-478

Shi, H., Kichaev, G., Pasaniuc, B., 2016. Contrasting the Genetic Architecture of 30 Complex Traits from Summary Association Data. Am. J. Hum. Genet. 99, 139–153. https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2016.05.013

Silva, T. de L., Gondro, C., Fonseca, P.A. de S., da Silva, D.A., Vargas, G., Neves, H.H. de R., Filho, I.C., Teixeira, C. de S., Albuquerque, L.G. de, Carvalheiro, R., 2023. Testicular hypoplasia in Nellore Cattle: Genetic analysis and functional analysis of genome-wide association study results. J. Anim. Breed. Genet. 140, 185–197. https://doi.org/10.1111/jbg.12747

Sonawane, A.R., Platig, J., Fagny, M., Chen, C.-Y., Paulson, J.N., Lopes-Ramos, C.M., DeMeo, D.L., Quackenbush, J., Glass, K., Kuijjer, M.L., 2017. Understanding Tissue-specific Gene Regulation. bioRxiv 110601. https://doi.org/10.1101/110601

Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Iny Stein, T., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., Lancet, D., 2016. The GeneCards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses. Curr. Protoc. Bioinforma. 2016, 1.30.1-1.30.33. https://doi.org/10.1002/cpbi.5

Tao, D., Wang, Y., Zhang, X., Wang, C., Yang, D., Chen, J., Long, Y., Jiang, Y., Zhou, X., Zhang, N., 2022. Identification of Angiogenesis-Related Prognostic Biomarkers Associated With Immune Cell Infiltration in Breast Cancer. Front. Cell Dev. Biol. 10, 836. https://doi.org/10.3389/fcell.2022.853324

Topoluk, N., Steckbeck, K., Siatkowski, S., Burnikel, B., Tokish, J., Mercuri, J., 2018. Amniotic mesenchymal stem cells mitigate osteoarthritis progression in a synovial macrophage-mediated in vitro explant coculture model. J. Tissue Eng. Regen. Med. 12, 1097–1110. https://doi.org/10.1002/term.2610

Vargas, G., Neves, H.H.R., Camargo, G.M.F., Cardoso, V., Munari, D.P., Carvalheiro, R., 2018. Genome-wide association study and functional analysis of feet and leg conformation traits in Nellore cattle. J. Anim. Sci. 96, 1617–1627. https://doi.org/10.1093/jas/sky079

Vargas, G., Neves, H.H.R., Cardoso, V., Munari, D.P., Carvalheiro, R., 2017. Genetic analysis of feet and leg conformation traits in Nelore cattle. J. Anim. Sci. 95, 2379. https://doi.org/10.2527/jas2016.1327

Veerkamp, R.F., Bouwman, A.C., Schrooten, C., Calus, M.P.L., 2016. Genomic prediction using preselected DNA variants from a GWAS with whole-genome sequence data in Holstein-Friesian cattle. Genet. Sel. Evol. 48, 1–14. https://doi.org/10.1186/s12711-016-0274-1

Verardo, L.L., Silva, F.F., Lopes, M.S., Madsen, O., Bastiaansen, J.W.M., Knol, E.F., Kelly, M., Varona, L., Lopes, P.S., Guimarães, S.E.F., 2016. Revealing new candidate genes for reproductive traits in pigs: Combining Bayesian GWAS and functional pathways. Genetics Selection Evolution 48, 1–13. https://doi.org/10.1186/s12711-016-0189-x

Visscher, P.M., Medland, S.E., Ferreira, M.A.R., Morley, K.I., Zhu, G., Cornes, B.K., Montgomery, G.W., Martin, N.G., 2006. Assumption-free estimation of heritability from genome-wide identity-by-descent sharing between full siblings. PLoS Genet. 2, 0316–0325. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020041

Wu, T., Hu, E., Xu, S., Chen, M., Guo, P., Dai, Z., Feng, T., Zhou, L., Tang, W., Zhan, L., Fu, X., Liu, S., Bo, X., Yu, G., 2021. clusterProfiler 4.0: A universal enrichment tool for interpreting omics data. Innov. 2, 100141. https://doi.org/10.1016/j.xinn.2021.100141

Yang, J., Weedon, M.N., Purcell, S., Lettre, G., Estrada, K., Willer, C.J., Smith, A. V., Ingelsson, E., O'Connell, J.R., Mangino, M., Mägi, R., Madden, P.A., Heath, A.C., Nyholt, D.R., Martin, N.G., Montgomery, G.W., Frayling, T.M., Hirschhorn, J.N., McCarthy, M.I., Goddard, M.E., Visscher, P.M., 2011. Genomic inflation factors under polygenic inheritance. Eur. J. Hum. Genet. 19, 807–812. https://doi.org/10.1038/ejhg.2011.39

Yu, G., Wang, L.G., Han, Y., He, Q.Y., 2012. ClusterProfiler: An R package for comparing biological themes among gene clusters. Omi. A J. Integr. Biol. 16, 284–287. https://doi.org/10.1089/omi.2011.0118

Zhang, J.X., Ma, H.W., Sang, M., Hu, Y.S., Liang, Z.N., Ai, H.X., Zhang, J., Cui, X.W., Zhang, S.Q., 2010. Molecular structure, expression, cell and tissue distribution, immune evolution and cell proliferation of the gene encoding bovine (Bos taurus) TNFSF13 (APRIL). Dev. Comp. Immunol. 34, 1199–1208. https://doi.org/10.1016/j.dci.2010.06.015

Zhou, Y., Shen, B., Jiang, J., Padhi, A., Park, K.E., Oswalt, A., Sattler, C.G., Telugu, B.P., Chen, H., Cole, J.B., Liu, G.E., Ma, L., 2018. Construction of PRDM9 allele-specific recombination maps in cattle using large-scale pedigree analysis and genome-wide single sperm genomics. DNA Res. 25, 183–194. https://doi.org/10.1093/dnares/dsx048