

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
SETOR DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

ESSAMAI BRIZOLA LAGOS

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA HÉRNIA UMBILICAL EM
SUÍNOS COMERCIAIS UTILIZANDO ABORDAGEM DE MARCADORES ÚNICOS
E MÚLTIPLOS**

PONTA GROSSA

2020

ESSAMAI BRIZOLA LAGOS

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA HÉRNIA UMBILICAL EM
SUÍNOS COMERCIAIS UTILIZANDO ABORDAGEM DE MARCADORES ÚNICOS
E MÚLTIPLOS**

Dissertação apresentada para obtenção do título de mestre na Universidade Estadual de Ponta Grossa, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Área de Melhoramento Genético Animal.

Orientador: Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa.
Co-orientadora: Dra. Mônica Corrêa Ledur.

PONTA GROSSA

2020

L177 Lagos, Essamai Brizola
Análise de associação genômica para hérnia umbilical em suínos comerciais utilizando abordagem de marcadores únicos e múltiplos / Essamai Brizola Lagos. Ponta Grossa, 2020.
114 f.

Dissertação (Mestrado em Zootecnia - Área de Concentração: Produção Animal), Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Orientador: Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa.
Coorientadora: Profa. Dra. Mônica Corrêa Ledur.

1. Defeito congênito. 2. Genes candidatos. 3. Marcadores genéticos. 4. Produção suína. I. Pedrosa, Victor Breno. II. Ledur, Mônica Corrêa. III. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. IV.T.

CDD: 636



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA
Av. General Carlos Cavalcanti, 4748 - Bairro Uvaranas - CEP 84030-900 - Ponta Grossa - PR - <https://uepg.br>

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

ESSAMAI BRIZOLA LAGOS

“Análise de associação genômica para hérnia umbilical em suínos comerciais utilizando abordagem de marcadores únicos e múltiplos”

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação em Zootecnia - Mestrado em Zootecnia, Setor de Ciências Agrárias e Tecnologia da Universidade Estadual de Ponta Grossa.

Ponta Grossa, 28 de Agosto
de 2020.

Dr. Vitor Breno Pedrosa - (UEPG)
Presidente

Dra. Mônica Corrêia Ledur - (Embrapa Suínos e Aves)
Membro Externo

Dra. Michele Porto Pires - (Embrapa Suínos e Aves)
Membro Externo

Dr. Marcelo Ricardo Vicari - (UEPG)
Membro Interno

AGRADECIMENTOS

À Deus... Todas minhas palavras seriam poucas diante a tudo fizeste por mim!

À minha família, em especial aos meus pais, por todo auxílio para eu poder chegar até aqui, vocês são os meus pilares, sem vocês nada teria sido possível! Obrigada por terem abdicado de suas vidas para me ajudar a construir a minha.

Ao meu esposo, por ter dividido comigo seus dias, e formado os “nossos” dias durante todo esse período!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa, agradeço por suas orientações, por toda ajuda e compreensão.

À Universidade Estadual de Ponta Grossa (UEPG), ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia.

Também as minhas orientadoras, Dra. Mônica Corrêa Ledur, Dra. Jane de Oliveira Peixoto, Dra. Adriana Mercia Guaratini muito obrigada pela oportunidade que me concederam, pela compreensão e pelos conhecimentos passados.

À Dra. Michele Porto Pires, não tenho palavras de agradecimento! Agradeço pelos ensinamentos, dedicação, auxílios, compreensão, ajudas, pelos bons momentos de convivência, por ser meu ombro amigo sempre quando precisei... Obrigada por ter se abdicado a este trabalho! Você foi meu suporte e para sempre serei grata.

Ao Rafael Keith Ono, pelo início do desenvolvimento do trabalho e pesquisa e ao Dr. Maurício Cantão, por toda assistência e melhorias dedicadas ao trabalho

Ao grupo do Laboratório de Genética da Embrapa Suínos e Aves, em especial ao Alexandre Luis Tessmann, Igor Savoldi, Fernanda Neis, Débora Ester Petry Marcelino e Àgata Vendruscolo, pela colaboração e pelos bons momentos de convivência e amizade.

À Embrapa Suínos e Aves, por proporcionar a realização deste trabalho de pesquisa e por sempre me receber, quando precisei. E a todos os funcionários a qual, compartilharam dos seus momentos, partilharam de momentos alegres e trocaram experiências;

Aos meus colegas da Universidade Estadual de Ponta Grossa e a toda equipe do LeMa, especialmente aos meus companheiros de Laboratório;

À CAPES, pelo auxílio financeiro através da concessão da bolsa de mestrado;

A todos que contribuíram de alguma forma, meus sinceros agradecimentos!

“Posso todas as coisas naquele que me fortalece.”
Filipenses 4-13

RESUMO

Existem vários defeitos congênitos que afetam a suinocultura mundial, dentre elas a criptorquidia, pernas abertas, tremor congênito, intersexualidade, atresia anal e hérnias. A hérnia umbilical (HU) é um dos defeitos congênitos mais comuns em suínos, ocasionado pela protusão do conteúdo intestinal pelo canal umbilical. A presença de hérnias causa prejuízos ao bem-estar dos animais e pode ocasionar perdas econômicas devido ao menor crescimento e pior conversão alimentar. Além disto, as hérnias também podem gerar danos no momento do abate, contaminando a carcaça caso ocorra o rompimento das alças intestinais. A etiologia deste defeito congênito é multifatorial, envolvendo dentre eles fatores genéticos, existentes em diferentes raças suínas. Por isto, é importante para a indústria suinícola, a identificação de marcadores no genoma suíno que possam estar relacionados a hérnia umbilical e, possam ser utilizados no processo de seleção de progenitores, evitando a ocorrência da anomalia. O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração levou a identificação de muitos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), tornando possível estudos de análise de associação genômica ampla (GWAS), que envolvem milhares de variantes em todo o genoma, utilizadas para identificar as associadas com características de interesse. Para este tipo de estudo, várias metodologias podem ser utilizadas, entre elas a de único marcador que avalia o efeito individual de cada SNP e a de múltiplos marcadores, que analisa os haplótipos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar regiões genômicas associadas ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suíno por meio de duas metodologias estatísticas, utilizando único e múltiplos marcadores. Foram avaliados e genotipados 325 animais (92 casos e 233 controles) advindos de granjas de Santa Catarina, sendo híbridos da genética Agroceres Pic[®], utilizando GGP *Porcine Bead Chip* (Neogen, Lincon, NE, EUA). Foram encontrados 10 SNPs significativos pela análise de único marcador contando com 23 transcritos de conhecimento biológico na extensão das regiões. Com a análise de múltiplos marcadores foram observados 401 SNPs distribuídos em 51 regiões do genoma contando com 116 transcritos conhecidos. Os processos biológicos significativamente associados a estes genes foram aqueles relacionados ao desenvolvimento da musculatura esquelética, a ocorrência da angiogênese, bem como o recrutamento de citocinas para combate inflamatório e cicatrização umbilical. De acordo com nossos resultados foram considerados fortes candidatos ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos segundo a metodologia utilizando único marcador, os genes *MTM1* e *MTMR1*, segundo a metodologia de múltiplos marcadores, os genes *EP300*, *MSTN* e *EYA2*, e por ambas as metodologias os genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6* e *WARS2*. Assim, pôde-se conhecer melhor os fatores genéticos associados a hérnia umbilical, demonstrando que genes relacionados ao desenvolvimento da musculatura esquelética, e processos ligados a matriz extracelular e ao sistema imune, podem estar intimamente relacionados a distúrbios que levam a predisposição da ocorrência de hérnia umbilical em suínos comerciais.

Palavras-chave: Defeito congênito. Genes candidatos. Marcadores genéticos. Produção suína.

ABSTRACT

There are several birth defects that affect pig farming worldwide, including cryptorchidism, splay legs, congenital tremor, intersexuality, anal atresia and hernias. Umbilical hernia (UH) is one of the most common congenital disabilities in pigs caused by the protrusion of the intestinal contents by the umbilical ring. The presence of hernias can cause economic losses due to the damage caused to the welfare of the animals, which results in reduced growth and poor feed conversion. Moreover, hernias can also cause damage in the moment of slaughter, contaminating the carcass if a rupture of the intestinal loops occurs. For this reason, it is essential for the pig industry, the identification of markers in the swine genome, which may be associated to umbilical hernia to be used in the selection process, preventing the occurrence of this anomaly. The development of new generation sequencing technologies has led to the identification of many single nucleotide polymorphisms (SNPs), making genome-wide association studies (GWAS) possible which involves thousands of variants across the genome used to identify those associated with traits of interest. For this type of study, several methodologies are available, such as single marker that evaluates the individual effect of each SNP and that of multiple markers, which analyzes the haplotypes. Thus, the objective of this study was to identify genomic regions associated with the development of umbilical hernia in pigs, using two statistical methodologies: single and multiple markers. A total of 325 crossbred pigs (92 cases and 233 controls), hybrids of the Agroceres Pic® genetics, from farms located in Santa Catarina State were evaluated and genotyped, using GGP Porcine Bead Chip (Neogen, Lincoln, NE, EUA). Ten significant SNPs were found with the single marker analysis, comprising 23 transcripts of biological knowledge in the extension of the regions. With the multiple marker analysis, 401 SNPs were also observed distributed in 51 genomic regions, with 116 transcripts biologically known. The biological processes significantly associated with these genes were those related to the development of skeletal muscle, the occurrence of angiogenesis, as well as the recruitment of cytokines to fight inflammation and umbilical healing. According to our results, strong candidates for the development of umbilical hernia in pigs were considered according to the methodology using a single marker, the *MTM1* and *MTMR1* genes, according to the multiple marker methodology, the *EP300*, *MSTN* and *EYA2* genes, and by both methodologies the genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6* and *WARS2*. Thus, it was possible to better understand the genetic factors associated with umbilical hernia, demonstrating that genes related to the development of skeletal muscle, and processes linked to the extracellular matrix and the immune system, may be closely related to disorders that lead to predisposition of occurrence of umbilical hernia in commercial pigs.

Keywords: Congenital defect. Candidate genes. Genetic markers. Swine production.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gráfico de distribuição dos escores obtidos pela análise de associação com múltiplos marcadores (Blossoc) mostrando os escores utilizados para definir o limiar de significância para declarar um SNP como associado à hérnia umbilical.....	44
Figura 2 – Gráfico de probabilidade Quantil-Quantil (<i>Q-Q plot</i>).....	47
Figura 3 – Gráfico de Manhattan com resultados da análise de associação genômica com único marcador, em ordem sequencial por cromossomo, para hérnia umbilical em suínos híbridos.....	48
Figura 4 – <i>TreeMap</i> com os processos biológicos associados a genes relacionados a hérnia umbilical, através da metodologia de único marcador.....	52
Figura 5 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir da análise de associação com único marcador relacionados à hérnia umbilical em suínos.....	53
Figura 6 – Rede de interação gênica construída com o software NetworkAnalyst 3.0 com os genes associados com a ocorrência de hérnia umbilical em suínos pelo método de único marcador.....	54
Figura 7 – Gráfico de Manhattan com resultados da análise de associação genômica com marcadores múltiplos, em ordem sequencial por cromossomo, para hérnia umbilical em suínos híbridos.....	56
Figura 8 – <i>TreeMap</i> com os processos biológicos associados a genes relacionados a hérnia umbilical, através da metodologia de múltiplos marcadores.....	58
Figura 9 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir da análise de associação com múltiplos marcadores relacionados à hérnia umbilical em suínos.....	59
Figura 10 – Rede de interação gênica construída com o software NetworkAnalyst 3.0 com os genes associados com a ocorrência de hérnia umbilical em suínos pelo método de único marcador.....	60

Figura 11 – Diagrama de Venn com o conjunto de genes prospectados advindos das análises de associação utilizando as metodologias de único e múltiplos marcadores.....61

Figura 12 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir das análises de associação de único e múltiplos marcadores relacionados à hérnia umbilical em suínos.....62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Amostras removidas pelos critérios de controle de qualidade de machos e fêmeas dentro dos grupos caso e controles.....	46
Tabela 2 – SNPs significativos para hérnia umbilical em suínos híbridos, identificados na análise de marcadores únicos.....	49
Tabela 3 – Genes observados nas regiões associadas à hérnia umbilical em suínos pela metodologia de marcadores únicos.....	50
Tabela 4 – Enriquecimento funcional para processos biológicos dos genes encontrados pelo método de único marcador.....	51
Tabela 5 – Número de SNPs removidos pelos critérios utilizados no controle de qualidade.....	55
Tabela 6 – Enriquecimento funcional para processos biológicos dos genes encontrados pelo método de múltiplos marcadores.....	57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
1.1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1 Cadeia Produtiva de Suínos.....	14
1.2.2 Defeitos Congênitos em Suínos.....	15
1.2.3 Hérnia Umbilical	16
1.2.4 Formação das Hérnia Umbilical.....	17
1.2.5 Influência Genética sobre o Desenvolvimento de Hérnia Umbilical em Suínos.....	18
1.2.6 Estudos Genômicos na Espécie Suína.....	19
1.2.7 Análise de Associação Genômica Ampla e suas Aplicações em Suínos.....	21
1.2.8 Análise de Associação Genômica Ampla Utilizando Marcadores Únicos e Múltiplos.....	24
REFERÊNCIAS	26
CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA HÉRNIA UMBILICAL EM SUÍNOS COMERCIAIS UTILIZANDO ABORDAGENS DE MARCADORES ÚNICOS E MÚLTIPLOS	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	37
2.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	39
2.2.1 Animais Utilizados e Coleta de Amostras.....	39
2.2.2 Isolamento de DNA e Genotipagem de Amostras.....	39
2.2.3 Controle de Qualidade dos Dados	40
2.2.3.1 Controle de qualidade das amostras.....	40
2.2.3.2 Controle de qualidade dos SNPS.....	41
2.2.4 Análise de Associação Genômica.....	41
2.2.4.1 Análise de associação genômica utilizando a abordagem de único	

marcador.....	41
2.2.4.2 Análise de associação genômica utilizando a abordagem de múltiplos marcadores.....	42
2.2.5 Análise Funcional e de Enriquecimento de Vias.....	44
2.2.6 Análise de Redes de Interação Proteína-Proteína (<i>PPI</i>).....	45
2.3 RESULTADOS.....	46
2.3.1 Controle de Qualidade para a Análise de Único Marcador.....	46
2.3.2 Análise de Associação Genômica Utilizando a Metodologia de Único Marcador.....	46
2.3.3 Análise de Enriquecimento Funcional para os Genes Identificados pela Metodologia de Único Marcador.....	51
2.3.4 Controle de Qualidade para a Análise de Múltiplos Marcadores.....	54
2.3.5 Análise de Associação Genômica Utilizando a Metodologia de Múltiplos Marcadores.....	55
2.3.6 Análise de Enriquecimento Funcional para os Genes Identificados pela Metodologia de Múltiplos Marcadores.....	56
2.3.7 Semelhanças Encontradas entre as Metodologias de Associação com Único e Múltiplos Marcadores.....	61
2.4 DISCUSSÃO.....	63
2.5 CONCLUSÃO.....	79
REFERÊNCIAS.....	79
ANEXO A - GRÁFICO DE ESCALA MULTIDIMENSIONAL (MULTIDIMENSIONAL SCALING - MDS) DAS AMOSTRAS PARA AVERIGUAR A ESTRUTURA DA POPULAÇÃO.....	95
ANEXO B – REPRESENTAÇÃO DOS SNPs SIGNIFICATIVOS EM CADA CROMOSSOMO PELA ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MÚLTIPLOS MARCADORES.....	96

ANEXO C - SNPs ENCONTRADOS NAS REGIÕES COM ESCORE DE SIGNIFICÂNCIA ALTO E MODERADO.....	105
ANEXO D – GENES CANDIDATOS DISTRIBUÍDOS NAS REGIÕES COM ALTA E MÉDIA SIGNIFICÂNCIA PELO MÉTODO DE MÚLTIPLOS MARCADORES.....	110

CAPÍTULO 1 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 INTRODUÇÃO

A hérnia umbilical (HU) representa um dos defeitos congênitos de desenvolvimento mais comuns em muitas espécies de mamíferos, como humanos, equinos, cães, bovinos e suínos (LIAO *et al.*, 2015). Em suínos, a prevalência relatada para defeitos congênitos varia de 0,11% a 4,96% (PARTLOW *et al.*, 1993), o que é considerada alta (MATTSSON, 2011). A prevalência para hérnia umbilical possui o relato de moderada de 1,8% (MATTSSON, 2011). Desta forma, a HU apresenta uma participação percentual relevante em criações de suínos, sendo considerada um problema que traz efeitos adversos à atividade suinícola, relacionada ao bem-estar animal e a diminuição do desempenho produtivo, ocasionando perdas econômicas severas para a indústria (DAETWYLER *et al.*, 2014).

No primeiro trimestre de 2020, o Brasil abateu aproximadamente 11,88 milhões de suínos (IBGE, 2020), dos quais, 0,81% a 4,55% deles poderiam estar acometidos por hérnia umbilical, conforme frequência média e máxima, respectivamente, da ocorrência de hérnia umbilical mencionada na literatura por Petersen (2008). Essa representativa parcela de animais acometidos gera riscos de contaminação no processo de abate, devido à ruptura do intestino, o que exige maiores cuidados para diminuição do risco de condenação da carcaça, que pode chegar a mais de 50% de animais com hérnias de tamanho maior (BOYLE; LEMOS TEIXEIRA, 2010). Devido às perdas na criação como maiores taxas de mortalidade e, também no momento do processamento das carcaças, a hérnia umbilical em suínos resulta em perdas significativas ao setor (STRAW; BATES; MAY, 2009).

O referido defeito congênito ocorre pela passagem do conteúdo abdominal no local da saída dos vasos umbilicais, o umbigo (GRINDFLEK *et al.*, 2018). A origem da hérnia umbilical é multifatorial, necessitando de estudos para melhor entendimento dos fatores responsáveis pela anomalia, esclarecendo quais possam ser advindos de componentes genéticos e não genéticos, ou ainda, da interação entre eles (LIAO *et al.*, 2015). Referindo-se aos fatores ambientais, o manejo inadequado pode ocasionar lesões físicas desde o momento do parto, como o estiramento do umbigo ou umbigo amarrado muito próximos ao abdômen, o que pode afetar o fechamento total do anel umbilical (MONSANG, 2014). Além desses fatores, a presença de hérnia umbilical em animais pertencentes à mesma família e a diferença de incidência entre diferentes raças, torna provável que o fator genético seja preponderante para a ocorrência da

hérnia umbilical (RUTTEN-RAMOS; DEEN, 2006). Ainda não existe um embasamento genético totalmente claro, que possa explicar fatores genéticos associados à hérnia umbilical (LI *et al.*, 2019). Dessa maneira, recomenda-se a identificação de genes causais e marcadores genéticos relacionados à susceptibilidade do animal para hérnia umbilical, propiciando a seleção de linhas maternas e paternas para maior efetividade no controle da hérnia umbilical.

Com isso, estudos que identifiquem regiões no genoma suíno associadas a genes causadores ou relacionados à hérnia umbilical são fundamentais para um melhor entendimento das relações genéticas vinculadas à essa desordem (LEPSHIN; SAZHENOVA; LEBEDEV, 2014). Sendo assim, no intuito de melhorar a acurácia na seleção através da utilização de informações genômicas, busca-se identificar genes e regiões no genoma associados e essa anomalia através da análise de associação genômica para hérnia umbilical em suínos comerciais utilizando as abordagens de marcadores únicos e múltiplos.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Cadeia Produtiva de Suínos

A origem dos suínos domésticos se deu através do Javali Eurasiano (*Sus Scrofa*), visto que ambas espécies advém de ancestrais em comum (GIUFFRA *et al.*, 2000). Em busca da adaptação desses animais às necessidades humanas, há aproximadamente 800 a 1000 anos, os primeiros direcionamentos da seleção genética visual, de características desejáveis foram realizados pelo homem (KADARMIDEEN; VON ROHR; JANSS, 2006). Mais recentemente, no início dos anos 60, iniciou-se a utilização de cruzamentos para melhorar a eficiência alimentar e a produção de carne magra em programas de melhoramento genético, resultando em distintas linhagens genéticas (MERKS, 2000). Já nos anos 70, iniciaram-se os estudos de genética que incrementavam as informações advindas do fenótipo com as informações contidas no DNA, tornando a seleção de animais com genótipos superiores mais eficiente (COUTINHO; ROSÁRIO; JORGE, 2010). Nos últimos anos, estudos do genoma suíno através dos avanços das tecnologias genéticas moleculares que tornaram o sequenciamento do DNA mais barato e acessível, possibilitaram a utilização da seleção genômica como uma nova ferramenta para aumentar o ganho genético na criação dos animais, através da seleção mais rápida e acurada (STOCK; REENTS, 2013).

Mediante evolução no processo de seleção, a carne suína tornou-se a principal fonte proteica de origem animal, sendo a mais consumida mundialmente e com consumo crescente

anualmente (HWANG *et al.*, 2019). De acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, no primeiro trimestre de 2020 o Brasil abateu 11,8 milhões de cabeças de suínos, representando um aumento de 5,2% quando relacionado ao mesmo período do ano de 2019 (IBGE, 2020). A maior contribuição para obtenção desses números foi dos estados de Santa Catarina, Mato Grosso, Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Paraná, Goiás e São Paulo (IBGE, 2020).

Devido a importância da cadeia produtiva de suínos brasileira, é relevante que haja constante aumento dos índices produtivos do setor. Para isto, torna-se necessário amplo investimento em novas estratégias de produção através de manejos de excelência, desenvolvimento de técnicas relacionadas ao bem-estar animal e alto rigor sanitário (COLPOYS *et al.*, 2014). Objetivando-se atender essas necessidades, e em busca de adequação da cadeia produtiva ao atendimento destes critérios, um dos fatores preocupantes são os defeitos congênitos, dentre eles a hérnia umbilical, que causam grande impacto econômico para a indústria (MATTSSON, 2011).

1.2.2 Defeitos Congênitos em Suínos

O grupo de anomalias consideradas como defeitos congênitos compreende a criptorquidia, pernas abertas, tremor congênito, intersexualidade, atresia anal e hérnia escrotal e umbilical (MATTSSON, 2011). Ainda não é totalmente desvendada pela ciência a etiologia dos defeitos congênitos em suínos, existindo a necessidade de estudos que apresentem informações sobre este assunto. No trabalho realizado por Mulley e Edwards (1984), em que estudaram a prevalência de anomalias congênitas em suínos, associando a incidência destes defeitos ao número de partos da fêmea e ao tamanho das leitegadas, observaram que quanto maior o número de partos e/ou maior a quantidade de leitões nascidos por leitegada, também a incidência de defeitos congênitos eram maiores. Porém, estudos como o relatado não evidenciam fatores genéticos associados à ocorrência de defeitos congênitos em suínos, mas sim a fatores extrínsecos.

Mattsson (2011) avaliou defeitos congênitos em várias raças de suínos em 17 rebanhos comerciais, onde observou a proporção média de leitegadas com a presença de pelo menos um defeito congênito de 7,0% em animais Hampshire, 12,0% em Landrace e 16,8% em Yorkshire, a qual, a hérnia umbilical teve ocorrência em 2% dos 17 rebanhos estudados. Atualmente, com os avanços da tecnologia, tem se buscado identificar regiões no genoma suíno responsáveis pelo controle desses defeitos (SEVILLANO *et al.*, 2015). O conhecimento de regiões geneticamente

associadas a anomalias tem despertado o interesse da indústria, por apresentar o potencial de aplicação em programas de melhoramento genético que permitam a seleção contrária ao acometimento destes defeitos, contribuindo também para o bem-estar animal (SEVILLANO *et al.*, 2015).

1.2.3 Hérnia Umbilical

As hérnias em suínos são classificadas como escrotais, inguinais e umbilicais (SEVILLANO *et al.*, 2015; GRINDFLEK *et al.*, 2018). Na espécie suína, as hérnias umbilicais são detectadas geralmente em torno da sétima a décima quarta semana de vida (RUTTENRAMOS; DEEN, 2006; SEARCY-BERNAL; GARDNER; HIRD, 1994). A incidência de hérnia umbilical em suínos pode levar a morbidade e até mesmo a mortalidade dos animais no campo (DING *et al.*, 2009). Animais afetados apresentam menor ganho de peso diário em comparação aos animais que não apresentam o defeito, em decorrência do desconforto gerado, que interfere no bem-estar animal, fazendo com que os animais se alimentem menos, retratem menor eficiência no consumo alimentar e em decorrência apresentem um crescimento retardado (STRAW; BATES; MAY, 2009).

As perdas econômicas geradas pela ocorrência de hérnia umbilical vão além dos períodos de criação dos animais. No momento do abate, animais acometidos pela enfermidade necessitam de cuidados dobrados, uma vez que a aderência do intestino ao tecido abdominal aumenta a tendência da ruptura do intestinal, contaminando a carcaça e levando a sua condenação em mais de 50%, diminuindo o seu preço (STRAW; BATES; MAY, 2009). Assim, perdas econômicas consideráveis são geradas pela incidência de hérnia umbilical para a cadeia suinícola, sendo ainda importante considerar a redução do bem estar dos animais afetados.

Referente a patogenia, explica-se que, durante a gestação, o feto é ligado à mãe através do cordão umbilical que, por sua vez, se liga a placenta (MATTSSON, 2011). A formação do cordão umbilical ocorre pela junção da veia umbilical, das duas artérias umbilicais, do úraco e de vestígios do saco vitelino (BOSELDMANN; MIELKE, 2015). Após o nascimento, o cordão umbilical se rompe e o anel umbilical normalmente se fecha, caso contrário, se o mesmo permanecer aberto ou não se fechar completamente, surge o risco para a ocorrência de hérnia umbilical (BENIRSCHKE *et al.*, 2012). Uma das explicações para o incorreto fechamento do tecido conjuntivo abdominal ao redor do anel umbilical é devido ao fenômeno que ocorre da sexta à sétima semana de crescimento fetal, quando o intestino cresce e se projeta em direção ao cordão umbilical (RADHAKRISHNA *et al.*, 2012).

1.2.4 Formação da Hérnia Umbilical

Mesmo que alguns fatores fisiológicos já tenham sido apontados como desencadeadores de hérnia umbilical em suínos, as causas deste defeito ainda não são totalmente esclarecidas. Alguns trabalhos buscando explicar a ocorrência de hérnia umbilical através da análise da interferência de fatores anatômicos, bioquímicos, químicos, patológicos e genéticos, identificaram como causa principal o metabolismo anormal de colágeno (BENDAVID, 2004). Verificou-se que animais acometidos por hérnias abdominais possuem uma proporção alterada das fibras de colágeno tipo I e III (ELANGO *et al.*, 2017). Esse fator também é observado em humanos com a presença de hérnia inguinal, em que estudos demonstraram a alteração do colágeno devido ao aumento da vascularização e celularidade (BENDAVID, 2004) e aos defeitos da matriz celular e extracelular (FRANZ, 2008).

A formação do colágeno tipo I se dá através da modificação pós-traducional da sua proteína precursora, o procolágeno (PROCKOP; KIVIRIKKO, 1995). O tropocolágeno pode se agregar com outras moléculas de tropocolágeno para formar moléculas de colágeno ricas em hidroxilisina e hidroxiprolina (QING, 2017). Após a ocorrência dessas reações bioquímicas, sucede o desenvolvimento de fibrilas de colágeno em situações como cicatrização de feridas, onde o colágeno forma ligações cruzadas com outro colágeno intramolecular e intermolecular, resultando em maior força de resistência na cicatrização dos ferimentos (QING, 2017).

Os genes de colágeno do tipo I e III codificam as principais proteínas da matriz extracelular, as quais possuem relação com a cicatrização (MARTIN *et al.*, 1990) e, conseqüentemente, podem estar relacionados à hérnia umbilical. Quando ocorre a redução da proporção dos colágenos tipo I e III nos tecidos, observa-se a alteração do arranjo geométrico e do diâmetro das fibras de colágeno, diminuindo o número de ligações cruzadas, o que gera a redução da estabilidade do tecido conjuntivo (BIRK *et al.*, 1997). Vários estudos apontam que a diminuição do colágeno do tipo I, ou o aumento do colágeno do tipo III, levam a uma susceptibilidade para hérnia umbilical por alterar a matriz de colágeno na região abdominal (HENRIKSEN *et al.*, 2015).

O colágeno do tipo I possui alta resistência e sustentabilidade muscular devido a sua formação consistir em fibras mais espessas e organizadas em feixes, conferindo uma estrutura resistente em locais com a deposição deste tipo de colágeno (JUNGE *et al.*, 2004). De forma contrária, o colágeno tipo III é bastante instável por não ser polimérico e solúvel, sendo mais observado nos estágios iniciais de cicatrizações (JUNGE *et al.*, 2004). A relação do colágeno tipo I e III determina a solidez do filamento do colágeno, o diâmetro da fibrila e a arquitetura

do feixe (LEIMAN *et al.*, 2017). Quando ocorrem falhas fisiológicas, esses fatores relacionados ao metabolismo do colágeno podem ocasionar alterações na fibrilogênese que regula o diâmetro da fibrila do colágeno e, em alguns casos, podem tornar os tecidos incapazes de suportar pressões exercidas sobre o mesmo, como ocorre no acometimento de hérnias (LORENTZEN *et al.*, 2018).

Propondo que o desenvolvimento de hérnia umbilical pode estar relacionado ao metabolismo de colágeno, a associação dessas informações a mecanismos genéticos pode trazer grandes benefícios para o entendimento de ocorrências de hérnia umbilical congênitas em suínos. Estudos com pacientes com o desenvolvimento de hérnias relatam alterações na expressão gênica de colágeno, porém, ainda não foram totalmente esclarecidas as variações genéticas em genes relacionados ao colágeno do tipo I e III, que por sua vez são associados à hérnia (JANSEN; KLINGE; MERTENS, 2006).

1.2.5 Influência Genética sobre o Desenvolvimento de Hérnia Umbilical em Suínos

A identificação de mutações causais relacionadas à susceptibilidade a hérnia umbilical pode trazer grandes benefícios para a indústria de suínos (TORE *et al.*, 2011). Acredita-se na influência genética sobre a ocorrência da hérnia umbilical congênita em suínos, uma vez que os animais podem nascer e/ou desenvolver-se com a anomalia em questão (RUTTEN-RAMOS; DEEN, 2006). Esses estudos são importantes para a indústria de suínos, pois o aumento da produção e produtividade se dá através de melhorias no bem-estar animal, nutrição, sanidade, manejo e também pelo melhoramento genético, aumentando assim os índices econômicos da atividade (SEVILLANO *et al.*, 2015).

Com relação a seleção genética de progenitores superiores, considerava-se basicamente o desempenho fenotípico e as informações de pedigree em programas de melhoramento genético, não considerando especificamente os genes que afetam cada característica, ou ainda, o efeito de cada gene (MA *et al.*, 2018). Atualmente, destaca-se a importância do uso das informações moleculares aliadas à seleção de características de interesse econômico. Especial atenção é atribuída ainda para características que apresentam baixa herdabilidade, difícil mensuração como àquelas que necessitam do abate do animal para serem medidas, ou ainda aquelas que são expressas em apenas um sexo, porém, tanto a mãe quanto o pai transmitem genes que influenciam no desenvolvimento da característica (ROTHSCHILD; PLASTOW, 2008).

A influência genética através da hereditariedade para hérnias em suínos é importante, uma vez que se pode verificar a ocorrência da mesma em diferentes raças e maior susceptibilidade em algumas raças e linhagens suínas (SEARCY-BERNAL; GARDNER; HIRD, 1994). A herdabilidade de 0,37, observada para esta anomalia, é considerada moderada indicando a forte atuação de fatores genéticos atuando sobre a predisposição desta anomalia (LARZUL *et al.*, 2008). No trabalho de Searcy-Bernal, Gardner e Hird (1994), os autores acompanharam animais desde o nascimento à creche, contando com um número de 378 leitões da raça Duroc, em que foram observados 10 animais acometidos pela enfermidade, filhos do mesmo reprodutor. Outro estudo avaliou a ocorrência de hérnia umbilical em diferentes linhagens e observou-se que o desenvolvimento da anomalia foi relacionado à linhagem genética (RUTTEN-RAMOS; DEEN, 2006). Em linhagens cruzadas, a ocorrência de hérnia umbilical pode ser menor em decorrência de uma maior variabilidade genética no rebanho (RUTTEN-RAMOS; DEEN, 2006).

Adicionalmente, nota-se o crescimento no número de trabalhos conduzidos para identificar regiões do genoma suíno que podem estar ligados à ocorrência de hérnia umbilical. Ding *et al.* (2009), avaliando possíveis locos responsáveis pela susceptibilidade para hérnia umbilical em suínos F₂, obtidos pelo cruzamento de suínos das raças Duroc e Erhualian, observaram regiões com associação sugestiva nos cromossomos SSC1, SSC2, SSC3, SSC4, SSC6, SSC7, SSC8, SSC10, SSC11, SSC13, SSC14 e SSC15, sendo que os marcadores mais relevantes foram encontrados no SSC7 e SSC10.

Em estudos mais recentes, como o realizado por Grindflek *et al.* (2018), utilizando a análise de associação genômica ampla (GWAS), foram encontrados três genes candidatos, *OSM*, *LIF* e *MIF*, localizados em regiões de QTL no SSC14, sugerindo o sistema imunológico como responsável pelo desenvolvimento de hérnia umbilical, devido tais genes serem responsáveis por fatores de respostas inflamatórias e reparações de lesões e infecções (LIU *et al.*, 2015; AMARAL, 2016; GRINDFLEK *et al.*, 2018).

1.2.6 Estudos Genômicos na Espécie Suína

Os estudos moleculares em suínos iniciaram-se de forma mais ampla na década de 1990 com o desenvolvimento internacional do projeto PigMap, assim como projetos em universidades dos Estados Unidos (EUA) e o Departamento da Agricultura dos Estados Unidos (USDA) (ROTHSCHILD; HU; JIANG, 2007). As análises com ênfase genômica objetivaram inicialmente a identificação de mutações causais para características quantitativas, as quais são

difíceis de serem encontradas e, conseqüentemente comprovadas, por possuírem poucos exemplares disponíveis no genoma (QIAO *et al.*, 2015). Inicialmente com relação aos estudos de marcadores moleculares tipo microssatélites, estes normalmente apresentavam-se em grandes quantidades, distribuídos em todo o genoma, de modo que pudessem mais facilmente estarem associados a características de interesse econômico (DEKKERS; HOSPITAL, 2002).

A princípio, dois mapas de ligação genética estavam disponíveis (ARCHIBALD *et al.*, 1995; ROHRER *et al.*, 1996), sendo que o maior possuía mais de 1.200 marcadores microssatélites, também chamados de repetições de sequências simples (SSRs) (ROTHSCHILD; HU; JIANG, 2007). Estes mapas foram de notável importância para o mapeamento de locos que controlam características quantitativas (QTL) com marcadores microssatélites, uma metodologia muito utilizada no início dos estudos com marcadores moleculares. Essa forma de mapeamento foi muito importante para a análise da variação genética de características com alta importância econômica, sendo que milhares de QTLs para essas características foram identificados (ERNST; STEIBEL, 2013).

O mapeamento de QTL é um método efetivo para identificar regiões do genoma que co-segregam para determinada característica (KORTE; FARLOW, 2013). Porém, devido a maioria dos estudos de QTL clássicos, utilizando marcadores microssatélites, apresentarem baixa resolução, tornou-se difícil detectar genes importantes para características de interesse zootécnico, baseando apenas nesta informação (ZHANG *et al.*, 2012). Desta forma, com a evolução das tecnologias, as análises de QTL passaram a ser realizadas utilizando-se painéis de alta densidade compostos por Polimorfismos de Base Única (SNP - *Single Nucleotide Polymorphism*) (ERNST; STEIBEL, 2013).

Os marcadores microssatélites são marcadores codominantes que consistem em repetições simples da sequência com comprimento variando entre um a seis pares de bases (FISCHER *et al.*, 2017). Esse método detecta a variabilidade do genoma através da atividade da DNA polimerase durante a replicação, levando à formação de alelos mais curtos ou mais longos (ELLEGREN, 2004). A genotipagem utilizando marcadores microssatélites possuía a desvantagem relacionada com a dependência da técnica de eletroforese, o que podia gerar inferência equivocada limitando a utilização da genotipagem por microssatélites (ZHAN *et al.*, 2017). Já os polimorfismos do tipo SNPs são marcadores bi-alélicos, portanto, apresentam menor quantidade de informações por locus comparado aos marcadores microssatélites, que por sua vez, são multialélicos (HAASL; PAYSEUR, 2011).

Os microssatélites foram muito utilizados, por algum tempo, porém, nos últimos anos vem sendo substituídos pelos marcadores do tipo SNPs (PUTMAN; CARBONE, 2014). Os

SNPs apresentam vantagens sobre os marcadores tipo microssatélites, como maior abundância nos genomas, menores taxas de erros de genotipagem, maior comodidade à genotipagem de alto rendimento e, potencialmente menor custo (GUICHOUX *et al.*, 2011). Estudos ressaltam a grande quantidade de SNPs, principalmente em humanos (ALLENDORF; LUIKART, 2007), justificando o crescimento da utilização de SNPs em pesquisas genéticas nos últimos anos, mostrando a maior eficiência desse tipo de marcador (SMITH *et al.*, 2011).

O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento de nova geração levou a identificação de muitos SNPs (VAN BERS *et al.*, 2010; RAMOS *et al.*, 2011). Essas tecnologias de nova geração são imprescindíveis para estudos em genética e genômica, para a identificação de variações genéticas no genoma suíno e também de outras espécies (RAMOS *et al.*, 2009). Em um estudo visando a identificação de SNPs de importância para rastreabilidade populacional em suínos, foram identificados o total de 10.816 SNPs para a raça Duroc, 5.236 SNPs para a raça Landrace, 6.592 para a raça Large White, 4.612 para a raça Pietran e também 4.441 para Javali selvagem, demonstrando que novas tecnologias de sequenciamento são eficientes para indicar possíveis SNPs específicos de cada raça (RAMOS *et al.*, 2011). Dentre as características abordadas em estudos com suínos, foram encontrados SNPs relacionados ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, sendo relatado por um estudo o total de 129 SNPs relacionados à característica (GRINDFLEK *et al.*, 2018).

Para a espécie suína, são relatados atualmente 30.580 QTLs representando 687 características diferentes, destes 55 QTLs associados à hérnia umbilical em suínos (<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index> - 16/07/2020). A maioria destes QTLs observados para a espécie suína foram mapeados através de microssatélites, porém, conforme mencionada a evolução de tecnologias de sequenciamento de nova geração, alguns destes já foram mapeados utilizando SNPs. Desta forma, é possível observar estudos de GWAS para diferentes características em suínos, a qual, foram encontradas várias regiões genômicas indicando a importância da utilização desta ferramenta na seleção genética de suínos (ZHANG *et al.*, 2015).

1.2.7 Análise de Associação Genômica Ampla e suas Aplicações em Suínos

A utilização de estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS) visa aumentar a acurácia da associação através da busca de mecanismos ligados a biologia molecular de importância para características quantitativas, identificação de genes e a análise funcional dos mesmos, acelerando desta forma o melhoramento genético para características de interesse

econômico (FAN *et al.*, 2011). Com a utilização deste método, torna-se mais eficiente o melhoramento genético em decorrência das análises de GWAS envolverem milhares de variantes em todo o genoma, para identificar aquelas associadas as características de interesse (HINDORFF *et al.*, 2009).

A utilização da análise de GWAS com marcadores tipo SNP reduziu o tempo de genotipagem e consequentemente da análise genômica, sendo uma forma eficiente para detectar QTLs importantes associados a características econômicas, quando comparado com as análises previamente utilizadas (WANG *et al.*, 2014). Mesmo sendo um método eficiente de análise genômica, no início da sua utilização acreditava-se que o GWAS era um método que poderia ter resultados imparciais (CANTOR; LANGE; SINSHEIMER, 2010). Esse pensamento era em decorrência deste método detectar variações no genoma com frequências superiores a 1%, e algumas características que possuem a frequência menor que 1% não teriam marcadores identificados associados a elas, uma vez que o sucesso de GWAS é a detecção de SNPs que se encontram em desequilíbrio de ligação com o QTL (CANTOR; LANGE; SINSHEIMER, 2010).

Para que as análises de GWAS sejam realizadas sem a ocorrência de falsos positivos, é necessário utilizar um número grande de amostras dentro de uma população de modo que forneçam informações reais, os genótipos possuam alelos polimórficos que possam ser genotipados de maneira barata e eficiente e, que sejam empregados métodos analíticos estatisticamente eficientes para identificar essas associações genéticas (CANTOR; LANGE; SINSHEIMER, 2010). Segundo a mesma fonte, o sequenciamento em grande escala que era extremamente caro, tem se tornado mais viável economicamente, sendo uma ótima opção dentro de programas de melhoramento genético animal. Para a realização da análise de associação genômica é necessário a realização de quatro etapas, as quais consistem na coleta da informação do fenótipo de interesse de estudo, genotipagem e avaliação da qualidade das amostras e dos SNPs, e por fim, a análise de associação entre o genótipo, ou seja, os SNPs e a característica avaliada, (PEARSON; MANOLIO, 2008).

Várias metodologias são utilizadas para realizar análise de associação genômica ampla, dentre elas uma mais simplificada que consiste na associação de um único marcador, considerando o efeito individual de cada SNP. A metodologia de marcadores únicos utiliza testes de hipótese entre o fenótipo e o marcador na tentativa de detectar associações estatisticamente significativas com a característica em estudo (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009). Outra metodologia disponível se baseia na associação de múltiplos

marcadores com a característica de interesse, ou seja, com a construção de haplótipos, visando a detecção e redução de falsos positivos (LI; ZHOU; ELSTON, 2006).

Os estudos envolvendo *GWAS* com a utilização de painéis de alta densidade se mostraram muito eficientes em identificar marcadores e genes candidatos, relacionados a características importantes economicamente (CAETANO, 2009; GUO *et al.*, 2017). Diversos estudos através desse método têm identificado genes relacionados a características importantes em suínos (ZHANG *et al.*, 2019). Entre estes, estão genes relacionados a características produtivas, uma delas é o consumo alimentar residual (*RFI - Residual Feed Intake*), para a qual foram identificados os genes candidatos *MAP3K5* e *PEX7* no SSC1, ENSSSCG00000022338 no SSC9 e *DSCAM* no SSC13 (DO *et al.*, 2014). Estudando o crescimento e deposição de gordura em suínos, foram identificados no SSC7 o gene candidato *HMGAI* relacionado a deposição de gordura, no SSC4 o gene *PLAG1* associado a espessura de toucinho e no SSC2 o gene *IGF2* relacionado ao metabolismo de gordura (QIAO *et al.*, 2015). Também já foram identificados genes candidatos associados a qualidade de carne, uma característica muito importante na produção de suínos, sendo que os genes com maiores efeitos em suínos comerciais foram *MC4R*, *IGF2*, *CAST* e *PRKAG3* (ROHRER *et al.*, 2012).

A maioria dos estudos realizados na espécie suína está relacionada às características de produção. Contudo, nos últimos anos, estudos genômicos relacionados a saúde dos suínos vêm sendo conduzidos, dentre eles estudos relacionados aos defeitos congênitos. No entanto, foram evidenciados na literatura genes associados apenas a algumas dessas características, dentre elas, se destacam as hérnias por serem defeitos com grande frequência em suínos (SEVILLANO *et al.*, 2015). Através de estudos de análise de associação genômica ampla (*GWAS*), foram associados a hérnia escrotal e inguinal os genes *RHOA*, *CYP19A1*, *EGF*, *LEF1* observados por Sevillano *et al.* (2015), *UST* e *CDKAL1* por Ruan *et al.* (2014). Para a hérnia umbilical, estudos como estes identificaram os genes *SRC* (LIAO *et al.*, 2015), *OSM*, *LIF*, *VCAN*, *MMP13*, *PYCR1* e *VIM* (GRINDFLEK *et al.*, 2018), *TBX15*, *WARS2*, *LIPI* e *RBM11* (FERNANDES *et al.*, 2018) e *CAPN9* (LI *et al.*, 2019).

Outra metodologia como a do transcriptoma, também revelou os genes candidatos *MYBPC1*, *BOK*, *SLC25A4*, *SLC8A3*, *DES*, *TPM2*, *MAP1CL3C* e *FGF1* relacionados a hérnia escrotal em suínos (ROMANO *et al.*, 2020), e também através da mesma metodologia foi possível obter genes candidatos associados a hérnia umbilical, sendo eles *ACAN*, *MMPs*, *COLs*, *EPYC*, *VIT*, *CCBE1* e *LGALS3* (SOUZA *et al.*, 2020). Esses resultados demonstram que vários genes estão relacionados com a ocorrência de hérnia umbilical em suínos.

Desta forma, a partir de análises de GWAS é possível detectar e identificar QTLs importantes e genes que controlam e explicam determinados fenótipos como a hérnia umbilical em suínos, selecionando animais que não apresentem a predisposição à anomalia. Essa técnica tem como objetivo, explorar a diversidade genética e identificar novas combinações alélicas de genes ligados a características complexas (NICOLAE et al., 2010). A descoberta destes QTLs associados com informações de genes encontrados nestas mesmas regiões, fornecem informações que podem ser incorporadas na seleção assistida por marcadores e/ou na seleção genômica, auxiliando nos programas de melhoramento genético suíno (SHARMA et al., 2015). Esse auxílio se dá através da inserção de novos marcadores encontrados, associados a característica de interesse, em chips de genotipagem, possibilitando a identificação de futuros reprodutores que gerem progênes mais produtivas, ou menos propensas a determinadas doenças e anomalias.

1.2.8 Análise de Associação Genômica Ampla Utilizando Marcadores Únicos e Múltiplos

O surgimento dos painéis de SNPs de alta densidade para espécies de animais domésticos permitiu a detecção de QTLs para características importantes economicamente através de estudos de associação, com maior precisão do que as análises utilizadas tradicionalmente (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009). Nestes estudos, a forma mais simplificada para realizar análises de associação genômica ampla, é através da associação de um único marcador (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009). Também podem ser utilizados múltiplos marcadores nas análises de associação, que podem atuar diminuindo o número de falsos positivos e aumentando o poder de detecção de SNPs associados a característica estudada (LI; ZHOU; ELSTON, 2006).

As análises de GWAS baseiam-se em encontrar variantes genéticas associadas a características fenotípicas (FREIMER; SABATTI, 2007). O teste de associação genômica ampla mais simples é a regressão de marcador único, e o marcador mostra a evidência estatística mais fortemente associada em uma região genômica (Janela de 2 Mb centralizada no locus, por exemplo) (YANG *et al.*, 2012). Esse teste não consegue realizar a associação sem viés, caso vários SNPs próximos estejam relacionados a uma variante causal devido ao desequilíbrio de ligação (LD) (SANNA *et al.*, 2011). Também pode haver diversas variantes causais em uma mesma região. Normalmente, um SNP apenas não pode ser responsável por todo LD entre as variantes causais desconhecidas, no entanto, a variação total que poderia ser explicada em um locus pode ser subestimada se apenas o SNP mais significativo da região for selecionado

(YANG *et al.*, 2012). Uma opção para diminuir esses problemas seria o ajuste para a análise de regressão múltipla (YANG *et al.*, 2012).

Com os avanços nas tecnologias de genotipagem, os SNPs tornaram-se os marcadores mais comumente utilizados. No entanto, estes são geralmente bi-alélicos, fornecendo um menor conteúdo de informação polimórfica (*PIC*) quando comparados a marcadores como SSRs, que são multi-alélicos, necessitando uma maior densidade do marcador tipo SNP para obtenção de resultados coerentes (N'DIAYE *et al.*, 2017). Desta forma, a análise de associação genômica ampla utilizando múltiplos marcadores, além de sanar o viés com relação a análises utilizando um único marcador, pode ser uma alternativa para diminuir essa limitação através da transformação de SNPs em haplótipos (LU *et al.*, 2012). Para a utilização da metodologia utilizando múltiplos marcadores, devido as variações genéticas no genoma serem herdadas em blocos de ligação, os marcadores são agrupados em haplótipos, o que não é realizado em análises de GWAS com marcadores únicos (BROWNING; BROWNING, 2011). A justificativa para utilização de haplótipos é que os marcadores podem se encontrar em maior LD com os QTLs do que os marcadores únicos, em que o r^2 entre o QTL e o haplótipo é maior, sendo maior o poder de detecção da metodologia (HAYES, 2013).

Existem alguns programas específicos que podem ser utilizados para as duas metodologias, podendo ser utilizando o software PLINK e Blossoc, para análise de associação de único e múltiplo marcador, respectivamente (PURCELL *et al.*, 2007; MAILUND; BESENBACHER; SCHIERUP, 2006).

O software Plink (PURCELL *et al.*, 2007) utiliza um método estatístico eficiente para testar hipóteses quando as variáveis apresentam duas condições, como em estudos de associação entre caso-controle, mostrando e detalhando as informações de diferenças encontradas (MCHUGH, 2013). Esse programa apresenta algumas funções como o gerenciamento dos dados, estatísticas resumidas, estratificação populacional, análise de associação e estimativa de identidade por descendência (PURCELL *et al.*, 2007). Essas características permitem detectar e corrigir estratificações populacionais e identificar variantes importantes que são raras (PURCELL *et al.*, 2007). O mesmo permite que os limiares de significância sejam ajustados pelo teste de Bonferroni, que é um método muito utilizado para ajuste dos níveis de significância em testes múltiplos, consistindo em rejeitar as hipóteses nulas com valor de p menores que a divisão do nível de significância esperada pelo número de testes realizados (GLICKMAN; RAO; SCHULTZ, 2014). Dentre as principais vantagens desse software, encontra-se a facilidade de manuseio por possuir uma metodologia simples, análise

de um número grande de amostras o que torna rápido o processo da análise (PURCELL *et al.*, 2007).

O software Blossoc realiza análises de associação utilizando a metodologia de múltiplos marcadores com o mapeamento da associação através do desequilíbrio de ligação, por meio da análise de haplótipos, sendo esta uma das principais vantagens por diminuir o número de falsos positivos (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009). Esse método utiliza a abordagem Bayesiana, não gerando o valor de p e consiste em construir árvores filogenéticas perfeitas para cada SNP e os pontua de acordo com o agrupamento não aleatório dos indivíduos afetados (caso), julgando as áreas de maior escore como prováveis candidatas a conter a variante causal (DASHAB *et al.*, 2012). Para a análise dos dados nesse programa é necessário que sejam removidos os SNPs distribuídos nos cromossomos sexuais e aqueles que ainda não possuem localização no genoma. Esse procedimento é realizado, pois essa metodologia utiliza um conjunto de SNPs que vem do pai e da mãe (Haplótipo) que são testados concomitantemente e verificados os seus efeitos. Dessa forma, não é possível realizar a análise com SNPs sem localização nem com os localizados nos cromossomos sexuais. O Blossoc visa principalmente a eficiência computacional, deduzindo em suas análises as genealogias contidas na população estudada, mostrando vantagens sobre as análises de marcador único com relação a precisão e localização de regiões relacionadas as características estudadas (SAHANA *et al.*, 2011).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA IBGE NOTÍCIAS. No 1º trimestre de 2020, abate de bovinos cai e o de suínos e frangos cresce. (2020) < <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/27922-no-1-trimestre-de-2020-abate-de-bovinos-cai-e-o-de-suinos-e-frangos-cresce> > Acesso em 08 de setembro de 2020.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. Conservation and the Genetics of Populations. *Mammalia*, v. 71, n. 4, p. 189–197, 2007.

AMARAL, R. C. **Diminuição dos níveis de quimiocinas no tecido cardíaco de ratos idosos submetidos ao modelo de pancreatite aguda grave: um novo mecanismo cardioprotetor durante a inflamação sistêmica.** Tese de doutorado (Faculdade de Medicina). Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

ARCHIBALD, A. L.; HALEY, C.S.; BROWN, J. F.; COUPERWHITE, S.; MCQUEEN, H. A.; NICHOLSON, D.; COPPIETERS, W.; VAN de WEGHE, A.; STRATIL, A.; WINTERØ, A. K.; FREDHOLM, M.; LARSEN, N. J.; NIELSEN, V. H.; MILAN, D.; WOLOSZYN, N.; ROBIC, A.; DALENS, M.; RIQUET, J.; GELLIN, J.; CARITEZ, J. C.; BURGAUD, G.,

OLLIVIER, L.; BIDANEL, J. P.; VAIMAN, M.; RENARD, C.; GELDERMANN, H.; DAVOLI, R.; RUYTER, D.; VERSTEGE, E. J. M.; MAM GROENEN, DAVIES, W.; HØYHEIM, B.; KEISERUD, A.; ANDERSSON, L.; ELLEGREN, H.; JOHANSSON, M.; MARKLUND, L.; MILLER, J. R.; ANDERSON CARO, D. V.; SIGNATÁRIO, E.; JEFFREYS, A. J.; MORAN, C.; LE TISSIER, P.; MULADNO, ROTHSCHILD, M. F.; TUGGLE, C. K.; VASKE, D.; HELM, J.; LIU, H. C.; RAHMAN, A.; YU, T. P.; LARSON, R. G.; SCHMITZ, C. B. The PiGMaP consortium linkage map of the pig (*Sus scrofa*). **Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society**, v. 6, n. 3, p. 157–75, 1995.

BENDAVID, R. The Unified Theory of hernia formation. **Hernia**, v. 8, n. 3, p. 171–176, 2004.

BENIRSCHKE, K.; BURTON, G. J.; BAERGEN, R. N. Anatomy and Pathology of the Umbilical Cord. In: **Pathology of the Human Placenta**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2012, p. 309–375.

BIRK, D. E.; ZYCBAND, E. I.; WOODRUFF, S.; WINKELMANN, D. A.; TRELSTAD, R. L. Collagen fibrillogenesis in situ: fibril segments become long fibrils as the developing tendon matures. **Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists**, v. 208, n. 3, p. 291–8, 1997.

BOSSSELMANN, S.; MIELKE, G. Sonographic Assessment of the Umbilical Cord. **Geburtshilfe und Frauenheilkunde**, Nova Iorque, v. 75, n. 08, p. 808-818, 2015.

BOYLE, L.; LEMOS TEIXEIRA, D. Improving pig welfare will reduce carcass losses Cow welfare in grass based milk production systems View project GiltLife View project Improving pig welfare will reduce carcass losses. In: **Proceeding Pig Farmers Conference**, v. 19, p. 20, 2010.

BROWNING, B. L.; BROWNING, S. R. A Fast, Powerful Method for Detecting Identity by Descent. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 2, p. 173–182, 2011.

CAETANO, A. R. Revista Brasileira de Zootecnia Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 38, n. SPE, p. 64-71, 2009.

CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS Results: A Review of Statistical Methods and Recommendations for Their Application. **The American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 6–22, 2010.

COLPOYS, J. D.; ABELL, C. E.; YOUNG, J. M.; KEATING, A. F.; GABLER, N. K.; MILLMAN, S. T.; SIEGFORD, J. M.; JOHNSON. AKEffects of genetic selection for residual feed intake on behavioral reactivity of castrated male pigs to novel stimuli tests. **Applied Animal Behaviour Science**, v. 159, p. 34–40, 1 out. 2014.

COUTINHO, L. L.; ROSÁRIO, M. F. do; JORGE, E. C. Biotecnologia animal. **Estudos Avançados**, v. 24, n. 70, p. 123–147, 2010.

DAETWYLER, H. D.; CAPITAN, A.; PAUSCH, H.; STOTHARD, P.; VAN BINSBERGEN, R.; BRØNDUM, R. F.; LIAO, X.; DJARI, A.; RODRIGUEZ, S. C.; GROHS, C.; ESQUERRÉ, D.; BOUCHEZ, O.; ROSSIGNOL, M. -N.; KLOPP, C.; ROCHA, D.; FRITZ, S.; EGGEN, A.; BOWMAN, P. J.; COOTE, D.; CHAMBERLAIN, A. J.; ANDERSON, C.; VANTASSELL, C. P.; HULSEGG, I.; GODDARD, M. E.; GULDBRANDTSEN, B.; LUND, M. S.; VEERKAMP, R. F.; BOICHARD, D. A.; FRIES, R.; HAYES, B. J. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. **Nature Genetics**, v. 46, n. 8, p. 858–865, 2014.

DASHAB, G. R.; KADRI, N. K.; SHARIATI, M. M.; SAHANA, G. Comparison of linear mixed model analysis and genealogy-based haplotype clustering with a Bayesian approach for association mapping in a pedigreed population. **BMC Proceedings**, v. 6, n. S2. 2, p. 1–5, 2012.

DEKKERS, J. C. M.; HOSPITAL, F. The use of molecular genetics in the improvement of agricultural populations. **Nature Reviews Genetics**, v. 3, n. 1, p. 22–32, 2002.

DING, N. S.; MAO, H. R.; GUO, Y. M.; REN, J.; XIAO, S. J.; WU, G. Z.; SHEN, H. Q.; WU, L. H.; RUAN, G. F.; BREINIG, B.; HUANG, L. S. A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian1. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 8, p. 2469–2474, 2009.

DO, D. N.; OSTERSEN, T.; STRATHE, A. B.; MARK, T.; JENSEN, J.; KADARMIDEEN, H. N. Genome-wide association and systems genetic analyses of residual feed intake, daily feed consumption, backfat and weight gain in pigs. **BMC Genetics**, v. 15, n. 1, p. 1–15, 2014.

ELANGO, S.; PERUMALSAMY, S.; RAMACHANDRAN, K.; VADODARIA, K. Mesh materials and hernia repair. **BioMedicine**, v. 7, n. 3, 2017.

ELLEGREN, H. Microsatellites: Simple sequences with complex evolution. **Nature Reviews Genetics**. **Nature Publishing Group**, v. 5, n.6, p. 435-445, 2004.

ERNST, C. W.; STEIBEL, J. P. Molecular advances in QTL discovery and application in pig breeding. **Trends in Genetics**, v. 29, n. 4, p. 215–224, 2013.

FAN, B.; ONTERU, S. K.; DU, Z. Q.; GARRICK, D. J.; STALDER, K. J.; ROTHSCHILD, M. F. Genome-Wide Association Study Identifies Loci for Body Composition and Structural Soundness Traits in Pigs. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, p. e14726, 2011.

FERNANDES, L. T.; ONO, R. K.; IBELLI, A. M. G.; LAGOS, E. B.; MORÉS, M. A. Z.; CANTÃO, M. E.; LORENZETTI, W. R.; PEIXOTO, J de O.; PEDROSA, V. B.; LEDUR, M. C. Novel putative candidate genes associated with umbilical hernia in pigs. *In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Auckland, Nova Zelândia, 2018.

FISCHER, M. C.; RELLSTAB, C.; LEUZINGER, M.; ROUMET, M.; GUGERLI, F.; SHIMIZU, K. K.; HOLDEREGGER, R.; WIDMER, A. Estimating genomic diversity and population differentiation - an empirical comparison of microsatellite and SNP variation in *Arabidopsis halleri*. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.

FRANZ, M. G. The Biology of Hernia Formation. **Surgical Clinics of North America**, v. 88,

n. 1, p. 1–15, 2008.

FREIMER, N. B.; SABATTI, C. Human genetics: Variants in common diseases *Nature*. **Nature Publishing Group**, v. 445, n. 7130, p. 828-830, 2007.

GIUFFRA, E. J. M. H.; KIJAS, J. M. H.; AMARGER, V.; CARLBORG, Ö., JEON, J. T., ANDERSSON, L. The Origin of the Domestic Pig: Independent Domestication and Subsequent Introgression. *Genetics*, v. 154, n. 4, p. 1785-1791, 2000.

GLICKMAN, M. E.; RAO, S. R.; SCHULTZ, M. R. False discovery rate control is a recommended alternative to Bonferroni-type adjustments in health studies. *Journal of Clinical Epidemiology*, v. 67, n. 8, p. 850–857, 2014.

GRINDFLEK, E.; HANSEN, M. H.; LIEN, S.; VAN SON, M. Genome-wide association study reveals a QTL and strong candidate genes for umbilical hernia in pigs on SSC14. *BMC Genomics*, v. 19, n. 1, p. 412, 2018.

GUICHOUX, E.; LAGACHE, L.; WAGNER, S.; CHAUMEIL, P.; LÉGER, P.; LEPAIS, O.; LEPOITTEVIN, C.; MALAUSA, T.; REVARDEL, E.; SALIN, F.; PETIT, R. J. Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology Resources*, v. 11, n. 4, p. 591–611, 2011.

GUO, Y.; HUANG, Y.; HOU, L.; MA, J.; CHEN, C.; AI, H.; HUANG, L.; REN, J. Genome-wide detection of genetic markers associated with growth and fatness in four pig populations using four approaches. *Genetics Selection Evolution*, v. 49, n. 1, p. 1–11, 2017.

HAASL, R. J.; PAYSEUR, B. A. Multi-locus inference of population structure: A comparison between single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Heredity*, v. 106, n. 1, p. 158–171, 2011.

HAYES, B. Overview of Statistical Methods for Genome-Wide Association Studies (GWAS). *In: Genome-wide association studies and genomic prediction*. Humana Press, Totowa, Nova Jersey, p. 149–169, 2013.

HENRIKSEN, N. A.; MORTENSEN, J. H.; SORENSEN, L. T.; BAY-JENSEN, A. C.; ÅGREN, M. S.; JORGENSEN, L. N.; KARSDAL, M. A. The collagen turnover profile is altered in patients with inguinal and incisional hernia. *Surgery*, v. 157, n. 2, p. 312–321, 2015.

HINDORFF, L. A.; SETHUPATHY, P.; JUNKINS, H. A.; RAMOS, E. M.; MEHTA, J. P.; COLLINS, F. S.; MANOLIO, T. A. Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 106, n. 23, p. 9362–9367, 2009.

HWANG, Y. H.; SABIKUN, N.; ISMAIL, I.; JOO, S. T. Changes in sensory compounds during dry aging of pork cuts. *Food Science of Animal Resources*, v. 39, n. 3, p. 379–387, 2019.

JANSEN, P. L.; KLINGE, U., MERTENS, P. R. Hernia disease and collagen gene regulation: are there clues for intervention? *Hernia*, v. 10, n. 6, p. 486–491, 2006.

JIA, G.; HUANG, X.; ZHI, H.; ZHAO, Y.; ZHAO, Q.; LI, W.; CHAI, Y.; YANG, L.; LIU, K.; LU, H.; ZHU, C.; LU, Y.; ZHOU, C.; FAN, D.; WENG, Q.; GUO, Y.; HUANG, T.; ZHANG, L.; LU, T.; FENG, Q.; HAO, H.; LIU, H.; LU, P.; ZHANG, N.; LI, Y.; GUO, E.; WANG, S.; WANG, P.; LIU, J.; ZHANG, W.; CHEN, G.; ZHANG, B.; LI, W.; WANG, Y.; LI, H.; ZHAO, B.; LI, J.; DIAO, X.; HAN, E. A haplotype map of genomic variations and genome-wide association studies of agronomic traits in foxtail millet (*Setaria italica*). **Nature Genetics**, v. 45, n. 8, p. 957–961, 2013.

JUNGE, K.; KLINGE, U.; ROSCH, R.; MERTENS, P. R.; KIRCH, J.; KLOSTERHALFEN, B.; LYNEN, P.; SCHUMPELICK, V. Decreased collagen type I/III ratio in patients with recurring hernia after implantation of alloplastic prostheses. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, n. 1, p. 17–22, 2004.

KADARMIDEEN, H. N.; VON ROHR, P.; JANSSE, L. L. G. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 6, p. 548–564, 2006.

KORTE, A.; FARLOW, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. **Plant Methods**, v. 9, n. 1, p. 29, 2013.

LARZUL, C.; DELAUNAY, I.; SCHWOB, S.; MERCAT, M. J. Paramètres génétiques des principales anomalies congénitales porcines. **40ème Journées de la Recherche Porcine: 5–6 February 2008**, p. 141-142, 2008.

LEDUR, M. C.; NAVARRO, N.; PÉREZ-ENCISO, M. Data modeling as a main source of discrepancies in single and multiple marker association methods. **BMC Proceedings**, v. 3, n. S1, p. S9, 2009.

LEIMAN, D.; MINKOWITZ, H.; DESPAIN, D.; JONES, M.; HOBSON, S. (214) Timing of reduction of postoperative pain intensity and opioid analgesia use with the bupivacaine-collagen matrix (INL-001) after open inguinal hernia repair. **The Journal of Pain**, v. 18, n. 4, p. S29, 2017.

LEPSHIN, M. V.; SAZHENOVA, E. A.; LEBEDEV, I. N. Multiple epimutations in imprinted genes in the human genome and congenital disorders. **Russian Journal of Genetics**, v. 50, n. 3, p. 221–236, 2014.

LI, J.; ZHOU, Y.; ELSTON, R. C. Haplotype-based quantitative trait mapping using a clustering algorithm. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 258, 2006.

LI, X.; XU, P.; ZHANG, C.; SUN, C.; LI, X.; HAN, X.; LI, M.; QIAO, R. Genome-wide association study identifies variants in the CAPN9 gene associated with umbilical hernia in pigs. **Animal Genetics**, v. 50, n. 2, p. 162-165, 2019.

LIAO, X. J.; LI, L.; ZHANG, Z. Y.; LONG, Y.; YANG, B.; RUAN, G. R.; SU, Y.; AI, H. S.; ZHANG, W. C.; DENG, W. Y.; XIAO, S. J.; REN, J.; DING, N. S.; HUANG, L. S. Susceptibility loci for umbilical hernia in swine detected by genome-wide association. **Russian Journal of Genetics**, v. 51, n. 10, p. 1000–1006, 2015.

- LIU, X.; LIU, R.; CROKER, B. A.; LAWLOR, K. E.; SMYTH, G. K.; WICKS, I. P. Distinctive pro-inflammatory gene signatures induced in articular chondrocytes by oncostatin M and IL-6 are regulated by Suppressor of Cytokine Signaling-3. **Osteoarthritis and Cartilage**, v. 23, n. 10, p. 1743–1754, 2015.
- LONG, Y.; SU, Y.; AI, H.; ZHANG, Z.; YANG, B.; RUAN, G.; XIAO, S.; LIAO, X.; REN, J.; HUANG, L.; DING, N. A genome-wide association study of copy number variations with umbilical hernia in swine. **Animal Genetics**, v. 47, n. 3, p. 298–305, 2016.
- LORENTZEN, L.; HENRIKSEN, N. A.; JUHL, P.; MORTENSEN, J. H.; ÅGREN, M. S.; KARSDAL, M. A.; JORGENSEN, L. N. Type V Collagen is Persistently Altered After Inguinal Hernia Repair. **Scandinavian Journal of Surgery**, v. 107, n. 3, p. 212–217, 2018.
- LU, Y.; XU, J.; YUAN, Z.; HAO, Z.; XIE, C.; LI, X.; SHAH, T.; LAN, H.; ZHANG, S.; RONG, T.; XU, Y. Comparative LD mapping using single SNPs and haplotypes identifies QTL for plant height and biomass as secondary traits of drought tolerance in maize. **Molecular Breeding**, v. 30, n. 1, p. 407–418, 2012.
- MA, X.; LI, P. H.; ZHU, M. X.; HE, L. C.; SUI, S. P.; GAO, S.; SU, G. S.; DING, N. S.; HUANG, Y.; LU, Z. Q.; HUANG, X. G.; HUANG, R. H. Genome-wide association analysis reveals genomic regions on Chromosome 13 affecting litter size and candidate genes for uterine horn length in Erhualian pigs. **Animal**, v. 12, n. 12, p. 2453–2461, 2018.
- MAILUND, T.; BESENBACHER, S.; SCHIERUP, M. H. Whole genome association mapping by incompatibilities and local perfect phylogenies. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 454, 2006.
- MARTIN, M.; EL NABOUT, R.; LAFUMA, C.; CRECHET, F.; REMY, J. Fibronectin and collagen gene expression during in vitro ageing of pig skin fibroblasts. **Experimental Cell Research**, v. 191, n. 1, p. 8–13, 1990.
- MATTSSON, P. **Prevalence of congenital defects in Swedish Hampshire, Landrace and Yorkshire pig breeds and opinions on their prevalence in Swedish commercial herds.** Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Department of Animal Breeding and Genetics, 2011.
- MCHUGH, M. L. The Chi-square test of independence. **Biochemia Medica**, v. 23, n. 2, p. 143–149, 2013.
- MERKS, J. W. M. One century of genetic changes in pigs and the future needs. **BSAP Occasional Publication**, v. 27, p. 8–19, 2000.
- MONSANG, S. W. Surgical Management of Concurrent Umbilical Hernia and Intestinal Fecolith in a white Yorkshire Piglet; Case Report. **Research Journal for Veterinary Practitioners**, v. 2, n. 4, p. 67–69, 2014.
- MULLEY, R. C.; EDWARDS, M. J. Prevalence of congenital abnormalities in pigs. **Australian Veterinary Journal**, v. 61, n. 4, p. 116–120, 1984.

N'DIAYE, A.; HAILE, J. K.; CORY, A. T.; CLARKE, F. R.; CLARKE, J. M.; KNOX, R. E.; POZNIAK, C. J. Single Marker and Haplotype-Based Association Analysis of Semolina and Pasta Colour in Elite Durum Wheat Breeding Lines Using a High-Density Consensus Map. **PLoS One**, v. 12, n. 1, p. e0170941, 2017.

NICOLAE, D. L.; GAMAZON, E.; ZHANG, W.; DUAN, S.; DOLAN, M. E.; COX, N. J. Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. **PLoS Genet**, v. 6, n. 4, p. e1000888, 2010.

PARTLOW, G. D.; FISHER, K. R.; PAGE, P. D.; MACMILLAN, K.; WALKER, A. F. Prevalence and types of birth defects in Ontario swine determined by mail survey. **Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire**, v. 57, n. 2, p. 67–73, 1993.

PEARSON, T. A.; MANOLIO, T. A. How to Interpret a Genome-wide Association Study. **JAMA**, v. 299, n. 11, p. 1335, 2008.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, E. O.; HASSING, A. G., ERSBØLL, A. K., NIELSEN, J. P. Prevalence of clinical signs of disease in Danish finisher pigs. **The Veterinary record**, v. 162, n. 12, p. 377–82, 2008.

Pig Quantitative Trait Locus (QTL) Database (Pig QTLdb).

<<https://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/SS/index>> Acesso em 20 de junho de 2020.

PROCKOP, D. J.; KIVIRIKKO, K. I. COLLAGENS: Molecular Biology, Diseases, and Potentials for Therapy. **Annual review of biochemistry**, v. 64, n. 1, p. 403-434, 1995.

PRYCE, J. E.; BOLORMAA, S.; CHAMBERLAIN, A. J.; BOWMAN, P. J.; SAVIN, K.; GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. A validated genome-wide association study in 2 dairy cattle breeds for milk production and fertility traits using variable length haplotypes. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 7, p. 3331–3345, 2010.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A.; MALLER, J.; SKLAR, P.; BAKKER, P. I. W.; DALY, M. J.; SHAM, P. C. SHAM, P. C. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.

PUTMAN, A. I.; CARBONE, I. Challenges in analysis and interpretation of microsatellite data for population genetic studies. **Ecology and Evolution**, v. 4, n. 22, p. 4399-4428, 2014.

QIAO, R.; GAO, J.; ZHANG, Z.; LI, L.; XIE, X.; FAN, Y.; CUI, L.; MA, J.; AI, H.; REN, J.; HUANG, L. Genome-wide association analyses reveal significant loci and strong candidate genes for growth and fatness traits in two pig populations. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 17, 2015.

QING, C. The molecular biology in wound healing & non-healing wound. Chinese Journal of Traumatology. **Chinese Journal of traumatology**, v. 20, n. 4, p. 189-193, 2017.

RADHAKRISHNA, U.; NATH, S. K.; MCELREAVEY, K.; RATNAMALA, U.; SUN, C.; MAITI, A. K.; GAGNEBIN, M.; BÉNA, F.; NEWKIRK, H.; SHARP, A. J.; EVERMAN, D.

- B.; MURRAY, J.; SCHWARTZ, C. E.; ANTONARAKIS, S. E.; BUTLER, M. Genome-wide linkage and copy number variation analysis reveals 710 kb duplication on chromosome 1p31.3 responsible for autosomal dominant omphalocele. **Journal of medical genetics**, v. 49, n. 4, p. 270–6, 2012.
- RAMOS, A. M.; CROOIJMANS, R. P.; AFFARA, N. A.; AMARAL, A. J.; ARCHIBALD, A. L.; BEEVER, J. E.; BENDIXEN, C.; CHURCHER, C.; CLARK, R.; DEHAIS, P.; HANSEN, M. S.; HEDEGAARD, J.; HU, Z. -L.; KERSTENS, H. H.; LAW, A.S.; MEGENS, H. -J.; MILAN, D.; NONNEMAN, D. J.; ROHRER, G. A.; ROTHSCHILD, M. F.; SMITH, T. P. L.; SCHNABEL, R. D.; VAN TASSELL, C. P.; TAYLOR, J. F.; WIEDMANN, R. T.; SCHOOK, L. B.; GROENEN, M. A. M. Design of a high density SNP genotyping assay in the pig using SNPs identified and characterized by next generation sequencing technology. **PLoS ONE**, v. 4, n. 8, p. e6524, 2009.
- RAMOS, A. M.; MEGENS, H. J.; CROOIJMANS, R. P. M. A.; SCHOOK, L. B.; GROENEN, M. A. M. Identification of high utility SNPs for population assignment and traceability purposes in the pig using high-throughput sequencing. **Animal Genetics**, v. 42, n. 6, p. 613–620, 2011.
- ROHRER, G. A.; ALEXANDER, L. J.; HU, Z.; SMITH, T. P.; KEELE, J. W.; BEATTIE, C. W. A comprehensive map of the porcine genome. **Genome Research**, v. 6, n. 5, p. 371–391, 1996.
- ROHRER, G. A.; NONNEMAN, D. J.; MILLER, R. K.; ZERBY, H.; MOELLER, S. J. Association of single nucleotide polymorphism (SNP) markers in candidate genes and QTL regions with pork quality traits in commercial pigs. **Meat Science**, v. 92, n. 4, p. 511–518, 2012.
- ROTHSCHILD, M. F.; HU, Z.; JIANG, Z. Advances in QTL mapping in pigs. **International journal of biological sciences**, v. 3, n. 3, p. 192–7, 2007.
- ROTHSCHILD, M. F.; PLASTOW, G. S. Impact of genomics on animal agriculture and opportunities for animal health. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 1, p. 21–25, 2008.
- RUAN, G.; LONG, Y.; SU, Y.; ZHANG, Z.; XIAO, S.; LIAO, X.; AI, H. S.; BIN, Y.; DENG, Z.; XIN, W. S.; TANG, J. H.; REN, J.; DING, N. S.; HUANG, L. S. Genome-wide association study on identifying susceptibility loci for pig inguinal/scrotal hernia. **Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica**, v. 45, n. 11, p. 1775-1783, 2014.
- RUTTEN-RAMOS, S. C.; DEEN, J. Association between umbilical hernias and genetic line in a swine multiplication herd and methods to differentiate the role of sire in the incidence of umbilical hernias in offspring. **Journal of Swine Health and Production**, v. 14, n. 6, p. 317–322, 2006.
- SAHANA, G.; MAILUND, T.; LUND, M. S.; GULDBRANDTSEN, B. Local genealogies in a linear mixed model for genome-wide association mapping in complex pedigreed populations. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, p. e27061, 2011.
- SANNA, S.; LI, B.; MULAS, A.; SIDORE, C.; KANG, H. M.; JACKSON, A. U.; PIRAS, M. G.; USALA, G.; MANINCHEDDA, G.; SASSU, A.; SERRA, F.; PALMAS, M. A.; WOOD,

W. H.; NJOLSTAD, I.; LAAKSO, M.; HVEEM, K.; TUOMILEHTO, J.; LAKKA, T. A.; RAURAMAA, R.; BOEHNKE, M.; CUCCA, F.; UDA, M.; SCHLESSINGER, D.; NAGARAJA, R.; ABECASIS, G., R. Fine mapping of five loci associated with low-density lipoprotein cholesterol detects variants that double the explained heritability. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 7, p. e1002198, 2011.

SEARCY-BERNAL, R.; GARDNER, I. A.; HIRD, D. W. Effects of and factors associated with umbilical hernias in a swine herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1660–4, 1994.

SEVILLANO, C. A.; LOPES, M. S.; HARLIZIUS, B.; HANENBERG, E. H.; KNOL, E. F.; BASTIAANSEN, J. W. Genome-wide association study using deregressed breeding values for cryptorchidism and scrotal/inguinal hernia in two pig lines. **Genetics Selection Evolution**, v. 47, n. 1, p. 18, 2015.

SHARMA, A.; LEE, J. S.; DANG, C. G.; SUDRAJAD, P.; KIM, H. C.; YEON, S. H.; KANG, H. S.; LEE, S. H. Stories and challenges of genome wide association studies in livestock—a review. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, v. 28, n. 10, p. 1371, 2015.

SMITH, M. J.; PASCAL, C. E.; GRAUVOGEL, Z. A. C.; HABICHT, C.; SEEB, J. E.; SEEB, L. W. Multiplex preamplification PCR and microsatellite validation enables accurate single nucleotide polymorphism genotyping of historical fish scales. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 268–277, mar. 2011.

SOUZA, M. R.; IBELLI, A. M. G.; SAVOLDI, I. R.; CANTÃO, M. E.; PEIXOTO, J. D. O.; MORES, M. A. Z.; LOPES, J. S.; COUTINHO, L. L.; LEDUR, M. C. Transcriptome analysis identifies genes involved with the development of umbilical hernias in pigs. **PLoS one**, v. 15, n. 5, p. e0232542, 2020.

STOCK, K.; REENTS, R. Genomic selection: Status in different species and challenges for breeding. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 48, p. 2–10, set. 2013.

STRAW, B.; BATES, R.; MAY, G. Case report Peer reviewed Anatomical abnormalities in prevalence and pig performance. **Journal of Swine Health and Production**, v. 17, n. 1, p. 28–31, 2009.

TORE, S.; CASULA, S.; CASU, G.; CONCAS, M. .P.; PISTIDDA, P.; PERSICO, I.; SASSU, A.; MAESTRALE, G. B.; MELE, C.; CARUSO, M. R.; BONERBA, B.; USAI, P.; DEIANA, I.; THORNTON, T.; PIRASTU, M.; FORABOSCO, P. Application of a New Method for GWAS in a Related Case/Control Sample with Known Pedigree Structure: Identification of New Loci for Nephrolithiasis. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 1, p. e1001281, 2011.

VAN BERS, N. E. V.; OERS, K. V.; KERSTENS, H. H.; DIBBITS, B. W.; CROOIJMANS, R. P.; VISSER, M. E.; GROENEN, M. A. Genome-wide SNP detection in the great tit *Parus major* using high throughput sequencing. **Molecular Ecology**, v. 19, 1, p. 89–99, mar. 2010.

WANG, H.; MISZTAL, I.; AGUILAR, I.; LEGARRA, A.; FERNANDO, R. L.; VITEZICA, Z.; OKIMOTO, R.; WING, T.; HAWKEN, R.; MUIR, W. M. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS)

for 6-week body weight in broiler chickens. **Frontiers in Genetics**, v. 5, p. 134, 2014.

YANG, J.; FERREIRA, T.; MORRIS, A. P.; MEDLAND, S. E.; MADDEN, P. A.; HEATH, A. C.; MARTIN, N. G.; MONTGOMERY, G. W.; WEEDON, M. N.; LOOS, R.; FRAYLING, T. M.; MCCARTHY, M. I.; HIRSCHHORN, J.; GODDARD, M. E.; VISSCHER, P. M. Conditional and joint multiple-SNP analysis of GWAS summary statistics identifies additional variants influencing complex traits. **Nature Genetics**, v. 44, n. 4, p. 369–375, 2012.

ZHAN, L.; PATERSON, I. G.; FRASER, B. A.; WATSON, B.; BRADBURY, I. R.; RAVINDRAN, P. N.; REZNICK, D.; BEIKO, R. G.; BENTZEN, P. megasat: automated inference of microsatellite genotypes from sequence data. **Molecular Ecology Resources**, v. 17, n. 2, p. 247–256, 2017.

ZHANG, C.; WANG, Z.; BRUCE, H.; KEMP, R. A.; CHARAGU, P.; MIAR, Y.; YANG, T.; PLASTOW, G. Genome-wide association studies (GWAS) identify a QTL close to PRKAG3 affecting meat pH and colour in crossbred commercial pigs. **BMC Genetics**, v. 16, n. 1, p. 1–12, 2015.

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. 1, p. 26, 2012.

ZHANG, Y.; ZHANG, J.; GONG, H.; CUI, L.; ZHANG, W.; MA, J.; CHEN, C.; AI, H.; XIAO, S.; HUANG, L.; YANG, B. Genetic correlation of fatty acid composition with growth, carcass, fat deposition and meat quality traits based on GWAS data in six pig populations. **Meat Science**, v. 150, p. 47–55, 2019.

CAPÍTULO 2 – ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA PARA HÉRNIA UMBILICAL EM SUÍNOS COMERCIAIS UTILIZANDO ABORDAGENS DE MARCADORES ÚNICOS E MÚLTIPLOS

RESUMO

A hérnia umbilical (HU) é um dos defeitos congênitos mais comuns em suínos, ocasionado pela protusão do conteúdo intestinal pelo umbigo. A presença de hérnias afeta o bem-estar dos animais e pode ocasionar perdas econômicas devido ao menor crescimento e pior conversão alimentar. Além disto, as hérnias também podem gerar danos no momento do abate, contaminando a carcaça caso ocorra o rompimento das alças intestinais. Por isto, é importante para a indústria suinícola, a identificação de marcadores no genoma suíno que possam estar relacionados à hérnia umbilical e serem utilizados no processo de seleção de progenitores, evitando a ocorrência da anomalia. O objetivo deste trabalho foi identificar regiões genômicas associadas ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos por meio de duas metodologias estatísticas: análise com marcadores únicos e múltiplos. Foram avaliados e genotipados 325 animais (92 casos e 233 controles) híbridos da genética Agroceres Pic[®] advindos de granjas de Santa Catarina, utilizando GGP *Porcine Bead Chip* (Neogen, Lincon, NE, EUA). Foram encontrados 10 SNPs significativos com a análise de único marcador, contando com 23 transcritos de conhecimento biológico na extensão das regiões. Com marcadores múltiplos, foram observados 401 SNPs distribuídos em 51 regiões do genoma, contando com 116 transcritos conhecidos. Os processos biológicos significativamente associados a estes genes foram relacionados ao desenvolvimento da musculatura esquelética, a ocorrência da angiogênese, bem como o recrutamento de citocinas para combate inflamatório e cicatrização umbilical. De acordo com nossos resultados foram considerados fortes candidatos ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos segundo a metodologia utilizando único marcador, os genes *MTM1* e *MTMR1*, segundo a metodologia de múltiplos marcadores, os genes *EP300*, *MSTN* e *EYA2*, e por ambas as metodologias os genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6* e *WARS2*. Assim, pôde-se conhecer melhor os fatores genéticos associados à hérnia umbilical, demonstrando que genes relacionados ao desenvolvimento da musculatura esquelética, e processos ligados a matriz extracelular e ao sistema imune, podem estar intimamente relacionados a distúrbios que levam a predisposição a ocorrência de hérnia umbilical em suínos comerciais.

Palavras-chave: Defeito congênito. Genes candidatos. Marcadores genéticos. Produção suína.

ABSTRACT

Umbilical hernia (UH) is one of the most common congenital disorders in pigs caused by the protrusion of the intestinal contents by the navel. The presence of hernias can cause economic losses due to the damage caused to the welfare of the animals, which results in less growth and worse feed conversion. Besides, hernias can also cause damage in the moment of slaughter, contaminating the carcass if the intestinal loops rupture. For this reason, it is essential for the pig industry the identification of markers in the pig genome related to umbilical hernia, which could be used in the selection process, to reduce the occurrence of this anomaly. The objective

of this study was to identify genomic regions associated with the development of umbilical hernia in pigs, using two statistical methodologies: single and multiple marker analyses. Three hundred twenty-five crossbred animals (92 cases and 233 controls) from farms located in Santa Catarina State were genotyped, with the GGP Porcine Bead Chip (Neogen, Lincoln, NE, EUA). Ten significant SNPs were found from the single marker analysis, with 23 transcripts of biological knowledge located in the extension of the regions. With the multiple marker analysis, 401 SNPs were observed distributed in 51 genomic regions, with 116 transcripts biologically known. The biological processes significantly associated with those genes were related to the development of skeletal muscle, the occurrence of angiogenesis, as well as the recruitment of cytokines to fight inflammation and umbilical healing. According to our results, strong candidates for the development of umbilical hernia in pigs were considered according to the methodology using a single marker, the *MTM1* and *MTMR1* genes, according to the multiple marker methodology, the *EP300*, *MSTN* and *EYA2* genes, and by both methodologies the genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6* and *WARS2*. Thus, it was possible to better understand the genetic factors associated with umbilical hernia, demonstrating that genes related to the development of skeletal muscle, and processes linked to the extracellular matrix and the immune system, might be closely related to disorders leading to predisposition of umbilical hernia occurrence in commercial pigs.

Keywords: Congenital defect. Candidate genes. Genetic markers. Swine production.

2.1 INTRODUÇÃO

Na suinocultura a ocorrência de defeitos congênitos é comum, dentre eles a hérnia umbilical, inguinal e escrotal (GRINDFLEK *et al.*, 2018). A hérnia umbilical (HU) apresenta prevalência na criação de suínos de 0,13 a 2,25% em distintas raças e sistemas de criação (PETERSEN *et al.*, 2008; LI *et al.*, 2019). A ocorrência deste defeito afeta o bem-estar animal e gera perdas econômicas significativas, uma vez que animais afetados apresentarem baixo crescimento, piores taxas de conversão alimentar e qualidade da carne inferior (LIAO *et al.*, 2015).

Geralmente, a visualização clínica deste defeito ocorre em torno da 9^a a 14^a semana de vida dos suínos (SEARCY-BERNAL; GARDNER; HIRD, 1994). O diagnóstico é realizado pela ocorrência da protusão intestinal, através do orifício umbilical, geralmente em decorrência do enfraquecimento dos músculos ao redor do anel umbilical, impedindo o total fechamento do mesmo e a projeção dos intestinos para fora do abdômen (GRINDFLEK *et al.*, 2018). A etiologia deste defeito congênito é multifatorial, envolvendo dentre eles fatores genéticos, existentes em diferentes raças suínas (LIAO *et al.*, 2015). Adicionalmente, este fator também pode ser observado quando avaliado os efeitos da utilização de animais com hérnia umbilical como reprodutores e suas implicações nas características reprodutivas, verificando-se diferença para filhos de reprodutores portadores de hérnia umbilical com relação a população controle

com relação ao período de gestação, número de leitões nascidos vivos e peso ao nascimento e aos 21 dias de idade, sugerindo a existência da herança genética (HAN *et al.*, 2017). Embora a HU em suínos apresente fator hereditário, ainda não foram amplamente identificados os genes envolvidos no processo de formação desta desordem.

Nos últimos anos, estudos foram realizados a fim de entender a contribuição da genética no desenvolvimento de hérnias em suínos, visando a identificação de regiões do genoma que possuam susceptibilidade a esta anomalia (FERNANDES *et al.*, 2018; GRINDFLEK *et al.*, 2018). Após o advento da biologia molecular, um maior número de pesquisas relacionadas ao entendimento da relação genética com o desenvolvimento de diferentes anomalias vem sendo realizado, possibilitando, inclusive, a identificação de genes que implicam no desencadeamento de hérnia umbilical em suínos (POMMEREHN *et al.*, 2014; SOUZA *et al.*, 2020).

Ding *et al.* (2009), utilizando análise de ligação com marcadores microssatélites, obtiveram associação significativa para HU em 12 cromossomos da espécie suína (SSC). Posteriormente, estudos de associação global do genoma (GWAS) utilizando painéis densos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) (SU *et al.*, 2014; LIAO *et al.*, 2015; GRINDFLEK *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2019) e variação no número de cópias (CNV) (LONG *et al.*, 2016), encontraram regiões no genoma suíno com susceptibilidade para o desenvolvimento de hérnia umbilical. Ainda, novos genes relacionados à susceptibilidade à HU foram mencionados, como no trabalho de Fernandes *et al.* (2018), em que os genes candidatos: *TBX15* (*T-box 15*), *WARS2* (*tryptophanyl-tRNA syntetase 2*), *LIP1* (*lipase I*) e *RBM11* (*RNA Binding Motif Protein 11*), foram apontados como cruciais para o desenvolvimento de condições biológicas e fisiológicas que aumentem a propensão ao acometimento da referida anomalia.

Os estudos de associação global do genoma são fundamentais para o apontamento de regiões genômicas associadas ao desenvolvimento de diferentes características de interesse econômico, mostrando-se como uma boa ferramenta para a identificação de genes candidatos (VISSCHER *et al.*, 2017). No entanto, existem diferentes abordagens metodológicas vinculadas às análises de GWAS, dentre as quais, uma que consiste na análise de um único marcador por vez, que considera o efeito individual dos SNPs (BADER, 2004), e outra que realiza a análise de associação com múltiplos marcadores, ou seja, com base na construção de haplótipos (LI; ZHOU; ELSTON, 2006). Quando utilizada a metodologia de únicos marcadores, uma das vantagens é conseguir analisar um grande número de marcadores, porém podem apresentar viés, quando abordadas características que são controladas por vários *loci* principais, seguidos de

vários outros de pequeno efeito que podem não ser detectados. Outro problema seria a correção para o valor limite do teste de significância, pois a correção típica de Bonferroni costuma ser mais conservadora e muitos SNPs importantes podem não atingir o critério do teste de significância (WANG *et al.*, 2016b). Desta forma, a metodologia utilizando múltiplos marcadores é uma opção para melhorar a qualidade das análises de associação, podendo-se encontrar um maior número de regiões associadas a características complexas (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009).

Neste contexto, a abordagem proposta neste trabalho foi realizar a análise de associação genômica para hérnia umbilical em suínos comerciais, utilizando marcadores únicos e múltiplos, comparando posicionalmente e funcionalmente regiões no genoma prospectadas em cada metodologia utilizada.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Animais Utilizados e Coleta de Amostras

Foram utilizados neste estudo 325 animais híbridos da genética Agroceres Pic[®], 165 machos e 160 fêmeas, com idade entre 8 a 21 semanas, provenientes de três granjas produtoras de suínos de elevado rigor sanitário, localizadas no estado de Santa Catarina, Brasil. Para a correta identificação do fenótipo foi realizado o diagnóstico clínico através da palpação para confirmação da presença de hérnia umbilical, evitando-se desta maneira, equívocos com abscessos. Do total, foram utilizados 92 animais afetados (casos – 36 machos e 69 fêmeas) e 233 animais normais (controle – 129 machos e 91 fêmeas), coletando-se de cada indivíduo amostras entre 25 a 100 mg do tecido da orelha, as quais foram devidamente identificadas, armazenas em sacos plásticos e mantidas à -20°C em freezer até o momento da extração do DNA.

2.2.2 Isolamento de DNA e Genotipagem de Amostras

O preparo e a extração de DNA das amostras foram realizados na Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, utilizando-se o PureLink[®] Genomic DNA Mini Kit (Life Technologies) para extração de DNA do tecido, de acordo com as instruções do fabricante. O tecido foi submetido ao tampão para a lise das células por um período de 4 horas. Após essa etapa, o DNA

foi aderido à coluna de sílica e centrifugado a 10000 xg durante 1 minuto. O mesmo procedimento foi repetido, adicionando-se a solução 2 de lavagem. Para finalizar, foi adicionado 100 uL de tampão TE (Tris-EDTA) à coluna para a eluição do DNA.

A qualidade, integridade e concentração do DNA foram avaliadas por espectrofotometria (ND-2000 NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA). Desta maneira, apenas amostras que apresentaram razão 260/280 entre 1,8 e 2,0 foram utilizadas para análises. Amostras de 500 ng de DNA foram encaminhadas para genotipagem pela empresa Neogen (Araçatuba, SP, Brasil) com o GGP *Porcine Bead Chip* (Neogen, Lincon, NE, EUA), que contém 51.558 marcadores SNPs distribuídos no genoma suíno, deste total, 50.703 SNPs se encontraram disponíveis para a análise de associação. Antecedendo o controle de qualidade, foi utilizado o software *CrossMap* (ZHAO *et al.*, 2017) para converter o mapa da versão do genoma suíno 10.2 para o da versão 11.1.

2.2.3 Controle de Qualidade dos Dados

2.2.3.1 Controle de qualidade das amostras

Foram removidas as informações que apresentaram eficiência da genotipagem amostral (*Call rate*) $\leq 90\%$, heterozigosidade média de ± 3 desvios padrão e IBD (*Identity by descente*) $\geq 98\%$. As amostras também foram removidas pela análise visual da estratificação populacional, dada pelo gráfico de Escalonamento Multidimensional (*Multidimensional Scaling* – MDS). Para a geração das coordenadas do gráfico, foram utilizados somente os SNPs que não se encontravam em desequilíbrio de ligação (LD - *linkage disequilibrium*) ($r^2 < 0,2$). Para tal, foi adotado o comando `--cluster -mds_plot` com 4 dimensões através do software PLINK versão 1.9 (PURCELL *et al.*, 2007). O gráfico MDS foi gerado por meio do software R (R core Team, 2018). O gráfico MDS permitiu a observação de amostras que se apresentaram isoladas e estas foram removidas das demais (Anexo A).

Após a remoção das amostras que não passaram pelos critérios de heterozigosidade, IBD e estratificação populacional visual através do MDS, o controle de qualidade foi reiniciado, repetindo este procedimento até a obtenção de um conjunto de dados que satisfizesse esses critérios e não houvesse mais a necessidade de remover amostras. Para a estratificação da população, as amostras que não passaram pelo controle de qualidade também foram removidas reiniciando-se o controle de qualidade.

2.2.3.2 Controle de qualidade dos SNPs

Para o controle de qualidade dos SNPs foi aplicado o critério de eficiência de genotipagem (*Call rate*), sendo removidos os SNPs que apresentaram eficiência de genotipagem $\leq 98\%$ e a análise de frequência do alelo menos comum (*Minor allele frequency* - MAF), sendo excluídos SNPs com $MAF < 5\%$. Também foram removidos SNPs que possuíam posições idênticas no genoma, permanecendo os que apresentaram maior valor de MAF. Ainda, para a análise de associação utilizando múltiplos marcadores pelo software Blossoc (MAILUND; BESENBACHER; SCHIERUP, 2006), foram removidos SNPs localizados nos cromossomos sexuais e também os sem posição definida no genoma.

Após o controle de qualidade das amostras (indivíduos) e dos SNPs (marcadores), foi utilizado o software FImpute versão 2.2 (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014), com a finalidade de realizar o faseamento dos haplótipos necessário para prosseguir com as análises utilizando a metodologia de múltiplos marcadores.

2.2.4 Análise de Associação Genômica

2.2.4.1 Análise de associação genômica utilizando a abordagem de único marcador

A análise de associação caso-controle utilizando únicos marcadores foi realizada através do Software PLINK 1.9 (PURCELL *et al.*, 2007), a qual não considerou o cromossomo sexual Y. Para a análise de associação foi utilizado o teste qui-quadrado (X^2), adotando-se o modelo alélico, dado pela seguinte equação:

$$X^2 = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^c \frac{(O_{ij} - E_{ij})^2}{E_{ij}}$$

Onde,

O_{ij} = frequência observada do alelo do marcador na i ^{ésima} linha e na j ^{ésima} coluna;

E_{ij} = frequência esperada do alelo do marcador na i ^{ésima} linha e na j ^{ésima} coluna;

r = número de linhas na tabela de contingência;

c = número de colunas na tabela de contingência.

Para análise da significância foram considerados diferentes limiares, estimados por α/N , em que $\alpha=0,05$ e N é o número de SNPs independentes, ou seja, que não se encontraram em desequilíbrio de ligação, foram dados: limiar alto e sugestivo, $6,384 \times 10^{-6}$, ($\alpha/N=0.05/7.832$) e $1,277 \times 10^{-4}$ ($\alpha/N=1/7.832$), respectivamente, gerados pela correção de Bonferroni, e o limiar de significância moderado de 5×10^{-5} , seguindo as recomendações do *Wellcome Trust Case Control Consortium* (WTCCC, 2007). O gráfico de Q-Q *plot* foi gerado com o software R (R core Team, 2018) e o gráfico de Manhattan foi construído com sua função interna, *wgplot*, escrita por *Matt Settles* (COLEMAN *et al.*, 2016).

2.2.4.2 Análise de associação genômica utilizando a abordagem de múltiplos marcadores

A segunda abordagem utilizada neste estudo foi baseada na formação de haplótipos, realizada através do Software Blossoc (MAILUND; BESENBACHER; SCHIERUP, 2006). A metodologia se baseia na construção de uma árvore filogenética perfeita ao redor de cada marcador, utilizando tantos marcadores quanto possível para ajustar uma única árvore filogenética. Para isso, um modelo de sítios infinitos é assumido (cada sítio segregante tem uma única mutação), o que equivale a definir uma região ao redor de cada marcador focal, assim todos os marcadores da região devem ser compatíveis com o marcador focal de acordo com o teste dos quatro gametas. Após essa etapa, diferentes medidas de agrupamento dos cromossomos caso são aplicadas na filogenia assim definida. Desta forma, a filogenia perfeita é tratada como uma árvore de decisões e mensura quão bem ela explica a classificação do fenótipo caso-controle. Se a árvore explicar bem a classificação, então há uma associação entre a topologia da árvore e a doença, caso contrário, a associação é inexistente.

Devido ao número de amostras disponíveis para a análise, a medida de agrupamento do cromossomo caso adotada foi a função de pontuação denominada *Prob score*. Esse método consiste em pontuar as árvores observando apenas as subárvores que possuem a super representação mais significativa dos indivíduos afetados. Essa probabilidade é pequena se há uma significativa super representação de indivíduos afetados em um agrupamento. A probabilidade de uma subárvore composta por n indivíduos ter no mínimo m indivíduos afetados é dada por (MAILUND; BESENBACHER; SCHIERUP, 2006):

$$Ps = \sum_{i=m}^n \binom{n}{i} \cdot p(a)^i \cdot p(u)^{n-i}$$

Onde:

$p(a)$ – Fração de indivíduos afetados

$p(u)$ – Fração de indivíduos controle

Em todo o conjunto de dados, a pontuação de uma árvore T é realizada a partir de uma subárvore de menor p-valor: (MAILUND; BESENBACHER; SCHIERUP, 2006):

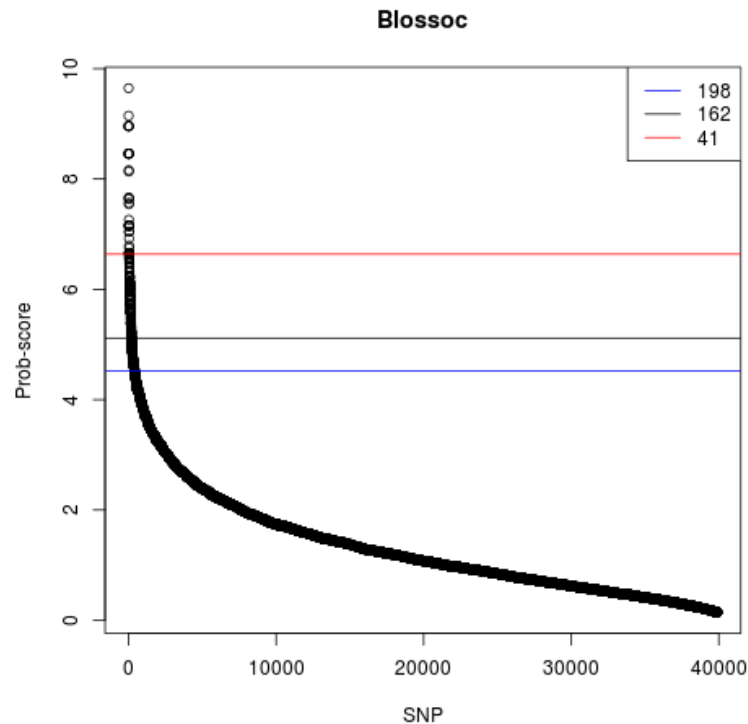
$$Score(T) = \min_{s \in subtree(T)} (-\ln Ps + depth(s))$$

Onde, $depth(s)$ é a profundidade da subárvore na árvore, ou seja, é o número de marcadores necessários para determinar a subárvore. Quanto maior for a magnitude do escore, maior será sua significância.

Para a escolha dos limiares de significância foram assumidas a priori que 1%, 0,5% e 0,1% dos SNPs mais significativos estariam associados à característica, sendo a associação classificada em diferentes intensidades, sugestiva, moderada e alta, respectivamente. Desta maneira, obtiveram-se os escores de 4,52487 para associação sugestiva, 5,1164 para associação moderada e 6,63656 para associação altamente significativa (Figura 1).

Posteriormente, foram utilizadas no estudo para análise dos genes relacionados à hérnia umbilical em suínos, especificamente apenas as regiões que apresentaram SNPs com escore de significância alta e moderada. Dois algoritmos *in house* foram utilizados, um algoritmo foi criado para formar regiões de SNPs com alta e moderada significância. Para que a adição de um dado SNP em uma determinada região ocorra, este deve estar localizado no mesmo cromossomo e a uma distância máxima de 300 kb do último SNP adicionado nessa região, caso contrário, o SNP irá pertencer a uma nova região. Esta distância física foi definida observando-se estudos que analisaram o padrão do LD de 8 populações de suínos comerciais, cuja média de LD foi de 0,29 a uma distância de 200-250 kb, aproximando para 300 kb como considerado um padrão adequado de extensão de LD entre 0,2 a 0,3 (VERONEZE *et al.*, 2014). Após essa etapa, outro algoritmo foi utilizado com o objetivo de automatizar a busca de genes que se encontravam dentro dessas regiões ou próximos a elas por meio da extensão de 100 Kb (50 kb à direita e à esquerda da região).

Figura 1 – Gráfico de distribuição dos escores obtidos pela análise de associação com múltiplos marcadores (Blossoc) mostrando os escores utilizados para definir o limiar de significância para declarar um SNP como associado à hérnia umbilical.



¹Linha vermelha: limiar de significância alta com escore de 6,63656 (41 SNPs).

²Linha preta: limiar de significância moderada com escore de 5,1164 (162 SNPs).

³Linha azul: limiar de significância sugestiva com escore de 4,52487 (198 SNPs).

2.2.5 Análise Funcional e de Enriquecimento de Vias

Objetivando a anotação dos marcadores (SNPs) significativos encontrados pela análise de um único marcador, foi utilizada a ferramenta Preditor de efeito da variante (*Variant effect predictor* -VEP) no *Ensembl 98* (https://www.ensembl.org/Sus_scrofa). No VEP foram determinados os efeitos destes SNPs, obtendo as variantes estruturais em genes e a localização das variantes (MCLAREN *et al.*, 2016) do *Ensembl 98* (<https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>). Posteriormente, a partir destas informações foram estendidas 150 kb *downstream* e *upstream* (Região com 300 kb de extensão) de cada variante significativa, para verificar a presença de genes próximos (HERMANIZYCKA; WLASNOWOLSKI; WILCZYNSKI, 2017). Genes distribuídos nestas regiões de 300 kb também foram anotados através da ferramenta BioMart (KINSELLA *et al.*, 2011) do *Ensembl 98* (https://www.ensembl.org/Sus_scrofa). Para a análise de associação utilizando a metodologia de marcadores múltiplos, foi gerada uma extensão de 50 kb *downstream* e *upstream* das regiões (Região de 100 kb de extensão) utilizando como referência as regiões geradas pelo

script em *perl* desenvolvido na Embrapa Suínos e Aves. Essas regiões foram utilizadas para anotação gênica utilizando o BioMart (KINSELLA *et al.*, 2011) do Ensembl 98 (https://www.ensembl.org/Sus_scrofa).

A análise de agrupamento funcional dos genes encontrados nestas regiões foi realizada inicialmente através do enriquecimento funcional e da análise das ontologias gênicas (*Gene Ontology* – GO), através do base de dados DAVID (*Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery*), versão 6.8 (<https://david.ncifcrf.gov/>), disponibilizando os respectivos processos biológicos (*Biological processes* - BP). O resultado das anotações funcionais advindos do DAVID, como os processos biológicos, as ontologias gênicas (GO) e os *p-values*, foram submetidos a análise de agrupamento no REViGO (*Reduce + Visualize Gene Ontology*) (<http://revigo.irb.hr>), organizando os processos biológicos ligados aos genes em forma de *treemaps* (SUPEK *et al.*, 2011). Os parâmetros utilizados para a formação dos *treemaps* foram: similaridade permitida = 0,7 (Média); p-valores; banco de dados da espécie suína e medida de similaridade semântica SimRel.

2.2.6 Análise de Redes de Interação Proteína-Proteína (PPI)

A análise de rede gênicas foi realizada utilizando-se a ferramenta STRING (db.org/cgi/about.pl?footer_active_subpage=references), que busca informações de banco de dados e indica genes e suas interações (ZHOU *et al.*, 2019). Para aumentar a possibilidade de encontrar mais interações entre os genes, foi permitida a associação de até 5 genes distintos dos genes encontrados nos resultados das análises de associação, limitados a espécie “*Sus scrofa*”, considerando as regiões estendidas para a análise de associação. Além disso, também foi realizado o enriquecimento funcional dos genes com o programa *NetworkAnalyst* 3.0 (ZHOU *et al.*, 2019). A plataforma InnateDB (<http://www.innatedb.com>) foi utilizada para gerar a interação entre genes (BREUER *et al.*, 2013). Para verificar os genes diferentes e semelhantes entre os dados advindos da análise utilizando um único marcador e múltiplos marcadores, foi utilizada a ferramenta *InteractiVenn* (HEBERLE *et al.*, 2015).

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Controle de Qualidade para a Análise de Único Marcador

Na análise de *call rate* e de heterozigosidade nenhuma amostra foi removida. Duas amostras foram removidas por apresentarem $IBD \geq 98\%$ e 37 amostras foram removidas pelo critério de estratificação populacional (Tabela 1). Após o término da análise do controle de qualidade das amostras, foram descartadas no total 39 amostras, permanecendo 286 animais, sendo 146 machos (34 casos e 112 controles) e 140 fêmeas (49 casos e 91 controles), com um total de 83 casos e 203 controles.

Tabela 1 – Amostras removidas pelos critérios de controle de qualidade de machos e fêmeas dentro dos grupos caso e controles.

	Nº total de amostras	Nº de amostras machos casos	Nº de amostras fêmeas casos	Nº de amostras machos controles	Nº de amostras fêmeas controles
Total de amostras iniciais	325	36	56	129	104
<i>Call rate</i>	0	0	0	0	0
Heterozigosidade	0	0	0	0	0
IBD	2	0	0	2	0
Estratificação	37	2	7	15	13
Amostras removidas totais	39	2	7	17	13
Total de amostras após CQ	286	34	49	112	91

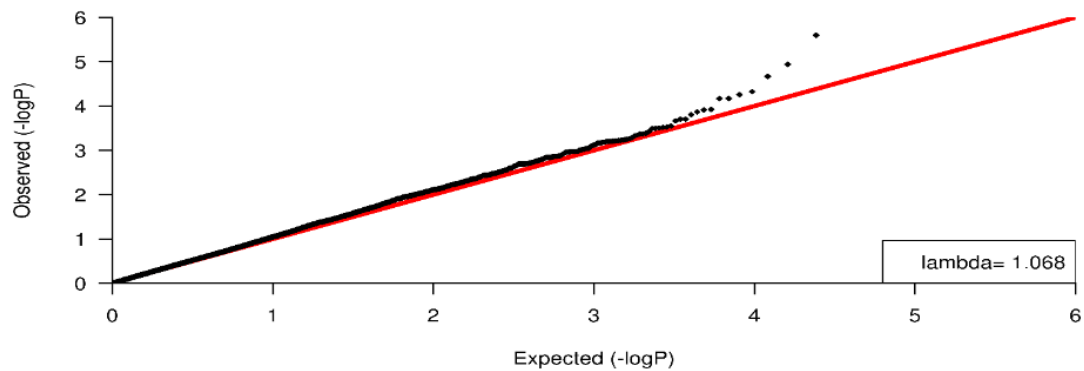
CQ: Controle de qualidade.

No controle de qualidade dos SNPs, conforme os critérios aplicados, 1.288 e 1.030 SNPs foram removidos por não passarem nos critérios de *call rate* e *MAF*, respectivamente. Desta maneira, após a conclusão do controle de qualidade dos SNPs, foram descartados no total 2.318 SNPs, permanecendo 48.385 SNPs dos 50.703 iniciais.

2.3.2 Análise de Associação Genômica Utilizando a Metodologia de Único Marcador

Para verificar o ajuste do modelo adotado nas análises, foi realizada a plotagem de um gráfico de probabilidade *Quantil (Q-Q plot)* (Figura 2) onde se pode verificar a não ocorrência da formação de subestrutura da população entre as amostras.

Figura 2 - Gráfico de probabilidade Quantil-Quantil (*Q-Q plot*).

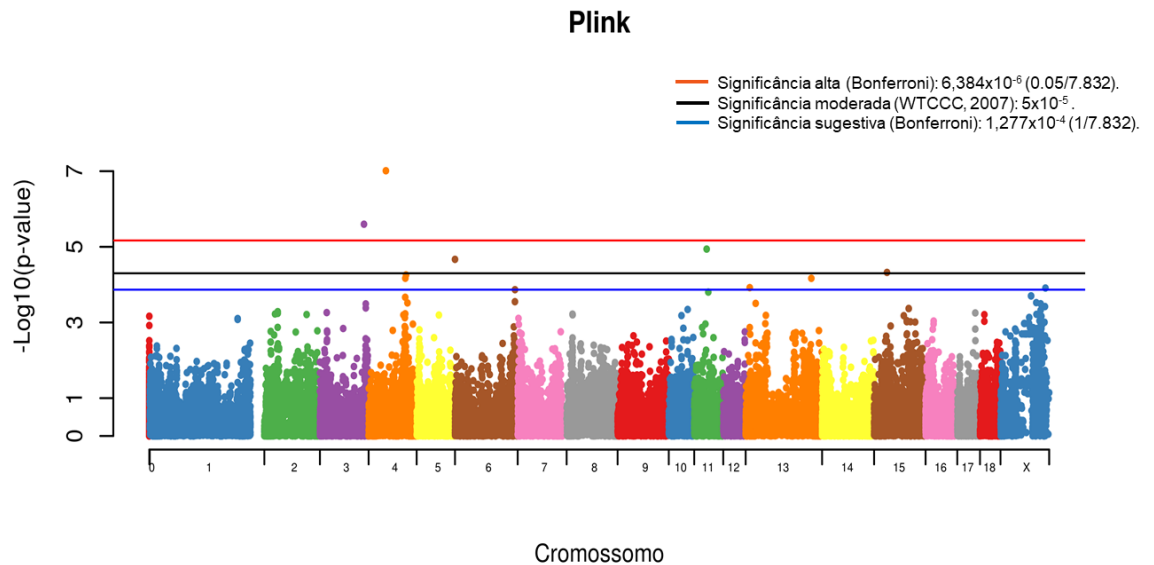


¹Valores de $-\log(p\text{-valor})$ esperado em relação ao observado para a característica de hérnia umbilical em suínos.

Os valores observados estão distribuídos uniformemente sobre quase toda a diagonal (hipótese de nulidade) com o valor de *Lambda* (λ) igual a 1,0682 muito próximo ao valor de referência 1,0. Além disso, ao final da curva, nota-se um desvio dos valores observados em relação aos esperados, indicando a existência de associação entre marcadores e a HU. Na sequência, os resultados da análise de associação genômica com a hérnia umbilical em suínos híbridos são apresentados na Figura 3.

Mediante análise de GWAS, foi verificada a ocorrência de dois SNPs altamente significativos pelo método de Bonferroni ($6,384 \times 10^{-6}$), considerando o nível de significância moderada (5×10^{-5}), foram identificados três SNPs significativos e com significância sugestiva ($1,277 \times 10^{-4}$), mais cinco SNPs foram identificados (Tabela 2).

Figura 3 - Gráfico de Manhattan com resultados da análise de associação genômica com único marcador, em ordem sequencial por cromossomo, para hérnia umbilical em suínos híbridos.



Quando avaliados os 10 SNPs oriundos da análise com um único marcador, 7 destes foram encontrados próximos a genes, perfazendo um total de 8 genes candidatos relacionados a hérnia umbilical nessas regiões (Tabela 2). O gene *KCNS3* (*Potassium voltage-gated channel modifier*) e um ainda não caracterizado (ENSSSCG00000047121) foram encontrados no SSC3, ambos próximos do SNP rs338601989, já no SSC4 foi encontrado o gene *RIPK2* (*Receptor interacting serine/threonine kinase 2*) próximo ao SNP rs80895706, estes SNPs citados apresentaram-se altamente associados ($P < 6,384 \times 10^{-6}$) à hérnia umbilical. Ainda no SSC4 foi observado dois genes próximos a SNPs de sugestiva significância, sendo eles o *BCL9* (*BCL9 transcription coactivator*) e *WARS2* (*Triptofanil RNAt sintetase 2 mitocondrial*). Dois genes em região sugestiva foram encontrados no SSC13, sendo eles o gene *THRB* (*Thyroid hormone receptor beta*) e *ROBO2* (*Roundabout guidance receptor 2*). No cromossomo sexual foi encontrado o gene *CD99L2* (*CD99 molecule like 2*) também em região sugestiva. Quando considerada a região de 150 *upstream* e 150 *downstream* em relação aos SNPs significativos, foram encontrados 37 genes, dos quais apenas 23 estavam anotados no genoma suíno (Tabela 3).

Tabela 2 - SNPs significativos para hérnia umbilical em suínos híbridos, identificados na análise de marcadores únicos.

Chr	Posição em pb	ID SNP	Alelo variante	p-valor	Sig	Gene	Loc
3	119.994.088	rs338601989	A/C	$2,52 \times 10^{-6}$	Alta	<i>KCNS3</i> ENSSSCG00000047121	<i>Upstream</i> <i>Dowstream</i>
4	47.044.201	rs80895706	A/C	$9,73 \times 10^{-8}$	Alta	<i>RIPK2</i>	Íntron
4	99.981.776	rs344348324	A/G	$6,78 \times 10^{-5}$	Baixa	<i>BCL9</i>	Íntron
4	101.887.188	rs334706328	A/G	$5,53 \times 10^{-5}$	Baixa	<i>WARS2</i>	<i>Dowstream</i>
6	10.727	rs81337222	G/T	$2,14 \times 10^{-5}$	Moderada	-	Intergênica
11	33.903.831	rs80813241	A/G	$1,15 \times 10^{-5}$	Moderada	-	Intergênica
13	11.126.421	rs340738255	G/A	$1,20 \times 10^{-4}$	Baixa	<i>THRB</i>	Íntron
13	178.935.022	rs337360700	T/C	$6,81 \times 10^{-5}$	Baixa	<i>ROBO2</i>	Íntron
15	35.108.861	rs80880633	A/G	$4,74 \times 10^{-5}$	Moderada	-	Intergênica
X	122.518.025	rs81258181	C/T	$1,23 \times 10^{-4}$	Baixa	<i>CD99L2</i>	Íntron

Valor de p para a associação sugestiva = $1,277 \times 10^{-4}$ (1/7.832), associação moderada = 5×10^{-5} e associação alta $6,384 \times 10^{-6}$ (0.05/7.832).

Quando avaliados os 10 SNPs oriundos da análise com um único marcador, 7 destes foram encontrados próximos a genes, perfazendo um total de 8 genes candidatos relacionados a hérnia umbilical nessas regiões (Tabela 2). O gene *KCNS3* (*Potassium voltage-gated channel modifier*) e um ainda não caracterizado (ENSSSCG00000047121) foram encontrados no SSC3, ambos próximos do SNP rs338601989, já no SSC4 foi encontrado o gene *RIPK2* (*Receptor interacting serine/threonine kinase 2*) próximo ao SNP rs80895706, estes SNPs citados apresentaram-se altamente associados ($P < 6,384 \times 10^{-6}$) à hérnia umbilical. Ainda no SSC4 foi observado dois genes próximos a SNPs de sugestiva significância, sendo eles o *BCL9* (*BCL9 transcription coactivator*) e *WARS2* (*Triptofanil RNAt sintetase 2 mitocondrial*). Dois genes em região sugestiva foram encontrados no SSC13, sendo eles o gene *THRB* (*Thyroid hormone receptor beta*) e *ROBO2* (*Roundabout guidance receptor 2*). No cromossomo sexual foi encontrado o gene *CD99L2* (*CD99 molecule like 2*) também em região sugestiva. Quando considerada a região de 150 *upstream* e 150 *dowstream* em relação aos SNPs significativos, foram encontrados 37 genes, dos quais apenas 23 estavam anotados no genoma suíno (Tabela 3).

Tabela 3- Genes observados nas regiões associadas à hérnia umbilical em suínos pela metodologia de marcadores únicos.

ID SNP	Chr	Pos da região em pb	Anotação Ensembl	Gene
rs338601989	3	119.844.088 – 120.144.088	ENSSSCG00000031905	<i>KCNS3*</i>
			ENSSSCG00000047121	ENSSSCG00000047121*
			ENSSSCG00000040752	ENSSSCG00000040752
			ENSSSCG00000026538	<i>MSGN1</i>
			ENSSSCG00000047252	ENSSSCG00000047252
			ENSSSCG00000008613	<i>GEN1</i>
			ENSSSCG00000008614	<i>SMC6</i>
rs80895706	4	46.894.201 – 47.194.201	ENSSSCG00000006127	<i>NBN</i>
			ENSSSCG00000021184	<i>OSGIN2</i>
			ENSSSCG00000024096	<i>RIPK2*</i>
			ENSSSCG00000050986	ENSSSCG00000050986
rs344348324	4	99.831.776 – 100.131.776	ENSSSCG00000006696	<i>GJA5</i>
			ENSSSCG00000006697	<i>ACP6</i>
			ENSSSCG00000006698	<i>BCL9*</i>
rs334706328	4	101.737.187 – 102.037.187	ENSSSCG00000006720	<i>HAO2</i>
			ENSSSCG00000027153	<i>WARS2*</i>
			ENSSSCG00000006725	ENSSSCG00000006725
rs81337222	6	0 – 160.726	ENSSSCG00000047181	ENSSSCG00000047181
			ENSSSCG00000026662	<i>PRDM7</i>
			ENSSSCG00000002633	<i>GAS8</i>
			ENSSSCG00000029761	ENSSSCG00000029761
			ENSSSCG00000042740	ENSSSCG00000042740
			ENSSSCG00000002637	<i>DBNDD1</i>
			ENSSSCG00000002640	<i>DEF8</i>
rs80813241	11	33.175.052 – 33.475.052	ENSSSCG00000041240	ENSSSCG00000041240
			ENSSSCG00000041286	ENSSSCG00000041286
rs340738255	13	10.976.421 – 11.276.421	ENSSSCG00000036033	<i>THRБ*</i>
rs3373607000	13	178.785.021 – 179.085.021	ENSSSCG00000012002	<i>ROBO2*</i>
rs80880633	15	34.958.861 – 35.258.861	ENSSSCG00000015748	<i>CSMD1</i>
			ENSSSCG00000046992	ENSSSCG00000046992
			ENSSSCG00000043206	ENSSSCG00000043206
			ENSSSCG00000041555	ENSSSCG00000041555
			ENSSSCG00000041369	ENSSSCG00000041369
rs81258181	X	122.368.025 – 122.668.025	ENSSSCG00000012742	<i>MTM1</i>
			ENSSSCG00000012743	<i>MTMR1</i>
			ENSSSCG00000012744	<i>CD99L2*</i>
			ENSSSCG00000035908	<i>HMGB3</i>

¹Genes marcados com * são os identificados bem próximo aos SNPs associados.

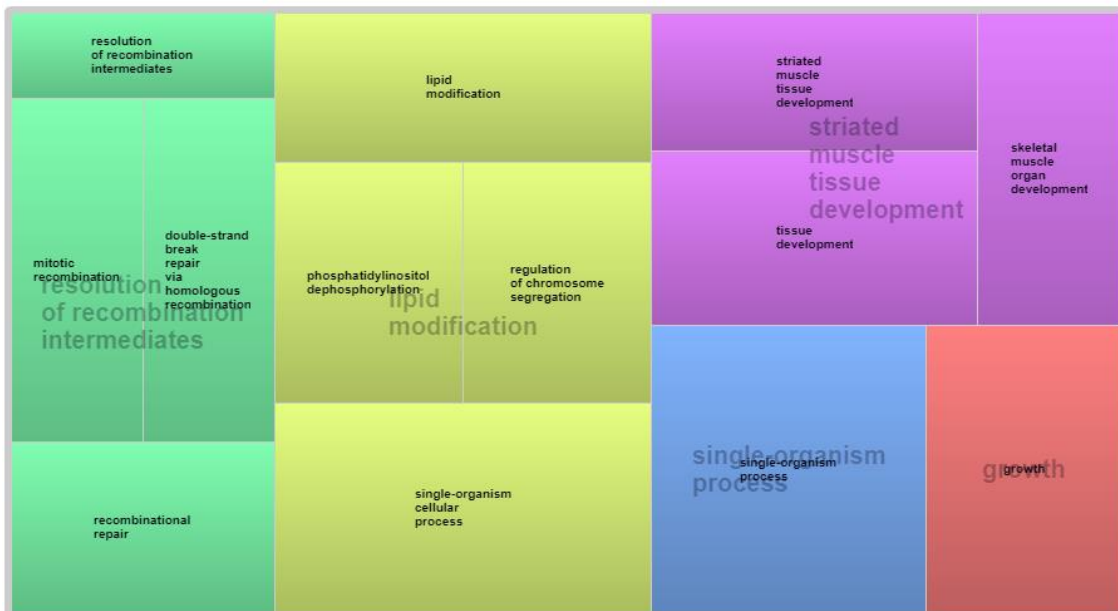
2.3.3 Análise de Enriquecimento Funcional para os Genes Identificados pela Metodologia de Único Marcador

Nas análises de ontologias gênicas utilizando o DAVID com os 23 genes associados com a anomalia, foram encontrados 18 processos biológicos (BP), sendo os principais estão relacionados a modificação lipídica, desenvolvimento de tecido muscular estriado, desenvolvimento de tecido muscular, desfosforilação do fosfatidilinositol, desfosforilação fosfolipídica, processo metabólico do fosfatidilinositol, desenvolvimento de tecidos, desenvolvimento de tecido muscular esquelético, desenvolvimento de órgãos musculares esqueléticos, processo metabólico lipídico celular e crescimento (Tabela 4). Os genes identificados na análise de associação podem estar relacionados com processos ligados ao desenvolvimento da musculatura esquelética e até mesmo a fatores relacionados com a cicatrização, como proteínas pertencentes a matriz extracelular e ao sistema inflamatório, que podem estar relacionados à ocorrência de hérnia umbilical em suínos. Para visualização das principais funções, os BP foram agrupados com o REViGO em cinco macroprocessos, sendo eles: *resolution of recombination intermediates*, *lipid modification*, *striated muscle tissue development*, *single organism process* e *growth* (Figura 4).

Tabela 4 - Enriquecimento funcional para processos biológicos dos genes encontrados pelo método de único marcador.

Grupo	Gene
Modificação lipídica	<i>HAO2, MTM1, MTMR1</i>
Resolução de intermediários de recombinação Recombinação mitótica	<i>GEN1, SMC6</i>
Desenvolvimento do tecido muscular estriado Desenvolvimento do tecido muscular	<i>BCL9, GJA5, MTM1</i>
Desfosforilação do fosfatidilinositol Desfosforilação fosfolipídica	<i>MTM1, MTMR1</i>
Processos organismos simples	<i>HAO2, OSGIN2, GJA5, MSGN1, WARS2, ACP6, GAS8, BCL9, DEF8, GEN1, SMC6, MTM1, MTMR1</i>
Regulação da segregação cromossômica Reparo de quebra de fita dupla por meio de recombinação homóloga Reparo recombinacional	<i>GEN1, SMC6</i>
Processo celular de organismo simples	<i>WARS2, ACP6, OSGIN2, BCL9, GAS8, HAO2, DEF8, GJA5, GEN1, SMC6, MTM1, MTMR1</i>
Processo metabólico do fosfatidilinositol Desenvolvimento de tecidos Desenvolvimento de tecido muscular esquelético Desenvolvimento de órgãos musculares esqueléticos	<i>BCL9, MTM1</i>
Processo metabólico lipídico celular	<i>HAO2, MTM1, MTMR1</i>
Crescimento	<i>MTM1, BCL9, MTMR1</i>

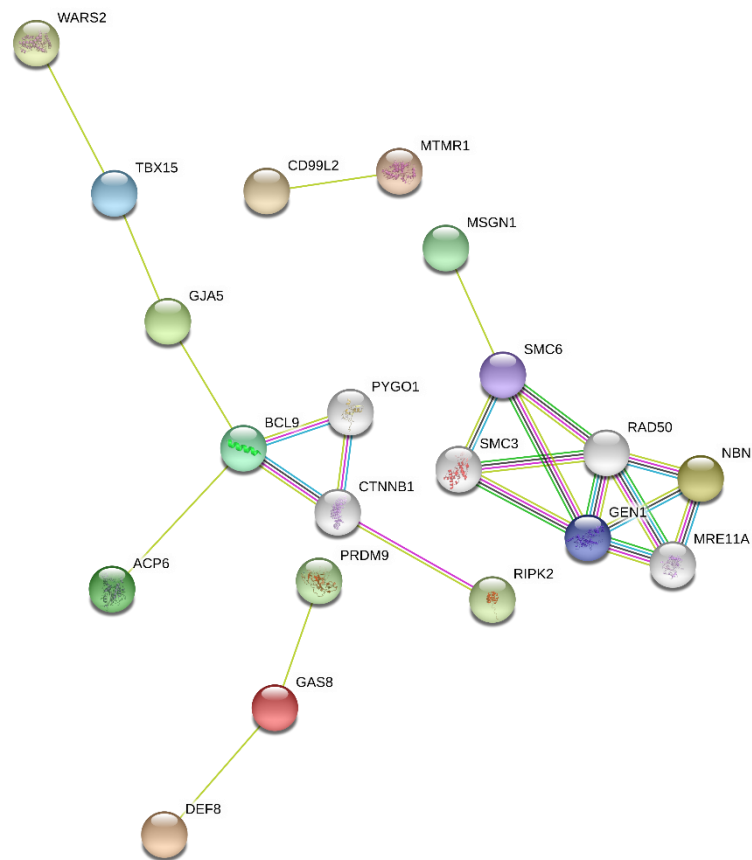
Figura 4 – *TreeMap* com os processos biológicos associados a genes relacionados a hérnia umbilical, através da metodologia de único marcador.



Na rede de genes gerada pelo STRING, alimentada por informações de dados de enriquecimento funcional, observou-se a ocorrência de quatro grupos de genes (*Clusters*), agrupando 15 genes encontrados no estudo que abrangem os BP ligados a angiogênese, fosforilação de proteínas na modificação pós-traducional, proliferação celular, combate inflamatório, estabilidade e maturação do tecido muscular. Dentro desses *clusters*, salienta-se a presença de dois grupos que apresentaram maior interação demonstrada pelo maior número de linhas que conecta os genes indicando maior força de interação gênica. Entre estes se encontram os genes *BCL9*, *SMC6* e *GEN1* (Figura 5). Os *clusters* agruparam os genes *WARS2*, *TBX15*, *GJA5*, *BCL9*, *ACP6* e *RIPK2* em um grupo de genes associados ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos. *PRDM9*, *GAS8* e *DEF8* formaram o segundo *cluster*, *CD99L2* e *MTMR1* o terceiro *cluster*, e o quarto *cluster* foi formado pelos genes *MSGN1*, *SMC6*, *GEN1* e *NBN*. Além destes genes agrupados que eram da própria análise, mais 5 genes (de cor cinza) foram acrescentados advindos de banco de dados do STRING e foram vinculados aos grupos de genes já existentes.

A análise de enriquecimento através do NetworkAnalyst mostrou uma rede montada com base no conjunto de interações, dividindo a rede em unidades densamente conectadas, permitindo a identificação de genes que se mostraram com maior atividade devido a maior interação. Estes genes encontram-se destacados nos locais de adensamento de genes (Figura 6).

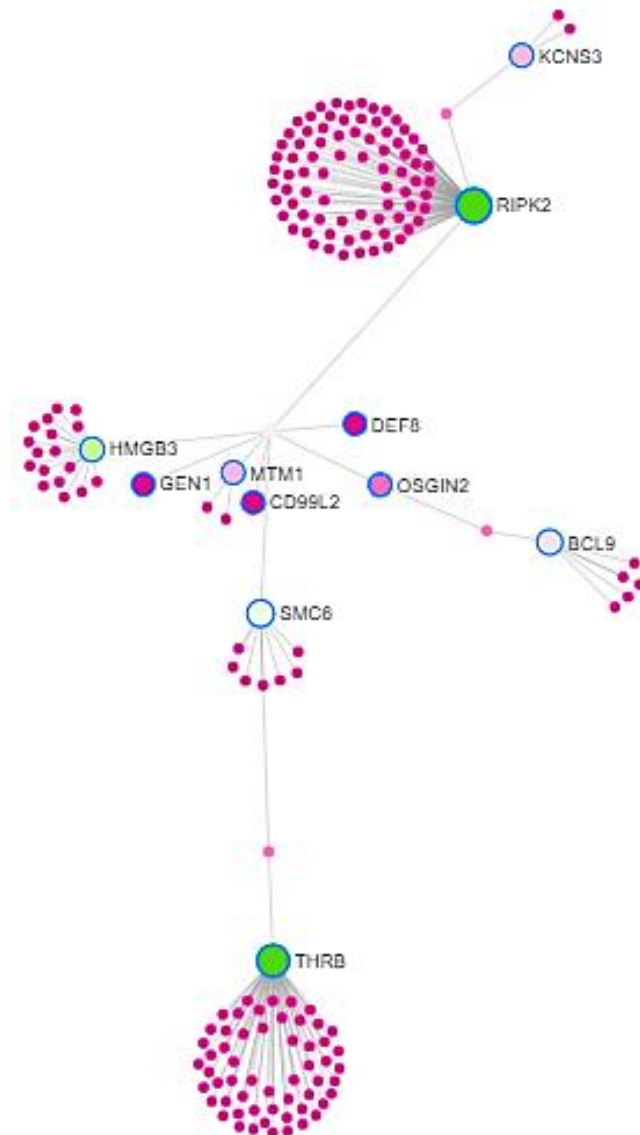
Figura 5 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir da análise de associação com único marcador relacionados à hérnia umbilical em suínos.



¹Círculos: representam as proteínas. Os coloridos indicam os genes fornecidos na análise e os cinzas, os genes que interagiram com os genes propostos, mas não foram encontrados no estudo.
²Linhas: indicam a interação entre os genes e a cor da linha o tipo de evidência usado nas predições de associação. A cor azul claro indica a evidência de base de dados curada, a rosa evidência experimental, a verde de genes na vizinhança, a vermelha de fusão gênica, azul escuro co-ocorrência gênica, verde claro de mineração textual, preto co-expressão gênica e cinza homologia proteica.

Os genes centralizados nas redes demonstram importantes ligações para o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, quando representadas suas funções biológicas. Destacam-se, ao total, 11 genes como centrais dessas unidades de densidade, sendo que estes genes apresentam uma ordem de relevância através das suas conectividades. Os genes *RIPK2*, *THR3* e *HMGB3* apresentaram-se como genes núcleos e de grande importância devido a sua maior conectividade. Os demais genes que também apresentaram notoriedade devido a sua conectividade foram *SMC6*, *BCL9*, *MTM1*, *KCNS3*, *OSGIN2*, *DEF8*, *GEN1* e *CD99L2*, mostrando grande importância funcional para o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos.

Figura 6 – Rede de interação gênica construída com o software NetworkAnalyst 3.0 com os genes associados com a ocorrência de hérnia umbilical em suínos pelo método de único marcador.



¹O grau de relação dos genes inicia com a cor verde escuro, representando os genes centrais com uma maior relação a outros genes. Os tons de verde ficam mais claros conforme vai diminuindo o número de ligações desses genes, e começa tons claros da cor rosa até o rosa mais escuro, que indica nenhuma relação a outros genes.

2.3.4 Controle de Qualidade para a Análise de Múltiplos Marcadores

No controle de qualidade da análise de múltiplos marcadores, inicialmente foram removidos 1.974 SNPs distribuídos nos cromossomos sexuais e 4.915 SNPs que ainda não foram localizados no mapa 11.1 do genoma suíno. Posteriormente, foi aplicado o controle de qualidade amostral utilizando os mesmos parâmetros usados para o QC com único marcador,

obtendo os mesmos resultados descritos na Tabela 1. Na análise do controle de qualidade dos SNPs, foram removidos 977 SNPs com *call rate* $\leq 98\%$, 807 SNPs que apresentaram MAF $< 5\%$ e 12 SNPs que se encontravam com a mesma localização no genoma, excluindo-se o SNP com menor MAF. Foram também removidos 2.118 SNPs não inferidos pela imputação realizada através do software FImpute (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL, 2014).

Desta maneira, ao final da aplicação dos critérios do controle de qualidade foram removidos 10.803 SNPs do total de 50.703 SNPs que se apresentavam antes do controle de qualidade. Assim, 39.900 SNPs restantes foram utilizados nas análises de marcadores múltiplos, utilizando somente os SNPs mapeados (Tabela 5).

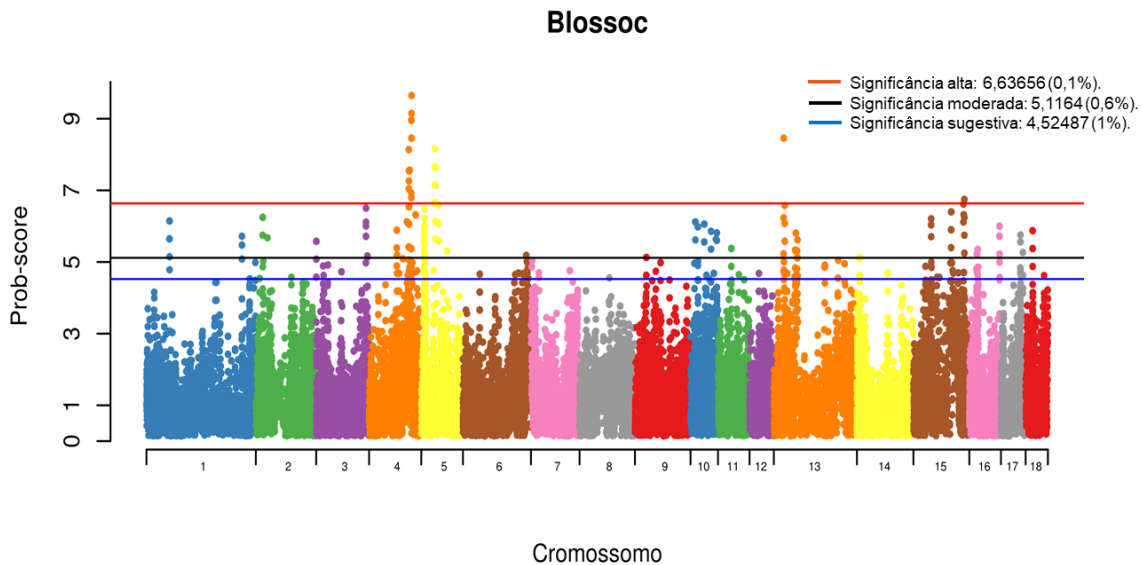
Tabela 5 - Número de SNPs removidos pelos critérios utilizados no controle de qualidade.

	N° de SNPs
Total de SNPs iniciais	50.703
Cromossomos sexuais	1.974
SNPs não mapeados	4.915
<i>Call rate</i>	977
MAF	807
SNPs com as mesmas posições	12
SNPs não inferidos pela imputação	2.118
SNPs removidas totais	10.803
Total de SNPs restantes	39.900

2.3.5 Análise de Associação Genômica Utilizando a Metodologia de Múltiplos Marcadores

Os resultados de GWAS com múltiplos marcadores podem ser observados na Figura 7. No total, 401 SNPs foram associados à hérnia umbilical. Destes, 37 foram altamente significativos, 204 associados moderadamente e 160 SNPs tiveram associação sugestiva. Considerando apenas SNPs com alta e moderada significância, 51 regiões foram formadas utilizando-se algoritmo “*in house*”, das quais 3 regiões foram altamente significativas e 44 moderadas. Outras 4 regiões apresentaram significâncias altas e moderadas concomitantemente (Anexo C). Nessas regiões, 188 transcritos foram localizados, sendo 116 transcritos com conhecimento biológico (Anexo D).

Figura 7 - Gráfico de Manhattan com resultados da análise de associação genômica com marcadores múltiplos, em ordem sequencial por cromossomo, para hérnia umbilical em suínos híbridos.



Pode-se observar que os cromossomos 4, 5, 13 e 15 foram fortemente associados a hérnia umbilical pela análise de associação com marcadores múltiplos (Figura 7). Nestas regiões com maior notabilidade, os principais genes observados no SSC4 foram *SHC1* (*SHC Adaptor Protein 1*), *RBM8A* (*RNA Binding Motif Protein 8A*), *PIAS3* (*Protein Inhibitor Of Activated STAT 3*), *GJA5* (*Gap Junction Protein Alpha 5*), *ACP6* (*Acid Phosphatase 6, Lysophosphatidic*), *BCL9* (*BCL9 Transcription Coactivator*), *WARS2* (*Tryptophanyl TRNA Synthetase 2, Mitochondrial*), *TSPAN2* (*Tetraspanin 2*) e *TRIM33* (*Tripartite Motif Containing 33*), no SSC5 os genes *RANGAP1* (*Ran GTPase Activating Protein 1*), *EP300* (*E1A Binding Protein P300*), *ATF4* (*Activating Transcription Factor 4*), *CCT2* (*Chaperonin Containing TCP1 Subunit 2*) e *TNFRSF1A* (*TNF Receptor Superfamily Member 1A*), no SSC13 o gene *EIF1B* (*Eukaryotic Translation Initiation Factor 1B*) e no SSC15 o gene *MSTN* (*Myostatin*) (Anexo D).

2.3.6 Análise de Enriquecimento Funcional para os Genes Identificados pela Metodologia de Múltiplos Marcadores

Para a realização do enriquecimento funcional dos genes através da base de dados DAVID, do total de 738 genes, sendo 643 genes distribuídos em regiões sugestivas, foram utilizados 95 genes advindos das regiões com SNPs de alta e moderada significância (Tabela 6).

Tabela 6 - Enriquecimento funcional para processos biológicos dos genes encontrados pelo método de múltiplos marcadores.

Grupo	Genes
Processo metabólico de molécula pequena	<i>DCTD, INPP1, TNFRSF1A, CYP24A1, WARS2, ENTPD3, PMVK, FLAD1, LPIN1, SLC25A17, TPH2, AMPD1</i>
Desenvolvimento de tecido muscular estriado Desenvolvimento do tecido muscular	<i>EYA2, EP300, MSTN, GJA5, BCL9</i>
Processo metabólico de composto cíclico orgânico	<i>NCBP1, CYP24A1, PDGFA, WARS2, CCT2, PMVK, SYCP1, TNFRSF1A, RBM8A, ENTPD3, PMS1, BCL9, ELP4, DCTD, L3MBTL2, MSTN, POLR3C, LPIN1, AMPD1, XPA, ATF4, EYA2, EP300, FLAD1, TPH2</i>
Processo metabólico de compostos nitrogenados celulares	<i>NCBP1, PDGFA, CCT2, WARS2, SYCP1, TNFRSF1A, RBM8A, ENTPD3, PMS1, BCL9, ELP4, DCTD, TRHDE, L3MBTL2, MSTN, EIF1B, POLR3C, LPIN1, AMPD1, XPA, ATF4, EYA2, EP300, FLAD1, TPH2, SLC25A17</i>
Via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA	<i>TNFRSF1A, XPA, EP300</i>
Processo metabólico de composto de nitrogênio	<i>NCBP1, PDGFA, CCT2, WARS2, SYCP1, TNFRSF1A, RBM8A, ITIH5, ENTPD3, PMS1, BCL9, ELP4, DCTD, TRHDE, L3MBTL2, MSTN, EIF1B, POLR3C, LPIN1, AMPD1, XPA, ATF4, EYA2, EP300, FLAD1, TPH2, SLC25A17</i>
Exocitose regulada por íons cálcio	<i>CACNA1I, SYT13, SYT6</i>
Processo metabólico de heterociclo Processo metabólico de compostos aromáticos celulares	<i>ELP4, DCTD, NCBP1, L3MBTL2, PDGFA, MSTN, CCT2, WARS2, POLR3C, SYCP1, LPIN1, AMPD1, XPA, TNFRSF1A, ATF4, EP300, EYA2, RBM8A, ENTPD3, FLAD1, PMS1, TPH2, BCL9</i>
Via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembranar	<i>RNF115, PDGFA, MSTN, SHC1, FRS2</i>
Processo metabólico de organofosfato	<i>DCTD, INPP1, PDGFA, ENTPD3, PMVK, FLAD1, AMPD1</i>
Regulação positiva da transcrição do promotor de RNA polimerase II envolvido na resposta celular a estímulos químicos	<i>ATF4, EP300</i>
Regulação positiva do processo metabólico composto contendo nucleobase	<i>TNFRSF1A, ATF4, EYA2, EP300, PDGFA, MSTN, CCT2, LPIN1, BCL9</i>
Processo metabólico composto contendo nucleobase	<i>ELP4, DCTD, NCBP1, L3MBTL2, PDGFA, MSTN, CCT2, WARS2, POLR3C, SYCP1, LPIN1, AMPD1, XPA, TNFRSF1A, ATF4, EP300, EYA2, RBM8A, ENTPD3, FLAD1, PMS1, BCL9</i>
Processo metabólico do composto hidroxil orgânico	<i>INPP1, CYP24A1, PMVK, TPH2</i>
Resposta celular ao estímulo de dano ao DNA	<i>TNFRSF1A, XPA, EYA2, EP300, SYCP1, PMS1</i>
Desenvolvimento de tecido muscular esquelético Desenvolvimento de órgãos musculares esqueléticos	<i>EP300, MSTN, BCL9</i>
Localização de RNA	<i>NCBP1, RBM8A, CCT2</i>
Regulação positiva do processo metabólico de compostos nitrogenados	<i>TNFRSF1A, ATF4, EYA2, EP300, PDGFA, MSTN, CCT2, LPIN1, BCL9</i>
Fertilização	<i>SPEF2, CCT2, SYT6</i>
Despolarização da membrana durante o potencial de ação	<i>CACNA1I, GJA5</i>
Via de sinalização apoptótica	<i>TNFRSF1A, XPA, EYA2, EP300, SCG2</i>
Exocitose de neurotransmissor regulada por íons de cálcio	<i>SYT13, SYT6</i>

Foram encontrados 25 BP ao total, se destacando o desenvolvimento de tecido muscular estriado, desenvolvimento de tecido muscular, via de sinalização apoptótica intrínseca em resposta a danos no DNA, regulação positiva da transcrição do promotor de RNA polimerase II envolvido na resposta celular a estímulos químicos, desenvolvimento de tecido muscular esquelético e desenvolvimento de órgão muscular esquelético, indicando a importância desses processos no desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos. Os 25 PB foram agrupados em nove grandes grupos pelo REViGO, divididos em macroprocessos que atuam sobre os bioprocessos de *organic cyclic compound metabolismo*, *membrane depolarization during action potential*, *cellular response to DNA damage stimulus*, *RNA localization*, *striated muscle tissue development*, *organic hydroxy compound metabolism*, *fertilization*, *nitrogen compound metabolism* e *small molecule metabolismo* (Figura 8).

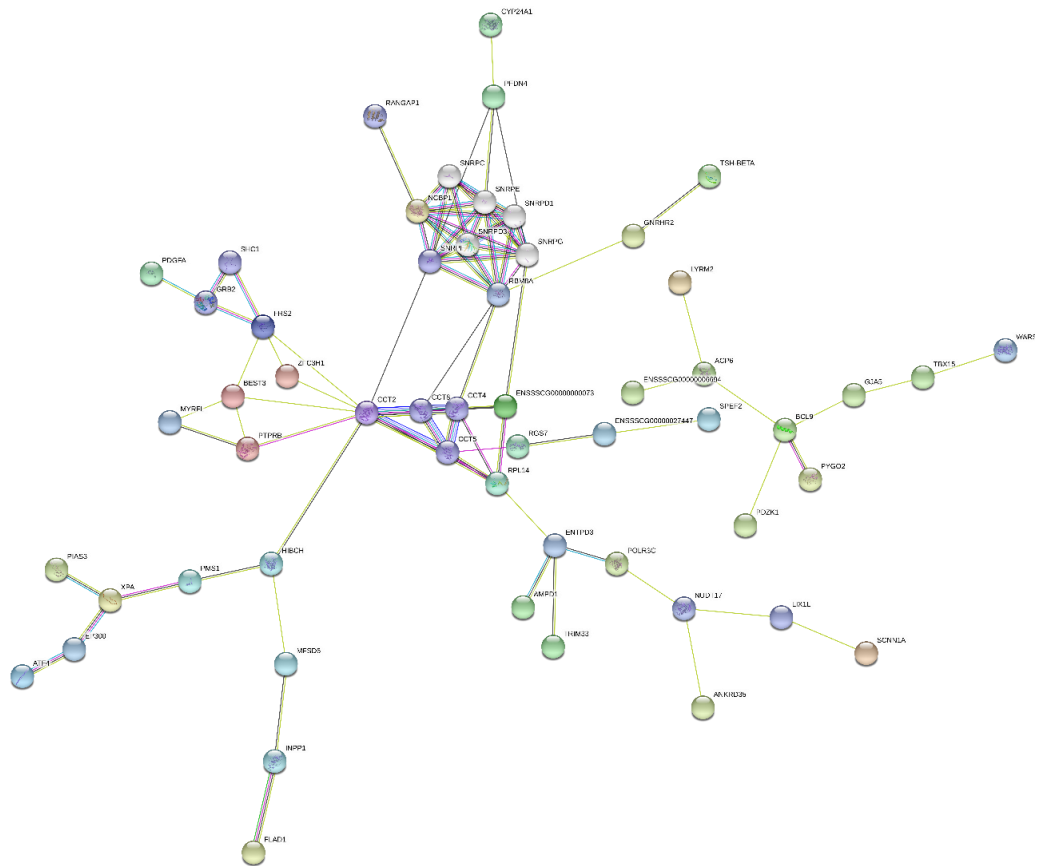
Figura 8 – *TreeMap* com os processos biológicos associados a genes relacionados a hérnia umbilical, através da metodologia de múltiplos marcadores.



Na rede de genes gerada pelo STRING, demonstrada na Figura 9, alimentada por informações de dados de enriquecimento funcional, observou-se a ocorrência de dois grandes grupos de genes, além de duas redes com maior espessura de linhas, podendo indicar maior força de interação. Dentro destes dois grandes agrupamentos, alguns genes apresentaram interações maiores, possivelmente por possuírem funções semelhantes ou por apresentarem dependência entre si. Estes genes podem ser observados pelo maior número de linhas de interação proteína-proteína formando outros subgrupos. Dentre os subgrupos com mais interações destacam-se o primeiro formado pelos genes *CCT2*, *CCT4*, *CCT5* e *CCT8*, o segundo pelos genes *SHC1*, *GRB2* e *FHS2*, e o terceiro subgrupo pelos genes *NCBPL*, *SNRPF* e *RBMB*.

Este último agrupou também em seu subgrupo genes do banco de dados externo, não provenientes dos nossos resultados, mas enriquecidos na análise com o STRING, sendo eles: *SNRPC*, *SNRPE*, *SNRPD1*, *SNRPG* e *SNRPD3*. Outros genes foram importantes funcionalmente, porém, não formaram grupos, podendo demonstrar tal importância por influência do tipo de interação entre os genes.

Figura 9 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir da análise de associação com múltiplos marcadores relacionados à hérnia umbilical em suínos.



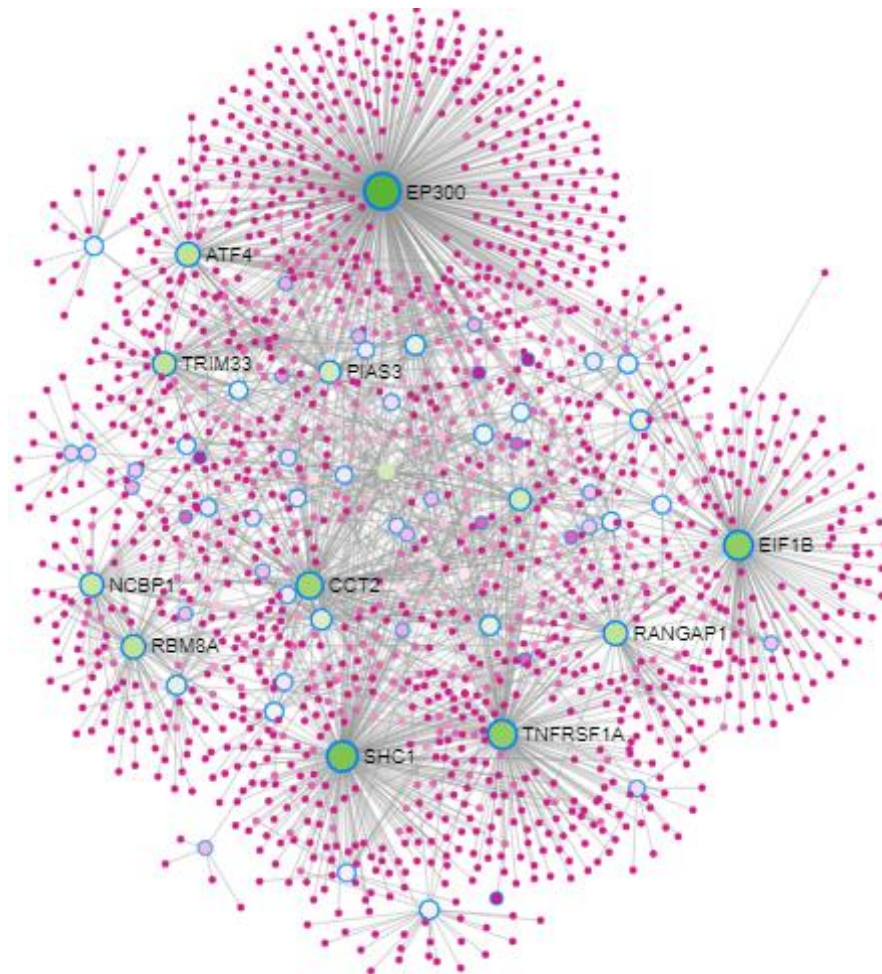
¹Círculos: representam as proteínas. Os coloridos indicam os genes fornecidos na análise e os cinzas, os genes que interagiram com os genes propostos, mas não foram encontrados no estudo.

²Linhas: indicam a interação entre os genes e a cor da linha o tipo de evidência usado nas previsões de associação. A cor azul claro indica a evidência de base de dados curada, a rosa evidência experimental, a verde de genes na vizinhança, a vermelha de fusão gênica, azul escuro co-ocorrência gênica, verde claro de mineração textual, preto co-expressão gênica e cinza homologia proteica.

A análise de enriquecimento através do programa NetworkAnalyst mostrou várias regiões com adensamento de genes, permitindo a identificação de 13 genes com maior interação, apresentando-se no núcleo do adensamento de genes (Figura 10). Seguindo a ordem de relevância devido ao número de conectividade com os demais genes, destacaram-se *EP300*, *TNFRSF1A*, *SHC1*, *EIF1B*, *CCT2*, *TRIM33*, *ATF4*, *PIAS3*, *UBC*, *ST13*, *NCBP1*, *RBM8A* e *RANGAP1*, respectivamente, da maior para a menor conectividade (Figura 10). Ainda,

destacam-se os genes que apresentaram grande notabilidade devido as suas respectivas conectividades, na seguinte ordem: *EP300*, *CCT2*, *SHC1*, *TNFRSF1A*, *EIF1B*, *RANGAP1*, *ATF4*, *TRIM33*, *NCBP1*, *RBM8A* e *PIAS3*. Além destes genes com maior conectividade, devido ao grande número de genes associados à hérnia umbilical pela metodologia de múltiplos marcadores, os demais genes adensados nas várias redes também podem estar relacionados ao aparecimento dessa anomalia em suínos.

Figura 10 – Rede de interação gênica construída com o software NetworkAnalyst 3.0 com os genes associados com a ocorrência de hérnia umbilical em suínos pelo método de único marcador.



¹O grau de relação dos genes inicia com a cor verde escuro, representando os genes centrais com uma maior relação a outros genes. Os tons de verde ficam mais claros conforme vai diminuindo o número de ligações desses genes, e começa tons claros da cor rosa até o rosa mais escuro, que indica nenhuma relação a outros genes.

Na análise de associação utilizando a metodologia de múltiplos marcadores, 13 genes foram diagnosticados como importantes posicionalmente e funcionalmente. Foram encontrados com maior notabilidade os genes *EP300*, *MSTN*, *EYA*, *ATF4*, *NCBP1*, *RBM8A*, *CCT2*, *SHC1*, *RANGAP1*, *TRIM33*, *PIAS3*, *TNFRSF1A* e *EIF1B*. Observa-se que o gene *CCT2* está

localizado em uma região de alta significância, e os genes *RBM8A*, *PIAS3*, *TRIM33* e *EIF1B* em regiões de alta e moderada significância, podendo ser genes de elevada influência para o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos.

2.3.7 Semelhanças Encontradas entre as Metodologias de Associação com Único e Múltiplos Marcadores

Alguns dos resultados foram similares entre as duas metodologias (Único e múltiplos marcadores), em particular 5 genes específicos podem ser destacados (Figura 11), localizados à aproximadamente 100 Mb no SSC4 (Tabela 3 e 4, Anexo D). Os genes mencionados foram *GJA5*, *ACP6*, *BCL9*, *WARS2* e *ENSSSCG00000006725* (sem conhecimento biológico), todos estes localizados em regiões com associação sugestiva pela análise de associação genômica por um único marcador. Porém, na análise de associação utilizando múltiplos marcadores os genes *GJA5*, *ACP6* e *BCL9* encontraram-se em uma região com alta e moderada significância, e *WARS2* e *ENSSSCG00000006725* em uma região com alta associação à hérnia umbilical em suínos (Anexo D).

Figura 11 – Diagrama de Venn com o conjunto de genes prospectados advindos das análises de associação utilizando as metodologias de único e múltiplos marcadores.

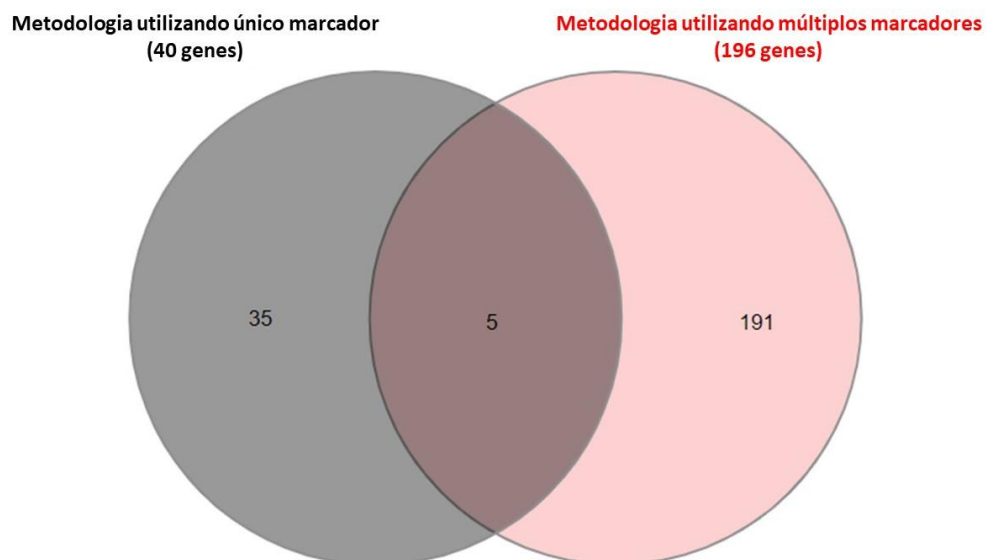
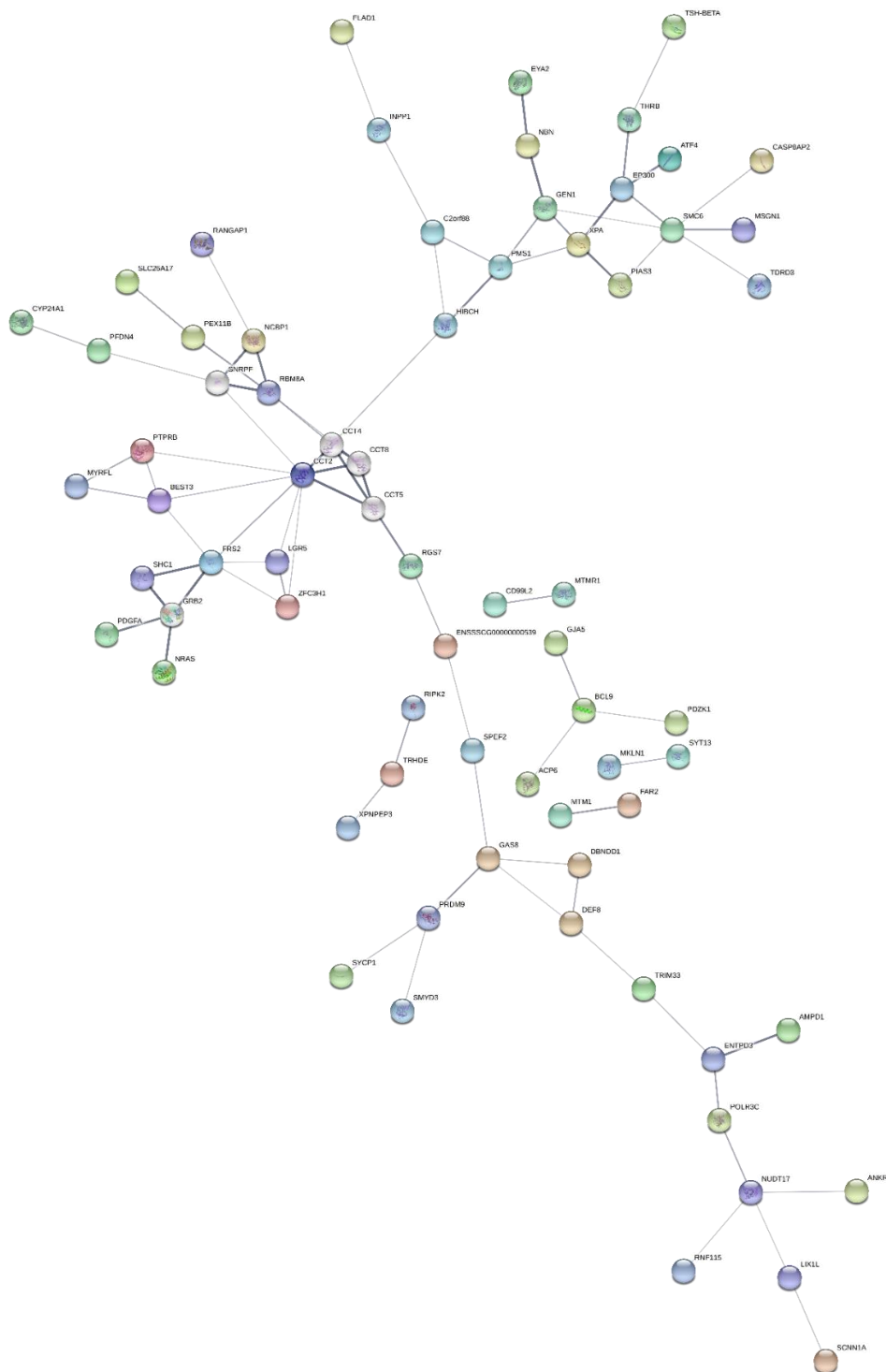


Figura 12 – Rede de interações de proteínas construída com o STRING utilizando os genes obtidos a partir das análises de associação de único e múltiplos marcadores relacionados à hérnia umbilical em suínos.



¹Círculos: representam as proteínas. Os coloridos indicam os genes fornecidos na análise e os cinzas, os genes que interagem com os genes propostos, mas não foram encontrados no estudo.

²Linhas: indicam a interação entre os genes e a cor da linha o tipo de evidência usado nas predições de associação. A cor azul claro indica a evidência de base de dados curada, a rosa evidência experimental, a verde de genes na vizinhança, a vermelha de fusão gênica, azul escuro co-ocorrência gênica, verde claro de mineração textual, preto co-expressão gênica e cinza homologia proteica.

Por fim, observa-se na Figura 12 a rede de associação do enriquecimento funcional construída com o STRING. Foram utilizados os genes das regiões de 300 kb da análise de associação realizada pelo método de único marcador, e os genes encontrados nas regiões com SNPs de alta e moderada significância observados no método de múltiplos marcadores. Neste agrupamento foi possível detectar seis agrupamentos de genes interligados por redes gênicas.

2.4 DISCUSSÃO

A hérnia umbilical em suínos pode ser desencadeada por distúrbios no fechamento na região do coto umbilical, ou pela ligação entre a região umbilical e o intestino (LI *et al.*, 2019). Esse fechamento incorreto, devido ao enfraquecimento muscular ao redor do umbigo, permite a projeção intestinal, resultante de processos como a apoptose e regeneração das células musculares (GRINDFLEK *et al.*, 2018; HAUERSLEV *et al.*, 2012). Sugere-se que a hérnia umbilical também esteja associada à fraqueza do tecido conjuntivo, através de proteínas da matriz extracelular, como o colágeno e proteínas envolvidas no seu metabolismo (HENRIKSEN *et al.*, 2016). Assim como o colágeno, outros componentes não celulares que compõe a matriz extracelular estão presentes em todos os tecidos e órgãos, regulando muitos processos celulares que podem influenciar o crescimento, migração, diferenciação, sobrevivência, homeostase e morfogênese (THEOCHARIS *et al.*, 2016; FRANTZ; STEWART; WEAVER, 2010). Tais fatores podem ser considerados participantes do crescimento e regeneração do tecido muscular esquelético, além de atuarem em processos que compõe o sistema imune, embriogênese e respostas inflamatórias a lesões e infecções (BRAUN; GAUTEL, 2011; CHODOROWSKA; GŁOWACKA; TOMCZYK, 2004). Grindflek *et al.* (2018) destacam em seu trabalho que muitos dos processos supracitados foram associados ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, o que corrobora com os resultados obtidos neste estudo.

Neste estudo, foi realizada a análise de associação genômica em suínos cruzados, utilizando as metodologias de marcadores únicos e múltiplos, e a análise funcional para identificar regiões do genoma e, posteriormente, genes funcionais responsáveis pela susceptibilidade à hérnia umbilical em suínos. Alguns resultados foram similares entre as duas metodologias utilizadas, localizando um importante grupo de genes à aproximadamente 100 Mb no SSC4 (Tabela 2 e 3, Anexo D). Os genes destacados foram *GJA5*, *ACP6* e *BCL9*, estes que participam de processos biológicos da matriz extracelular e o gene *WARS2*, relacionado a

PB envolvendo o sistema imune. Todos estes genes apresentaram-se na análise de associação por um único marcador, próximos a SNPs com associação sugestiva a hérnia umbilical em suínos (Tabela 3 e 4), já quando utilizada a metodologia de associação por múltiplos marcadores os genes *GJA5*, *ACP6* e *BCL9* encontraram-se em uma região com alta e moderada associação, e *WARS2* apresentou-se em uma região com alta associação à hérnia umbilical em suínos (Anexo D), mostrando a importância da utilização associada das metodologias de associação utilizando único e múltiplos marcadores. Esses resultados, demonstram a grande importância destes genes, uma vez que foram confirmados por ambas as metodologias, enaltecendo a associação dos mesmos com o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos.

Na análise de associação utilizando a metodologia de único marcador, 11 genes foram descritos como importantes. Além dos quatro genes que também foram similares para a metodologia de múltiplos marcadores e já descritos acima, foram encontrados os genes *MTMI* (SSCX) e *MTMR1* (SSCX) relacionados ao tecido muscular esquelético, *KCNS3* (SSC3), *HMGB3* (SSCX), *GEN1* (SSC3), *OSGIN2* (SSC4), *SMC6* (SSC3) e *THRB* (SSC13) associados a processos da matriz extracelular e *RIPK2* (SSC4), *CD99L2* (SSCX) e *DEF8* (SSC6) ao sistema imunológico. Os SNPs rs338601989, rs80895706, rs340738255 e rs81258181, encontraram-se dispostos próximos aos genes, *KCNS3*, *RIPK2*, *THRB* e *CD99L2*, respectivamente. Destaca-se a proximidade dos SNPs com alta significância, rs338601989 a *KCNS3* e rs80895706 ao gene *RIPK2*, demonstrando sua relevância posicional para a ocorrência de HU.

De forma a obter mais informações sobre a ocorrência desse defeito congênito, foi realizada a análise de associação utilizando a metodologia de múltiplos marcadores, onde se observou mais 13 genes importantes que não foram diagnosticados pela metodologia de único marcador. Foram encontrados os genes *MSTN* e *EYA2* relacionados ao tecido muscular esquelético, os genes *EP300*, *ATF4*, *NCBP1*, *RBM8A*, *CCT2*, *SHC1* e *RANGAP1* relacionados à matriz extracelular e os genes *TRIM33*, *PIAS3*, *TNFRSF1A* e *EIF1B* ao sistema imunológico. Observa-se que os SNPs na região 13 do SSC4 (rs339261815, rs321389839 e rs81380101) estão mapeados próximo ao gene *TRIM33*, na região 18 no SSC5, os SNPs mapeados apresentam alta significância (rs345043801, rs80841312, rs80786392, rs80964888, rs80989707, rs80837106 e rs80845463) e apresentaram-se próximos ao gene *CCT2*.

Desta maneira, pode-se verificar a importância da utilização destas duas metodologias de GWAS, pois além de permitir a comparação de genes que se apresentaram tanto na metodologia de único marcador quanto na de múltiplos marcadores, também foi possível identificar genes que não foram encontrados pela metodologia de único marcador, pela possível

causa de serem genes de menor efeito, mas que foram detectados pela metodologia de múltiplos marcadores (LEDUR; NAVARRO; PÉREZ-ENCISO, 2009), de forma que uma metodologia complementa a outra.

Referente aos genes encontrados na análise GWAS e usados na análise funcional, dos 18 e 25 processos biológicos observados, respectivamente para as metodologias de único e múltiplos marcadores, destacam-se os processos relacionados ao tecido muscular esquelético, matriz extracelular e sistema imunológico. Desta forma, foi possível observar genes com maior relação aos PB relacionados à ocorrência de hérnia umbilical em suínos, na população avaliada, que serão discutidos a seguir.

Desenvolvimento do tecido muscular

Um dos fatores fisiológicos que desencadeiam hérnia umbilical em suínos é o enfraquecimento dos músculos abdominais. O músculo da parede abdominal possui regiões que podem apresentar fraqueza muscular quando expostas a alta pressão, pois são propensas a fragilidade do tecido, permitindo assim a manifestação de diversos tipos de hérnias, inclusive a hérnia umbilical (MONSANG, 2014). As células do tecido muscular apresentam proteínas citoesqueléticas estando estas predispostas a ocorrências fisiológicas das células, como adesão, distendimento, migração, reprodução, sinalização, expressão gênica e na síntese de secreção de proteínas (PENNISI *et al.*, 2011). No presente estudo, seis genes foram enriquecidos em BP relacionados ao desenvolvimento esquelético (Tabela 4 e 5), sendo eles: *MTMI*, *MTMR1*, *EP300*, *MSTN*, *EYA2*, *ATF4* e *ROBO2* (Tabela 2 e 4, Anexo D). Dois genes muito importantes no estudo participam de processos fisiológicos relacionados à matriz extracelular (MEC), o *BCL9* que atua na via de sinalização Wnt/ β -catenina (ZHANG *et al.*, 2017b) e o *GJA5* atuante sobre as junções *gap*, operando assim sobre processos pós-traducionais (BAI, 2014; SUN *et al.*, 2014). Estes dois genes foram enriquecidos também em BP envolvidos no desenvolvimento da musculatura esquelética (Tabela 4). Estes resultados podem indicar que alterações no desenvolvimento da musculatura esquelética estejam relacionadas a variações de proteínas que compõem a MEC.

O gene *MTMI* apresentou-se em destaque com grande conectividade com outros genes (Figura 6). O mesmo integra a família das fosfatases (RAESS *et al.*, 2017) e possui algumas proteínas relacionadas, como a *MTMR1* que afeta a musculatura esquelética, desempenhando papel importante na formação muscular (BUJ-BELLO, 2002). Foi observado que genes da classe *MTMs* podem não atuar diretamente nas proteínas, mas desfosforilam os

fosfoinosítídeos, que são lipídios agrupados em subdomínios específicos da membrana celular, com atuação em uma gama de processos celulares, incluindo sinalização e organização celular (DONG, 2010). Em humanos, uma mutação no gene *MTM1* foi relacionada à ocorrência de miopatia centronuclear ligada ao X, devido a modificação irregular de fosfoinosítida PI(3) em PI(4) nos endossomos (KETEL *et al.*, 2016). Ressalta-se que as miotubularinas contêm domínios funcionais que promovem interações proteína-proteína ou lipídeo-proteína, demonstrando que a falta do complexo miotubularina, responsável pela estabilidade muscular, pode gerar a fraqueza muscular (MCENTAGART *et al.*, 2002), uma das causas para a ocorrência de hérnia umbilical. Adicionalmente, durante o processo de diferenciação das células musculares, a expressão do *MTM1* é regulada através da ocorrência do *splicing* negativo sobre éxons específicos, com um significativo aumento dos níveis da isoforma C do mRNA, e uma diminuição das isoformas A e B do mRNA na fase adulta (BUJ-BELLO, 2002). Observou-se que quando ocorreram outras formas de *splicing* alternativo do pré-RNA do *MTM1*, houve interferência na diferenciação celular em humanos, evidenciando a maturação tardia nos tecidos musculares, resultando em problemas relacionados ao tecido muscular e até mesmo a fraqueza muscular como observada em humanos (AMACK; MAHADEVAN, 2004; LAPORTE *et al.*, 2000). Diante das evidências, nota-se que os genes inclusos na classe *MTMs* podem exercer influência sobre a estabilidade e maturação tardia do tecido muscular (AMACK; MAHADEVAN, 2004; KETEL *et al.*, 2016), tornando-os possíveis candidatos à propensão a hérnias umbilicais em suínos. A atuação de fatores musculares sobre o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos já foi comprovada em estudo, destacando o gene *CAP9* como associado a fatores que contribuem com a estabilidade muscular da região abdominal interferindo na cicatrização umbilical (LI *et al.*, 2019).

Além disto, os genes *MTM1*, *EP300* e *ATF4* atuam sobre as principais formas de renovação das células musculares, no sistema ubiquitina-proteassoma (*UPS*), atuando sobre os fatores da autofagia, que garantem a manutenção e resistência da fibra muscular (GAVRIILIDIS *et al.*, 2018). O gene *MTM1* está envolvido, ainda, na formação do complexo *MTM1-UBQLN2*, que reconhece proteínas citoesqueléticas como a desmina e a vimentina (Proteínas de filamentos intermediários tipo III) e direciona à degradação de proteínas em células eucarióticas via proteassoma (HJERPE *et al.*, 2016). A degradação mediada pelo *UPS* ocorre no retículo endoplasmático (ARAKI; NAGATA, 2011), sendo que o acúmulo de proteínas mal enoveladas no mesmo, que geralmente incluem elementos citoesqueléticos, ocasiona distúrbios musculares (HNIA *et al.*, 2015).

O gene *EP300* regula a expressão gênica da histona acetiltransferase, podendo adicionar grupos acetil a resíduos de lisina em proteínas alvo de histonas e não histonas, para protegê-los da proteólise mediada por ubiquitina (GRÖNROOS *et al.*, 2002). Função semelhante foi encontrada em *ATF4*, que atua na transcrição dos genes envolvidos no metabolismo de aminoácidos e na resistência ao estresse oxidativo mitocondrial (KILBERG *et al.*, 2012). Devido a esses mecanismos, o *EP300* pode atuar nas vias do controle do crescimento celular, reparo do DNA, diferenciação celular, apoptose e supressão tumoral (TSAI *et al.*, 2011). O gene *ATF4* pode agir através da expressão de genes citoprotetores específicos, reprogramando o metabolismo celular através da síntese de principais metabólitos, da antioxidação e da regulação da apoptose (DEY *et al.*, 2012; QUIRÓS *et al.*, 2017). Desta maneira, como as células musculares possuem vida longa, podem ser mais acometidas pelo estresse proteotóxico e oxidativo das células, observando também relações entre o *MTMI* sobre o estresse proteotóxico e o *EP300* e *ATF4* sobre o estresse oxidativo nas células musculares, e *AMPDI* sobre a atividade metabólica muscular afetando a resistência muscular (GOEBEL; BLASCHEK, 2011; TSAI *et al.*, 2011; KILBERG *et al.*, 2012; BALCHIN; HAYER-HARTL; HARTL, 2016).

O gene *MSTN* codifica a miostatina, que por sua vez atua sobre a família do fator de crescimento β e outros fatores de crescimento e diferenciação celular da musculatura esquelética (MCPHERRON; HUYNH; LEE, 2009; HU *et al.*, 2013). A miostatina desempenha funções importantes sobre o desenvolvimento embrionário e manutenção da homeostase tecidual em animais adultos, devido a funções regulatórias da miogênese e diminuição do crescimento muscular (HICKFORD *et al.*, 2010). A deficiência de miostatina em camundongos está associada à redução no tamanho e fraqueza de tendões, os quais são formados por colágeno e consistem na resistência do tecido (MENDIAS; BAKHURIN; FAULKNER, 2008). A regulação da homeostase tecidual apresenta implicações sobre o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, uma vez que polimorfismos que se encontram em regiões do gene *MSTN* foram associados com a ocorrência de hiper muscularidade, e que em humanos foi observada a falta de gordura e extrema muscularidade, assim como a proeminência umbilical (PATNI; GARG, 2015). Ressalta-se, por fim, que a renovação de colágeno (Homeostase do tecido conjuntivo) pode, portanto, estar intimamente relacionada a ocorrência de hérnia umbilical em humanos, quando este processo não é bem regulado (HENRIKSEN *et al.*, 2015).

Para a funcionalidade do tecido musculoesquelético, é necessário a junção correta entre tendões e músculos, para isso é necessário que durante o desenvolvimento muscular a fibrila muscular em crescimento se projete em direção aos tendões (SCHEJTER; BAYLIES,

2010). Em nosso trabalho foi observado o gene *ROBO2* com funções relacionadas às funções de ligação de células musculares com os tendões, a qual foi observada sua atuação deste gene sobre as conexões musculoesqueléticas em *Drosophila* através da via de sinalização *Slit-Robo* (ORDAN; VOLK, 2015). *Slit-Robo* fornece condições para interações célula-célula e célula-matriz, influenciando diretamente em muitos processos fisiológicos e patológicos (BLOCKUS, CHÉDOTAL, 2016). Este fragmento, o *Slit* encontra-se nas células dos tendões e atua como quimiorrefecedor para guiar a migração das células musculares durante o desenvolvimento (ORDAN et al., 2015). Desta forma, foi observado que a principal função de *ROBO2* quando expresso nas células é tornar estável o *Slit* existente nas células dos tendões (ORDAN; VOLK, 2015). Também, já foi possível observar relatos que a via de sinalização *Slit-Robo* possui funções sobre a angiogênese, mediando a diafonia entre células cancerígenas e as células endoteliais em humanos (WANG et al., 2003). Desta forma, ainda que as funções de *Slit* sejam pouco conhecidas, podemos inferir que há a influência na ocorrência da hérnia umbilical em suínos, devido a ocorrência de homeostase muscular abdominal através dos fragmentos de *Slit*.

Embora não existam muitas informações sobre a relação com musculatura ou hérnia umbilical em estudos de respostas aos danos no DNA (DDR), o gene *EYA2* foi encontrado altamente expresso em tecidos com regeneração celular e, especialmente, em células-tronco (SOUSOUNIS et al., 2020). Assim, este gene de função muscular pode influenciar a ocorrência de hérnia umbilical, uma vez que já foi relatado que outros genes, como o *LIF*, que atuam sobre a regeneração celular ou inflamação no local da anomalia, fatores que por sua vez influenciam na cicatrização, um dos principais agentes envolvidos na ocorrência do defeito (CHODOROWSKA; GŁOWACKA; TOMCZYK, 2003; GRINDFLEK et al., 2018). A cicatrização do umbigo é necessária para que não ocorra a hérnia, sendo necessário o reparo celular, granulação e a remodelação de tecidos, através de componentes da MEC como fatores de crescimento e citocinas (BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013). Embora estudos de DDR e regeneração celular não tenham sido associados com hérnia umbilical, nossos resultados sugerem o envolvimento destes fatores na manifestação desta anomalia em suínos.

Matriz extracelular

A MEC é o material encontrado ao redor e entre as células, sendo altamente dinâmico, sofrendo remodelação contínua e controlada (BONNANS; CHOU; WERB, 2014). Essa estrutura é gerada durante os estágios embrionários iniciais, persistem durante a vida, se remodelando e sendo reparada em casos de lesões e doenças (LU et al., 2011). A interação das

células com a MEC é influenciada pela composição química, estrutural e mecânica, promovendo eventos celulares como a adesão, proliferação, apoptose, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular, a fim de promover a homeostase mecânica (BONNANS; CHOU; WERB, 2014; HUMPHREY; DUFRESNE; SCHWARTZ, 2014).

Alguns genes que apresentaram maior conectividade com outros genes associados à hérnia umbilical foram relacionados à MEC nas análises com ambas metodologias, de marcadores únicos e múltiplos, sendo estes: *BCL9*, *HMGB3*, *GJA5*, *ACP6*, *KCNS3*, *OSGIN2*, *GEN1*, *SMC6*, *THRB*, *CCT2*, *SHC1*, *RANGAP1*, *NCBP1* e *TSPAN2* (Figuras 6 e 10). Esses genes podem estar associados com a susceptibilidade ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos por meio da influência da MEC.

Acredita-se que a MEC pode desempenhar funções sobre o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, uma vez que está envolvida em processos biológicos como, resposta inflamatória, angiogênese, movimento celular, crescimento e proliferação celular e na proteólise (GRINDFLEK *et al.*, 2018; TORISEVA *et al.*, 2012). Sabe-se que enzimas como a lisil oxidase, que realizam modificações pós-traducionais em diversas moléculas (Colágeno, fibronectina, elastina e fibrilinas), formam ligações cruzadas intermoleculares e as proteinases, que clivam ligações peptídicas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), também são componentes da MEC (HUBMACHER; APTE, 2013). No entanto, a fosforilação de proteínas é uma das maneiras mais comuns de modificação pós-traducional, ativando ou inativando enzimas. Os genes *GJA5*, *ACP6*, *CCT2*, *SHC1* e *OSGIN2* interagem fortemente entre si e podem estar vinculados ao processo de modificação pós-traducional (HUNTER, 2012).

Dos genes com maior conectividade, o *GJA5*, *BCL9* e *ACP6* apresentaram maior enriquecimento funcional em BP relacionados principalmente ao desenvolvimento do tecido muscular. Estes genes estão dispostos em um mesmo *cluster* em ambas as metodologias adotadas neste estudo (Figuras 5 e 9), indicando que os mesmos possam apresentar interações funcionais entre si. Esses genes destacam-se também por estarem associados à fosforilação de proteínas na modificação pós-traducional, compondo a MEC (Tabela 4). O gene *GJA5* atua sobre as junções *gap*, que são canais intercelulares formados por fosfoproteínas denominadas conexinas (Cx40), permitindo a passagem de moléculas de até <1000 kDa nas células (BAI, 2014; SUN *et al.*, 2014). Sugere-se que as conexinas se tornem permeáveis quando submetidas a alguns processos, como despolarização prolongada da membrana celular, estresse mecânico e alterações citoplasmáticas de Ca⁺ (EVANS; DE VUYST; LEYBAERT, 2006). O gene *ACP6* regula os níveis de fosfolípídeos mitocondriais (LI *et al.*, 2013), pertencendo ao grupo de ácidos lisofosfatídicos, que atuam sobre a proliferação, migração e sobrevivência celular devido a

sinalização extracelular de pelo menos seis receptores acoplados à proteína G das sete transmembranas G existentes (GOTOH *et al.*, 2012; LI *et al.*, 2013; YUNG; STODDARD; CHUN, 2014). O gene *ACP6* também regula a atividade celular através da sinalização intracelular, dividindo a mesma função com o *BCL9* que é um sinalizador celular através da via Wnt/ β -catenina (ZHANG *et al.*, 2017b). Em *Drosophila*, o *BCL9* mostrou-se necessário para a ativação da sinalização canônica de Wnt para a regeneração muscular (BRACK *et al.*, 2009). A via de sinalização Wnt não canônica Wnt/ Ca^{+} é muito importante para o desenvolvimento embrionário, uma vez que a sinalização de Ca^{+} está totalmente ligada à formação da região ventral e dorsal do embrião, muito importante no caso da formação de hérnia umbilical (CRÉTON; KREILING; JAFFE, 2000). O gene *GJA5* também participa desta mesma função, pois possui a sugestível sinalização de Ca^{+} celular através da formação das Cx40 (BAI, 2014; SUN *et al.*, 2014), podendo estar associado ao *BCL9*, uma vez que ambos atuam sobre a sinalização de Ca^{+} celular. Outro gene envolvido em processos relacionados à regulação pós-traducional, que compõe a MEC e apresenta funções relacionadas ao Ca^{+} celular é o *OSGIN2*. Este gene participa do metabolismo de metais pesados, através da fosforilação oxidativa e da produção de ATP, interferindo no crescimento celular e estando associado a apoptose (BONAVENTURA *et al.*, 2018). Foi observado em um estudo que *OSGIN2* regula positivamente a adesão de células endoteliais da artéria coronária humana (HCAEC), contribuindo com o desgaste endotelial sobrejacente a placas estenóticas (WHITE *et al.*, 2018). Este gene é um possível alvo do miR-199a-5p, uma vez que a menor expressão desse miRNA aumentou a morbidade em pacientes portadores de células carcinogênicas (KEßLER *et al.*, 2016). Tal gene foi expresso em condições de hipóxia celular, situação esta que aumenta os níveis de Ca^{+} celular, o que pode ter relação com a hérnia umbilical. O aumento de níveis de Ca^{+} mostrou-se relacionado à ativação de células hepáticas, associando-se a autofagia que levou a uma maior expressão de colágeno tipo I, situações estas muito importantes para o desenvolvimento de hérnia umbilical (JIN *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2015; KEßLER *et al.*, 2016). Souza *et al.* (2020), também observaram a associação da hérnia umbilical em suínos com os genes *ACAN*, *MMPs*, *COLs*, *EPYC*, *VIT*, *CCBE1* e *LGALS3*, todos relacionados a processos da MEC principalmente ligados a bioprocessos do colágeno.

Os outros dois genes, *SHC1* e *CCT2*, também relacionados à fosforilação e a modificação pós-traducional, possuem funções semelhantes, relacionados à proliferação celular, função também associada à movimentação de Ca^{+} . O gene *SHC1* atua no estímulo do fator de crescimento epidérmico (*EGF*) através de processos de fosforilação e interações proteicas, bem como a ubiquitinação (ZHENG *et al.*, 2013). Já o *CCT2*, que apresenta funções

semelhantes aos dois genes anteriores, forma um conjunto com as subunidades de chaperoninas *CCT4* (*Chaperonin Containing TCP1 Subunit 4*), *CCT5* (*Chaperonin Containing TCP1 Subunit 5*) e *CCT8* (*Chaperonina contendo a subunidade TCP1 8*). As CCTs formam uma família de proteínas importantes para o dobramento de outras proteínas (CARRASCOSA; LLORCA; VALPUESTA, 2001). A característica principal das CCTs é homeostase celular e tem como função o enovelamento das proteínas citoesqueléticas, actina e tubulina, sendo que algumas subunidades das CCTs podem ser ativas em uma grande quantidade de funções que compõe a MEC (DEKKER *et al.*, 2008). As CCTs funcionam como auxiliadoras dos polipeptídeos a conseguir atingir a sua estrutura tridimensional estrutural (GUEST *et al.*, 2015). Foi observado que o gene *CCT2* está relacionado à *STAT3*, fator responsável pela proliferação celular que pode vir a atuar sobre o ciclo do desenvolvimento de hérnia umbilical (CARR *et al.*, 2017; MINEGISHI; NAKAYA; TOMAREV, 2018).

A associação dos genes relacionados ao metabolismo de Ca^+ e aos demais fatores que atuam em processos da MEC indica a probabilidade da relação dessa estrutura com a resistência estrutural e sinais químicos nas células dos animais (DRAGOŠ; KOVÁCS, 2017), uma vez que Ca^+ é muito importante no reparo celular (MOE; GOLDING; BEMENT, 2015). Os genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6*, *OSGIN2* e *SHC1* apresentam relação com genes pós-traducionais que compõe a MEC e com a ocorrência de hérnias umbilicais em suínos, visto que na cicatrização do umbigo estão envolvidos fatores que podem desencadear a referida anomalia. Assim, sugere-se que o reparo de tecidos lesionados que envolve atividades das células locais e de recrutamento de células em resposta a sinais locais e sistêmicos, pode ser um dos fatores de desregulação no processo de cicatrização do umbigo (SERRANO *et al.*, 2011). Um importante fator decorrente da lesão tecidual por inflamações é a fibrose fisiopatológica, que é o acúmulo excessivo de componentes da matriz extracelular, em particular, do colágeno, formando cicatrizes permanentes (MANN *et al.*, 2011). Durante o reparo muscular após lesões, as fibras danificadas ou mortas são removidas pelas células inflamatórias e posteriormente substituídas por células-tronco musculares de células satélites. Essas células podem se esgotar ao longo do tempo ou perder sua capacidade de reparo. Nesses casos, ocorre a substituição de tecido muscular por tecido adiposo e fibroso (MAURO, 1961; MANN *et al.*, 2011), podendo ser um dos fatores predisponentes para ocorrência de hérnia umbilical.

Conforme observado na Figura 6, o gene *KCNS3* pode interagir com o gene *RIPK2*, o qual atua no sistema imune e influencia o ciclo de proliferação celular, regulando as ações das membranas celulares (O'GRADY; SO, 2005). Esse mecanismo é possível devido aos canais de K_v permitirem a permeabilidade celular e, conseqüentemente, alterarem a concentração de Ca^+ ,

atuando sobre o crescimento celular (URREGO *et al.*, 2014). Esses fatores podem indicar que processos inflamatórios podem atuar sobre o crescimento celular, podendo ter relação com o gene *THRB*, que apresenta-se interligado aos genes anteriormente citados, e possui ação sobre a regulação da expressão de transportadores de hormônios tireoidianos, atuantes especificamente em células de tecidos (CHENG; LEONARD; DAVIS, 2010). Grindflek *et al.* (2018) observaram o gene *VIM* com características semelhantes a este, a qual atua sobre as células da musculatura lisa, além de estar envolvido em processos da imunidade. Outro gene associado a estes é *RANGAPI*, por apresentar modificações em sua expressão quando associado com uma proteína ubiquitina importante na regulação proteica (MATUNIS; COUTAVAS; BLOBEL, 1996), sendo possível fator a predisposição da ocorrência de hérnia umbilical.

Outra condição importante é o reparo de danos causados no DNA por recombinação homóloga (*HR*), necessária para a correta propagação dos cromossomos durante os ciclos mitótico e meiótico (CROOK *et al.*, 2013). Foram encontrados dois genes relacionados à *HR*, sendo eles *GEN1* e *SMC6*. O *GEN1* é uma endonuclease que corta as junções de *Holliday* (HJ) (MATOS; WEST, 2014). Desta maneira, *GEN1* determina o número de centrosomas, que são os principais organizadores de microtúbulos nas células, podendo resultar em múltiplos fusos mitóticos, multinucleação e também na morte celular (GAO *et al.*, 2012). Já o *SMC6* pode formar o complexo proteico *SMC5/SMC6*, relacionado à coesina e a condensina, que também atuam sobre a manutenção estrutural dos cromossomos, fundamental para o desenvolvimento fetal e proliferação celular (JU *et al.*, 2013).

Foram encontrados também dois genes, *BCL9* e *HMGB3*, que são sinalizadores da via Wnt/ β -catenina (KRAMPS *et al.*, 2002; BIELEFELD; AMINI-NIK; ALMAN, 2013; ZHANG *et al.*, 2017b). As proteínas Wnt são vias sinalizadoras muito importantes durante a embriogênese e na homeostase de tecidos em adultos, estimulando a ação mitogênica, a especificação do destino celular e a diferenciação do destino celular, demonstrando as funções de desenvolvimento que as proteínas Wnt possuem (LOGAN; NUSSE, 2004). A sinalização Wnt atua sobre vários processos biológicos, entre eles a proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração celular e apoptose (CHEN *et al.*, 2006). A cicatrização de feridas é possível através da ativação da via Wnt/ β -catenina, visto que ocorre uma reação de fosforilação acumulada no citoplasma, preenchendo o núcleo e recuperando o tecido danificado (PEIFER, 2000). Ma e Hottiger (2016) e Bielefeld, Amini-Nik e Alman (2013) reforçam em seus trabalhos que as vias de sinalização de Wnt/ β -catenina são muito importantes para o desenvolvimento e regeneração tecidual, fundamentais para o reparo da integridade do tecido lesionado, o que corrobora com a relação dos genes aqui encontrados, associados a distúrbios musculares

durante a formação de hérnia umbilical em suínos. Outra sinalização realizada pelas proteínas Wnt é através dos receptores *Frizzled* (*Fz*). Dentre as várias vias Wnt-Fz identificadas, uma muito importante é a via Wnt/Polaridade celular planar, essencial em processos de desenvolvimento e formação citoesqueléticas (CHEN *et al.*, 2006).

Adicionalmente, *TSPAN2* foi um gene observado associado a hérnia umbilical, em que os TSPANs possuem funções regulatórias através de vias de sinalização única, chamados de microdomínios enriquecidos com TSPANs, organizados em *cis* com integrantes da membrana desempenhando atuação fundamental sobre a adesão, proliferação, diferenciação e migração celular (HEMLER *et al.*, 2001; HEMLER *et al.*, 2008). Esses fatores demonstram a importância dos genes relacionados com a via de sinalização Wnt no desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos.

Sistema imunológico

O sistema imunológico é um conjunto de células e moléculas que atuam na defesa do organismo contra infecções e malignidades, atuando sobre a cicatrização de feridas (DELVES; ROITT, 2000; WEYAND; GORONZY, 2016). Existem duas maneiras distintas de respostas a patógenos invasores pelo sistema imune, as respostas inatas e as adquiridas (WEYAND; GORONZY, 2016). As respostas inatas (naturais) estão presentes desde o momento do nascimento e são sustentadas por células fagocíticas (Neutrófilos, monócitos e macrófagos), células que liberam mecanismos mediadores de inflamações (Basófilos, mastócitos e eosinófilos) e células exterminadoras naturais do organismo, incluindo glicoproteínas como os interferons que pertencem a classe das citocinas (DELVES; ROITT, 2000). Já a resposta adquirida (adaptativa ou específica) ocorre após a primeira exposição a um novo antígeno, envolvendo a proliferação de células B e T específicas do antígeno. As células B secretam anticorpos como as imunoglobulinas, que atuam sobre a invasão de patógenos extracelulares e as células T atuam junto as células B na secreção de anticorpos contra microorganismos intracelulares, eliminando vírus invasores através da ativação de macrófagos (MAK; FERRICK, 1998; DELVES; ROITT, 2000). Desta forma, neste estudo, nove genes foram enriquecidos relacionados a BP ligados ao sistema imunológico, sendo eles: *WARS2*, *DEF8*, *RIPK2*, *CD99L2*, *PIAS3*, *TRIM33*, *TNFRSF1A*, *EIF1B* e *RBM8A*. Esses genes foram agrupados em processos imunológicos relacionados à angiogênese, produção de leucócitos, receptores intracelulares NOD e complexo STAT-3.

Os genes *WARS2* e *EIF1B* atuam sobre a atividade mitocondrial na angiogênese (WANG *et al.*, 2016a). Foi observado o gene *MMP13*, fortemente associado a ocorrência de hérnia umbilical em suínos, a qual, este gene também mostrou-se atuar sobre a angiogênese (GRINDFLEK *et al.*, 2018). Desta forma, *EIF1B* apresentou função de regular a metástase, migração e imunomodulação celular em células cancerígenas (GERAMI *et al.*, 2015). A angiogênese, por sua vez, exerce influência sobre lesões e reparo de feridas, substituindo capilares danificados, suprindo a exigência celular de oxigênio, componentes sanguíneos e nutrientes ao tecido lesionado, normalizando a normoxia e ocasionando a fibroplasia (BAUER; BAUER; VELAZQUEZ, 2005). O combate a inflamações é uma reação do organismo contra danos em seus tecidos, em que leucócitos são levados através do sangue para o local da lesão (MULLER, 2011). Quando ocorre a migração de leucócitos devido a inflamações, os mesmos são transportados diretamente para os locais alvo, permitindo a fixação dos fatores de adesão na parede dos vasos (LEY *et al.*, 2007). Essa interação permite uma melhor relação entre os leucócitos e o endotélio, possibilitando que o fluxo de leucócitos no sangue passe a ser menor (ZARBOCK *et al.*, 2011). Assim, nota-se que a diapedese ou a migração transendotelial é um processo fundamental para respostas imunes, determinando que os leucócitos possam combater processos de inflamações, por meio da marginação, ativação, adesão, migração e locomoção destes agentes (MARTINELLI *et al.*, 2014).

O gene *CD99L2*, relacionado à *MTMR1*, atua na musculatura esquelética (Figura 5) e também em processos que combatem inflamações (MULLER, 2007). Em camundongos, a interação do antígeno *CD99* com *CD99L2* mostrou relação deste agente com a adesão e migração celular (NAM *et al.*, 2013). A princípio, a proteína *CD99L2* está relacionada com uma glicoproteína tipo I, que é expressa em leucócitos e células endoteliais, ou seja, agindo no sistema imune, desempenhando função importante sobre a diapedese de leucócitos e na emigração de neutrófilos e monócitos, além de desempenhar outras funções no desenvolvimento dos timócitos (SCHENKEL *et al.*, 2007).

Apesar dos poucos relatos na literatura sobre o gene *DEF8*, ele se apresentou altamente expresso em leucócitos primários, os quais quando apresentam suas ações inibidas, atrasam o processo de recuperação tecidual (HOTFILDER *et al.*, 1999). Foi verificada a deficiência de adesão leucocitária-I (LAD-I), caracterizada pela ausência da β -2-integrina (CD18) na superfície celular dos leucócitos, prejudicando a movimentação destes para o local de inflamação ou danos. Por consequência, a ausência plena de leucócitos resulta em insuficiência imunológica, elevando o processo infeccioso na superfície da pele e mucosas (NEWBURGER *et al.*, 2001). Desta forma, *CD99L2* e *DEF8* podem estar relacionados a hérnias umbilicais, uma

vez que estudos comprovam a associação da ocorrência de casos de inflamações com a pré-disposição a desenvolver a referida desordem (VAN DE VIJVER; VAN DEN BERG; KUIJPERS, 2013).

Outro gene que atua sobre o sistema imune é *STAT-3*, integrando sinais de vários estímulos extracelulares e vias de cinase, bem como regula genes envolvidos em muitos processos celulares importantes, como proliferação celular e apoptose (LEVY; DARNELL, 2002; SAYDMOHAMMED; JOSEPH; SYED, 2010). Foram observados os genes *PIAS3* e *TNFRSF1A* (Figura 10), como associados ao sistema imune, relacionados aos fatores de transcrição *STAT-3*. Estes fatores de transcrição são estimulados por tirosinas quinases em reação a diversas citocinas e receptores de fatores de crescimento (ZHANG *et al.*, 2017a; EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2018). PIAS são proteínas reguladoras negativas da transcrição de genes mediados por *STAT*, dentre elas, uma das suas isoformas é a *PIAS3*, uma proteína associada ao canal de potássio, além de possuírem capacidade de atividade da Ligase *E3* do modificador relacionado à ubiquitina (JACKSON, 2001). A estimulação de citocinas faz com que a proteína *PIAS3* se ligue a *STAT-3*, o ativando, e ocorre o impedimento da sua ligação ao DNA (SHUAI; LIU, 2005). Adicionalmente, o gene *TNFRSF1A* está relacionado ao aumento de citocinas, as quais estão relacionadas a processos anti-inflamatórios (CANTARINI *et al.*, 2014). Apesar da principal função do receptor de necrose tumoral (*TNFR*), outra função do gene que pertence a essa classe *TNFRSF1A* é o controle apoptótico de células endoteliais. A diminuição da expressão do *TNFRSF1A* ocasionada por inflamações e por tumores em *zebra fish* foi relacionada a uma via apoptótica evolutivamente conservada, associada a homeostase vascular, responsável pelo controle da angiogênese (ESPÍN *et al.*, 2013). Corroborando com esta informação, foi observado em pacientes com mutações no gene *TNFRSF1A* que os neutrófilos apresentaram resistência à apoptose induzida pelo fator de necrose tumoral (D'OSUALDO *et al.*, 2006). Também foi observado que o *TNFRSF1A* é regulado negativamente por *STAT-3*, principal receptor da superfície celular da citocina $TNF\alpha$, que por sua vez, quando se liga ao fator de transcrição $NF-\kappa B$, promove a sobrevivência e proliferação de células carcinogênicas (NDLOVU *et al.*, 2009; EGUSQUIAGUIRRE *et al.*, 2018).

Além disso, o gene *RBM8A* forma um heterodímero com o gene *MAGOH*, que por sua vez podem formar um complexo com o *STAT-3*, podendo implicar em uma nova função na transcrição mediada por *STAT-3* que ainda não é totalmente elucidada (MUROMOTO *et al.*, 2009). De acordo com estudos realizados em camundongos, *MAGOH* atua sobre a regulação de quinase dependente de ciclina (Cdk) (INAKI *et al.*, 2011). A Cdk é importante para a ocorrência da mitose celular, demonstrando que o gene *MAGOH* atua sobre a propagação

celular (ISHIGAKI *et al.*, 2014). O *RBM8A* foi relacionado ao crescimento celular e ao *MAGOH* como já relatado (SUDO *et al.*, 2010). Este gene atua sobre o crescimento celular por contribuir com a maturação dos centríolos, atuando diretamente sobre a divisão celular (SILVER *et al.*, 2010). Um estudo com *Drosophila* demonstrou que a associação de *RBM8A* e *MAGOH* induziu a diminuição da formação de proteínas celulares afetando o crescimento celular (HIR *et al.*, 2001). Estando *RBM8A* e *MAGOH* relacionados à evolução do ciclo celular, a deficiência destes genes pode ocasionar a apoptose celular (ISHIGAKI *et al.*, 2014). Estes genes que apresentam relação com *STAT-3* possuem importância imunológica sobre desenvolvimento da hérnia umbilical em suínos, uma vez que participam do ciclo celular como a apoptose e transcrição celular, como fatores já relacionados ao acometimento da anomalia em suínos (LIAO *et al.*, 2015).

Os genes *TRIM33* (*TIF1 γ* , *Ectoderm*) e *RIPK2* influenciam os processos pró-inflamatórios através da secreção de citocinas. Grindflek *et al.* (2018) observou os genes *OSM* e *LIF* com funções semelhantes à de *TRIM33*, a qual, estes dois genes mostraram-se relacionados a susceptibilidade a ocorrência de hérnia umbilical em suínos, ligados ao sistema imune, com funções de citocinas pleiotrópicas. A família de proteínas TRIM desempenha funções importantes na imunidade inata e na infecção antimicrobiana (PETIT *et al.*, 2019). *TRIM33* pertence a sub-família de proteínas TRIM de ligação a cromatina, que também inclui *TRIM24* (*TIF1 α*), *TRIM28* (*TIF1 β* , *KAP1*) e *TRIM66* (*TIF1 δ*) (HATAKEYAMA, 2011). O *TRIM33* foi um gene observado em pacientes com miosite idiopática (HOSHINO *et al.*, 2010). A miosite pode ser dividida em alguns tipos, dentre elas a polimiosite e dermatomiosite, que são distúrbios inflamatórios idiopáticos que afetam principalmente os músculos e a pele, ou os dois tecidos conjuntamente. Essas miopatias inflamatórias que afetam o músculo esquelético causam inflamação e fraqueza muscular de moderadas a graves e estão relacionadas a distúrbios autoimunes (REED *et al.*, 2000; TARGOFF, 2002; DALAKAS; HOHLFELD, 2003). Desta forma, observou-se a atuação de *TRIM33* sobre a função pró-inflamatória das células Th17, que são reguladores importantes da defesa contra infecções, como de células produtoras de interleucinas (IL-10) (DONG, 2008; ESPLUGUES *et al.*, 2011). *TRIM33* realiza a sinalização para a diferenciação e manutenção dos linfócitos TCD4+FOXP3+, que por sua vez inibem as respostas imunes no organismo (MALHOTRA; ROBERTSON; KANG, 2010). Este gene também regula a diferenciação celular através da ligação das proteínas SMAD2 com TGF β , que também é uma citocina que participa da homeostase das células T (MALHOTRA; ROBERTSON; KANG, 2010). TGF β regula um gama de processos biológicos, como proliferação, sobrevivência, diferenciação e migração celular, e a produção de componentes da

matriz extracelular (MEC) (MISHRA *et al.*, 2011). Foi observado, que quando ocorreu diminuição da expressão de TGF β também houve uma menor proliferação celular devido estimular inibidores de quinases dependentes de ciclina por meio de sua via de sinalização canônica envolvendo proteínas SMAD2/3, o que pode ter impedido a progressão de câncer (MISHRA *et al.*, 2011). Outra observação importante foi que *TRIM33* possui um domínio de ubiquitina ligase E3 que inibe a função de SMAD4 (DUPONT *et al.*, 2009), sugerindo que processos inflamatórios possam estar ligados à regulação de proteínas através da degradação proteica mediada pela ubiquitina ligase E3 e o proteassoma (XU; ATTISANO, 2000).

O gene *RIPK2* é um mediador das sinalizações de *NOD1* e *NOD2*, que pertencem a família dos receptores tipo *NOD* (*NLR*) que são componentes importantes do sistema imunológico inato dos mamíferos, atuando como receptores intracelulares contra patógenos e moléculas endógenas produzidas por lesões teciduais (PARK *et al.*, 2007; FAIRHEAD *et al.*, 2008; CORREA; MILUTINOVIC; REED, 2012). Quando é ativada a sinalização via *NOD*, ocorre a ativação de quinases NF- κ B e MAP, ocasionando a transcrição de citocinas pró-inflamatórias, como ocorre na indução da autofagia (TRAVASSOS *et al.*, 2010). Através da sinalização de *NOD*, o *RIPK2* é ubiquitilado por proteínas inibidoras da apoptose (DAMGAARD *et al.*, 2012). *NOD1* é uma proteína estimulada principalmente por propriedades da parede celular de bactérias gram-negativas, bactérias estas presentes em grande escala na flora intestinal (CORREA; MILUTINOVIC; REED, 2012). O gene *NOD1* apresenta funções sobre a movimentação de neutrófilos polimorfonucleares (*PMN*) no fígado, onde os *PMNs* desempenham função muito importante sobre a resposta imune inata, atuando sobre infecções e lesões teciduais (DHARANCY *et al.*, 2010). Devido à alta mobilidade e aptidão para liberar citotóxicos no organismo, os *PMNs* são responsáveis por eliminar patógenos invasores e remover células mortas em locais de inflamação, mediante a indução de citocinas inflamatórias e a relação entre citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias (XU *et al.*, 2018). O *NOD2* também desempenha função importante sobre a imunidade inata detectando bactérias gram-positivas e gram-negativas, e se expressa em células apresentadoras de antígenos (*APCs*), células epiteliais, macrófagos, monócitos, linfócitos T, células de Paneth e dendríticas (*DC*) (PROELL *et al.*, 2008; XU *et al.*, 2018). O gene *RIPK2* pode estar relacionado ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, uma vez que possui interação com fatores imunológicos, pois embora a inflamação no umbigo não tenha sido previamente associada ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, foram observados aqui, resultados que sugerem que fatores imunológicos estão associados à ocorrência da característica em questão.

Principais genes associados ao desenvolvimento de hérnia umbilical

Vários estudos para identificar genes associados a hérnia umbilical em suínos vem sendo realizados, com a finalidade de entender melhor a relação genética com esta anomalia (LIAO *et al.*, 2015; LONG *et al.*, 2016; GRINDFLEK *et al.*, 2018). Desta maneira, estes estudos permitiram a observação da associação da hérnia umbilical à marcadores e posteriormente a genes responsáveis a predisposição a esta anormalidade em suínos. No nosso estudo foram obtidos resultados através de análises de associação envolvendo duas metodologias de GWAS, a de único e múltiplos marcadores, mostrando que a utilização concomitante de ambas as metodologias em estudos de associação é muito importante para melhorar a confiabilidade dos resultados. Com a metodologia utilizando múltiplos marcadores foi possível detectar um maior número de genes associados a hérnia umbilical em suínos. Esse fato pode ser em decorrência desse método apresentar maior poder de detecção de genes de menor efeito para a característica, ou seja, que não atingiram o limiar de significância da metodologia de associação utilizando único marcador (WANG *et al.*, 2016b).

Desta forma, os genes que foram observados em ambas as metodologias possuem maior confiabilidade em influenciar o desenvolvimento de hérnias umbilical em suínos. No entanto, também alguns genes observados em apenas uma metodologia possuem importância para ocorrência a anomalia. Assim, pode-se dizer que os principais genes relacionados a anomalia prospectados em ambas as metodologias foram *GJA5*, *ACP6*, *BCL9* relacionados a MEC e *WARS2* ao sistema imunológico. Esses genes se mostraram muito próximos posicionalmente (Tabela 4 e Anexo D) e possuíram associação funcional entre os mesmos (Figura 5 e 9), para ambos os métodos utilizados, sugerindo que no cromossomo 4 do suíno haja uma região responsável à propensão para o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos comerciais. Já os genes prospectados pela metodologia de um único marcador *MTM1* e *MTMRI* no SSCX, e pela metodologia de múltiplos marcadores *EP300* no SSC5, *MSTN* no SSC15 e *EYA2* no SSC17, relacionados ao desenvolvimento do tecido muscular esquelético (Tabela 4 e 6), apresentaram notável importância na participação em bioprocessos relacionados ao desenvolvimento do tecido muscular, cuja fraqueza muscular abdominal é um dos principais processos citados como possíveis responsáveis pelo desenvolvimento de hérnia umbilical (MONSANG, 2014). Desta maneira, a associação posicional e funcional destes genes por ambas as metodologias, as interações gênicas entre eles e a participação em importantes PB possivelmente relacionados a ocorrência de hérnias indica que os mesmos estão intimamente ligados com o desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos.

Devido ao fato da metodologia de análise de associação utilizando múltiplos marcadores detectar genes de pequeno efeito, a análise de associação por múltiplos marcadores observou um maior número de genes associados à hérnia umbilical em suínos, quando relacionada à metodologia utilizando único marcador. Desta forma, 13 genes de grande relevância foram observados apenas pelo método utilizando múltiplos marcadores, dentre eles encontram-se os genes *EP300*, *MSTN*, *EYA2* e *ATF4* relacionados ao desenvolvimento do tecido muscular, *CCT2*, *SHC1*, *RANGAP1* e *NCBP1* à matriz extracelular e *PIAS3*, *TRIM33*, *TNFRSF1A*, *EIF1B* e *RBM8A* ao sistema imune. Estudos realizados identificando genes responsáveis a susceptibilidade à hérnia umbilical em suínos, corroboram com esses resultados. Uma vez que Li *et al.* (2019) identificou o gene *CAP9* como um forte gene candidato à desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, estando relacionado ao desenvolvimento e manutenção do tecido muscular. Souza *et al.*, (2020) por sua vez, também observaram *ACAN*, *MMPs*, *COLs*, *EPYC*, *VIT*, *CCBE1* e *LGALS3* como genes candidatos fortemente associados ao desenvolvimento de hérnia umbilical em suínos, uma vez que estão relacionados à produção de componentes e alteração da matriz extracelular, e na estabilidade do colágeno. Grindflek *et al.* (2018), observaram associados ao desenvolvimento de hérnia umbilical os genes *LIF* e *MIF* relacionados ao sistema imune, *PYCR1*, *MMP13* e *VCAN* envolvidos em estruturas do colágeno e conseqüentemente, relacionados a matriz extracelular e *VIM*, um gene relacionado ao desenvolvimento do tecido muscular e ao sistema imune.

2.5 CONCLUSÃO

Neste estudo, regiões genômicas foram associadas a manifestação de hérnia umbilical em suínos. Além disso, diversos genes candidatos relacionados a hérnia umbilical foram prospectados, muitos destes ainda não relatados na literatura. Nossos resultados identificam os genes *GJA5*, *BCL9*, *ACP6*, *WARS2*, *MTM1*, *MTMR1*, *EP300*, *MSTN* e *EYA2* relacionados a bioprocessos da MEC, do sistema imune e ao desenvolvimento do tecido muscular esquelético como fortemente associados a ocorrência de hérnia umbilical em suínos comerciais.

REFERÊNCIAS

AASEN, T.; JOHNSTONE, S.; VIDAL-BRIME, L.; LYNN, K. S.; KOVAL, M. Connexins: Synthesis, Post-Translational Modifications, and Trafficking in Health and Disease.

International Journal of Molecular Sciences, v. 19, n. 5, p. 1296, 2018.

AMACK, J. D.; MAHADEVAN, M. S. Myogenic defects in myotonic dystrophy. **Developmental Biology**, v. 265, n. 2, p. 294-301, 2004.

ARAKI, K.; NAGATA, K. Protein folding and quality control in the ER. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 11, p. a007526, 2011.

BADER, J. S. The relative power of SNPs and haplotype as genetic markers for association tests. **Pharmacogenomics**, v. 2, n. 1, p. 11-24, 2001.

BAI, D. Atrial fibrillation-linked GJA5/connexin40 mutants impaired gap junctions via different mechanisms. **FEBS Letters**, v. 588, n. 8, p. 1238-1243, 2014.

BALCHIN, D.; HAYER-HARTL, M.; HARTL, F. U. In vivo aspects of protein folding and quality control. **Science**, v. 353, n. 6294, 2016.

BAUER, S. M.; BAUER, R. J.; VELAZQUEZ, O. C. Angiogenesis, vasculogenesis, and induction of healing in chronic wounds. **Vascular and endovascular surgery**, v. 39, n. 4, p. 293–306, 2005.

BIELEFELD, K. A.; AMINI-NIK, S.; ALMAN, B. A. Cutaneous wound healing: Recruiting developmental pathways for regeneration. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 70, n. 12, p. 2059-2081, 2013.

BLOCKUS, H.; CHÉDOTAL, A. Slit-robo signaling. **Development**, v. 143, n. 17, p. 3037-3044, 2016.

BONAVENTURA, G.; LA COGNATA, V.; IEMMOLO, R.; ZIMBONE, M.; CONTINO, A.; MACCARRONE, G.; FAILLA, B.; BARCELLONA, M. L.; CONFORTI, F. L.; D'AGATA, V.; CAVALLARO, S. Ag-NPs induce apoptosis, mitochondrial damages and MT3/OSGIN2 expression changes in an in vitro model of human dental-pulp-stem-cells-derived neurons. **NeuroToxicology**, v. 67, p. 84–93, 2018.

BONNANS, C.; CHOU, J.; WERB, Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 786-801, 2014.

BRACK, A. S.; MURPHY-SEILER, F.; HANIFI, J.; DEKA, J.; EYCKERMAN, S.; KELLER, C.; AGUET, M.; RANDO, T. A. BCL9 is an essential component of canonical Wnt signaling that mediates the differentiation of myogenic progenitors during muscle regeneration. **Developmental Biology**, v. 335, n. 1, p. 93–105, 2009.

BRAUN, T.; GAUTEL, M. Transcriptional mechanisms regulating skeletal muscle differentiation, growth and homeostasis. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 12, n. 6, p. 349-361, 2011.

BRINGOLF, F. **Functional analysis and knock-down phenotype of BCL9 and BCL9L in cancer cell lines**. Ecole Polytechnique Federale de Lausanne, School of life Sciences, Lausanne, 2010.

BUJ-BELLO, A. Muscle-specific alternative splicing of myotubularin-related 1 gene is impaired in DM1 muscle cells. **Human Molecular Genetics**, v. 11, n. 19, p. 2297–2307, 2002.

CANTARINI, L.; RIGANTE, D.; MERLINI, G.; VITALE, A.; CASO, F.; LUCHERINI, O. M.; SFRISO, P.; FREDIANI, B.; PUNZI, L.; GALEAZZI, M.; CIMAZ, R.; OBICI, L. The expanding spectrum of low-penetrance TNFRSF1A gene variants in adults presenting with recurrent inflammatory attacks: Clinical manifestations and long-term follow-up. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 43, n. 6, p. 818–823, 2014.

CARR, A. C.; KHALED, A. S.; BASSIOUNI, R.; FLORES, O.; NIERENBERG, D.; BHATTI, H.; VISHNUBHOTLA, P.; MANUEL, J. P.; SANTRA, S.; KHALED, A. R. Targeting chaperonin containing TCP1 (CCT) as a molecular therapeutic for small cell lung cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 66, p. 110273–110288, 2017.

CARRASCOA, J. L.; LLORCA, O.; VALPUESTA, J. M. Structural comparison of prokaryotic and eukaryotic chaperonins. **Micron**, v. 32, n. 1, p. 43–50, 2001.

CHEN, Y.; STUMP, R. J. W.; LOVICU, F. J.; MCAVOY, J. W. A role for Wnt/planar cell polarity signaling during lens fiber cell differentiation? *In: Seminars in cell & developmental biology*. Department of Anatomy & Histology, The University of Sydney, New South Wales, Australia, p. 712-725, 2006.

CHENG, S. Y.; LEONARD, J. L.; DAVIS, P. J. Molecular aspects of thyroid hormone actions. **Endocrine Reviews**, v. 31, n. 2, p. 139-170, 2010.

CHODOROWSKA, G.; GŁOWACKA, A.; TOMCZYK, M. Leukemia inhibitory factor (LIF) and its biological activity. **Annales Universitatis Mariae Curie-Skłodowska. Sectio D: Medicina**, v. 59, n. 2, p. 189–93, 2004.

CHRYPLEWICZ, A.; TIENDA, S. M.; NAHOTKO, D. A.; PETERS, P. N.; LENGYEL, E.; ECKERT, M. A. Mutant p53 regulates LPA signaling through lysophosphatidic acid phosphatase type 6. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1-10, 2019.

COLEMAN, J. R.; EUESDEN, J.; PATEL, H.; FOLARIN, A. A.; NEWHOUSE, S.; BREEN, G. Quality control, imputation and analysis of genome-wide genotyping data from the Illumina HumanCoreExome microarray. **Briefings in Functional Genomics**, v. 15, n. 4, p. 298–304, 2016.

CORREA, R. G.; MILUTINOVIC, S.; REED, J. C. Roles of NOD1 (NLRC1) and NOD2 (NLRC2) in innate immunity and inflammatory diseases. **Bioscience reports**, v. 32, n. 6, p. 597-608, 2012.

CRÉTON, R.; KREILING, J. A.; JAFFE, L. F. Presence and roles of calcium gradients along the dorsal-ventral axis in *Drosophila* embryos. **Developmental Biology**, v. 217, n. 2, p. 375–385, 2000.

CROOK, M. B.; MITRA, S.; ANÉ, J. M.; SADOWSKY, M. J.; GYANESHWAR, P. Complete genome sequence of the *Sesbania* symbiont and rice growth-promoting endophyte *Rhizobium* sp. strain IRBG74. **Genome Announcements**, v. 1, n. 6, 2013.

- D'OSUALDO, A.; FERLITO, F.; PRIGIONE, I.; OBICI, L.; MEINI, A.; ZULIAN, F.; PONTILLO, A.; CORONA, F.; BARCELLONA, R.; DUCA, M. D.; SANTAMARIA, G.; TRAVERSO, F.; PICCO, P.; BALDI, M.; PLEBANI, A.; RAVAZZOLO, R.; CECCHERINI, I.; MARTINI, A.; GATTORNO, M. Neutrophils from patients with TNFRSF1A mutations display resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis: Pathogenetic and clinical implications. **Arthritis and Rheumatism**, v. 54, n. 3, p. 998–1008, 2006.
- DALAKAS, M. C.; HOHLFELD, R. Polymyositis and dermatomyositis. **The Lancet**, v. 362, n. 9388, p. 971-982, 2003.
- DAMGAARD, R. B.; NACHBUR, U.; YABAL, M.; WONG, W. W. L.; FIIL, B. K.; KASTIRR, M.; RIESER, E.; RICKARD, A.; BANKOVACKI, A.; PESCHEL, C.; RULAND, J.; BEKKER-JENSEN, S.; MAILAND, N.; KAUFMANN, T.; STRASSER, A.; WALCZAK, H.; SILKE, J.; JOST, P. J.; GYRD-HANSEN, M. The Ubiquitin Ligase XIAP Recruits LUBAC for NOD2 Signaling in Inflammation and Innate Immunity. **Molecular Cell**, v. 46, n. 6, p. 746–758, 2012.
- DEKKER, C.; STIRLING, P. C.; MCCORMACK, E. A.; FILMORE, H.; PAUL, A.; BROST, R. L.; COSTANZO, M.; BOONE, C.; LEROUX, M. R.; WILSON, K. R. The interaction network of the chaperonin CCT. **The EMBO Journal**, v. 27, n. 13, p. 1827–1839, 2008.
- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 1, p. 37–49, 2000.
- DERIBE, Y. L.; PAWSON, T.; DIKIC, I. Post-translational modifications in signal integration Nature Structural and Molecular Biology. **Nature structural & molecular biology**, v. 17, n. 6, p. 666-672, 2010.
- DEY, S.; SAVANT, S.; TESKE, B. F.; HATZOGLOU, M.; CALKHOVEN, C. F.; WEK, R. C. Transcriptional repression of ATF4 gene by CCAAT/enhancer-binding protein β (C/EBP β) differentially regulates integrated stress response. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 26, p. 21936–21949, 2012.
- DHARANCY, S.; BODY-MALAPEL, M.; LOUVET, A.; BERREBI, D.; GANTIER, E.; GOSSET, P.; VIALA, J.; HOLLEBECQUE, A.; MORENO, C.; PHILPOTT, D. J.; GIRARDIN, S. E.; SANSONETTI, P. J.; DESREUMAUX, P.; MATHURIN, P.; DUBUQUOY, L. Neutrophil Migration During Liver Injury Is Under Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1 Control. **Gastroenterology**, v. 138, n. 4, p. 1546-1556, 2010.
- DING, N. S.; MAO, H. R.; GUO, Y. M.; REN, J.; XIAO, S. J.; WU, G. Z.; RUAN, G. F.; BRENIG, B.; HUANG, L. S. A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian1. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 8, p. 2469–2474, 2009.
- DONG, C. TH17 cells in development: An updated view of their molecular identity and genetic programming. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 337-348, 2008.
- DONG, K. **Polyphosphoinositide-derived signals in the regulation of vacuole membrane fusion and fission**. University of Birmingham, Birmingham 2010.
- DRAGOŠ, A.; KOVÁCS, Á. T. The Peculiar Functions of the Bacterial Extracellular Matrix.

Trends in Microbiology, v. 25, n. 4, p. 257-266, 2017.

DUPONT, S.; MAMIDI, A.; CORDENONSI, M.; MONTAGNER, M.; ZACCHIGNA, L.; ADORNO, M.; MARTELLO, G.; STINCHFIELD, M. J.; SOLIGO, S.; MORSUT, L.; INUI, M.; MORO, S.; MODENA, N.; ARGENTON, J. F.; NEWFELD, S.; FLAUTIM, S. FAM/USP9x, a Deubiquitinating Enzyme Essential for TGF β Signaling, Controls Smad4 Monoubiquitination. **Cell**, v. 136, n. 1, p. 123–135, 2009.

EGUSQUIAGUIRRE, S. P.; YEH, J. E.; WALKER, S. R.; LIU, S.; FRANK, D. A. The STAT3 Target Gene TNFRSF1A Modulates the NF- κ B Pathway in Breast Cancer Cells. **Neoplasia**, v. 20, n. 5, p. 489–498, 2018.

ESPÍN, R.; ROCA, F. J.; CANDEL, S.; SEPULCRE, M. P.; GONZÁLEZ-ROSA, J. M.; ALCARAZ-PÉREZ, F.; MESENGUER, J.; CAYUELA, M. L.; MERCADER, N.; MULERO, V. TNF receptors regulate vascular homeostasis in zebrafish through a caspase-8, caspase-2 and P53 apoptotic program that bypasses caspase-3. **DMM Disease Models and Mechanisms**, v. 6, n. 2, p. 383–396, 2013.

ESPLUGUES, E.; HUBER, S.; GAGLIANI, N.; HAUSER, A. E.; TOWN, T.; WAN, Y. Y.; O'CONNOR, W.; RONGVAUX, A.; VAN ROOIJEN, N.; HABERMAN, A. M.; IWAKURA, Y.; KUCHROO, V. K.; KOLLS, J. K.; BLUESTONE, J. A.; HEROLD, K. C.; FLAVELL, R. A. Control of TH17 cells occurs in the small intestine. **Nature**, v. 475, n. 7357, p. 514–518, 2011.

EVANS, W. H.; DE VUYST, E.; LEYBAERT, L. The gap junction cellular internet: connexin hemichannels enter the signalling limelight. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 1, p. 1-14, 2006.

FERNANDES, L. T.; ONO, R. K.; IBELLI, A. M. G.; LAGOS, E. B.; MORÉS, M. A. Z.; CANTÃO, M. E.; LORENZETTI, W. R.; PEIXOTO, J de O.; PEDROSA, V. B.; LEDUR, M. C. Novel putative candidate genes associated with umbilical hernia in pigs. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Auckland, Nova Zelândia, 2018.

FRANTZ, C.; STEWART, K. M.; WEAVER, V. M. The extracellular matrix at a glance. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. 24, p. 4195-4200, 2010.

GAO, M.; DANIELSEN, J. R.; WEI, L. Z.; ZHOU, D. P.; XU, Q., LI, M. M.; WANG, Z. -Q.; TONG, W. -M.; YANG, Y. -G. A Novel Role of Human Holliday Junction Resolvase GEN1 in the Maintenance of Centrosome Integrity. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. e49687, 2012.

GAVRIILIDIS, C.; LAREDJ, L.; SOLINHAC, R.; MESSADDEQ, N.; VIAUD, J.; LAPORTE, J.; SUMARA, I.; HNIA, K. The MTM1-UBQLN2-HSP complex mediates degradation of misfolded intermediate filaments in skeletal muscle. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 198–210, 2018.

GERAMI, P.; COOK, R. W.; WILKINSON, J.; RUSSELL, M. C.; DHILLON, N.; AMARIA, R. N.; GONZALEZ, R.; LYLE, S.; JOHNSON, C. E.; OELSCHLAGER, K. M.; JACKSON, G. L.; GREISINGER, A. J.; MAETZOLD, D.; DELMAN, K. A.; LAWSON, D. H.; PEDRA, J. F. Development of a prognostic genetic signature to predict the metastatic risk associated

with cutaneous melanoma. **Clinical Cancer Research**, v. 21, n. 1, p. 175–183, 2015.

GOEBEL, H. H.; BLASCHEK, A. Protein Aggregation in Congenital Myopathies. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 18, n. 4, p. 272–276, 2011.

GOTOH, M.; FUJIWARA, Y.; YUE, J.; LIU, J.; LEE, S.; FELLS, J.; UCHIYAMA, A.; MURAKAMI-MUROFUSHI, K.; KENNEL, S.; WALL, J.; PATIL, R.; GUPTE, R.; BALAZS, L.; MILLER, D. D.; TIGYI, G. J. Controlling cancer through the autotaxin-lysophosphatidic acid receptor axis. **Biochemical Society Transactions**, v. 40, n. 1, 2012.

GRINDFLEK, E.; HANSEN, M. H.; LIEN, S.; VAN SON, M. Genome-wide association study reveals a QTL and strong candidate genes for umbilical hernia in pigs on SSC14. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, p. 412, 2018.

GRÖNROOS, E.; HELLMAN, U.; HELDIN, C. H.; ERICSSON, J. Control of Smad7 stability by competition between acetylation and ubiquitination. **Molecular Cell**, v. 10, n. 3, p. 483–493, 2002.

GUEST, S. T.; KRATCHE, Z. R.; BOLLIG-FISCHER, A.; HADDAD, R.; ETHIER, S. P. Two members of the TRiC chaperonin complex, CCT2 and TCP1 are essential for survival of breast cancer cells and are linked to driving oncogenes. **Experimental Cell Research**, v. 332, n. 2, p. 223–235, 2015.

HAN, S. H.; CHO, I. C.; CHO, Y. I.; PARK, Y. S.; KANG, T. Y. Effects of using Umbilical Hernia Animals as Breeding Pigs on the Reproductive Traits. **Journal of Veterinary Clinics**, v. 34, n. 2, p. 126, 2017.

HAUERSLEV, S.; SVEEN, M. L.; DUNO, M.; ANGELINI, C.; VISSING, J.; KRAG, T. O. Calpain 3 is important for muscle regeneration: Evidence from patients with limb girdle muscular dystrophies. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2012.

HEBERLE, H.; MEIRELLES, G. V.; DA SILVA, F. R.; TELLES, G. P.; MINGHIM, R. InteractiVenn: A web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**, v. 16, n. 1, p. 1-7, 2015.

HENRIKSEN, N. A.; MORTENSEN, J. H.; SORENSEN, L. T.; BAY-JENSEN, A. C.; ÅGREN, M. S.; JORGENSEN, L. N.; KARSDAL, M. A. The collagen turnover profile is altered in patients with inguinal and incisional hernia. **Surgery**, v. 157, n. 2, p. 312–321, 2015.

HENRIKSEN, N. A.; MORTENSEN, J. H.; LORENTZEN, L.; ÅGREN, M. S.; BAY-JENSEN, A. C.; JORGENSEN, L. N.; KARSDAL, M. A. Abdominal wall hernias—A local manifestation of systemically impaired quality of the extracellular matrix. **Surgery**, v. 160, n. 1, p. 220-227, 2016.

HERMAN-IZYCKA, J.; WLASNOWOLSKI, M.; WILCZYNSKI, B. Taking promoters out of enhancers in sequence based predictions of tissue-specific mammalian enhancers. **BMC Medical Genomics**, v. 10, n. S1, p. 34, 2017.

- HICKFORD, J. G. H.; FORREST, R. H.; ZHOU, H.; FANG, Q.; HAN, J.; FRAMPTON, C. M.; HORRELL, A. L. Polymorphisms in the ovine *myostatin* gene (*MSTN*) and their association with growth and carcass traits in New Zealand Romney sheep. **Animal Genetics**, v. 41, n. 1, p. 64–72, 2010.
- LE HIR, H.; GATFIELD, D.; BRAUN, I. C.; FORLER, D.; IZAURRALDE, E. The protein Mago provides a link between splicing and mRNA localization. **EMBO reports**, v. 2, n. 12, p. 1119–1124, 2001.
- HJERPE, R.; BETT, J. S.; KEUSS, M. J.; SOLOVYOVA, A.; MCWILLIAMS, T. G.; JOHNSON, C.; SAHU, I.; VARGHESE, J.; WOOD, N.; WIGHTMAN, M.; ORBORNE, G.; BATES, G. P.; GLICKMAN, M. H.; TROST, M.; KNEBEL, A.; MARCHESI, F.; KURZ, T. UBQLN2 Mediates Autophagy-Independent Protein Aggregate Clearance by the Proteasome. **Cell**, v. 166, n. 4, p. 935–949, 2016.
- HNIA, K.; RAMSPACHER, C.; VERMOT, J.; LAPORTE, J. Desmin in muscle and associated diseases: beyond the structural function. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 3, p. 591–608, 2015.
- HOSHINO, K.; MURO, Y.; SUGIURA, K.; TOMITA, Y.; NAKASHIMA, R.; MIMORI, T. Anti-MDA5 and anti-TIF1-c antibodies have clinical significance for patients with dermatomyositis. **Rheumatology**, v. 49, n. 9, p. 1726–1733, 2010.
- HOTFINDER, M.; BAXENDALE, S.; CROSS, M. A.; SABLITZKY, F. Def-2, -3, -6 and -8, novel mouse genes differentially expressed in the haemopoietic system. **British Journal of Haematology**, v. 106, n. 2, p. 335–344, 1999.
- HU, W.; CHEN, S.; ZHANG, R.; LIN, Y. Single nucleotide polymorphisms in the upstream regulatory region alter the expression of myostatin. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal**, v. 49, n. 6, p. 417–423, 2013.
- HUBMACHER, D.; APTE, S. S. The biology of the extracellular matrix: Novel insights. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 25, n. 1, p. 65, 2013.
- HUMPHREY, J. D.; DUFRESNE, E. R.; SCHWARTZ, M. A. Mechanotransduction and extracellular matrix homeostasis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 12, p. 802–812, 2014.
- HUNTER, T. Why nature chose phosphate to modify proteins. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1602, p. 2513–2516, 2012.
- INAKI, M.; KATO, D.; UTSUGI, T.; ONODA, F.; HANAOKA, F.; MURAKAMI, Y. Genetic analyses using a mouse cell cycle mutant identifies magoh as a novel gene involved in Cdk regulation. **Genes to Cells**, v. 16, n. 2, p. 166–178, 2011.
- ISHIGAKI, Y.; NAKAMURA, Y.; TATSUNO, T.; HASHIMOTO, M.; IWABUCHI, K.; TOMOSUGI, N. RNA-binding protein RBM8A (Y14) and MAGOH localize to centrosome in human A549 cells. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 141, n. 1, p. 101–109, 2014.

JACKSON, P. K. A new RING for SUMO: Wrestling transcriptional responses into nuclear bodies with PIAS family E3 SUMO ligases. **Genes and Development**, v. 15, n. 23, p. 3053-3058, 2001.

JIN, Y.; BAI, Y.; NI, H.; QIANG, L.; YE, L.; SHAN, Y.; ZHOU, M. Activation of autophagy through calcium-dependent AMPK/mTOR and PKC θ pathway causes activation of rat hepatic stellate cells under hypoxic stress. **FEBS Letters**, v. 590, n. 5, p. 672–682, 2016.

JU, L.; WING, J.; TAYLOR, E.; BRANDT, R.; SLIJEPCEVIC, P.; HORSCH, M.; RATHKOLB, B.; RÁCZ, I.; BECKER, L.; HANS, W.; ADLER, T.; BECKERS, J.; ROZMAN, J.; KLINGENSPOR, M.; WOLF, E.; ZIMMER, A.; KLOPSTOCK, T.; BUSCH, D. H.; GAILUS-DURNER, V.; FUCHS, H.; DE ANGELIS, M. H.; VAN DER HORST, G.; LEHMANN, A. R. SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities. **DNA Repair**, v. 12, n. 5, p. 356–366, 2013.

JUNGBLUT, P. R.; HOLZHÜTTER, H. G.; APWEILER, R.; SCHLÜTER, H. The speciation of the proteome. **Chemistry Central Journal**, v. 2, n. 1, p. 1-10, 2008.

KEßLER, J.; ROT, S.; BACHE, M.; KAPPLER, M.; WÜRL, P.; VORDERMARK, D.; TAUBERT, H.; GREITHER, T. miR-199a-5p regulates HIF-1 α and OSGIN2 and its expression is correlated to soft-tissue sarcoma patients' outcome. **Oncology Letters**, v. 12, n. 6, p. 5281–5288, 2016.

KETEL, K.; KRAUSS, M.; NICOT, A. S.; PUCHKOV, D.; WIEFFER, M.; MÜLLER, R.; SUBRAMANIAN, D.; SCHULTZ, C.; LAPORTE, J.; HAUCKE, V. A phosphoinositide conversion mechanism for exit from endosomes. **Nature**, v. 529, n. 7586, p. 408–412, 2016.

KILBERG, M. S.; BALASUBRAMANIAN, M.; FU, L.; SHAN, J. The Transcription Factor Network Associated With the Amino Acid Response in Mammalian Cells. **Advances in Nutrition**, v. 3, n. 3, p. 295–306, 2012.

KINSELLA, R. J.; KÄHÄRI, A.; HAIDER, S.; ZAMORA, J.; PROCTOR, G.; SPUDICH, G.; ALMEIDA-KING, J.; STAINES, D.; DERWENT, P.; KERHORNOU, A.; KERSEY, P.; FLICEK, P. Ensembl BioMarts: A hub for data retrieval across taxonomic space. **Database**, v. 2011, 2011.

KRAMPS, T.; PETER, O.; BRUNNER, E.; NELLEN, D.; FROESCH, B.; CHATTERJEE, S.; MURONE, M.; ZULLING, S.; BASLER, K. Wnt/Wingless signaling requires BCL9/legless-mediated recruitment of pygopus to the nuclear β -catenin-TCF complex. **Cell**, v. 109, n. 1, p. 47–60, 2002.

LAI, M. B.; ZHANG, C.; SHI, J.; JOHNSON, V.; KHANDAN, L.; MCVEY, J.; KLYMKOWSKY, M. W.; CHEN, Z.; JUNGE, H. J. TSPAN12 is a Norrin co-receptor that amplifies Frizzled4 ligand selectivity and signaling. **Cell reports**, v. 19, n. 13, p. 2809-2822, 2017.

LAPORTE, J.; BIANCALANA, V.; TANNER, S. M.; KRESS, W.; SCHNEIDER, V.; WALLGREN-PETTERSSON, C.; HERGER, F.; BUJ-BELLO, A.; BLONDEAU, F.; LIECHTI-GALLATI, S.; MANDEL, J. -L. MTM1 mutations in X-linked myotubular myopathy. **Human Mutation**, v. 15, n. 5, p. 393–409, 2000.

- LEDUR, M. C.; NAVARRO, N.; PÉREZ-ENCISO, M. Data modeling as a main source of discrepancies in single and multiple marker association methods. **BMC Proceedings**, v. 3, n. S1, p. S9, 2009.
- LEVY, D. E.; DARNELL, J. E. STATs: transcriptional control and biological impact. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 3, n. 9, p. 651–662, 2002.
- LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: The leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, n. 9, p. 678–689, 2007.
- LI, J.; DONG, Y.; LÜ, X.; WANG, L.; PENG, W.; ZHANG, X. C.; RAO, Z. Crystal structures and biochemical studies of human lysophosphatidic acid phosphatase type 6. **Protein and Cell**, v. 4, n. 7, p. 548–561, 2013.
- LI, J.; ZHANG, Y.-P.; KIRSNER, R. S. Angiogenesis in wound repair: Angiogenic growth factors and the extracellular matrix. **Microscopy Research and Technique**, v. 60, n. 1, p. 107–114, 2003.
- LI, J.; ZHOU, Y.; ELSTON, R. C. Haplotype-based quantitative trait mapping using a clustering algorithm. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 258, 2006.
- LI, J.; DONG, Y.; LÜ, X.; WANG, L.; PENG, W.; ZHANG, X. C.; RAO, Z. Protein Cell Protein Cell Protein Cell & Crystal structures and biochemical studies of human lysophosphatidic acid phosphatase type 6. **Protein Cell**, v. 2013, n. 7, p. 548–561, 2013.
- LI, S.; IAKOUCHEVA, L. M.; MOONEY, S. D.; RADIVOJAC, P. Loss of post-translational modification sites in disease. In: **Biocomputing 2010**. p. 337–347, 2010.
- LI, X.; XU, P.; ZHANG, C.; SUN, C.; LI, X.; HAN, X.; LI, M.; QIAO, R. Genome-wide association study identifies variants in the CAPN9 gene associated with umbilical hernia in pigs. **Animal Genetics**, v. 50, n. 2, p. 162–165, 2019.
- LIAO, X. J.; LI, L.; ZHANG, Z. Y.; LONG, Y.; YANG, B.; RUAN, G. R.; SU, Y.; AI, H. S.; ZHANG, W. C.; DENG, W. Y.; XIAO, S. J.; REN, J.; DING, N. S.; HUANG, L. S. Susceptibility loci for umbilical hernia in swine detected by genome-wide association. **Russian Journal of Genetics**, v. 51, n. 10, p. 1000–1006, 2015.
- LOGAN, C. Y.; NUSSE, R. THE WNT SIGNALING PATHWAY IN DEVELOPMENT AND DISEASE. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 20, n. 1, p. 781–810, 2004.
- LONG, Y.; SU, Y.; AI, H.; ZHANG, Z.; YANG, B.; RUAN, G.; XIAO, S.; LIAO, X.; REN, J.; HUANG, L.; DING, N. A genome-wide association study of copy number variations with umbilical hernia in swine. **Animal Genetics**, v. 47, n. 3, p. 298–305, 2016.
- LU, P.; TAKAI, K.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. Extracellular Matrix degradation and remodeling in development and disease. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 12, p. a005058, 2011.

- MA, B.; HOTTIGER, M. O. Crosstalk between Wnt/ β -catenin and NF- κ B signaling pathway during inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 7, p. 378, 2016.
- MAILUND, T.; BESENBACHER, S.; SCHIERUP, M. H. Whole genome association mapping by incompatibilities and local perfect phylogenies. **BMC Bioinformatics**, v. 7, n. 1, p. 454, 2006.
- MAK, T. W.; FERRICK, D. A. The $\gamma\delta$ T-cell bridge: Linking innate and acquired immunity. **Nature Medicine**, v. 4, n. 7, p. 764–765, 1998.
- MALHOTRA, N.; ROBERTSON, E.; KANG, J. SMAD2 is essential for TGF β -mediated Th17 cell generation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 38, p. 29044–29048, 2010.
- MANN, C. J.; PERDIGUERO, E.; KHARRAZ, Y.; AGUILAR, S.; PESSINA, P.; SERRANO, A. L.; MUÑOZ-CÁNOVES, P. Aberrant repair and fibrosis development in skeletal muscle. **Skeletal Muscle**, v. 1, n. 1, p. 21, 2011.
- MARTINELLI, R.; ZEIGER, A. S.; WHITFIELD, M.; SCIUTO, T. E.; DVORAK, A.; VAN VLIET, K. J.; GREENWOOD, J.; CARMAN, C. V. Probing the biomechanical contribution of the endothelium to lymphocyte migration: Diapedesis by the path of least resistance. **Journal of Cell Science**, v. 127, n. 17, p. 3720–3734, 2014.
- MATOS, J.; WEST, S. C. Holliday junction resolution: Regulation in space and time. **DNA Repair**, v. 19, p. 176–181, 2014.
- MATUNIS, M. J.; COUTAVAS, E.; BLOBEL, G. A novel ubiquitin-like modification modulates the partitioning of the Ran-GTPase-activating protein RanGAP1 between the cytosol and the nuclear pore complex. **The Journal of cell biology**, v. 135, n. 6, p. 1457–1470, 1996.
- MAURO, A. Satellite cell of skeletal muscle fibers. **The Journal of biophysical and biochemical cytology**, v. 9, n. 2, p. 493–495, 1961.
- MAYANAGI, T.; SOBUE, K. Diversification of caldesmon-linked actin cytoskeleton in cell motility. **Cell Adhesion & Migration**, v. 5, n. 2, p. 150–159, 2011.
- MCENTAGART, M.; PARSONS, G.; BUJ-BELLO, A.; BIANCALANA, V.; FENTON, I.; LITTLE, M.; KRAWCZAK, M.; THOMAS, N.; HERMAN, G.; CLARKE, A.; WALLGREN-PETTERSSON, C. Genotype-phenotype correlations in X-linked myotubular myopathy. **Neuromuscular Disorders**, v. 12, n. 10, p. 939–946, 2002.
- MCPHERRON, A. C.; HUYNH, T. V.; LEE, S. J. Redundancy of myostatin and growth/differentiation factor 11 function. **BMC Developmental Biology**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2009.
- MENDIAS, C. L.; BAKHURIN, K. I.; FAULKNER, J. A. Tendons of myostatin-deficient mice are small, brittle, and hypocellular. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 105, n. 1, p. 388–393, 2008.

MINEGISHI, Y.; NAKAYA, N.; TOMAREV, S. I. Mutation in the Zebrafish *cct2* gene leads to abnormalities of cell cycle and cell death in the Retina: A model of CCT2-related leber congenital amaurosis. **Investigative Ophthalmology and Visual Science**, v. 59, n. 2, p. 995–1004, 2018.

MISHRA, S.; TANG, Y.; WANG, L.; DEGRAFFENRIED, L.; YEH, I. T.; WERNER, S.; TROYER, D.; COPLAND, J. A.; SUN, L. -Z.; SUN, L. Z. Blockade of transforming growth factor-beta (TGF β) signaling inhibits osteoblastic tumorigenesis by a novel human prostate cancer cell line. **The Prostate**, v. 71, n. 13, p. 1441–1454, 2011.

MOE, A. M.; GOLDING, A. E.; BEMENT, W. M. Cell healing: Calcium, repair and regeneration. In: **Seminars in Cell and Developmental Biology**, p. 18-23, 2015.

MONSANG, S. W. Surgical Management of Concurrent Umbilical Hernia and Intestinal Fecolith in a white Yorkshire Piglet; Case Report. **Research Journal for Veterinary Practitioners**, v. 2, n. 4, p. 67–69, 2014.

MULLER, W. A. PECAM: Regulating the start of diapedesis. In: **Adhesion Molecules: Function and Inhibition**. Birkhäuser Basel, p. 201–220, 2007.

MULLER, W. A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 6, n. 1, p. 323–344, 2011.

MUROMOTO, R.; TAIRA, N.; IKEDA, O.; SHIGA, K.; KAMITANI, S.; TOGI, S.; KAWAKAMI, S.; SEKINE, Y.; NANBO, A.; ORITANI, K.; MATSUDA, T. The exon-junction complex proteins, Y14 and MAGOH regulate STAT3 activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 382, n. 1, p. 63–68, 2009.

NAM, G.; LEE, Y. K.; LEE, H. Y.; MA, M. J.; ARAKI, M.; ARAKI, K.; LEE, S.; LEE, I. - S.; CHOI, E. Y. Interaction of CD99 with Its Paralog CD99L2 Positively Regulates CD99L2 Trafficking to Cell Surfaces. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 11, p. 5730–5742, 2013.

NDLOVU, M. N.; VAN LINT, C.; VAN WESEMAEL, K.; CALLEBERT, P.; CHALBOS, D.; HAEGEMAN, G.; BERGHE, W. V. Hyperactivated NF- κ B and AP-1 Transcription Factors Promote Highly Accessible Chromatin and Constitutive Transcription across the Interleukin-6 Gene Promoter in Metastatic Breast Cancer Cells. **Molecular and Cellular Biology**, v. 29, n. 20, p. 5488–5504, 2009.

NEWBURGER, P. E. Disorders of neutrophil number and function. **Hematology**, v. 2006, n. 1, p. 104-110, 2006.

O'GRADY, S. M.; SO, Y. L. Molecular diversity and function of voltage-gated (Kv) potassium channels in epithelial cells. **The international journal of biochemistry & cell biology**, v. 37, n. 8, p. 1578-1594, 2005.

ORDAN, E.; BRANKATSCHK, M.; DICKSON, B.; SCHNORRER, F.; VOLK, T. (2015).

Slit cleavage is essential for producing an active, stable, non-diffusible short-range signal that guides muscle migration. **Development**, v. 142, n. 8, 1431-1436.

ORDAN, E.; VOLK, T. A non-signaling role of Robo2 in tendons is essential for Slit processing and muscle patterning. *Development*, v. 142, n. 20, p. 3512-3518, 2015. PARK, J.-H. *et al.* RICK/RIP2 Mediates Innate Immune Responses Induced through Nod1 and Nod2 but Not TLRs. **The Journal of Immunology**, v. 178, n. 4, p. 2380–2386, 2007.

PEIFER, M. Wnt Signaling in Oncogenesis and Embryogenesis--a Look Outside the Nucleus. **Science**, v. 287, n. 5458, p. 1606–1609, 2000.

PENNISI, C. P.; DOLATSHAHI-PIROUZ, A.; FOSS, M.; CHEVALLIER, J.; FINK, T.; ZACHAR, V.; BESENBACHER, F.; YOSHIDA, K. Nanoscale topography reduces fibroblast growth, focal adhesion size and migration-related gene expression on platinum surfaces. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 85, n. 2, p. 189–197, 2011.

PETERSEN, H. H.; NIELSEN, E. O.; HASSING, A. G.; ERSBØLL, A. K.; NIELSEN, J. P. Prevalence of clinical signs of disease in Danish finisher pigs. **The Veterinary record**, v. 162, n. 12, p. 377–82, 2008.

PETIT, V.; PARCELIER, A.; MATHÉ, C.; BARROCA, V.; TORRES, C.; LEWANDOWSKI, D.; FERRI, F.; GALLOUET, A. -S.; DALLOZ, M.; DINET, O.; BOSCHETTI, G.; VOZENIN, M.; -C., ROMÉO, P. -H. TRIM33 deficiency in monocytes and macrophages impairs resolution of colonic inflammation. **EBioMedicine**, v. 44, p. 60–70, 2019.

POMMEREHN, L.; TAKEUTI, K.; NEIS, L.; BARCELLOS, D. Hérnias : patogenia e causas em leitões. **A Hora Veterinária**, v. 34, p. 62–65, 2014.

PROELL, M.; RIEDL, S. J.; FRITZ, J. H.; ROJAS, A. M.; SCHWARZENBACHER, R. The Nod-Like Receptor (NLR) family: A tale of similarities and differences. **PLoS ONE**, v. 3, n. 4, p. e2119, 2008.

PURCELL, S.; NEALE, B.; TODD-BROWN, K.; THOMAS, L.; FERREIRA, M. A.; BENDER, D.; MALLER, J.; SKLAR, P.; DE BAKKER, P. I. W.; DALY, M. J.; SHAM, P. C. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 3, p. 559–575, 2007.

QUIRÓS, P. M.; PRADO, M. A.; ZAMBONI, N.; D'AMICO, D.; WILLIAMS, R. W.; FINLEY, D.; GYGI, S. P.; AUWERX, J. Multi-omics analysis identifies ATF4 as a key regulator of the mitochondrial stress response in mammals. **Journal of Cell Biology**, v. 216, n. 7, p. 2027–2045, 2017.

RAESS, M. A.; COWLING, B. S.; BERTAZZI, D. L.; KRETZ, C.; RINALDI, B.; XUEREB, J. M.; KESSLER, P.; ROMERO, N. B.; PAYRASTRE, B.; FRIANT, S.; LAPORTE, J. Expression of the neuropathy-associated MTMR2 gene rescues MTM1-associated myopathy. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 19, p. 3736–3748, 2017.

REED, A. M.; PICORNELL, Y. J.; HARWOOD, A.; KREDICH, D. W. Chimerism in children with juvenile dermatomyositis. **Lancet**, v. 356, n. 9248, p. 2156–2157, 2000.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J. P.; SCHENKEL, F. S. A new approach for efficient genotype imputation using information from relatives. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 478, 2014.

SARRAZY, V.; BILLET, F.; MICALLEF, L.; COULOMB, B.; DESMOULIÈRE, A. Mechanisms of pathological scarring: Role of myofibroblasts and current developments. **Wound Repair and Regeneration**, v. 19, p. s10–s15, 2011.

SAYDMOHAMMED, M.; JOSEPH, D.; SYED, V. Curcumin suppresses constitutive activation of STAT-3 by up-regulating protein inhibitor of activated STAT-3 (PIAS-3) in ovarian and endometrial cancer cells. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 110, n. 2, p. 447–456, 2010.

SCHEJTER, E. D.; BAYLIES, M. K. Born to run: creating the muscle fiber. **Current opinion in cell biology**, v. 22, n. 5, p. 566–574, 2010.

SCHENKEL, A. R.; DUFOUR, E. M.; CHEW, T. W.; SORG, E.; MULLER, W. A. The Murine CD99-Related Molecule CD99-Like 2 (CD99L2) Is an Adhesion Molecule Involved in the Inflammatory Response. **Cell Communication & Adhesion**, v. 14, n. 5, p. 227–237, 2007.

SEARCY-BERNAL, R.; GARDNER, I. A.; HIRD, D. W. Effects of and factors associated with umbilical hernias in a swine herd. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v. 204, n. 10, p. 1660–4, 1994.

PATNI, N.; GARG, A. Congenital generalized lipodystrophies—new insights into metabolic dysfunction. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 11, n. 9, p. 522, 2015.

SERRANO, A. L.; MANN, C. J.; VIDAL, B.; ARDITE, E.; PERDIGUERO, E.; MUNOZ-CANOVES, P. Cellular and molecular mechanisms regulating fibrosis in skeletal muscle repair and disease. In: **Current topics in developmental biology**. Academic Press, 2011. p. 167–201.

SHOULDERS, M. D.; RAINES, R. T. Collagen Structure and Stability. **Annual Review of Biochemistry**, v. 78, n. 1, p. 929–958, 2009.

SHUAI, K.; LIU, B. Regulation of gene-activation pathways by pias proteins in the immune system. **Nature Reviews Immunology**, v. 5, n. 8, p. 593–605, 2005.

SILVER, D. L.; WATKINS-CHOW, D. E.; SCHRECK, K. C.; PIERFELICE, T. J.; LARSON, D. M.; BURNETTI, A. J.; LIAW, H. -J.; MYUNG, K.; WALSH, C.; GAIANO, N.; PAVAN, W. J. The exon junction complex component Magoh controls brain size by regulating neural stem cell division. **Nature Neuroscience**, v. 13, n. 5, p. 551–558, 2010.

SOUSOUNIS, K.; BRYANT, D. M.; FERNANDEZ, J. M.; EDDY, S. S.; TSAI, S. L.; GUNDBERG, G. C.; HAN, J.; COURTEMANCHE, K.; LEVIN, M.; WHITED, J. L. Eya2 promotes cell cycle progression by regulating DNA damage response during vertebrate limb

regeneration. **Elife**, v. 9, p. e51217, 2020.

SOUZA, M. R.; IBELLI, A. M. G.; SAVOLDI, I. R.; CANTÃO, M. E.; PEIXOTO, J. D. O.; MORES, M. A. Z.; LOPES, J. S.; COUTINHO, L. L.; LEDUR, M. C. Transcriptome analysis identifies genes involved with the development of umbilical hernias in pigs. **PLoS one**, v. 15, n. 5, p. e0232542, 2020.

SUDO, H.; TSUJI, A. B.; SUGYO, A.; KOHDA, M.; SOGAWA, C.; YOSHIDA, C.; HARADA, Y. -N.; HINO, O.; SAGA, T. Knockdown of copa, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. **Genomics**, v. 95, n. 4, p. 210–216, 2010.

SUN, Y.; HILLS, M. D.; WILLY, G. Y.; TONG, X.; BAI, D. Atrial fibrillation-linked germline GJA5/connexin40 mutants showed an increased hemichannel function. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e95125, 2014.

SUPEK, F.; BOŠNJAK, M.; ŠKUNCA, N.; ŠMUC, T. REVIGO Summarizes and Visualizes Long Lists of Gene Ontology Terms. **PLoS ONE**, v. 6, n. 7, p. e21800, 2011.

TARGOFF, I. N. Laboratory testing in the diagnosis and management of idiopathic inflammatory myopathies. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 28, n. 4, p. 859-90, 2002.

THEOCHARIS, A. D.; SKANDALIS, S. S.; GIALELI, C.; KARAMANOS, N. K. **Advanced drug delivery reviews**, v. 97, p. 4-27, 2016.

TORISEVA, M.; LAATO, M.; CARPÉN, O.; RUOHONEN, S. T.; SAVONTAUS, E.; INADA, M.; KRANE, S. M.; KÄHÄRI, V. M. MMP-13 regulates growth of wound granulation tissue and modulates gene expression signatures involved in inflammation, proteolysis, and cell viability. **PLoS ONE**, v. 7, n. 8, 7 2012.

TRAVASSOS, L. H.; CARNEIRO, L. A.; RAMJEET, M.; HUSSEY, S.; KIM, Y. G.; MAGALHÃES, J. G.; YUAN, L.; SOARES, F.; CHEA, E.; BOURHIS, L. L.; BONECA, I. G.; ALLAOUI, A.; JONES, N. L.; NUÑES, G.; GIRARDIN, S. E.; PHILPOTT, D. J. Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry. **Nature Immunology**, v. 11, n. 1, p. 55–62, 2010.

TSAI, A. C. H.; DOSSETT, C. J.; WALTON, C. S.; CRAMER, A. E.; ENG, P. A.; NOWAKOWSKA, B. A.; PURSLEY, A. N.; STANKIEWICZ, P.; WISZNIEWSKA, J.; CHEUNG, S. W. Exon deletions of the EP300 and CREBBP genes in two children with Rubinstein-Taybi syndrome detected by aCGH. **European Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 1, p. 43–49, 2011.

TURNER, A. S.; MCILWRAITH, C. W. **Techniques in large animal surgery**. 2 ed. Colorado, 1989.

URREGO, D.; TOMCZAK, A. P.; ZAHED, F.; STÜHMER, W.; PARDO, L. A. Potassium channels in cell cycle and cell proliferation *Philosophical Transactions of the Royal Society. B: Biological Sciences*, v. 369, n. 1638, p. 20130094, 2014.

VAN DE VIJVER, E.; VAN DEN BERG, T. K.; KUIJPERS, T. W. Leukocyte Adhesion Deficiencies. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 27, n. 1, p. 101-116, 2013.

VERONEZE, R.; BASTIAANSEN, J. W.; KNOL, E. F.; GUIMARÃES, S. E.; SILVA, F. F.; HARLIZIUS, B.; LOPES, M. S.; LOPES, P. S. Linkage disequilibrium patterns and persistence of phase in purebred and crossbred pig (*Sus scrofa*) populations. **BMC genetics**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2014.

VISSCHER, P. M.; WRAY, N. R.; ZHANG, Q.; SKLAR, P.; MCCARTHY, M. I.; BROWN, M. A.; YANG, J. 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 101, n. 1, p. 5–22, 2017.

WANG, B.; XIAO, Y.; DING, B. B.; ZHANG, N.; YUAN, X. B.; GUI, L.; QIAN, K. -X.; DUAN, S.; CHEN, Z.; RAO, Y.; GENG, J. G. Induction of tumor angiogenesis by Slit-Robo signaling and inhibition of cancer growth by blocking Robo activity. **Cancer cell**, v. 4, n. 1, pág. 19-29, 2003.

WANG, M.; SIPS, P.; KHIN, E.; ROTIVAL, M.; SUN, X.; AHMED, R.; WIDJAJA, A. A.; SCHAFER, S.; YUSOFF, P.; CHOKSI, P. K.; KO, N. S. J.; SINGH, M. K.; EPSTEIN, D.; GUAN, Y.; HOUSTEK, J.; MRACEK, T.; NUSKOVA, H.; MIKELL, B.; TAN, J.; PESCE, F.; KOLAR, F.; BOTTOLO, L.; MANCINI, M.; HUBNER, N.; PRAVENEC, M.; PETRETTO, R.; MACRAE, C.; COOK, S. A. Wars2 is a determinant of angiogenesis. **Nature Communications**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2016a.

WANG, S. B.; FENG, J. Y.; REN, W. L.; HUANG, B.; ZHOU, L.; WEN, Y. J.; ZHANG, J.; DUNWELL, J. M.; XU, S.; ZHANG, Y. -M. Improving power and accuracy of genome-wide association studies via a multi-locus mixed linear model methodology. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 1–10, 2016b.

WEYAND, C. M.; GORONZY, J. J. Aging of the immune system: Mechanisms and therapeutic targets. **Annals of the American Thoracic Society**, v. 13, n. Suplemento 5, p. S422-S428, 2016.

WHITE, S.; SATTA, S.; HAZELL, G.; TEASDALE, J.; SALA-NEWBY, G.; JOHNSON, T.; JOHNSON, J.; NEWBY, A.; ALEXANDER, Y. 134 Osgin1 and osgin2 regulate adhesion of HCAEC and potentially contribute to endothelial erosion overlying stenotic plaques. **BMJ Journals**, v.4, n.6, p. A1-A118, 2018.

XU, J.; ATTISANO, L. Mutations in the tumor suppressors Smad2 and Smad4 inactivate transforming growth factor β signaling by targeting Smads to the ubiquitin-proteasome pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 9, p. 4820–4825, 2000.

XU, T.; DU, Y.; FANG, X. B.; CHEN, H.; ZHOU, D. D.; WANG, Y.; ZHANG, L. New insights into Nod-like receptors (NLRs) in liver diseases. **International journal of physiology, pathophysiology and pharmacology**, v. 10, n. 1, p. 1–16, 2018.

YANAGISAWA, S.; KATO, M.; OSHIO, T.; MORIKAWA, Y. Reappraisal of adhesive strapping as treatment for infantile umbilical hernia. **Pediatrics International**, v. 58, n. 5, p. 363–368, 2016.

YUNG, Y. C.; STODDARD, N. C.; CHUN, J. LPA receptor signaling: pharmacology, physiology, and pathophysiology. **Journal of lipid research**, v. 55, n. 7, p. 1192-1214, 2014.

ZARBOCK, A.; LEY, K.; MCEVER, R. P.; HIDALGO, A. Leukocyte ligands for endothelial selectins: Specialized glycoconjugates that mediate rolling and signaling under flow. **Blood**, v. 118, n. 26, p. 6743-6751, 2011.

ZHANG, C.; MUKHERJEE, S.; TUCKER - BURDEN, C.; ROSS, J. L.; CHAU, M. J.; KONG, J.; BRAT, D. J. TRIM8 regulates stemness in glioblastoma through PIAS3-STAT3. **Molecular Oncology**, v. 11, n. 3, p. 280–294, 2017a.

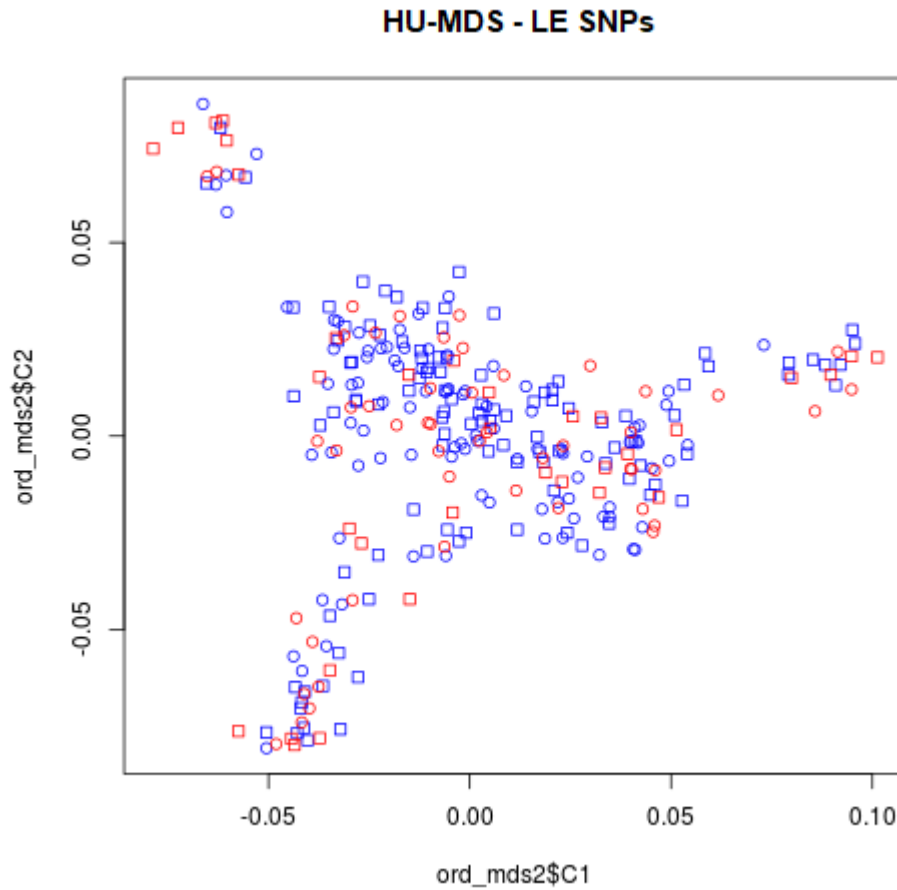
ZHANG, Z.; CHANG, Y.; ZHANG, J.; LU, Y.; ZHENG, L.; HU, Y.; ZHANG, F.; LI, X.; ZHANG, W.; LI, X. HMGB3 promotes growth and migration in colorectal cancer by regulating WNT/ β -catenin pathway. **PLoS ONE**, v. 12, n. 7, 2017b.

ZHAO, H.; SUN, Z.; WANG, J.; HUANG, H.; KOCHER, J. P.; WANG, L. CrossMap: a versatile tool for coordinate conversion between genome assemblies. **Oxford**, v. 34, n. 8, p. 1401–1403, 2017.

ZHENG, Y.; ZHANG, C.; CROUCHER, D. R.; SOLIMAN, M. A.; ST-DENIS, N.; PASCULESCU, A.; TAYLOR, L.; TATE, S. A.; HARDY, W. R.; COLWILL, K.; DAI, A. Y.; DENNIS, J. W.; GINGRAS, A. -C.; DALY, R. J.; PAWSON, T. Temporal regulation of EGF signalling networks by the scaffold protein Shc1. **Nature**, v. 499, n. 7457, p. 166–171, 2013.

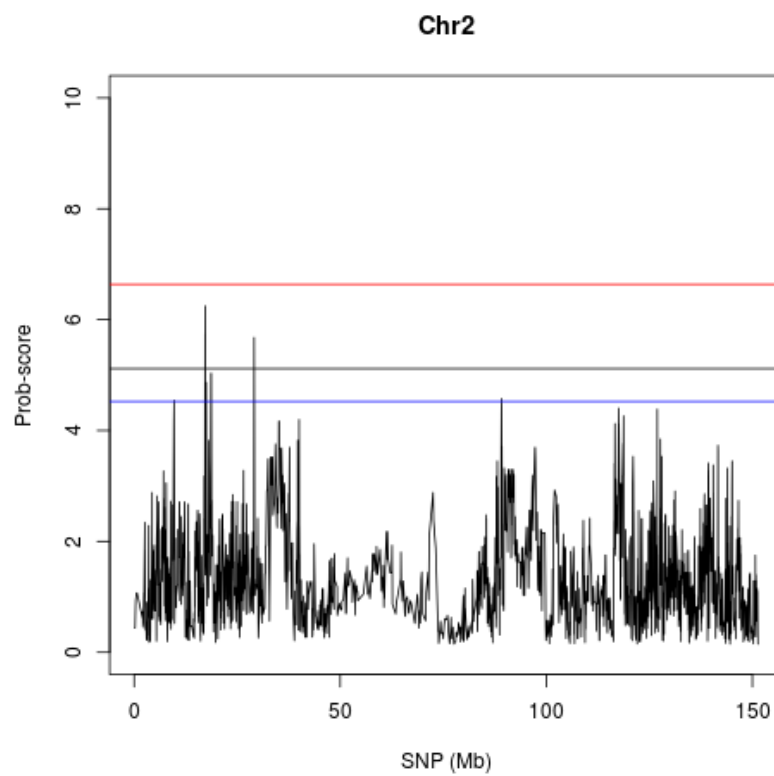
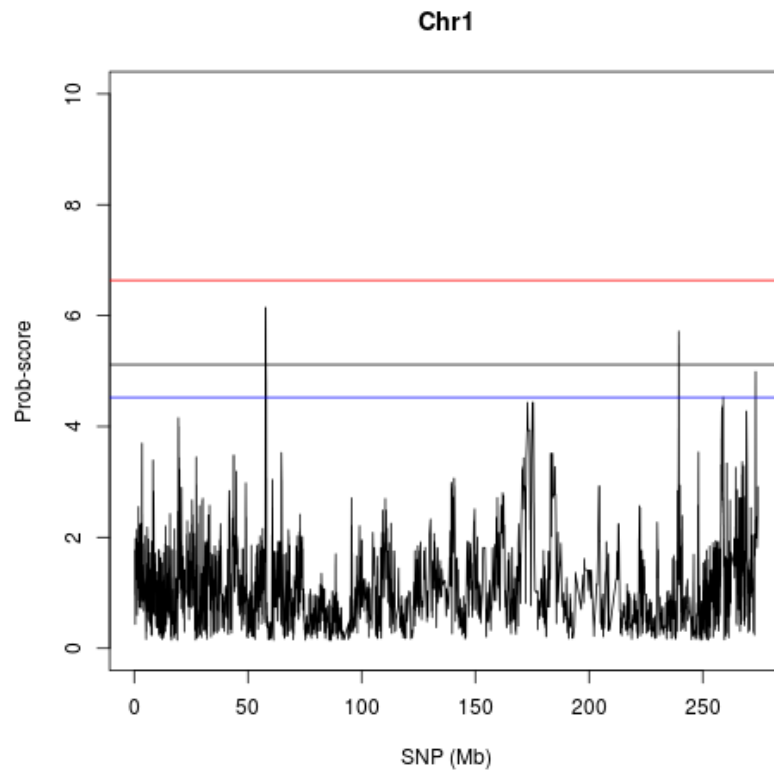
ZHOU, G.; SOUFAN, O.; EWALD, J.; HANCOCK, R. E.; BASU, N.; XIA, J. NetworkAnalyst 3.0: a visual analytics platform for comprehensive gene expression profiling and meta-analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W234–W241, 2019.

ANEXO A - GRÁFICO DE ESCALA MULTIDIMENSIONAL (*MULTIDIMENSIONAL SCALING* - MDS) DAS AMOSTRAS PARA AVERIGUAR A ESTRUTURA DA POPULAÇÃO.



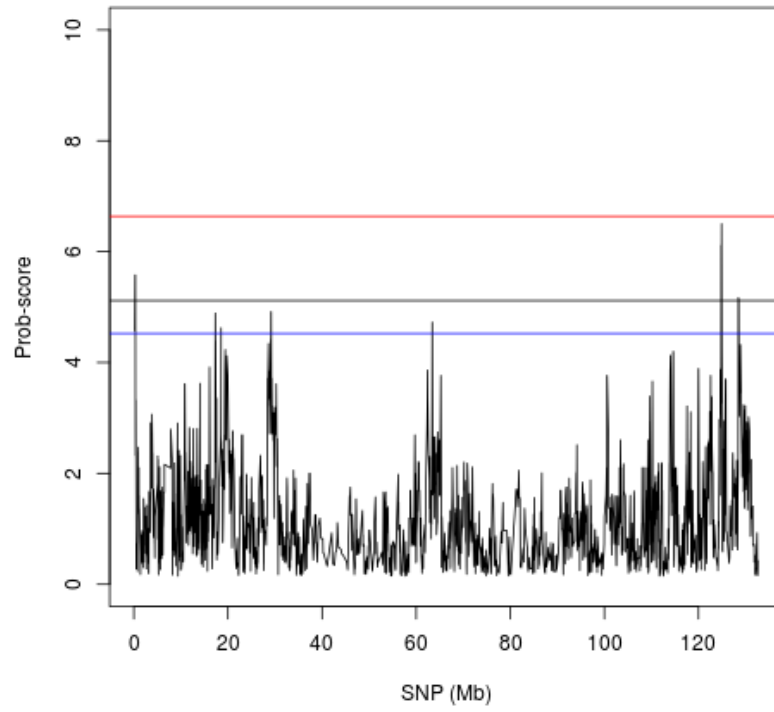
¹Gráfico gerado após o QC utilizando 7.832 SNPs em *linkage equilibrium* (LE) ($r^2 < 0,2$). As amostras representadas por quadrados são os animais controle e os representados por círculo são os animais caso.

ANEXO B – REPRESENTAÇÃO DOS SNPs SIGNIFICATIVOS EM CADA CROMOSSOMO PELA ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO UTILIZANDO A METODOLOGIA DE MÚLTIPLOS MARCADORES.

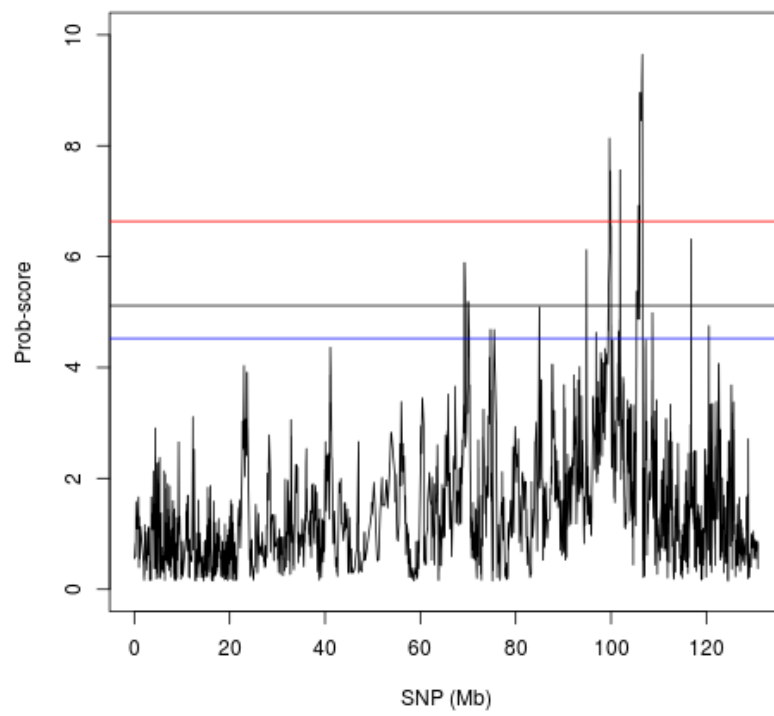


(continuação)

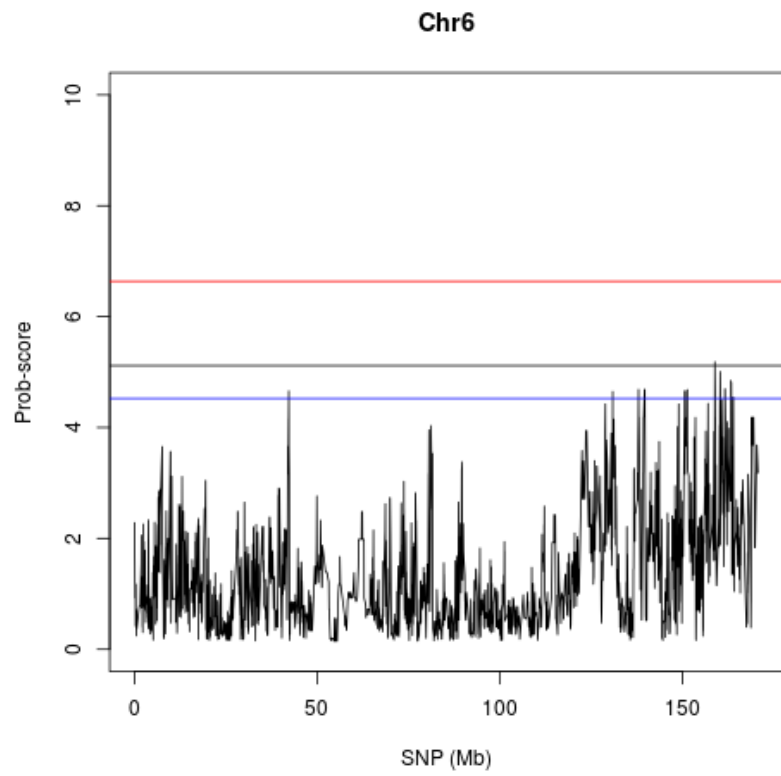
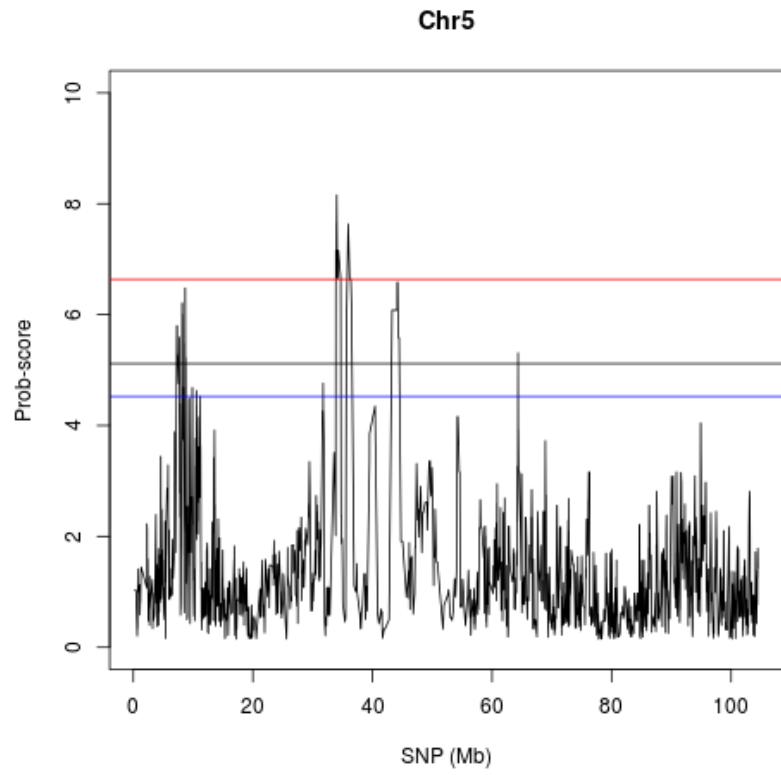
Chr3



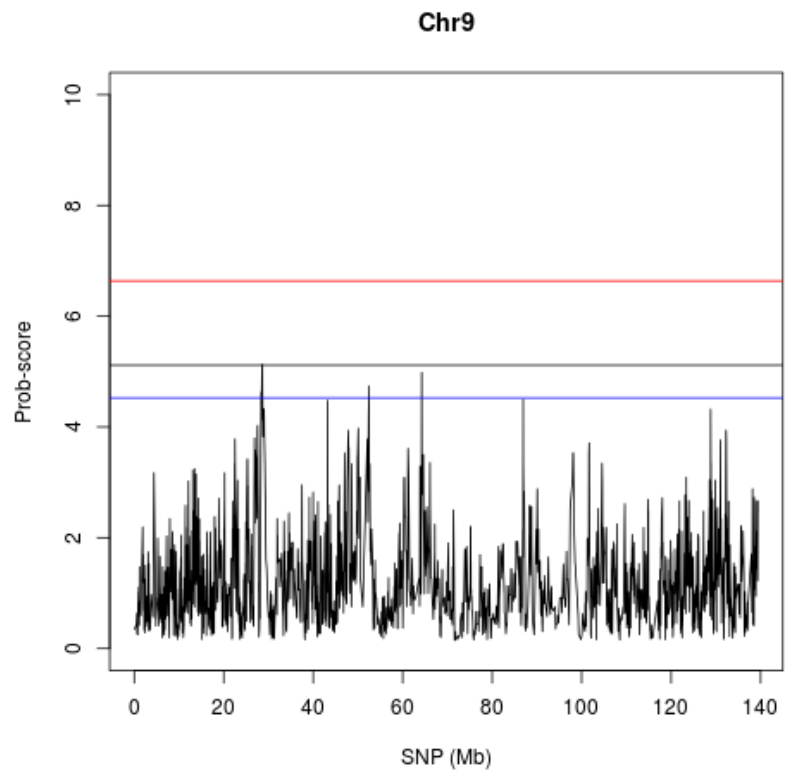
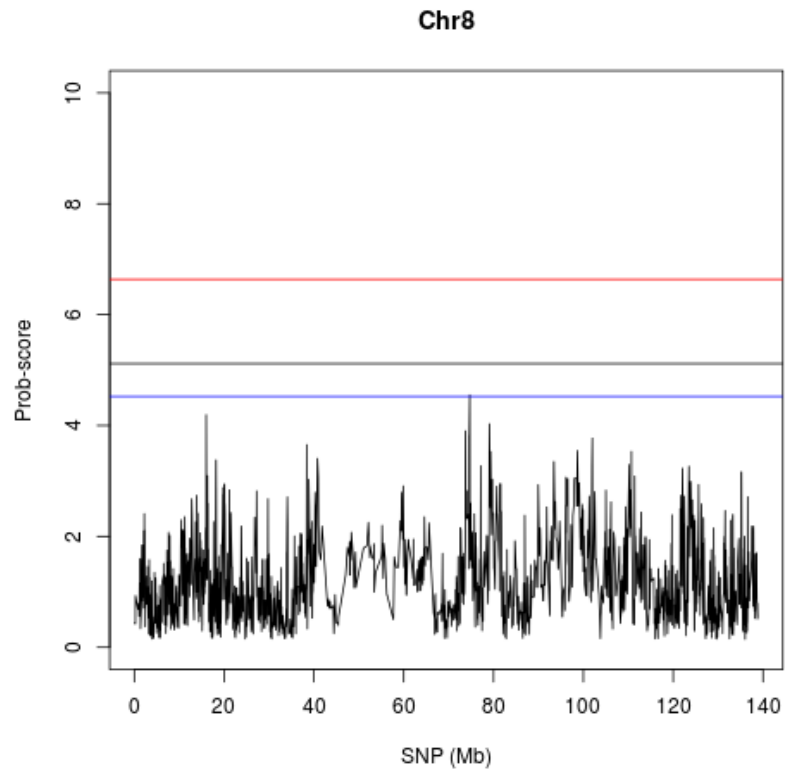
Chr4



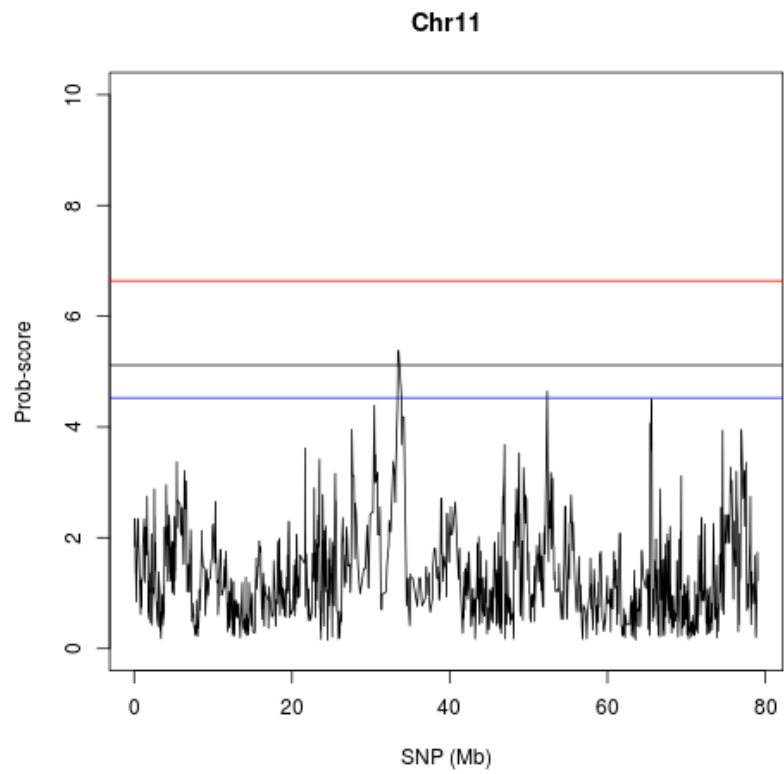
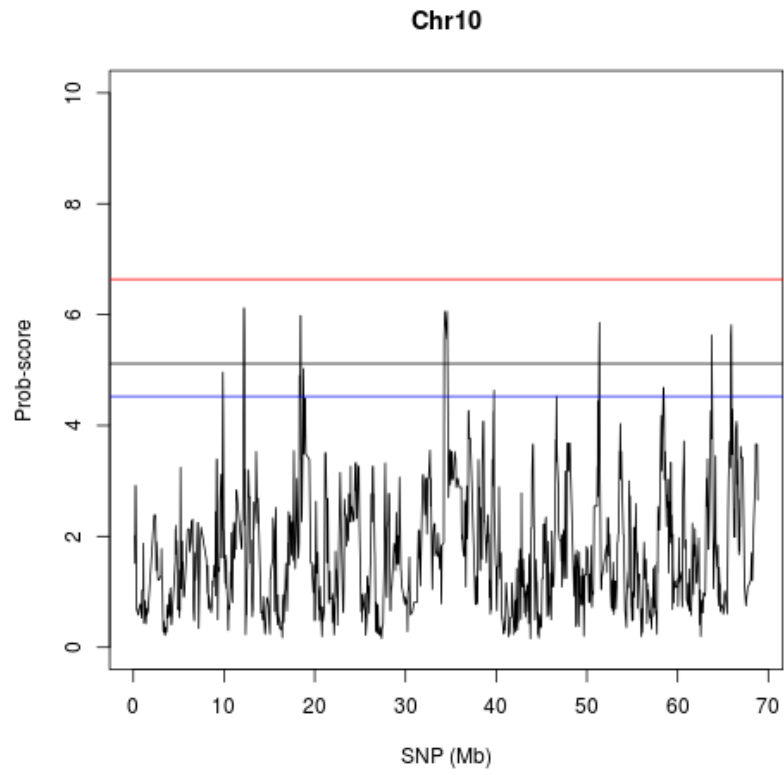
(continuação)



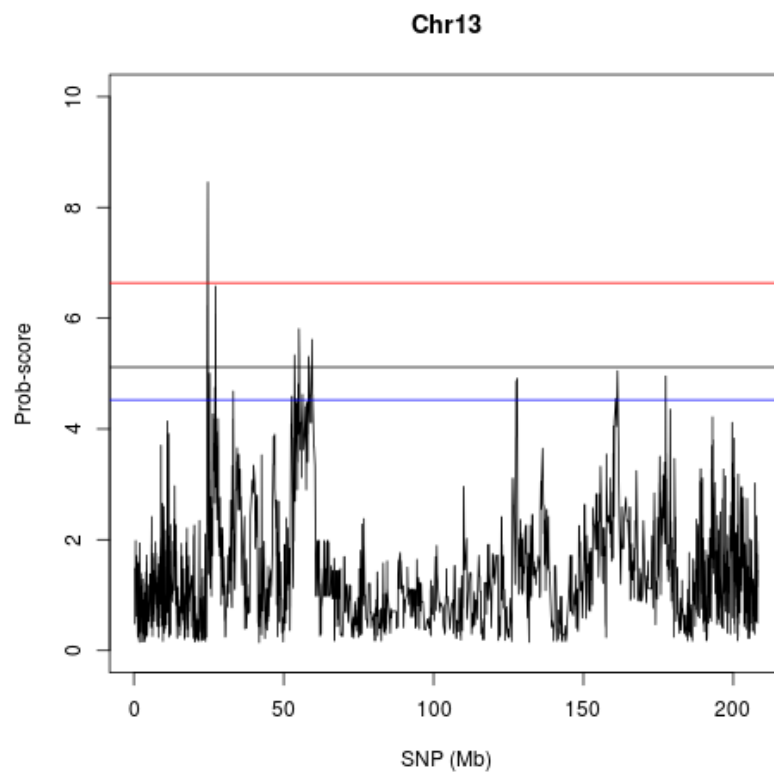
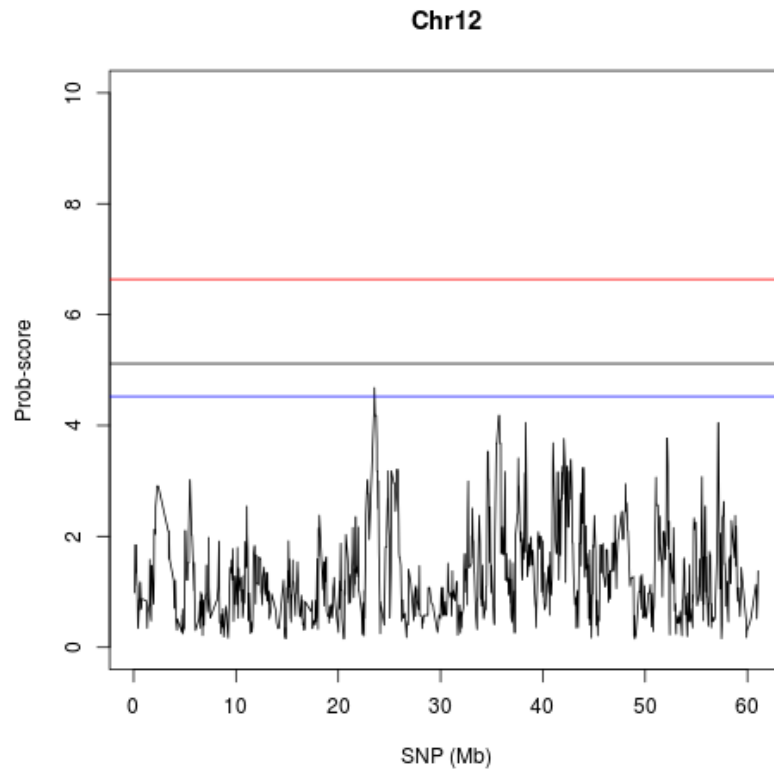
(continuação)



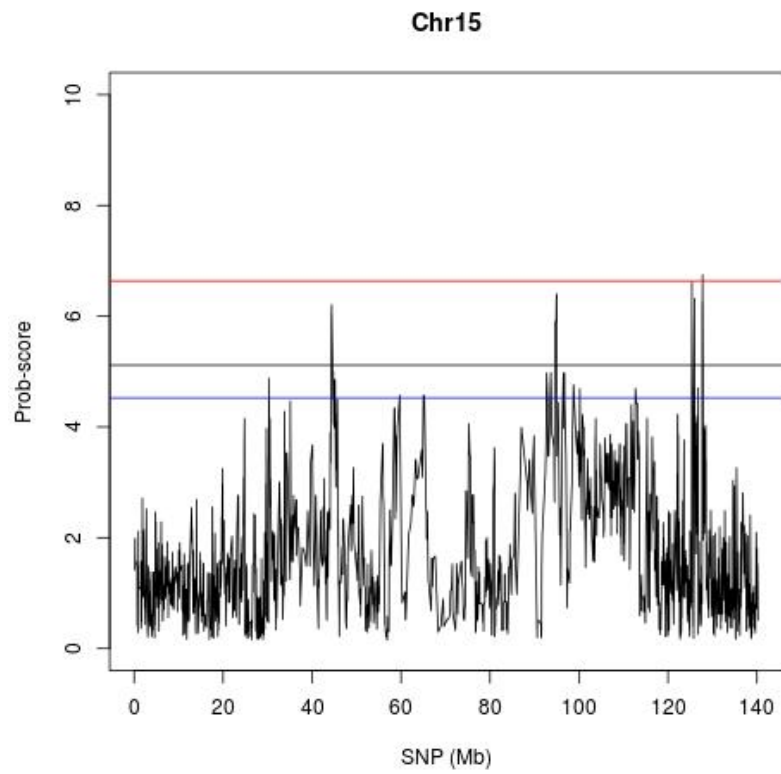
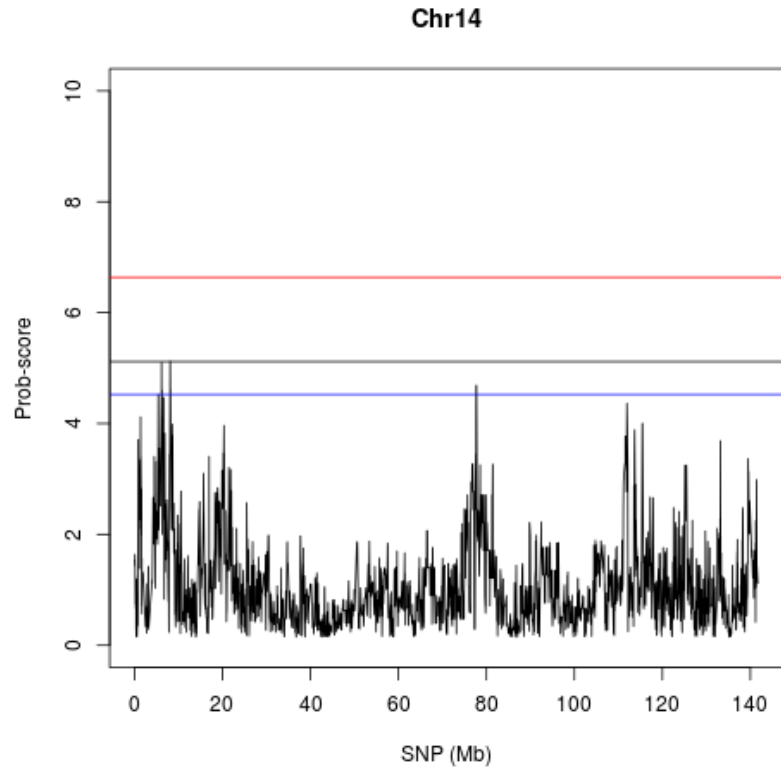
(continuação)



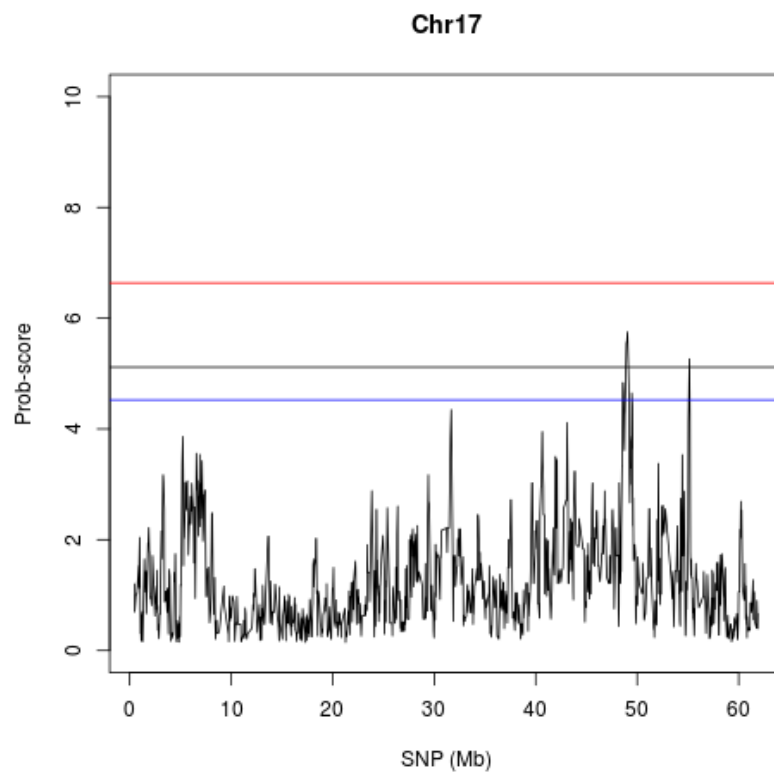
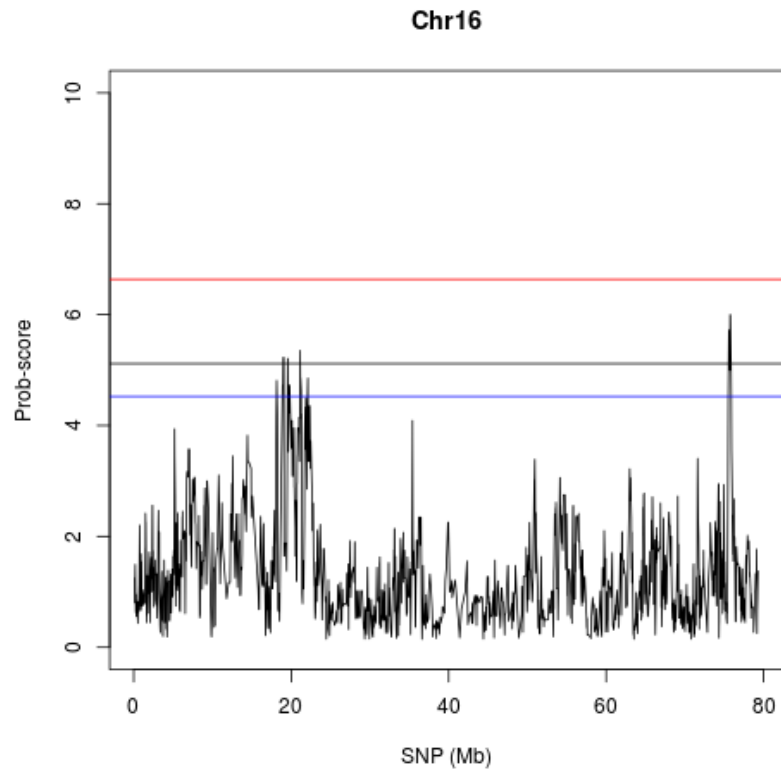
(continuação)



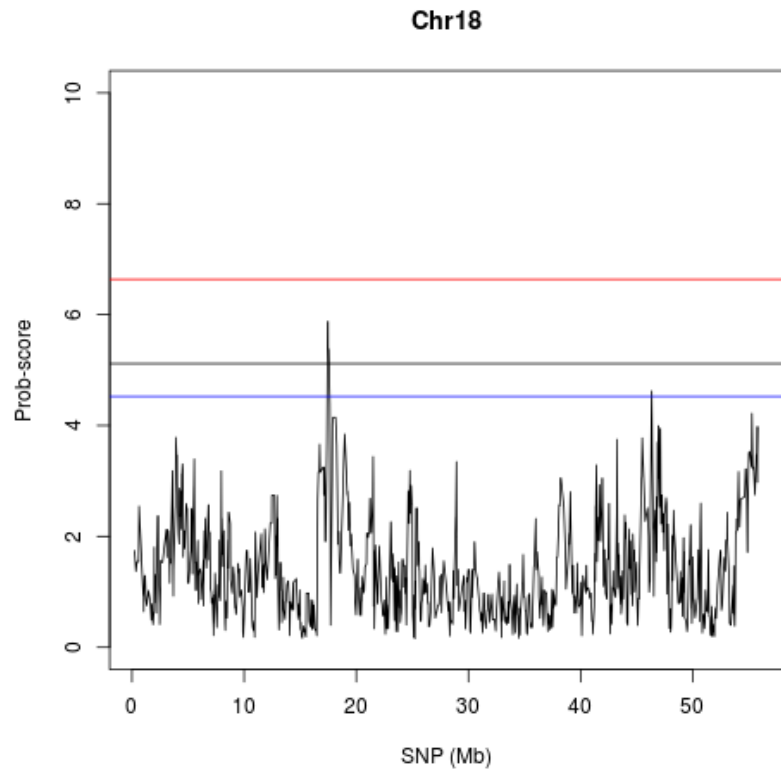
(continuação)



(continuação)



(conclusão)



ANEXO C - SNPs ENCONTRADOS NAS REGIÕES COM ESCORE DE SIGNIFICÂNCIA ALTO E MODERADO.

Região	SSC.	Pos. SNP	SNP	Sig. SNP	Alelo variante	Pos. região
1	1	57.698.755	rs81354368	Moderada	G/A	57.648.755
		57.759.396	rs81354344	Moderada	G/A	
		57.773.102	rs81354354	Moderada	C/T	
		57.800.971	rs80845539	Moderada	G/A	
		57.873.684	rs80951688	Moderada	G/A	
		57.920.577	rs80916220	Moderada	A/G	
2	1	239.433.673	rs81351336	Moderada	C/A	239.383.673
		239.495.491	rs346212105	Moderada	A/G	239.545.491
3	2	17.192.362	rs81262483	Moderada	C/T	17.142.362
		17.214.830	rs343604023	Moderada	C/T	-
		17.231.640	rs320015354	Moderada	A/G	17.293.844
		17.243.844	rs81339919	Moderada	T/C	-
4	2	29.121.688	rs81356789	Moderada	G/A	29.071.688
		-	-	-	-	29.171.688
5	3	269.884	rs333627113	Moderada	G/A	219.884
		290.463	rs319317542	Moderada	A/G	-
		320.350	rs318521640	Moderada	C/T	370.350
6	6	124.821.068	rs81316610	Moderada	A/G	124.771.068
		124.874.919	rs81250040	Moderada	G/A	-
		124.890.996	rs318621684	Moderada	G/A	124.989.107
		124.902.556	rs81377977	Moderada	G/T	-
		124.939.107	rs81378077	Moderada	G/A	-
7	3	128.471.318	rs319215576	Moderada	T/G	128.421.318
		128.568.743	rs81316038	Moderada	G/T	128.618.743
8	4	69.216.389	rs80816278	Moderada	T/C	69.166.389
		69.229.159	rs80878915	Moderada	G/A	-
		69.266.782	rs80848027	Moderada	C/T	69.438.194
		69.293.090	rs80973034	Moderada	C/T	-
		69.388.194	rs80809599	Moderada	T/C	-
9	4	69.971.363	rs80893885	Moderada	C/T	69.921.363
		70.099.828	rs334044784	Moderada	C/A	70.149.828
10	4	94.865.512	rs80935126	Moderada	C/T	94.815.512
		-	-	-	-	94.915.512
11	4	99.451.057	rs319035966	Moderada	G/T	99.401.057
		99.484.384	rs81382508	Moderada	G/A	
		99.654.692	rs328626336	Moderada	A/G	
		99.670.128	rs343205058	Alta	A/G	
		99.805.067	rs80815019	Moderada	G/A	
		99.817.682	rs81001128	Alta	G/A	
		99.841.310	rs80934838	Alta	G/A	
		99.864.129	rs80858549	Alta	G/A	
		99.876.131	rs81000069	Alta	C/A	
		99.915.087	rs332665353	Moderada	T/C	
		99.947.929	rs80971667	Moderada	T/C	
		99.967.847	rs80922194	Moderada	A/C	
		99.981.776	rs344348324	Moderada	G/A	
		-	-	-	-	

(continuação)

12	4	101.887.188	rs334706328	Alta	A/G	101.837.188
						-
						101.937.188
13	4	105.367.780	rs80838420	Moderada	G/A	105.317.780
		105.485.188	rs80935603	Moderada	G/A	
		105.519.125	rs80956011	Moderada	G/A	
		105.565.718	rs318583289	Moderada	A/G	
		105.771.448	rs321649463	Alta	C/A	
		105.851.764	rs332499931	Alta	G/A	
		106.037.400	rs80877188	Alta	C/T	
		106.062.165	rs339261815	Alta	G/A	
		106.079.954	rs321389839	Alta	A/G	
		106.164.873	rs81380101	Alta	G/A	
		106.293.182	rs80808441	Alta	T/G	
		106.322.944	rs80788252	Alta	A/G	
		106.354.741	rs80991781	Alta	A/G	
		106.370.864	rs328643405	Alta	A/G	
		106.443.342	rs331322169	Alta	A/G	
		106.477.681	rs80829512	Alta	A/G	
		106.571.934	rs80838764	Alta	T/C	
						106.621.934
14	4	116.791.409	rs80972790	Moderada	A/G	116.741.409
						-
						116853481
15	5	7.269.895	rs80921487	Moderada	G/A	7.219.895
		7.336.449	rs335368613	Moderada	T/G	
		7.350.466	rs336182799	Moderada	G/A	
		7.379.744	rs342486837	Moderada	C/T	
		7.618.541	rs81275045	Moderada	T/C	
		7.665.916	rs330340592	Moderada	T/C	
		7.674.983	rs80925041	Moderada	G/A	
16	5	8.152.313	rs328386778	Moderada	A/C	8.102.313
		8.161.443	rs344668491	Moderada	T/C	
		8.186.694	rs80811565	Moderada	T/C	
		8.195.731	rs337712466	Moderada	T/C	
		8.201.859	rs329011886	Moderada	C/T	
		8.208.348	rs318253189	Moderada	T/C	
		8.245.684	rs80848923	Moderada	G/A	
8.255.051	rs340483649	Moderada	G/A			
17	5	8.632.144	rs80945398	Moderada	G/A	8.582.144
		8.668.121	rs345549562	Moderada	G/A	
		8.681.385	rs80807024	Moderada	T/C	
		8.688.864	rs341937300	Moderada	C/T	
		8.694.611	rs80927783	Moderada	G/A	
		8.772.762	rs80975122	Moderada	T/G	
18	5	33.871.482	rs345043801	Alta	G/A	33.821.482
		33.897.913	rs80841312	Alta	T/C	
		33.912.700	rs80786392	Alta	A/G	
		33.934.311	rs80964888	Alta	G/A	
		33.970.407	rs80989707	Alta	G/A	
		33.991.092	rs80837106	Alta	T/C	
		34.022.700	rs80845463	Alta	C/T	
		34.122.773	rs81383707	Alta	T/C	
		34.151.822	rs81383713	Alta	C/T	
		34.189.654	rs80835055	Alta	G/A	
						34.353.955

(continuação)

18	5	34.221.053	rs81319635	Alta	A/G	33.821.482
		34.256.405	rs80816650	Alta	T/C	-
		34.303.955	rs80841410	Alta	G/T	34.353.955
						34.627.764
19	5	34.677.764	rs81000718	Alta	C/T	-
						34727764
20	5	35.634.440	rs81383732	Moderada	C/T	
		35.710.555	rs81303130	Moderada	A/G	
		35.929.672	rs339913443	Alta	C/T	
		36.066.415	rs81383742	Alta	G/A	35.584.440
		36.197.319	rs81383754	Moderada	G/A	-
		36.236.803	rs81315975	Moderada	T/C	36.556.086
		36.346.640	rs323754097	Moderada	G/A	
		36.385.239	rs81259515	Moderada	A/G	
21	5	36.506.086	rs81383780	Moderada	T/C	
		43.276.920	rs80830417	Moderada	C/T	43.226.920
		43.293.810	rs81229615	Moderada	A/G	-
						43.343.810
22	5	44.096.325	rs81323542	Moderada	C/A	
		44.127.767	rs81331039	Moderada	A/G	
		44.138.728	rs81238065	Moderada	A/G	44.046.325
		44.228.018	rs81329660	Moderada	C/T	-
		44.319.617	rs81475526	Moderada	A/G	44.514.360
						44.464.360
23	5	64.350.471	rs81254499	Moderada	C/T	64.300.471
						64.400.471
24	6	158.874.827	rs327393763	Moderada	C/T	158.824.827
						158.924.827
25	9	28.572.001	rs325981114	Moderada	T/C	28.522.001
		28.642.359	rs81408687	Moderada	G/A	-
						28.692.359
26	10	12.183.539	rs81429690	Moderada	A/C	12.133.539
		12.201.213	rs346235976	Moderada	G/A	-
		12.232.435	rs81429722	Moderada	G/T	12.310.482
		12.260.482	rs81305942	Moderada	G/T	
27	10	18.428.038	rs81336685	Moderada	G/A	18.378.038
		18.458.018	rs336306009	Moderada	A/G	-
						18.508.018
28	10	34.265.416	rs80969522	Moderada	A/G	34.215.416
		34.356.137	rs81423600	Moderada	C/A	-
		34.574.312	rs81239671	Moderada	G/A	34.649.631
		34.599.631	rs81423633	Moderada	C/T	
29	10	51.344.359	rs81425519	Moderada	G/A	51.294.359
		51.390.114	rs81425479	Moderada	T/C	-
						51.440.114
30	10	63.771.521	rs81477511	Moderada	C/T	63.721.521
						63.821.521
31	10	65.857.747	rs330731573	Moderada	C/A	65.807.747
		65.925.963	rs81427614	Moderada	A/G	-
						65.975.963
32	11	33.429.680	rs80886790	Moderada	A/G	33.379.680
		33.516.188	rs336061778	Moderada	C/T	-
						33.566.188

(continuação)

		24.427.529	rs334226534	Moderada	T/G	
		24.499.189	rs80892333	Moderada	A/G	24.377.529
33	13	24.508.626	rs80855745	Moderada	T/C	-
		24.540.944	rs344381503	Moderada	T/C	24.728.816
		24.678.816	rs81335253	Alta	T/C	
		27.264.043	rs81444283	Moderada	T/G	
34	13	27.277.134	rs81444288	Moderada	G/A	27.214.043
		27.301.386	rs81444292	Moderada	G/A	-
		27.325.912	rs81444299	Moderada	C/T	27.375.912
						53.542.177
35	13	53.592.177	rs81478249	Moderada	C/A	-
						53.642.177
		55.064.930	rs81446034	Moderada	T/C	55.014.930
36	13	55.071.611	rs81446033	Moderada	T/C	-
		55.174.195	rs81446037	Moderada	T/C	55.224.195
		58.339.902	rs81298388	Moderada	G/A	58.289.902
37	13	58.456.118	rs80911418	Moderada	G/A	-
		58.469.908	rs81446113	Moderada	A/G	58.519.908
		59.291.803	rs327084119	Moderada	T/C	
		59.351.990	rs80979626	Moderada	G/A	59.241.803
38	13	59.392.279	rs80877471	Moderada	A/C	-
		59.489.784	rs81446136	Moderada	G/A	59.587.559
		59.537.559	rs80995462	Moderada	A/C	
		8.107.043	rs318823001	Moderada	C/A	8.057.043
39	14	8.134.833	rs80942235	Moderada	G/A	-
						8.184.833
		44.344.760	rs345636277	Moderada	C/T	
40	15	44.374.340	rs80969272	Moderada	T/C	44.294.760
		44.413.428	rs344679256	Moderada	C/A	-
		44.497.429	rs80864602	Moderada	A/G	44.547.429
		94.558.268	rs80859828	Moderada	G/A	
		94.608.820	rs345793133	Moderada	A/G	
		94.737.785	rs81478831	Moderada	A/G	
41	15	94.744.720	rs324359989	Moderada	C/T	94.508.268
		94.765.099	rs81478871	Moderada	G/A	-
		94.839.330	rs337294454	Moderada	A/G	95.039.604
		94.923.471	rs80816554	Moderada	A/G	
		94.989.604	rs81454056	Moderada	T/C	
		125.369.618	rs328556701	Moderada	G/A	125.319.618
42	15	125.374.772	rs343769895	Moderada	T/C	-
						125.424.772
						125.900.863
43	15	125.950.863	rs319218314	Moderada	A/G	-
						126.000.863
		127.690.561	rs341795928	Moderada	G/A	
		127.705.040	rs323659725	Moderada	T/C	
		127.763.879	rs331863188	Alta	A/G	
44	15	127.780.480	rs81000722	Moderada	T/G	127.640.561
		127.795.307	rs330863154	Moderada	T/C	-
		127.812.049	rs339891372	Moderada	C/T	127.924.746
		127.858.713	rs321681825	Moderada	C/T	
		127.874.746	rs80939746	Moderada	T/C	
		18.982.386	rs318640472	Moderada	A/G	18.932.386
45	16	19.015.840	rs81465094	Moderada	A/C	-
		19.065.198	rs81342203	Moderada	A/G	19.115.198

(conclusão)

46	16	19.553.964	rs334843577	Moderada	A/G	19.503.964
		19.573.048	rs81315539	Moderada	T/G	- 19.623.048
47	16	21.132.510	rs81311642	Moderada	T/G	21.082.510 -
						21182510
48	16	75.584.545	rs333556647	Moderada	G/A	
		75.611.451	rs81285733	Moderada	A/G	75.534.545
		75.680.612	rs81463457	Moderada	A/G	-
		75.737.273	rs81463489	Moderada	G/A	75.827.992
		75.777.992	rs81463514	Moderada	G/T	
49	17	48.932.908	rs336865007	Moderada	T/A	48.882.908
		48.976.253	rs81313748	Moderada	T/C	-
		49.046.378	rs320757372	Moderada	T/G	49.096.378
50	17	55.140.287	rs80813585	Moderada	C/T	55.090.287 -
						55.190.287
51	18	17.452.054	rs81472236	Moderada	G/A	
		17.486.343	rs81330637	Moderada	G/A	17.402.054
		17.489.965	rs81333352	Moderada	G/T	-
		17.506.376	rs81213998	Moderada	G/A	17.602.507
		17.552.507	rs329089964	Moderada	G/A	

ANEXO D – GENES CANDIDATOS DISTRIBUÍDOS NAS REGIÕES COM ALTA E MÉDIA SIGNIFICÂNCIA PELO MÉTODO DE MÚLTIPLOS MARCADORES.

Crom	Região	Significância região	Anotação Ensembl	Nome gene
1	1	Moderada	ENSSSCG00000004324	
			ENSSSCG00000004328	<i>MDN1</i>
			ENSSSCG00000004331	<i>CASP8AP2</i>
			ENSSSCG00000004330	<i>GJA10</i>
1	2	Moderada	ENSSSCG00000005366	<i>NCBP1</i>
			ENSSSCG00000005367	<i>TSTD2</i>
			ENSSSCG00000005368	<i>XPA</i>
			ENSSSCG000000031590	<i>SYT13</i>
2	3	Moderada	ENSSSCG00000043766	
			ENSSSCG00000013276	<i>PRDM11</i>
2	4	Moderada	ENSSSCG00000013321	<i>ELP4</i>
			ENSSSCG00000046424	
3	5	Moderada	ENSSSCG00000041708	
			ENSSSCG00000048845	
			ENSSSCG00000046854	
			ENSSSCG00000007541	<i>PDGFA</i>
			ENSSSCG00000045247	
3	6	Moderada	ENSSSCG00000043460	
			ENSSSCG00000008624	<i>LPIN1</i>
3	7	Moderada	ENSSSCG00000043310	
4	8	Moderada	ENSSSCG00000042850	
			ENSSSCG00000042827	
			ENSSSCG00000049754	
			ENSSSCG00000045879	
4	9	Moderada	ENSSSCG00000040677	
			ENSSSCG00000019505	<i>ssc-mir-124a-1</i>
4	10	Moderada	ENSSSCG00000006538	<i>FLAD1</i>
			ENSSSCG00000006539	<i>SHC1</i>
			ENSSSCG00000006540	<i>PBXIP1</i>
			ENSSSCG00000006535	<i>PMVK</i>
4	11	Alta e Moderada	ENSSSCG00000026502	<i>LIX1L</i>
			ENSSSCG00000028509	<i>RBM8A</i>
			ENSSSCG00000006685	
			ENSSSCG00000006687	<i>ITGA10</i>
			ENSSSCG00000006688	<i>ANKRD35</i>
			ENSSSCG00000006689	<i>PIAS3</i>
			ENSSSCG00000006690	<i>NUDT17</i>
			ENSSSCG00000006691	<i>POLR3C</i>
			ENSSSCG00000037355	<i>RNF115</i>
			ENSSSCG00000050955	

(continuação)

			ENSSSCG00000043346	
			ENSSSCG0000006693	<i>PDZK1</i>
			ENSSSCG0000006694	
4	11	Alta e Moderada	ENSSSCG00000036921	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000036239	<i>GJA8</i>
			ENSSSCG0000006696	<i>GJA5</i>
			ENSSSCG0000006697	<i>ACP6</i>
			ENSSSCG0000006698	<i>BCL9</i>
4	12	Alta	ENSSSCG00000027153	<i>WARS2</i>
			ENSSSCG0000006725	
			ENSSSCG00000043502	
			ENSSSCG0000006748	<i>TSPAN2</i>
			ENSSSCG0000006749	<i>TSHB</i>
			ENSSSCG0000006750	<i>SYCP1</i>
			ENSSSCG00000042525	
			ENSSSCG0000006751	<i>SIKE1</i>
			ENSSSCG0000006752	<i>CSDE1</i>
			ENSSSCG00000032477	<i>NRAS</i>
4	13	Alta e Moderada	ENSSSCG0000006754	<i>AMPD1</i>
			ENSSSCG0000006755	<i>DENND2C</i>
			ENSSSCG0000006757	<i>TRIM33</i>
			ENSSSCG00000050091	
			ENSSSCG00000042671	
			ENSSSCG0000006758	<i>SYT6</i>
			ENSSSCG00000042123	
			ENSSSCG00000047541	
			ENSSSCG00000045712	<i>OLFML3</i>
			ENSSSCG0000006760	<i>HIPK1</i>
4	14	Moderada	ENSSSCG00000048322	
			ENSSSCG00000028202	<i>RANGAP1</i>
			ENSSSCG00000000067	<i>CHADL</i>
			ENSSSCG00000000066	<i>L3MBTL2</i>
			ENSSSCG00000051371	
			ENSSSCG00000045392	
			ENSSSCG00000000068	<i>EP300</i>
5	15	Moderada	ENSSSCG00000018737	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000050483	
			ENSSSCG00000034230	
			ENSSSCG00000033823	<i>XPNPEP3</i>
			ENSSSCG00000034801	
			ENSSSCG00000000071	<i>ST13</i>
			ENSSSCG00000000072	<i>SLC25A17</i>
			ENSSSCG00000000073	
5	16	Moderada	ENSSSCG00000000078	<i>TNRC6B</i>
			ENSSSCG00000034670	<i>ssc-mir-7134</i>
			ENSSSCG00000000082	<i>CACNA11</i>
5	17	Moderada	ENSSSCG00000000084	<i>ATF4</i>
			ENSSSCG00000039538	
			ENSSSCG00000038126	<i>MGAT3</i>

(continuação)

			ENSSSCG00000000493	<i>FRS2</i>
			ENSSSCG00000000496	<i>CCT2</i>
			ENSSSCG00000000500	
			ENSSSCG000000036760	<i>LRRC10</i>
5	18	Alta	ENSSSCG00000000499	<i>BEST3</i>
			ENSSSCG000000044473	
			ENSSSCG000000023936	<i>MYRFL</i>
			ENSSSCG000000045667	
			ENSSSCG000000047171	
			ENSSSCG000000041173	
			ENSSSCG000000031173	<i>KCNMB4</i>
5	19	Alta	ENSSSCG00000000504	<i>PTPRB</i>
			ENSSSCG000000049925	
			ENSSSCG000000030511	<i>LGR5</i>
			ENSSSCG00000000509	<i>ZFC3H1</i>
			ENSSSCG000000021270	<i>THAP2</i>
			ENSSSCG00000000510	<i>TMEM19</i>
5	20	Alta e Moderada	ENSSSCG000000043294	
			ENSSSCG00000000512	<i>TBC1D15</i>
			ENSSSCG000000021122	<i>TPH2</i>
			ENSSSCG000000046209	
			ENSSSCG000000048562	
			ENSSSCG00000000515	<i>TRHDE</i>
5	21	Moderada	ENSSSCG000000040992	
			ENSSSCG000000027447	<i>TMTC1</i>
			ENSSSCG00000000540	<i>OVCH1</i>
5	22	Moderada	ENSSSCG000000044413	
			ENSSSCG00000000536	<i>ERGIC2</i>
			ENSSSCG00000000541	<i>FAR2</i>
			ENSSSCG000000019686	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000000707	<i>SCNN1A</i>
5	23	Moderada	ENSSSCG00000000708	<i>TNFRSF1A</i>
			ENSSSCG00000000709	<i>PLEKHG6</i>
			ENSSSCG000000041399	
6	24	Moderada	ENSSSCG000000045271	
			ENSSSCG00000003848	<i>LRP8</i>
10	26	Moderada	ENSSSCG000000010840	<i>RGS7</i>
10	27	Moderada	ENSSSCG000000022034	<i>SMYD3</i>
			ENSSSCG000000046623	
			ENSSSCG000000051410	
10	28	Moderada	ENSSSCG000000044813	
			ENSSSCG000000051170	
			ENSSSCG000000050564	
			ENSSSCG000000050972	
10	29	Moderada	ENSSSCG000000051481	
			ENSSSCG000000047313	
10	30	Moderada	ENSSSCG000000011129	<i>ITIH5</i>

(continuação)

10	31	Moderada	ENSSSCG00000044272	
			ENSSSCG00000042764	
11	32	Moderada	ENSSSCG00000009449	<i>TDRD3</i>
			ENSSSCG00000011269	<i>MYRIP</i>
13	33	Alta e Moderada	ENSSSCG00000046162	
			ENSSSCG00000011270	<i>EIF1B</i>
			ENSSSCG00000025783	<i>ENTPD3</i>
			ENSSSCG00000050952	
			ENSSSCG00000011272	
			ENSSSCG00000011271	<i>ZNF619</i>
13	34	Moderada	ENSSSCG00000050558	
			ENSSSCG00000045193	
			ENSSSCG00000050748	
			ENSSSCG00000044145	
13	36	Moderada	ENSSSCG00000048446	
			ENSSSCG00000047664	
			ENSSSCG00000048642	
13	37	Moderada	ENSSSCG00000048689	
			ENSSSCG00000018941	<i>U6</i>
13	38	Moderada	ENSSSCG00000011527	<i>CNTN4</i>
14	39	Moderada	ENSSSCG00000042399	
			ENSSSCG00000048450	
15	40	Moderada	ENSSSCG00000015774	<i>TENM3</i>
			ENSSSCG00000015775	<i>DCTD</i>
			ENSSSCG00000051286	
15	41	Moderada	ENSSSCG00000016045	<i>PMS1</i>
			ENSSSCG00000033941	<i>C2orf88</i>
			ENSSSCG00000041649	
			ENSSSCG00000016047	<i>MSTN</i>
			ENSSSCG00000016049	<i>HIBCH</i>
			ENSSSCG00000044720	
			ENSSSCG00000016050	<i>INPP1</i>
			ENSSSCG00000050828	
15	42	Moderada	ENSSSCG00000050467	
			ENSSSCG00000023032	<i>SCG2</i>
15	43	Moderada	ENSSSCG00000051594	
15	44	Moderada	ENSSSCG00000019560	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000046536	
16	45	Moderada	ENSSSCG00000044320	
			ENSSSCG00000041531	
16	46	Moderada	ENSSSCG00000018535	
			ENSSSCG00000016816	<i>ADAMTS12</i>
16	47	Moderada	ENSSSCG00000016831	<i>SPEF2</i>
			ENSSSCG00000042382	
16	48	Moderada	ENSSSCG00000049835	
			ENSSSCG00000033070	
			ENSSSCG00000045602	
			ENSSSCG00000044693	

(conclusão)

			ENSSSCG00000041724	
17	49	Moderada	ENSSSCG00000033678	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000039038	<i>U6</i>
			ENSSSCG00000007453	<i>EYA2</i>
17	50	Moderada	ENSSSCG00000007486	<i>CYP24A1</i>
			ENSSSCG00000007487	<i>PFDN4</i>
18	51	Moderada	ENSSSCG00000047208	
			ENSSSCG00000016548	
			ENSSSCG00000016549	<i>MKLNI</i>