

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

EMANUELI DE FATIMA PEREIRA DA SILVA

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA
CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA
HOLANDESA DO BRASIL

PONTA GROSSA
2023

EMANUELI DE FATIMA PEREIRA DA SILVA

ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA
CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA
HOLANDESA DO BRASIL

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Zootecnia, no Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, da Universidade Estadual de Ponta Grossa, na área de concentração: Produção Animal, com ênfase em Melhoramento Genético e Reprodução Animal.

Orientador: Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa

PONTA GROSSA
2023

S586 Silva, Emanuéli de Fátima Pereira da
Estudos de associação genômica ampla para características de conformação em bovinos da raça holandesa no Brasil / Emanuéli de Fátima Pereira da Silva. Ponta Grossa, 2023.
54 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa.

1. Gwas. 2. Ambiente. 3. Classificação - tipo. 4. Compostos. 5. Snp. I. Pedrosa, Victor Breno. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. III.T.

CDD: 636

Ficha catalográfica elaborada por Maria Luzia Fernandes Bertholino dos Santos-
CRB9/986



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

EMANUELI DE FATIMA PEREIRA DA SILVA

“ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA DO BRASIL”

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,

01 de dezembro de 2023.

Prof. Dr. Victor Breno Pedrosa – (UEPG)
Presidente

Profa. Dra. Adriana de Souza Martins - (UEPG)
Membro Interno

Prof. Dr. Luis Fernando Batista Pinto - (UFBA)
Membro Externo



Documento assinado eletronicamente por **Victor Breno Pedrosa, Professor(a)**, em 01/12/2023, às 16:42, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana de Souza Martins, Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Zootecnia**, em 02/12/2023, às 13:49, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Aparecida Telles, Secretário(a)**, em 14/12/2023, às 15:01, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Luis Fernando Batista Pinto, Usuário Externo**, em 18/12/2023, às 17:45, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



A autenticidade do documento pode ser conferida no site <https://sei.uepg.br/autenticidade> informando o código verificador **1690760** e o código CRC **E8EEFA7C**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pois esse momento só se fez possível sob suas bençãos.

Agradeço a minha família, em especial a minha mãe que é minha luz e meu exemplo. Que juntamente com minhas imas e irmão, Lu, Fran, Adri e Rafa são minha força. Agradeço aos meus cunhados Rô, Isaque e Ana e meus sobrinhos Gabi, Gabi, Isa, Gut e Gui. Todos vocês foram fundamentais nesse processo.

Agradeço imensamente o Prof^o. Victor que mais que um orientador, se tornou um grande amigo. Obrigada professor por acreditar em mim, obrigada por todos os conselhos e conversas que tivemos. O senhor é meu exemplo.

Agradeço imensamente a Rita, que além de colega de laboratório se tornou minha melhor amiga, obrigada meu anjo por sempre segurar minha mão nos momentos que mais precisei.

Agradeço a todos que me ajudaram no desenvolvimento desse projeto, principalmente o Henrique, Pamela e Rafa Martins que não mediram esforços para sanar minhas dúvidas.

Agradeço a todos os professores do Programa por compartilhar seus conhecimentos. E a coordenação, que estava sempre solícita em ajudar. Agradeço em especial o Prof^o Dr^o Marcelo por me acolher na disciplina de estágio. Um agradecimento especial a Prof^a Dr^a Natali por sempre estar ao meu lado durante essa caminhada.

Agradeço ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa e recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos a minha eterna gratidão.

Não é todo dia que alguém tem um sonho e o torna realidade
(Brittainy Cherry)

RESUMO

A demanda por produtos lácteos vem crescendo à medida que a população mundial tem um incremento em seu poder de compra. Isso desencadeia uma busca pelo aumento da produção por parte dos produtores de leite. Sabendo que o potencial produtivo do animal é afetado por diversos fatores, dentre eles a conformação dos animais. Esta é importante para a saúde e longevidade e também para a produção, sendo separado por compostos: Garupa, Força leiteira, Pernas e pés, e Sistema mamário. Esses compostos são definidos de acordo com um conjunto de características, que recebem valores de escore de acordo com sua apresentação que ao final são origem ao valor de Classificação Final. As características morfológicas do animal apresentam influência na produção de leite e na longevidade, sendo duas características determinantes na lucratividade das propriedades produtoras de leite. Cada composto individualmente influencia na funcionalidade do animal. O composto da Garupa tem efeito sobre o composto pernas e pés, largura e inserção de úbere além de influência na reprodução. A Força Leiteira avalia a distribuição da energia consumida relacionada com o tamanho corporal, peso e condição corporal que afetam energia destinada a manutenção. O composto de Pernas e Pés, o animal que apresenta esse composto com baixa qualidade pode apresentar problemas de casco, que interfere de forma negativa na produção, reprodução, saúde e bem estar. O Sistema Mamário consiste na avaliação da região do úbere que está ligada diretamente com a produção e armazenamento dentro do animal. A pontuação dada aos compostos é denominada Classificação Final que auxilia na avaliação da estrutura do animal. O melhoramento genético vem apresentando avanços significativos para várias características de interesse econômico através da utilização de painéis de polimorfismo de base única (SNP). Com a identificação de regiões genômicas associadas as características através do Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS), é possível detectar genes candidatos que podem estar relacionados com a formação do fenótipo estudado. Além disso, sabe-se que a expressão do genótipo pode ser diferente em diferentes ambientes, o que pode alterar o potencial produtivo da progênie.

Palavras-chave: Ambiente; classificação para tipo; compostos, GWAS, longevidade; SNP.

ABSTRACT

The demand for dairy products has been increasing as the world's population experiences a rise in purchasing power. This triggers a search for increased production by dairy producers. Knowing that the productive potential of the animal is affected by various factors, among them the conformation of the animals. This is important for health and longevity as well as for production, being separated into compounds: Rump, Dairy Strength, Feet and Legs, and Mammary System. These compounds are defined according to a set of characteristics, which receive score values according to their presentation that ultimately give rise to the value of the Final Classification. The morphological characteristics of the animal have an influence on milk production and longevity, two determining factors in the profitability of milk-producing properties. Each compound individually influences the functionality of the animal. The Rump compound has an effect on the Feet and Legs compound, udder width and insertion, as well as influencing reproduction. Dairy Strength assesses the distribution of consumed energy related to body size, weight, and body condition, affecting energy allocated to maintenance. The Feet and Legs compound, the animal that presents this compound with low quality, may have hoof problems, which negatively interfere with production, reproduction, health, and well-being. The Mammary System consists of evaluating the udder region, which is directly linked to production and storage within the animal. The score given to the compounds is called Final Classification, assisting in evaluating the structure of the animal. Genetic improvement has been making significant advances for various economically important traits through the use of single nucleotide polymorphism (SNP) panels. With the identification of genomic regions associated with traits through Genome-Wide Association Study (GWAS), it is possible to detect candidate genes that may be related to the formation of the studied phenotype. Additionally, it is known that genotype expression can be different in different environments, which can alter the productive potential of the progeny.

Keywords: Environment; type classification; Compounds; GWAS; longevity; SNP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - *Manhattan plot* dos resultados da análise single-step GWAS para as características de Classificação final (CL), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamario (SM), características que compõe a conformação.30
- Figura 2 - Rede de interação gênica para genes associados as características de Conformação em vacas da raça Holandesa.....35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição dos SNP's significativos, com os genes e números de QTL's associados significativamente a Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) em vacas da raça Holandesas.....32

Tabela 2 - Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para as características: Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) em vacas da raça Holandesas.33

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	11
1.1 INTRODUÇÃO	11
1.2 CONTEXTUALIZACAO	12
1.3 CONFORMAÇÃO	13
1.3.1 Garupa	14
1.3.2 Força Leiteria	14
1.3.3 Pernas e Pés	15
1.3.4 Sistema Mamário	15
1.3.5 Classificação Final	16
1.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA - GWAS	16
REFERÊNCIAS	18
CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA DO BRASIL	23
2.1 INTRODUÇÃO	24
2.2 MATERIAIL E METODOS	26
2.2.1 Fenótipos e genótipos	26
2.2.3 Controle de qualidade	26
2.2.4 Estudos de associação genômica em etapa única	26
2.2.4 Identificação de genes candidatos e análises funcionais	29
2.3 RESULTADOS	29
2.3.1 Single-step GWAS	29
2.3.2 Análise funcional	33
2.3.3 Rede de interação gênica	34
2.4 DISCUSSÃO	35
2.4.1 Genes candidatos para Classificação Final	35
2.4.2 Genes candidatos para Garupa	36
2.4.3 Genes candidatos para Pernas e pés	39
2.4.4 Genes candidatos para Sistema Mamário	40
2.4.5 Genes em destaque na análise da Rede Intergênica.	41
3 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	43

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

Com o aumento da população mundial e o incremento em seu poder de compra, a demanda pelo consumo de produtos láteos vem crescendo (Oliveira Junior *et al.*, 2021), e com isso, os produtores de leite vem buscando o melhoramento na produção do volume de leite e seus componentes (Pedrosa *et al.*, 2021). Sabe-se que a rentabilidade das fazendas leiteiras depende principalmente da produção de leite, porém, outros fatores também exercem influência sobre o potencial produtivo do animal, como, saúde, fertilidade e conformação (Abo-Ismael *et al.*, 2017), que afetam tanto a produção como o seu bem-estar (Mucha *et al.*, 2018).

A conformação dos animais também é importante fator para a saúde, longevidade e produção de bovinos leiteiros (Kern *et al.*, 2015). No conjunto de características de conformação, os compostos que ganham destaque, são: Garupa, Força Leiteira, Sistema mamário e Pernas e Pés (Sewalem *et al.*, 2004). Estes compostos são definidos de acordo com um conjunto de características pré-estabelecidas, que no cômputo final determinam uma pontuação em escore para característica avaliada, que no final dão origem ao valor de Classificação Final (Gutiérrez; Goyache, 2001). As características morfológicas do animal, principalmente as relacionadas ao sistema mamário, apresentam influência na produção de leite, como por exemplo, a profundidade do úbere e a colocação de tetos que afetam a capacidade e a eficiência da ordenha (McLaren *et al.*, 2016). Adicionalmente, a locomoção, afetada pelo composto perna e pés, que está diretamente relacionada com a eficiência produtiva e reprodutiva (Vargas *et al.*, 2018) e influenciando também a longevidade (Gonzalez Guzman *et al.*, 2020).

Com o advento da genômica, o melhoramento genético vem apresentando avanços significativos para várias características de interesse econômico. Isso se deu, principalmente, em função do uso de painéis de polimorfismo de base única (SNP) (Abo-Ismael *et al.*, 2017). Neste sentido, uma abordagem que pode ser utilizada para identificar regiões genômicas significativas associadas a diversas características de interesse econômico são os estudos de associação de genoma amplo (GWAS) (Mohammadi *et al.*, 2020). Esta, possibilita a detecção de genes candidatos, que

podem estar relacionados as vias biológicas para formação do fenótipo (Gebreyesus *et al.*, 2019).

Como se sabe, a expressão do genótipo pode ser diferente em diferentes ambientes, o que pode implicar em alterações no desempenho dos animais e de suas progênes dependendo do ambiente onde são inseridos (Ismael *et al.*, 2016). Nesse contexto, o estudo de GWAS para animais de produção mostra-se necessário para o conhecimento de possíveis variações genéticas em diferentes ambientes. No caso deste estudo, no ambiente tropical, ainda não explorado em pesquisas anteriores (Hayes; Lewin; Goddard, 2013). Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi identificar regiões genômicas e genes associados aos compostos, garupa, sistema mamário, força leiteira, pernas e pés e classificação final. Adicionalmente, foram realizadas análises funcionais para melhor conhecimento dos processos e vias metabólicas relacionados aos genes significativos identificados.

1.2 CONTEXTUALIZACAO

A produção mundial de leite no ano de 2022 era prevista para atingir 930 milhões de toneladas, representando um aumento de 0,6% em relação ao ano anterior (FAO, 2022). O Brasil é o terceiro maior produtor de leite a nível mundial, possuindo um rebanho efetivo de aproximadamente 16 milhões de vacas ordenhadas, produzindo um total de 35 milhões de litros de leite, resultando em um faturamento anual de 69 milhões de reais (IBGE, 2022), sendo a pecuária leiteira responsável pela formação de cerca de 4 milhões empregos diretos e indiretos (MAPA, 2022).

Realizando um comparativo entre os animais produtores de leite nos primórdios da produção industrial e os utilizados atualmente, podemos observar que os animais da atualidade são expostos a diferentes desafios como: alta demanda corporal para a alta produção, alto desempenho reprodutivo, alimentação com elevados níveis energéticos, além de diferentes tipos de alojamento (Atkins, 2007). Dessa forma, estima-se que até o ano de 2030, no Brasil, irão permanecer na atividade somente os produtores mais eficientes, ou seja, os que mais se adaptarem ao emprego das tecnologias (MAPA, 2022), incluindo o uso de animais geneticamente melhorados.

Embora o melhoramento genético do gado tenha sido muito bem-sucedido no aumento da produtividade, ainda há pressão para melhorar a sustentabilidade da

indústria de laticínios e as características que contribuem para isso (Oliveira Junior *et al.*, 2021). Como é o caso das características reprodutivas e de conformação corporal, que em boas condições reduzem a taxa de descarte, o que influencia de forma direta na lucratividade da indústria (Abo-Ismael *et al.*, 2017). O aumento da lucratividade com a melhora dessas características ocorre pois um animal com a vida produtiva mais longa representa diminuição no custo de reposição, maiores números de lactação, conseqüentemente apresenta maiores rendimentos (Atkins, 2007).

1.3 CONFORMAÇÃO

Historicamente, a realização da classificação linear tinha como objetivo principal a precificação dos animais e o reconhecimento dos produtores que criavam potenciais reprodutores, sendo assim, as características de tipo corporal tornaram-se muito conhecidas, principalmente pela sua fácil mensuração (Miglior *et al.*, 2017; Olasege *et al.*, 2019). Porém, a avaliação era feita no animal como um todo, sem a realização dos destaques em pontos fortes e fracos de cada animal, sendo apenas pontuada a conformação, podendo ser “bom mais”, “muito bom” ou “excelente” (Atkins, 2007).

Com o passar do tempo, observou-se a influência das características físicas dos animais nos resultados econômicos das propriedades (Abdalla *et al.*, 2021), ou seja, notou-se que a seleção de animais voltado para melhor conformação corporal influenciava no rendimento financeiro (Olasege *et al.*, 2019). Esse incremento financeiro ocorre, pois, a conformação do animal possui correlação com a longevidade, reprodução, locomoção, (Abo-Ismael *et al.*, 2017), afetando conseqüentemente a produtividade (McLaren *et al.*, 2016). Dentre estas características, a longevidade é uma das mais importantes na determinação do lucro da propriedade, pois sua melhora implica na redução de custos com a reposição de animais (pois reduz o descarte involuntário), maior intensidade de seleção materna e maior proporção de vacas com maior número de lactações e maior produtividade (Morek-Kopeć; Zarnecki, 2012).

Os primeiros esforços para a melhoria da longevidade através da conformação iniciaram na década de 1970, através do desenvolvimento de programas de avaliação

linear realizado pelas associações (Kern *et al.*, 2015). Há relatos que a avaliação da conformação corporal em gado leiteiro começou no início da década de 80, com o foco em avaliar as características do úbere e de tetos, pela sabida influência na produção (McLaren *et al.*, 2016). Desde então, são realizados diversos estudos que abordam relação entre essas características, lembrando ainda, que além do fator genético, a longevidade também é afetada por fatores ambientais (Atkins, 2007). A conformação em geral também é um indicativo de adaptação dos animais ao ambiente pois alguns dos genes já identificados indicam pressão de seleção para essas adaptações (González *et al.*, 2017).

1.3.1 Garupa

O conjunto denominado de garupa é composto pelas características: largura da garupa, ângulo de guapa e força lombar, apresentando grande influência nas estruturas de pernas e pés, largura e inserção de úbere e na reprodução (Atkins, 2007). Apresenta também grande influência na facilidade de parto, pois o comprimento e largura da garupa afetam o tamanho da região pélvica, assim como também o angulo de garupa influência na passagem do neonato (Sawa *et al.*, 2013).

Além da sua influência na reprodução, as estruturas da garupa possuem alta correlação com os compostos de pernas e pés (Bohlouli *et al.*, 2015). As características que compõe esse composto, juntamente com os outros grupos de composto, são importantes para a predição da produtividade, fertilidade e saúde, pois influencia na capacidade de locomoção do animal (Martins *et al.*, 2020), além de influenciar a longevidade (Getu *et al.*, 2015).

1.3.2 Força Leitaria

Esse composto é formado pelas seguintes características: estatura, largura de peito, profundidade corporal, angulosidade, condição corporal e nivelamento linha superior. O objetivo desse composto é a avaliação do equilíbrio corporal e capacidade de produção (Atkins, 2007), pois um animal bem conformado tem maiores chances de possuir um maior potencial produtivo. O tamanho corporal do animal está diretamente ligado a distribuição da energia consumida, dessa forma, a diminuição do gasto de

energia de manutença, relacionado ao tamanho corpóreo, é um fator importante para a manutenção e aumento da produção (Schmidtman *et al.*, 2022).

Além disso, o peso e a condição corporal estão correlacionados de forma negativa com a eficiência produtiva, sendo assim, animais menores e com melhores condições corporais tendem a ser os mais eficientes (Vallimont *et al.*, 2011). A condição corporal se refere a quantidade de gordura armazenada e essa reserva possui importância principalmente após o parto. Porém, um animal com alta reserva tem sua saúde e reprodução afeta de forma negativa (Isensee *et al.*, 2014). A mensuração da condição corporal ocorre através do escore de condição corporal (ECC).

1.3.3 Pernas e Pés

Esse composto é responsável pela avaliação das seguintes características: qualidade óssea, pernas vista lateral e posterior, profundidade do talão e ângulo de casco, dessa forma avaliando a qualidade da locomoção. Problemas na morfologia das pernas e pés, que pode contribuir para lesões nos cascos (Pérez-Cabal *et al.*, 2006). Representa a terceira maior causa de descarte involuntário em animais na idade produtiva, ficando atrás somente de problemas reprodutivos e saúde do úbere (Luigi-Sierra *et al.*, 2020). Sabe-se que uma locomoção adequada está diretamente associada com a produção, eficiência reprodutiva, saúde e bem-estar (Vargas *et al.*, 2018).

A formação desse composto possui correlação baixa a moderada com a saúde dos cascos (Chapinal *et al.*, 2013), influenciando sua ocorrência (Mucha *et al.*, 2018). Esse problema causa dor e desconforto ao animal, afetando diretamente o seu bem estar (Heringstad *et al.*, 2018) e causando prejuízos no seu potencial de produção (Chapinal *et al.*, 2013). Os animais acometidos com problemas nos cascos, além de necessitarem de intervenção veterinária, gerando custos com seu tratamento (Wu *et al.*, 2016), também apresentam dificuldade para se locomoverem até o local de alimentação e até a ordenha (Pérez-Cabal *et al.*, 2006).

1.3.4 Sistema Mamário

Esse composto engloba as seguintes características: altura do úbere, largura do úbere e colocação de tetos vista posterior, ligamento central, textura do úbere, profundidade do úbere, inserção de úbere, colocação de tetos anteriores e comprimento dos tetos. Sabemos que a estrutura mamaria está associada com a longevidade, saúde e bem-estar, estando diretamente ligada com os rendimentos econômicos (Devani *et al.*, 2020). Isso ocorre, pois a produção de leite necessita de um úbere saudável e bem conformado, para sustentação da produção e resistência a doenças como a mastite, um problema recorrente nas propriedades leiteiras (Tribout *et al.*, 2020). Adicionalmente, influencia na saúde, na estrutura dos tetos, assim como seu tamanho e diâmetro influenciam na ordenha mecânica, tanto na colocação de equipamentos como na velocidade de extração (McLaren *et al.*, 2016).

1.3.5 Classificação Final

A classificação final, pode ser chamada também de sistema de pontuação linear, se refere a pontuação geral dada ao animal de acordo com a avaliação individualizada dos compostos, tendo como objetivo auxiliar a avaliação da estrutura geral do animal (Bohloulo, *et al.*, 2015). Os valores referência variam de acordo com a raça e programa utilizado para a avaliação, contudo para o gado holandês são utilizados os scores de 1 a 9, onde 1 se refere a característica indesejada e 9 para excelente (Miglior *et al.*, 2017).

No passado sua avaliação tinha como objetivo principal a identificação e pontuação da beleza dos animais. Atualmente é utilizada como uma ferramenta para produtores e programas de seleção (Miglior *et al.*, 2017). Isso ocorre pois a soma de todos os compostos que formam o animal interfere no seu potencial produtivo, além de saúde, bem-estar e longevidade (Campos *et al.*, 2015).

1.4 ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA - GWAS

O melhoramento genético de várias espécies, tanto animais como de plantas, está evoluindo rapidamente com a utilização da seleção genômica (Boichard *et al.*, 2012). Esse avanço já era esperado, visto que, há muito tempo já se conhecia a importância do conhecimento e funcionalidade dos genes (Kanehisa; Goto, 2000).

Dessa forma, desde 2009 essa tecnologia vem auxiliando no melhoramento genéticos de várias características de interesse econômico (Abo-Ismael *et al.*, 2017).

A genotipagem de animais tem se tornado cada vez mais acessível, pois seu custo vem diminuindo possibilitando avaliação molecular de rebanhos comerciais dos mais diferentes tamanhos. Com isto, um número maior de animais pode contribuir com sua informação genômica, o que permite que maiores estudos com marcadores moleculares sejam realizados, desde análises de GWAS como no uso para a seleção genômica (Marete *et al.*, 2018). O aumento na genotipagem dos animais para realizar a seleção genômica tornou possível a implementação de estudos de associação genômica ampla - GWAS nas características complexas e de interesse econômico (Tribout *et al.*, 2020), e sua utilização em larga escala na pecuária (Marín-Garzón *et al.*, 2021). Sendo assim, nas últimas décadas, os estudos de GWAS se tornaram uma ferramenta poderosa na busca de potenciais marcadores genéticos em todo o genoma (Abdalla *et al.*, 2021).

Através do conhecimento das regiões genômicas é possível associá-las a possíveis genes candidatos que afetam a expressão da característica de interesse (Wu *et al.*, 2013). Além disso, os avanços tecnológicos para a genotipagem vem permitindo a identificação de vários SNPs distribuídos por todo o genoma (Marín-Garzón *et al.*, 2021). Essa identificação é importante, pois juntamente com estudos de GWAS é possível realizar o mapeamento dos genes envolvidos no controle fisiológico para formação do fenótipo (Pedrosa *et al.*, 2021; Santana *et al.*, 2015).

Como um dos avanços de estudo de GWAS, pode-se citar o estudo de associação genômica ampla em uma única etapa, ou de passo único – ssGWAS, que vem sendo o método preferencialmente utilizado para estudos de GWAS no melhoramento genético animal, principalmente quando há um número de grande de animais não genotipados porém com informações de pedigree e fenótipos conhecidos (Tarekegn *et al.*, 2021).

A metodologia ssGWAS aumenta a precisão e a potência das buscas sem aumento no custo da genotipagem, pois realiza o aproveitamento dos fenótipos de outros animais relacionados através da relação de pedigree e genótipo, realizando a conversão dessas informações em valores genéticos estimados genômicos (GEBVs), e com isso estima os efeitos de cada marcador e seus respectivos pesos (Wang *et al.*, 2012).

1.5 ANÁLISE FUNCIONAL

O objetivo principal da genômica é a descoberta de novas informações, incluindo o conhecimento de genes ligados a processos biológicos e como essa via funciona (Jeffrey Skolnick; Jacquelyn S. Fetrow; Andrzej Kolinski, 2000). Para esse conhecimento são utilizados recursos de bioinformática, sendo que o mais utilizado é a ontologia gênica (GO), responsável pelo fornecimento de informações dos produtos gênicos, suas atividades, funções biológicas e localizações celulares (Hu *et al.*, 2009).

Como resultados de estudos de GWAS, as regiões genômicas identificadas ajudam a explicar os processos fisiológicos e características fisiológicas, sendo os genes encontrados nessas regiões podem ser utilizados como candidatos na busca de possíveis mutações causais (Gonzalez Guzman *et al.*, 2020). Um dos programas disponíveis para aquisição dessas informações chama-se *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID), que é capaz de extrair das listas de genes as características biológicas associadas (Huang; Sherman; Lempicki, 2009). Sabemos que os genes são associados a vários termos biológicos e as funções biológicas também podem ser associadas a vários genes, essa interação entre genes e processos biológicos mostram a complexidade dessa rede (Hu *et al.*, 2009).

Após a conclusão dessas análises funcionais é possível compreender melhor se os genes candidatos ou as mutações estudadas, e suas ações nas vias biológicas (Macleod *et al.*, 2016). A realização desses estudos juntamente com suas conclusões proporciona maior força a ferramenta de conhecimento genômico e como os genes controlam as características de interesse em animais de produção (Hu; Park; Reecy, 2019) e para futura implementação na avaliação genômica (Gonzalez Guzman *et al.*, 2020).

REFERÊNCIAS

ABDALLA, I. M. *et al.* Genome-wide association study identifies candidate genes associated with feet and leg conformation traits in chinese holstein cattle. **Animals**, v. 11, n. 8, 1 ago. 2021.

ABO-ISMAIL, M. K. *et al.* Genome-wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 49, n. 1, 7 nov. 2017.

ATKINS, G. Using Conformational Anatomy to Identify Functionality in Dairy Cows. **Proceedings of the 24th South Western Ontario Dairy Symposium**, p. 37–48, 2007.

BOHLOULI, M. *et al.* Genetic relationships among linear type traits and milk production traits of Holstein dairy cattle. **Annals of Animal Science**, v. 15, n. 4, p. 903–917, 1 out. 2015.

BOICHARD, D. *et al.* Design of a bovine low-density snp array optimized for imputation. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 28 mar. 2012.

CAMPOS, R. V. *et al.* Genetic parameters for linear type traits and milk, fat, and protein production in Holstein cows in Brazil. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences**, v. 28, n. 4, p. 476–484, 1 abr. 2015.

CHAPINAL, N. *et al.* Genetic parameters for hoof lesions and their relationship with feet and leg traits in Canadian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 4, p. 2596–2604, abr. 2013.

DEVANI, K. *et al.* Genome-wide association study for mammary structure in Canadian Angus cows. **PLoS ONE**, v. 15, n. 8 August, 1 ago. 2020.

FAO. **DAIRY MARKET REVIEW Emerging trends and outlook 2022.**

GEBREYESUS, G. *et al.* Multi-population GWAS and enrichment analyses reveal novel genomic regions and promising candidate genes underlying bovine milk fatty acid composition. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 6 mar. 2019.

GETU, A. *et al.* The role of conformational traits on dairy cattle production and their longevity. **Open Access Library Journal**, v. 2, n. 03, p. 1, 2015.

GONZALEZ GUZMAN, J. L. *et al.* Genome-wide association study applied to type traits related to milk yield in water buffaloes (*Bubalus bubalis*). **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 2, p. 1642–1650, 1 fev. 2020.

GONZÁLEZ, M. E. *et al.* Genome-wide association analysis of body conformation traits in Mexican Holstein cattle using a mix of sampled and imputed SNP genotypes. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 2, p. 1–9, 2017.

GUTIÉRREZ, J. P.; GOYACHE, F. Estimation of genetic parameters of type traits in Asturiana de los Valles beef cattle breed. **Journal Animal Breeding Genetics**, v. 0931, n. 2668, p. 93–100, 2001.

HAYES, B. J.; LEWIN, H. A.; GODDARD, M. E. **The future of livestock breeding: Genomic selection for efficiency, reduced emissions intensity, and adaptation.** **Trends in Genetics**, abr. 2013.

HERINGSTAD, B. *et al.* Invited review: Genetics and claw health: Opportunities to enhance claw health by genetic selection. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 6, p. 4801–4821, 1 jun. 2018.

HU, Z. *et al.* VisANT 3.5: Multi-scale network visualization, analysis and inference based on the gene ontology. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. SUPPL. 2, 2009.

- HU, Z. L.; PARK, C. A.; REECY, J. M. Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. D1, p. D701–D710, 8 jan. 2019.
- HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and Integrative Analysis of Large Gene Lists Using DAVID. **Nature protocols**, v. 4, n. 1, p. 44–57, 2009.
- IBGE. **Censo Agorpecuário** . Disponível em: <<https://censoagro2017.ibge.gov.br/>>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- ISENSEE, A. *et al.* Comparison of a classical with a highly formularized body condition scoring system for dairy cattle. **Animal**, v. 8, n. 12, p. 1971–1977, 4 ago. 2014.
- ISMAEL, A. *et al.* Genotype by environment interaction for activity-based estrus traits in relation to production level for Danish Holstein. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9834–9844, 2016.
- JEFFREY SKOLNICK; JACQUELYN S. FETROW; ANDRZEJ KOLINSKI. Structural genomics and its importance for gene function analysis. **Nature America Inc.**, 2000.
- KANEHISA, M.; GOTO, S. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. **Nucleic Acids Research**, v. 28, n. 1, p. 27–30, 2000.
- KERN, E. L. *et al.* Genetic association between longevity and linear type traits of holstein cows. **Scientia Agricola**, v. 72, n. 3, p. 203–209, 2015.
- LUIGI-SIERRA, M. G. *et al.* A genome-wide association analysis for body, udder, and leg conformation traits recorded in Murciano-Granadina goats. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 12, p. 11605–11617, 1 dez. 2020.
- MACLEOD, I. M. *et al.* Exploiting biological priors and sequence variants enhances QTL discovery and genomic prediction of complex traits. **BMC Genomics**, v. 17, n. 1, 2016.
- MAPA. **MAPA do Leite**. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/producao-animal/mapa-do-leite>>. Acesso em: 22 nov. 2022.
- MARETE, A. *et al.* A system-based analysis of the genetic determinism of udder conformation and health phenotypes across three French dairy cattle breeds. **PLoS ONE**, v. 13, n. 7, 1 jul. 2018.
- MARÍN-GARZÓN, N. A. *et al.* Genome-wide association study identified genomic regions and putative candidate genes affecting meat color traits in Nellore cattle. **Meat Science**, v. 171, 1 jan. 2021.
- MARTINS, B. M. *et al.* Estimating body weight, body condition score, and type traits in dairy cows using three dimensional cameras and manual body measurements. **Livestock science**, v. 236, p. 104054, 2020.
- MCLAREN, A. *et al.* Genetic parameters of linear conformation type traits and their relationship with milk yield throughout lactation in mixed-breed dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5516–5525, 1 jul. 2016.

- MIGLIOR, F. *et al.* A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10251–10271, 1 dez. 2017.
- MOHAMMADI, A. *et al.* Genome-Wide Association Study and Pathway Analysis for Female Fertility Traits in Iranian Holstein Cattle. **Annals of Animal Science**, v. 20, n. 3, p. 825–851, 1 jul. 2020.
- MOREK-KOPEĆ, M.; ZARNECKI, A. Relationship between conformation traits and longevity in Polish Holstein Friesian cattle. **Livestock Science**, v. 149, n. 1–2, p. 53–61, nov. 2012.
- MUCHA, S. *et al.* Genome-wide association study of conformation and milk yield in mixed-breed dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 3, p. 2213–2225, 1 mar. 2018.
- OLASEGE, B. S. *et al.* Genetic parameter estimates for body conformation traits using composite index, principal component, and factor analysis. **Journal of Dairy Science**, v. 102, n. 6, p. 5219–5229, 1 jun. 2019.
- OLIVEIRA JUNIOR, G. A. *et al.* Estimated genetic parameters for all genetically evaluated traits in Canadian Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 8, p. 9002–9015, 1 ago. 2021.
- PEDROSA, V. B. *et al.* Genome wide association analyses of lactation persistency and milk production traits in holstein cattle based on imputed whole-genome sequence data. **Genes**, v. 12, n. 11, 1 nov. 2021.
- PÉREZ-CABAL, M. A. *et al.* Genetic and phenotypic relationships among locomotion type traits, profit, production, longevity, and fertility in Spanish dairy cows. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 5, p. 1776–1783, 2006.
- SANTANA, M. H. A. *et al.* A genome wide association mapping study using ultrasound-scanned information identifies potential genomic regions and candidate genes affecting carcass traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 132, n. 6, p. 420–427, 1 dez. 2015.
- SAWA, A. *et al.* Association between rump score and course of parturition in cows. **Archives Animal Breeding**, v. 56, n. 1, p. 816–822, 10 out. 2013.
- SCHMIDTMANN, C. *et al.* Genetic analysis of production traits and body size measurements and their relationships with metabolic diseases in German Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, 1 jan. 2022.
- SEWALEM, A. *et al.* Analysis of the relationship between type traits and functional survival in Canadian Holsteins using a Weibull proportional hazards model. **Journal of Dairy Science**, v. 87, n. 11, p. 3938–3946, 2004.
- TAREKEGN, G. M. *et al.* Single-step genome-wide association study uncovers known and novel candidate genomic regions for endocrine and classical fertility traits in Swedish Red and Holstein dairy cows. **Livestock Science**, v. 253, 1 nov. 2021.
- TRIBOUT, T. *et al.* Confirmed effects of candidate variants for milk production, udder health, and udder morphology in dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 52, n. 1, 1 out. 2020.

VALLIMONT, J. E. *et al.* Short communication: Heritability of gross feed efficiency and associations with yield, intake, residual intake, body weight, and body condition score in 11 commercial Pennsylvania tie stalls. **Journal of Dairy Science**, v. 94, n. 4, p. 2108–2113, abr. 2011.

VARGAS, G. *et al.* Genome-wide association study and functional analysis of feet and leg conformation traits in Nellore cattle. **Journal of Animal Science**, v. 96, n. 5, p. 1617–1627, 4 maio 2018.

WANG, H. *et al.* Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics Research**, v. 94, n. 2, p. 73–83, abr. 2012.

WU, X. *et al.* Genome wide association studies for body conformation traits in the Chinese Holstein cattle population. **BMC Genomics**, v. 14, n. 897, 2013.

WU, X. *et al.* Association analysis for feet and legs disorders with whole-genome sequence variants in 3 dairy cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7221–7231, 1 set. 2016.

CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERÍSTICAS DE CONFORMAÇÃO EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA DO BRASIL

RESUMO

A conformação linear dos animais exerce influência sobre a saúde, reprodução, produção e bem-estar, além da longevidade, o que influencia de forma direta a rentabilidade das fazendas produtoras de leite. Sabendo que a expressão dos genes é influenciada pelo ambiente em que o animal está inserido. O estudo teve como objetivos: 1) a realização de estudos de associação genômica ampla (GWAS) para característica de conformação, sendo elas: garupa, pernas e pés, sistema mamário, força leiteira e classificação final; 2) Identificação dos possíveis genes candidatos que possam estar envolvidos em processos fisiológicos associados ao características de conformação e as vias que essas estão envolvidas, em rebanhos da raça Holandesa do Brasil. Foram utilizados dados fenotípicos e genotípicos de 2.339 animais da raça Holandesa distribuídos nos estados do Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo e Minas Gerais. As informações genotípicas foram provenientes das análises realizadas com base em um painel de 100k marcadores do tipo SNP, com extração do material biológico por meio do folículo piloso. Para a análise de GWAS foi utilizada a metodologia ssGBLUP. Os genes candidatos foram determinados considerando um intervalo de 100kb up e downstream, utilizando o banco de dados Ensembl disponível na ferramenta BioMart. O banco de dados DAVID foi utilizado para a identificação das principais vias metabólicas e o programa STRING para a confecção da rede intergênica. Foram encontrados 37 SNPs significativos em 15 cromossomos, sendo que 27 destes SNPs possuem ligação com genes que podem estar influenciando as características estudadas. Ainda, foram encontrados 14 genes candidatos e 4 genes que apresentaram interação gênica em importantes vias metabólicas, como miogênese, adipogênese e angiogênese. Dentre os 18 genes candidatos, 4 foram associados a miogênese (*TMOD2*, *TMOD3*, *CCND2* e *CTBP2*) 3 foram associados a angiogênese (*FGF23*, *FGF1* e *SCG3*) e 3 relacionados com a adipogênese e tamanho e desenvolvimento corporal (*C5H12orf4*, *CCND2*, *EMILIN1* e *FGF6*). Os genes candidatos relatados nesse estudo podem ser utilizados em programas de melhoramento genético visando as características de conformação em bovinos da raça Holandesa criadas no Brasil.

Palavras-chaves: ambiente; genes; longevidade; ssGBLUP; vacas leiteiras.

ABSTRACT

The linear conformation of animals has an influence on health, reproduction, production, and well-being, as well as longevity, which directly affects the profitability of dairy farms. Knowing that gene expression is influenced by the environment in which the animal is placed, this study aimed to 1) conduct Genome-Wide Association Studies (GWAS) for conformation traits, namely: rump, legs and feet, mammary system, milk

strength, and final classification; 2) Identify possible candidate genes that may be involved in physiological processes associated with conformation traits and the pathways in which they are involved in Holstein cattle herds in Brazil. Phenotypic and genotypic data from 2,339 Holstein animals distributed across the states of Rio Grande do Sul, Paraná, São Paulo, and Minas Gerais were used. Genotypic information was obtained from analyses based on a 100k SNP marker panel, with biological material extracted from hair follicles. The ssGBLUP methodology was used for GWAS analysis. Candidate genes were determined considering a 100kb up and downstream interval using the Ensembl database available in the BioMart tool. The DAVID database was used for identifying major metabolic pathways, and the STRING program was used for constructing the intergenic network. 37 significant SNPs were found on 15 chromosomes, with 27 of these SNPs having associations with genes related to the studied characteristics. Additionally, 14 candidate genes were identified, along with 4 genes that exhibited genetic interactions in crucial metabolic pathways such as myogenesis, adipogenesis, and angiogenesis. Among these 18 candidate genes, 4 were linked to myogenesis (*TMOD2*, *TMOD3*, *CCND2*, and *CTBP2*), 3 were associated with angiogenesis (*FGF23*, *FGF1*, and *SCG3*), and 3 were related to adipogenesis, body size, and development (*C5H12orf4*, *CCND2*, *EMILIN1*, and *FGF6*). The candidate genes identified in this study can be utilized in genetic improvement programs targeting conformation traits in Holstein cattle raised in Brazil.

Keywords: environment; genes; longevity; ssGBLUP; dairy cattle.

2.1 INTRODUÇÃO

A seleção genética vem auxiliando na transformação e avanço da pecuária leiteira em todo o mundo. Durante as últimas décadas houve uma evolução na eficiência de produção, com um aumento expressivo na produção de leite (Schmidtman *et al.*, 2022). Porém, a preocupação em selecionar exclusivamente animais com perfil genético para o aumento da produção de leite, induziu a um progresso genético desbalanceado entre as características de interesse econômico (Miglior *et al.*, 2017).

Dentre elas, a conformação dos animais, que com a evolução de estudos voltados para produção foi observado uma correlação entre as características lineares e a produção dos animais (Miglior *et al.*, 2017). Pode-se destacar que essa característica exerce influência sobre aspectos importantes na pecuária leiteira, como a saúde animal, saúde do úbere, e em aspectos reprodutivos, como a facilidade de parto. Dessa forma, tem-se observado que as características de conformação estão associadas tanto a características produtivas e não-produtivas (Sawa *et al.*, 2013).

As características de conformação geralmente são mensuradas na primeira lactação, e além das associações citadas, elas também está correlacionada (0,15 a 0,40) com a longevidade funcional dos animais, ou seja, a capacidade dos animais não precisarem de um descarte involuntário (Zavadilová; Štípková, 2012). Além da conformação, o estresse térmico pode afetar de forma negativa a longevidade dos animais, pois o animal terá sua saúde prejudicada, além de redução na reprodução e produção, resultando em impactos financeiros indesejados (Luo *et al.*, 2021).

Dentro disso, a adaptação dos animais a diferentes ambientes, doenças e parasitas, possibilita a identificação de genes envolvidos no processo adaptativo dentro do genoma da espécie (Naval-Sánchez *et al.*, 2020). Estudos têm mostrado com o passar dos anos a crescente modificação do genoma bovino em resposta a seleção artificial e evolução, incluindo as modificações advindas da adaptação (Maiorano *et al.*, 2022).

Na seleção artificial, o peso dado as características a serem selecionadas é um reflexo da necessidade do rebanho, objetivos do criador, além de preferência dos consumidores e necessidades sociais, como aspectos que envolvem o meio ambiente (Paakala *et al.*, 2018). A utilização da genômica na seleção artificial tem apresentado ganhos genéticos mais acurados em relação a seleção artificial anterior ao advento da genômica (Massender *et al.*, 2023).

Dentro da genômica, destacam-se Estudos de Associação Genômica Ampla (GWAS - *Genome-Wide Association Study*). Esses têm como uma de suas estratégias a investigação de mutações que influenciam características de interesse econômico (Tizioto *et al.*, 2016; Yan *et al.*, 2020), através da exploração da arquitetura genômica (Massender *et al.*, 2023), utilizando os marcadores (SNP) como base nessa exploração. É uma tecnologia que apresenta bom desempenho na avaliação de bases genéticas de características complexas, ou seja, sofre a influência de vários genes como é o caso da característica de conformação (Cantor; Lange; Sinsheimer, 2010).

A realização da análise de enriquecimento, ontologia gênica (GO), é realizada juntamente com a análise GWAS, para a identificação de genes candidatos posicionados ligados, ou seja, em desequilíbrio de ligação (LD), em vias enriquecidas que podem ser relevantes para a característica de interesse (Gebreyesus *et al.*, 2019). Dessa forma os objetivos do presente trabalho foram: 1) a realização de GWAS análises das características de conformação, sendo elas: garupa, pernas e pés, sistema mamário, força leiteira e classificação final; 2) Identificar os possíveis genes

candidatos que possam estar envolvidos em processos fisiológicos associados às características de conformação, que estão envolvidas, em rebanhos da raça Holandesa do Brasil.

2.2 MATERIAL E METODOS

2.2.1 Fenótipos e genótipos

Foram utilizados neste estudo informações das características de conformação, mensuradas em 2.339 animais da raça Holandesa de rebanhos localizados nos estados brasileiros de Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul. As informações foram coletadas entre os anos 2021 e 2022, provenientes de primíparas. As informações genóticas foram provenientes de um painel de 100 mil marcadores do tipo SNP, comercialmente intitulado GGP Bovine 100k SNP Chip (Neogen Corporation, Lincoln, Nebraska, USA). A extração do material genético foi realizada a partir das amostras de folículos pilosos dos animais, seguindo o protocolo baseado na extração com Fenol-Clorofórmio (Sambrook; Fritsch; Maniatis, 1989).

2.2.3 Controle de qualidade

Para o controle de qualidade dos dados genóticos os seguintes critérios foram considerados para a exclusão das informações: Call-Rate menor que 0.90, SNPs presentes em cromossomos não autossômicos, SNPs com posição desconhecida ou duplicados; SNPs com alelo de menor frequência (MAF) < 0,05 e SNPs com alto desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,995$). Para as informações fenóticas, dados que excederam três desvios padrões com relação à média, dentro do grupo de contemporâneo, foram consideradas *outliers* e removidas do banco de dados. Após o controle de qualidade, realizado conforme descrição abaixo, restaram 82.897 marcadores para as análises de GWAS posteriores.

2.2.4 Estudos de associação genômica em etapa única

O método ssGWAS foi utilizado para realização das análises de associação genômica, por meio dos programas da família BLUPF90 (Misztal *et al.*, 2018). O

módulo RENUMF90 foi utilizado para renumeração dos dados fenotípicos e marcadores genômicos. O módulo PREGSF90 (Aguilar *et al.*, 2014) foi aplicado para estruturação da matriz de relacionamento e, sequencialmente, foi utilizado o BLUPF90 (Misztal *et al.*, 2018), responsável pelo processamento de equações de modelos mistos. Finalizando, o módulo postGSF90 foi usado para retroceder os valores genômicos estimados e apresentar as soluções dos efeitos dos SNPs para cada característica.

As características foram analisadas utilizando o modelo animal, conforme descrito abaixo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Za} + \mathbf{e}$$

onde \mathbf{y} representa o vetor de observações fenotípicas; \mathbf{X} é a matriz de incidência relacionando os fenótipos aos efeitos fixos, \mathbf{b} o vetor de efeitos fixos relacionado ao grupo de contemporâneo (fazenda, ano e estação) e considerando a idade do animal como covariável linear e quadrática; \mathbf{Z} é a matriz de incidência que relaciona os efeitos aleatórios; \mathbf{a} é o vetor de efeitos genéticos aditivos; \mathbf{e} é o vetor de efeitos residuais.

As variâncias de \mathbf{a} e \mathbf{e} são representados por:

$$\text{Var} [\mathbf{a} \ \mathbf{e}] = \begin{bmatrix} \mathbf{H}\sigma_a^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

em que: σ_a^2 é a variância genética aditiva direta e σ_e^2 é a variância residual. \mathbf{H} é a matriz que combina a matriz de pedigree e a matriz de informação genômica, conforme apresentado por Aguilar *et al.* (2010). \mathbf{I} é uma matriz identidade. A inversa da matriz \mathbf{H} é representada pela equação:

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}^{-1}_{22} \end{bmatrix}$$

onde \mathbf{A} é a matriz de pedigree para todos os animais; \mathbf{A}_{22} é a matriz de relacionamento dos animais genotipados; e \mathbf{G} é a matriz de relacionamento genômico, como recomendado em MISZTAL *et al.* (2018).

O seguinte algoritmo foi utilizado para resolver os efeitos dos SNP com base no ssGWAS (Wang, *et al.*, 2012).

$$\mathbf{a} = \mathbf{Z}\mathbf{u}$$

onde \mathbf{a} é um vetor de valores genéticos para os indivíduos genotipados gerados a partir de BLUPF90; \mathbf{Z} é uma matriz relacionando indivíduos aos fenótipos e \mathbf{u} é um vetor de efeitos de marcadores SNP.

Os efeitos SNP foram estimados utilizando-se a seguinte equação:

$$\hat{\mathbf{u}} = \mathbf{I}\mathbf{Z}'(\mathbf{Z}\mathbf{I}\mathbf{Z}')^{-1}\hat{\mathbf{a}}$$

onde \mathbf{u} é um vetor de efeitos de marcadores SNP, \mathbf{I} é uma matriz de identidade, \mathbf{Z} é uma matriz que relaciona indivíduos aos fenótipos e \mathbf{a} é um vetor de valores genéticos para os indivíduos genotipados. Cada SNP foi assumido como tendo uma variância de efeito de substituição de alelo igual, e foi assumido que os efeitos de SNPs seguiram o modelo infinitesimal.

Os p-valores associados aos efeitos SNP foram obtidos do programa POSTGSF90 dentro do pacote de software BLUPF90, conforme detalhado em (Masuda, 2019). O p-valor para o efeito SNP foi obtido seguindo a equação abaixo (Aguilar *et al.*, 2019).

$$p_i = 2 \left(1 - \Phi \left(\left| \frac{\alpha_i}{SD(\alpha_i)} \right| \right)\right)$$

onde α_i é a estimativa dos efeitos do marcador, SD é o desvio padrão e Φ é a função normal padrão cumulativa. Os p-valores foram gerados pela “*backsolving*” dos efeitos dos SNPs das estimativas de valores genéticos. Esta abordagem é possível porque o ajuste do animal como um efeito aleatório para gerar estimativas de valor genético é um modelo equivalente a ajustar todos os SNPs como efeitos aleatórios e resolver esses efeitos diretamente (Garrick, 2007).

2.2.4 Identificação de genes candidatos e análises funcionais

As regiões genômicas contendo SNPs significativos foram exploradas para identificação dos genes associados as características estudadas, considerando-se o P-value $<5 \times 10^{-8}$ (Jannot *et al.*, 2015). A lista de genes candidatos foi determinada considerando-se 100kb up e downstream da posição do marcador no genoma, por meio do banco de dados Ensembl Genes e o genoma referência de bovinos ARS-UCD1.2 (Cunningham, 2022).

Visando o aprimoramento da compreensão envolta dos mecanismos e processos biológicos compartilhados por esses genes anotados, foram realizadas análises de enriquecimento, por meio das ferramentas de anotação funcional do minerador de banco de dados DAVID (Sherman *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2009). Adicionalmente, foram estruturadas redes gênicas utilizando-se a ferramenta STRING (Szklarczyk *et al.*, 2023).

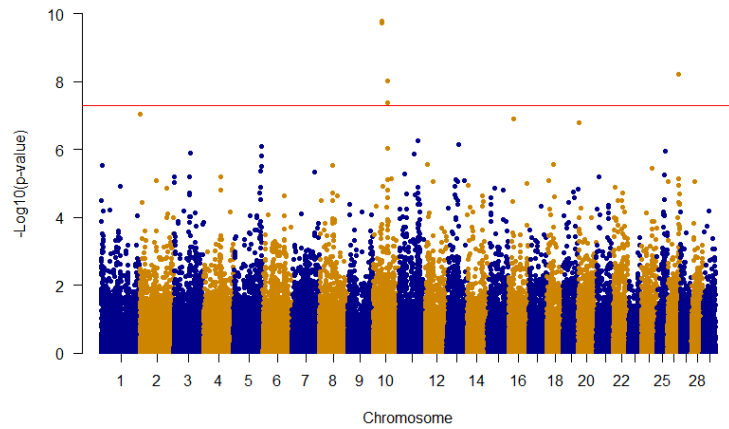
2.3 RESULTADOS

2.3.1 Single-step GWAS

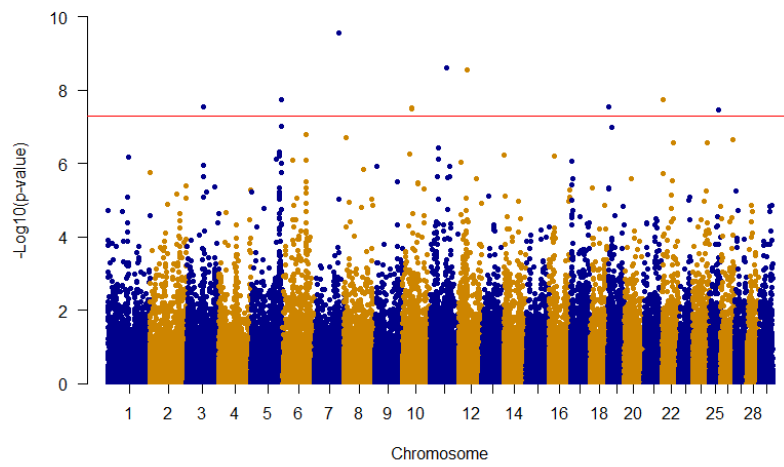
Após a análise de GWAS para as características de conformação foram encontrados um total de 36 SNP significativos, sendo 5 para Classificação Final, 9 para Garupa, 10 para Força Leiteira, 7 para Pernas e Pés, e 5 para Sistema Mamário, como podemos observar no *Manhattan plot* presente na Figura 1. Os SNP significativos para as 5 características estudadas foram encontrados nos seguintes cromossomos: BTA2, BTA3, BTA5, BTA7, BTA9, BTA10, BTA11, BTA12, BTA14, BTA19, BTA22, BTA23, BTA25, BTA26 e BTA28. Do total de SNP encontrados, 27 SNP's possuem ligação com genes e QTL conhecidos para as características estudadas. Os SNP significativos para cada característica e seus respectivos genes associados encontram-se na Tabela 1.

Figura 1 - *Manhattan plot* oriundo das análises de single-step GWAS para as características de Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) na raça Holandesa.

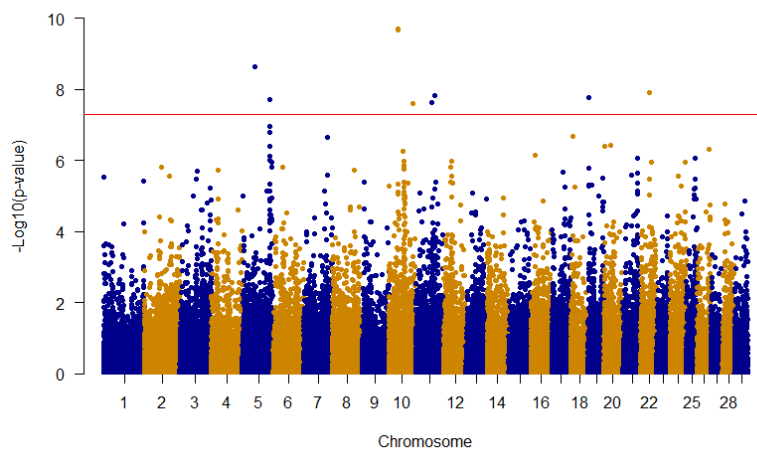
(continua)



(CF)



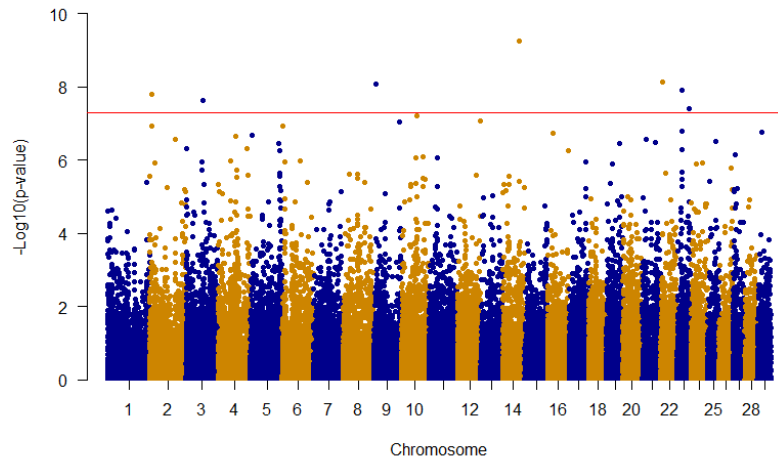
(FL)



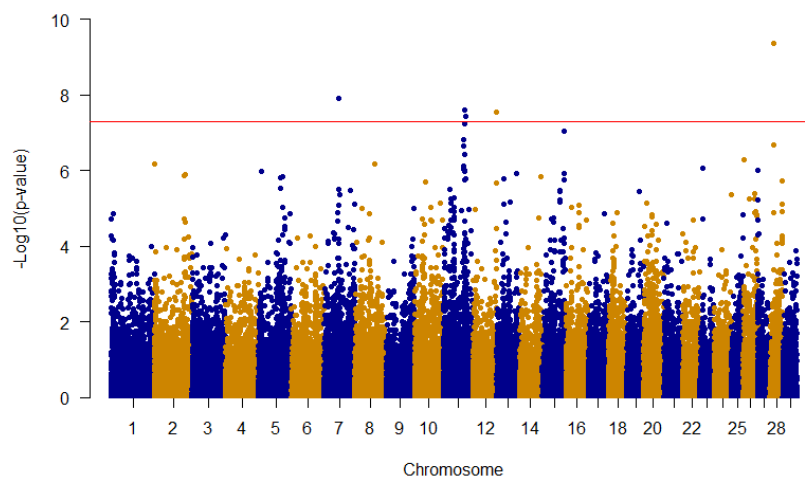
(GAR)

Figura 2 - *Manhattan plot* oriundo das análises de single-step GWAS para as características de Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) na raça Holandesa.

(conclusão)



(PP)



(SM)

Eixo x – cromossomos autossômicos.

Eixo y – porcentagem da variância genética aditiva explicada.

----- - Nível de significância genômico

Fonte: A autora.

Tabela 1 - Descrição dos SNP's significativos, com os genes e números de QTL's associados significativamente a Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) em vacas da raça Holandesa.

CARACTERÍSTICA	CHR	Posição (bp)	log-10 (p-valor)	GENES (± 100 kb)	QTL
CF	10	58643603	8,02	<i>TMOD2, TMOD3, LYSD2, SCG3, DMXL2, ENSBTAG00000050593</i>	-
	10	58635462	7,38	<i>TMOD2, TMOD3, LYSD2, SCG3, ENSBTAG00000050593</i>	-
	26	44637034	8,22	<i>ZRANB1, CTBP2</i>	7
FL	3	63243334	7,55	<i>ADGRL2</i>	-
	5	112981457	7,75	<i>SREBF2, bta-mir-33a, SHISA8, TNFRSF13C, CENPM, ENSBTAG00000050336, SEPTIN3, WBP2NL, NAGA, PHETA2, SMDT1, NDUFA6, MGC127055</i>	47
	11	63571138	8,61	<i>RAB1A, ACTR2</i>	15
	12	31640020	8,54	<i>FLT1</i>	-
	19	5726386	7,54	<i>MMD</i>	1
	22	2988284	7,73	<i>ZCWPW2</i>	2
	25	35085041	7,46	<i>CUX1, MYL10</i>	7
GAR	5	47431158	8,62	<i>GRIP1, U1, HELB, ENSBTAG00000053419</i>	23
	5	105666159	7,72	<i>RAD51AP1, C5H12orf4, FGF6, FGF23, TIGAR, CCND2</i>	27
	10	93552272	7,60	<i>ENSBTAG00000050021</i>	-
	11	72567462	7,82	<i>TCF23, PRR30, ABHD1, PREB, CGREF1, KHK, EMILIN1, AGLB5, TMEM214, MAPRE3, SNORA62</i>	15
	11	63571138	7,64	<i>RAB1A, ACTR2</i>	-
	19	5726386	7,77	<i>MMD</i>	1
	22	32355169	7,91	<i>FRMD4B, LMOD3, ARL6IP5</i>	1
PP	3	63219395	7,61	<i>ADGRL2</i>	-
	9	7763043	8,07	<i>ADGRB3</i>	3
	14	61736112	9,26	<i>ENSBTAG00000052148, KLF10</i>	27
	22	6375507	8,14	<i>OSBPL10</i>	15
	23	17018464	7,91	<i>ZNF318, ABCC10, DLK2, TJAP1, LRRC73, YIPF3, POLR1C, XPO5, POLH</i>	16
	23	44473942	7,41	<i>HIVEP1</i>	-
SM	7	53622219	7,91	<i>FGF1, bta-mir-2460, ENSBTAG00000042624</i>	5
	11	78083413	7,60	<i>LDAH</i>	20
	12	85218262	7,54	<i>COL4A2, RAB20, NAXD, CARS2, ING1</i>	1
	28	14058016	9,36	<i>BICC1</i>	-

Fonte: A autora.

2.3.2 Análise funcional

Os genes candidatos para cada característica estudada encontram-se na Tabela 2. Pode-se observar que os genes *TMOD5* e *TMOD3*, que possuem ação na formação do músculo estriado esquelético, foram associados a característica de classificação final (CF) nesse estudo. Os genes relacionados com a formação do composto garupa foram 16 genes enriquecidos para a função de regulação de processos celulares, regulação da expressão gênica, vias de sinalização, diferenciação celular, morfogênese de órgãos e outras funções celulares, sendo eles: *EMILIN1*, *FGF23*, *FGF6*, *TCF23*, *RAD51AP1*, *ACTR2*, *CCND2*, *MAPRE3*, *HELB*, *FRMD4B*, *TIGAR*, *C5H12orf4*, *KHK*, *ARL6IP5*, *LMOD3* e *TMAM214*.

Desses 16 genes foram selecionados sete que apresentaram funções relacionadas com as características estudadas, sendo genes candidatos para o composto de garupa: *C5H12orf4*, *CCND2*, *EMILIN1*, *FGF23*, *FGF6*, *HELB* e *TIGAR*. Para o composto pernas e pés foram encontrados oito genes enriquecidos com funções na membrana e no citosol, sendo eles: *ABCC10*, *ADGRL2*, *OSBPL10*, *TJAP1*, *POLH*, *HIVEP1*, *XPO5* e *ZNF318*, entre esses, três genes candidatos tinham relação com as características aqui estudadas, sendo eles: *POLH*, *HIVP1* e *ADGRL2*. Para o sistema mamário dois genes enriquecidos foram encontrados o *COL4A2* e *FGF1*, apresentando função na matriz extracelular. Para o composto de força leiteira não foi encontrado nenhum gene enriquecido em termos de ontologia gênica.

Tabela 2 - Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para as características: Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) em vacas da raça Holandesas.

(continua)

Característica	GO	Termo	p-Valor	Genes
CF	GO:0051694	Capeamento de filamento de actina de extremidade pontiaguda	2,10E-03	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0030239	Conjunto de miofibrilas	3,00E-03	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0006936	Contração muscular	1,30E-02	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0007015	Organização do filamento de actina	3,80E-02	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0005865	Filamento fino de músculo estriado	2,40E-03	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0030016	Miofibrila	5,30E-03	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0005856	Citoesqueleto	7,40E-02	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>
	GO:0005523	Ligação da tropomiosina	2,50E-03	<i>TMOD2</i> , <i>TMOD3</i>

Tabela 3 - Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para as características: Classificação final (CF), Força Leiteira (FL), Garupa (GAR), Pernas e Pés (PP) e Sistema Mamário (SM) em vacas da raça Holandesas.

(conclusão)

Característica	GO	Termo	p-Valor	Genes
CF	GO:0010628	Regulação positiva da expressão gênica	6,30E-03	<i>EMILIN1, FGF23, FGF6, TCF23</i>
	GO:1905168	Regulação positiva do reparo de quebra de fita dupla via recombinação homóloga	2,00E-02	<i>RAD51AP1, ACTR2</i>
	GO:0045737	Regulação positiva da atividade da proteína serina/treonina quinase dependente de cíclica	2,40E-02	<i>CCND2, MAPRE3</i>
GAR	GO:0008543	Via de sinalização do receptor do fator de crescimento de fibroblastos	5,00E-02	<i>FGF23, FGF6</i>
	GO:0008284	Regulação positiva da proliferação celular	5,90E-02	<i>CCND2, FGF23, FGF6</i>
	GO:0030154	Diferenciação celular	8,30E-02	<i>FGF23, FGF6, TCF23</i>
	GO:0009887	Morfogênese de órgão animal	9,20E-02	<i>FGF23, FGF6</i>
	GO:0005737	Citoplasma	2,70E-02	<i>HELB, FRMD4B, TIGAR, ACTR2, C5H12orf4, CCND2, FGF23, FGF6, KHK</i>
	GO:0005856	Citoesqueleto	4,00E-02	<i>ARL6IP5, FRMD4B, LMOD3</i>
	GO:0005881	Microtúbulo citoplasmático	4,90E-02	<i>MAPRE3, TMEM214</i>
	GO:0035861	Local de quebra da fita dupla	6,70E-02	<i>HELB, ACTR2</i>
	GO:0005104	Ligação do receptor do fator de crescimento de fibroblastos	2,20E-02	<i>FGF23, FGF6</i>
	PP	GO:0016020	Membrana	2,10E-02
GO:0005829		Citosol	7,60E-02	<i>POLH, HIVEP1, XPO5, OSBPL10, ZNF318</i>
SM	GO:0031012	Matriz extracelular	6,60E-02	<i>COL4A2, FGF1</i>

Fonte: A autora.

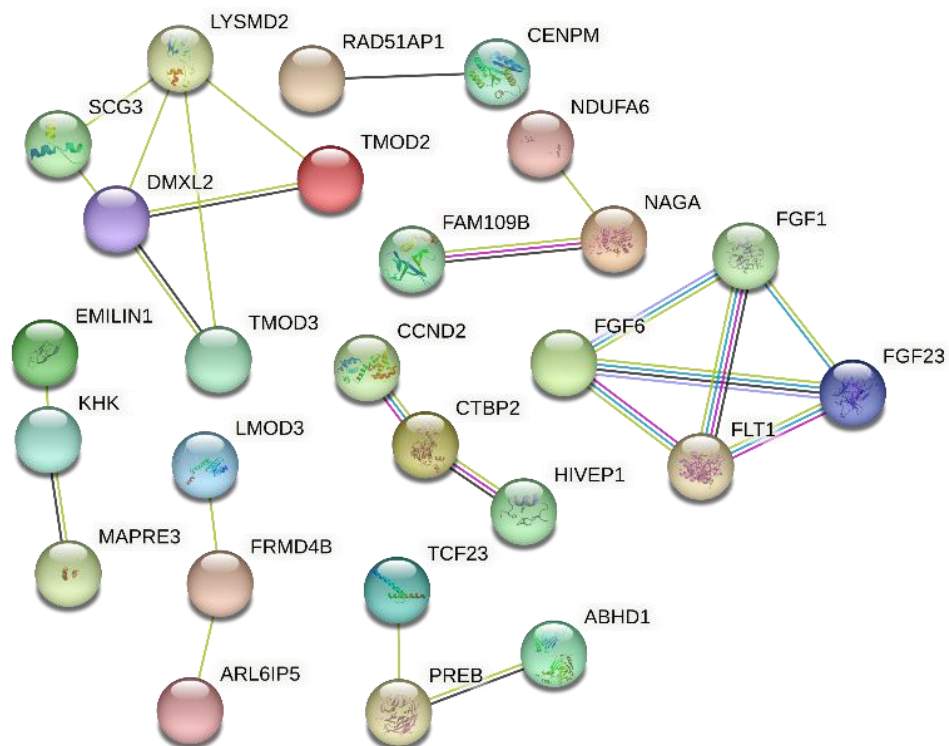
2.3.3 Rede de interação gênica

A rede de interação gênica está sendo apresentada na Figura 2. A coloração da ligação entre os genes mostra a intensidade de interação entre os genes. Nota-se que para a característica de conformação foram identificados vários genes com diferentes intensidades de interação. Pode-se observar na Figura 2 uma interação genica entre os genes candidatos de Garupa (*FGF6* e *FGF23*) e Sistema Mamário (*FGF1*), além do gene *FLT1* que apresenta função de angiogênese, sendo importante,

pois sabemos que o coração é um dos principais componentes da maquinaria de produção de leite, pela sua função de bombeamento de sangue.

Os genes *TMOD2* e *TMOD3*, genes candidatos para classificação final, aparecem em interação com o gene *SCG3* (gene com função na angiogênese). Os genes candidatos dos compostos garupa (*CCND2*) e pernas e pés (*HIVP1*) também se encontram em interação genica entre si e com o gene *CTBP2*, que apresenta função no processo de miogênese. Além das interações já citadas, os genes *EMILIN* e *KHK*, ambos genes candidatos da garupa, apresentam uma interação na via de formação do fenótipo.

Figura 3 - Rede de interação gênica para genes associados as características de Conformação em vacas da raça Holandesa.



Fonte: A autora.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Genes candidatos para Classificação Final

O gene *TMOD2* (Tropomodulin 2) está localizado no BTA10 em bovinos. Essa proteína faz parte da família Tropomodulina, que possui 4 isoformas: *TMOD1*, *TMOD2*, *TMOD3* e *TMOD4* (Tolkatchev *et al.*, 2021). Sendo que, a isoforma *TMOD2* é expressa em estruturas neurais (Bao *et al.*, 2012; Fath *et al.*, 2011; Moroz *et al.*, 2013; Yamashiro *et al.*, 2012), sendo responsável pela codificação de uma tropomodulina neural que regula o alongamento e a despolimerização da actina pela interação com a tropomiosina (Quintana *et al.*, 2017). Essa proteína pode estar associada a formação de novas estruturas sinápticas e ao aumento da extensão de neuritos (axônio ou dendrito) (Taherabadi *et al.*, 2019; Taherabadi; Rahmati, 2019).

O gene *TMOD3* (Tropomodulin 3), localizado no BTA10, é uma das isoformas da família de Tropomodulinas (Tolkatchev *et al.*, 2021), sendo expressa principalmente no tecido muscular esquelético, está associada as extremidades pontiagudas dos filamentos finos de actina (Gokhin *et al.*, 2014) com função de ligação e cobertura dessas filamentos (Stobdan *et al.*, 2022), sendo responsável pelo controle da polimerização do filamento de actina (Liu *et al.*, 2016) e interação da actina com a topomiosina (Nolte; Thaller; Kuehn, 2019). Sendo funções importantes para a manutenção da estrutura e função das fibras musculares.

Estudos recentes vêm apresentando associações dessa proteína a outras características, como na resposta adaptativa de ratos submetidos a diferentes pressões atmosféricas, representando diferentes altitudes (Stobdan *et al.*, 2022). Outro estudo associou o gene *TMOD3* a característica de crescimento em Dromedários, apontando que essa associação se dá pelo desenvolvimento de eritrócitos, capeamento de filamentos de actina de extremidade pontiaguda e vias de ligação da tropomiosina (Sani *et al.*, 2022). Pela participação dos genes *TMOD2* e *TMOD3* na via da miogênese, pode-se considerar sua relação com o desenvolvimento muscular, o que pode indiretamente exercer influência nas características de conformação de bovinos leiteiros.

2.4.2 Genes candidatos para Garupa

O gene *C5H12orf4* (Chromosome 5 C12orf4), localizado no BTA5, não possui sua função totalmente elucidada, mas já se sabe que atua na diferenciação e crescimento celular. Em trabalhos relacionados a bovinos, foi encontrado como gene candidato para tamanho (Ghoreishifar *et al.*, 2020) e peso corporal (Igoshin *et al.*,

2019) em diferentes populações. Tal fato remete a uma possível relação deste gene com a estruturação corporal de bovinos, o que pode indicar uma relação direta com a conformação linear em bovinos leiteiros.

O gene *CCND2* (Cyclin D2), localizado no BTA5, codifica a proteína ciclina D2 que é uma das proteínas reguladoras que fazem parte do complexo ciclina D2-CDK4 (ciclina dependente de quinase 4) que atua na transição da fase G1 para a fase S (Hatzirodos *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2019; Yoshioka *et al.*, 2013). Alguns estudos analisados apontam sua atuação na reprodução e regulação de hormônios reprodutivos em várias espécies (Aglan *et al.*, 2020; Baddela *et al.*, 2020; Dias *et al.*, 2018; GUPTA *et al.*, 2014; Sharma *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2022; Xie *et al.*, 2020; Yenuganti; Viergutz; Vanselow, 2016).

Esse gene também já foi associado a proliferação de pré-adipócitos (Du *et al.*, 2023; Wei *et al.*, 2016) e proliferação de células musculares (Zhou *et al.*, 2022). Em bovinos, esse gene já foi identificado como um possível influenciador na estatura e tamanho corporal (An *et al.*, 2019; Ghoreishifar *et al.*, 2020; Jiang *et al.*, 2019), conformação corporal (Fang *et al.*, 2020) e ganho de peso diário em gado da raça Holandesa (Igoshin *et al.*, 2019). Como podemos observar em estudos realizados com a avaliação desse gene, o *CCND2* pode estar associado com as características morfológicas dos animais, pois tem ação na via da miogênese e adipogênese, o que pode influenciar as características estudadas no presente trabalho.

O gene *EMILIN1* (Elastin Microfibril Interfacer 1), localizado no BTA11, codifica uma glicoproteína que faz parte da família de matriz extracelular. Tem atuação na elastogênese em diversos tecidos, além de possuir interação com o TGF β (Fator de Crescimento Transformador Beta) (Randell; Daneshtalab, 2017), fator de crescimento com função no desenvolvimento embrionário, diferenciação celular, secreção hormonal e função imunológica. Esse gene faz parte da estrutura microfibrilar das fibras elásticas (Bot *et al.*, 2015), atuando na elasticidade da pele e tecidos (Capuano *et al.*, 2016). Adicionalmente, esse gene já foi associado a características de crescimento em bovinos da raça Charolês (Jahuey-Martínez *et al.*, 2016), a placentação e a migração e invasão de trofoblastos (Martínez-Rocha *et al.*, 2022; Minuti *et al.*, 2020; Pinto de Melo *et al.*, 2017). Sua expressão é maior em tecidos que necessitam de maior elasticidade como a pele e alguns órgãos, como o útero e glândula mamaria. Tal gene pode afetar a conformação dos animais, visto que já foi

associado ao crescimento de bovinos, também podemos associá-lo a sua ação de manutenção do tecido mamário, o que afeta os bovinos leiteiros.

O gene *FGF23* (Fibroblast Growth Factor 23), localizado no BTA5, é um membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF). Estudos relacionaram esse hormônio a diversos processos biológicos, como: angiogênese, morfogênese, regulação tecidual, oncogênese (Yin; König, 2019), atuação no sistema cardiovascular (Lindberg *et al.*, 2013) e formação de osteoclastos (Mattinzoli *et al.*, 2016). Produzido principalmente no osso, o FGF23 atua na homeostase do fosfato (PO_4^{3-}) e metabolismo da vitamina D (Blau; Collins, 2015; Imel *et al.*, 2019; Kinoshita; Fukumoto, 2018; Onal *et al.*, 2018). O PO_4^{3-} atua ativamente em várias vias biológicas como o desenvolvimento do esqueleto, mineralização óssea, composição da membrana, estrutura de nucleotídeos, manutenção do pH plasmático e sinalização celular.

O gene *FGF6* (Fibroblast Growth Factor 6), está localizado no BTA5, é um membro da família dos fatores de crescimento de fibroblastos (FGF), família essa que está envolvida em vários processos celulares. Estudos realizados com diferentes raças bovinas, apontaram influência desse gene no tamanho corporal (Ghoreishifar *et al.*, 2020), conformação corporal (Fang *et al.*, 2020), possíveis ações desse gene na massa muscular (Bernard *et al.*, 2009), além de uma possível maior expressão do gene em tecido adiposo em ambientes mais frio, para uma melhor termogênese (Shamsi *et al.*, 2020). Em termos moleculares, esse gene atua em alguns processos biológicos como angiogênese, morfogênese, regulação tecidual, oncogênese (Yin; König, 2019), além de atuar no desenvolvimento embrionário (COOKE *et al.*, 2009). Em estudos realizados com espécies de peixes observaram a influência da proteína FGF6 na hiperplasia do tecido muscular (Campos *et al.*, 2010). Adicionalmente a isso, foi observado em ratos um papel importantíssimo dessa proteína na miogênese, tanto em filhotes como em adultos (Xu *et al.*, 2019), além de atuar também na regeneração muscular (Armand; Laziz; Chanoine, 2006; Laziz *et al.*, 2007).

O gene *HELB* (DNA Helicase B), está localizado no BTA5 dos bovinos e sua expressão ocorre durante a replicação celular (Fortes *et al.*, 2013), pois atua no reparo e duplicação do DNA, além de apresentar função de helicase, ou seja, o desenrolamento da fita dupla de DNA. Em decorrência da sua função, encontra-se predominantemente no núcleo durante fase G1 do ciclo celular (Hazeslip *et al.*, 2020). Adicionalmente, em bovinos, esse gene exerce função na adaptação dos animais a

regiões de clima tropical (Sun *et al.*, 2022) e ambientes com altas temperaturas constantes e altos níveis de intensidade de UV (Maiorano *et al.*, 2022). Além disso, vários SNPs nesse gene foram associados com peso ao ano em bovinos da raça Brahman (Naval-Sánchez *et al.*, 2020). Tal fato corrobora com a hipótese testada em nosso trabalho, de que alguns genes podem estar relacionados a adaptações dos bovinos leiteiros da raça Holandesa no Brasil, situados no clima tropical e subtropical, como é o caso dos animais participantes da nossa pesquisa.

O gene *TIGAR* (TP53 Induced Glycolysis Regulatory Phosphatase), está localizado no BTA5 e apresenta importantes funções a nível celular, como metabolismo de glicose (Melnik; Schmitz, 2022; Nair; Gupta; Shanmugam, 2022; Saatchi *et al.*, 2014), regulação do ciclo celular (Kim *et al.*, 2017), e resposta celular ao estresse metabólico (Bensaad; Cheung; Vousden, 2009). Sua expressão ocorre em quase todos os tecidos do organismo, sendo mais expresso no músculo, cérebro e coração (Tang *et al.*, 2021). Regulado principalmente pelo fator de transcrição induzido pelo estresse p53, responsável pelo controle de mecanismos celulares, como ciclo celular e apoptose (Marete *et al.*, 2018). Esse gene codifica uma enzima reguladora da glicose que contribui na formação de nicotinamida adeninaducleotídeo fosfato (NADPH) (Simon-Molas *et al.*, 2022). Além disso, estudos realizados com bovinos têm associado esse gene a outras características como adaptação a diferentes altitudes (Abdelmanova *et al.*, 2021; Deshmukh, 2022; Ghoreishifar *et al.*, 2020) e ambientes (Catillo *et al.*, 2018), tamanho e peso corporal e estrutura (Chebii *et al.*, 2021). Tais características já associadas a esse gene, nos sugere que ele pode estar influenciando a adaptação dos animais participantes da nossa pesquisa com relação a diferença de clima, sendo exposto ao clima tropical e subtropical, em diferentes altitudes.

2.4.3 Genes candidatos para Pernas e pés

O gene *POLH* (DNA Polymerase Eta), localizado no BTA23 dos bovinos, codifica a enzima “DNA polimerase eta” que está envolvida no ciclo celular, replicação e reparo do DNA e morfologia celular (Lin *et al.*, 2020). Mutações nesse gene afetam a assertividade na replicação do DNA, acarretando mutações (Kano; Hanaoka; Wang, 2012; Masuda *et al.*, 2007).

O gene *HIVEP1* (Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding

Protein 1), está localizado no BTA23 dos bovinos. A proteína codificada por esse gene participa na regulação de genes que atuam na resposta inflamatória (Diepeveen; Roth; Salzburger, 2013; Dürr *et al.*, 2004; Zare *et al.*, 2014).

O gene *ADGRL2* (Adhesion G Protein-Coupled Receptor L2), está localizado no BTA3. Esse gene foi associado ao peso e crescimento em suínos (Palombo *et al.*, 2021), além do desenvolvimento das regiões intra e extracelular (Kang *et al.*, 2018). Em humanos sua ação também foi associada ao sistema imunológico (Lagou *et al.*, 2018).

2.4.4 Genes candidatos para Sistema Mamário

O gene *COL4A2* (Collagen Type IV Alpha 2), localizado no BTA12, é responsável pela codificação da proteína pro α 2(IV), molécula precursora do Colágeno Tipo IV, responsável pelo fornecimento de suporte estrutural a tecidos e órgãos, como endomísio e perimísio (Ueda *et al.*, 2021). Este tipo de colágeno é principal constituinte das membranas basais (Meuwissen *et al.*, 2015), que juntamente com outros constituintes da membrana basal regulam sua incorporação e adesão as membranas (Pollner *et al.*, 1997). Mutações nesse gene podem gerar várias doenças em vários tecidos corporais, incluindo muscular (Kuo; Labelle-Dumais; Gould, 2012).

Em um estudo realizado com ovelhas, foi observado um aumento da expressão desse gene no final da lactação, que foi associado ao turnover da lâmina basal, durante a involução da glândula mamaria (Suárez-Vega *et al.*, 2015). Em vacas Holandesas produtoras de leite foi observado que esse gene desempenha papel importante na manutenção da morfologia e função nos órgãos da glândula mamaria (Dai *et al.*, 2017). Estudo avaliando diferentes tipos de alimentação em vacas Holandesas, observou que há uma diferença na expressão gênica ocasionada pelo tipo de alimento ingerido, influenciando o crescimento e desenvolvimento mamário (Dai *et al.*, 2018). Além disso, estudos recentes apontam para uma influência desse gene no metabolismo de gordura (Bai *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2020). De acordo com as características já relacionadas a esses genes, podemos associá-lo a estruturação do úbere em bovinos leiteiros.

O gene *FGF1* (Fibroblast Growth Factor 1), localizado no BTA7, faz parte da família de proteínas chamadas de fator de crescimento de fibroblastos (FGFs). Essa proteína desempenha funções como: regulação da proliferação celular (Bryckaert *et*

al., 2000), divisão celular, migração celular, neurogênese (Hsu *et al.*, 2012; Uchida *et al.*, 2017) e angiogênese (Butt *et al.*, 2007). Estudos apontam ações desse gene na reprodução (Einspanier *et al.*, 2000; Han *et al.*, 2017; Herzog *et al.*, 2019; Jiang; Price, 2012; Pfarrer *et al.*, 2006) e desenvolvimento embrionário (Chiumia *et al.*, 2020; Okumu *et al.*, 2014). Além disso essa proteína é importante para a reparação tecidual (Zhou *et al.*, 2011), visto que esse grupo de proteínas atua na formação de um tipo de tecido conectivo.

2.4.5 Genes em destaque na análise da Rede Intergênica.

O gene *ABHD1* (Abhydrolase Domain Containing 1) está localizado no BTA11. Esse gene foi encontrado próximo a um SNP associado a características de crescimento em Bovinos de corte da raça Charolês (Jahuey-Martínez *et al.*, 2016). Em vacas leiteiras Crioulas, esse gene foi encontrado em corrida de homozigose (ROH) (Martínez-Rocha *et al.*, 2022), dessa forma, não apresentando modificações e adaptações com o passar das gerações, sendo um gene fixado.

Os RNAm provenientes desse gene já foram encontrados em diversos tipos celulares como: músculo liso, fibroblastos, alguns tipos de células sanguíneas, células endoteliais e epiteliais (Makalowska; Lin; Makalowski, 2005). Sendo esse último tipo celular um dos formadores no fígado, um órgão com atividade do gene *ABHD1* (Shahzad *et al.*, 2015), órgão esse que possui interferência no crescimento e desenvolvimento corporal pois auxilia e estimula o crescimento de células e tecidos, como ossos, músculos e demais órgãos. As proteínas/enzimas codificadas por esse gene possuem ação em processos metabólicos de degradação de ácidos graxos no fígado (LIU *et al.*, 2022; Wathes *et al.*, 2021). Além disso, em estudos realizados em ratos foi observado que a proteína alpha beta hidrolase contendo domínio 1 possui função na regulação de níveis plasmáticos de LysoPCs (Linke *et al.*, 2020), sendo essa molécula um fosfolipídio importante na construção de membrana celular.

O gene *CTBP2* (C-Terminal-Binding Protein 2) é responsável pela codificação da proteína de ligação C-terminal 2, que está envolvida em vários processos celulares, como regulação transcricional e resposta a danos no DNA. A principal função dos membros da família CTBP é ser um co-repressor transcricional, interagindo com os fatores de transcrição e afetando a transcrição do DNA. Adicionalmente, ele atua em organelas, como o complexo de Golgi, e na diferenciação de tecido adiposo marrom

(Acosta-Baena *et al.*, 2022), além da atuação para a ocorrência de apoptose celular (Kovi *et al.*, 2010). Esse gene também está envolvido na regulação transcricional de mediadores de Notch e outras vias de sinalização (Mengistie; Suk Kim; Samuel, 2022), dessa forma, atuando no controle de vários processos biológicos (Van Hateren; Shenton; Borycki, 2006).

Dado seu envolvimento nos processos celulares, ele afeta os processos de desenvolvimento do organismo, como a miogênese (Ponsuksili *et al.*, 2009). Além disso, alguns estudos sugerem sua influência no sistema imunológico (Chen *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2009) e reprodutivo (Cochran *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2017; Valdez-Torres *et al.*, 2021). Além de ser considerado um gene candidato para a produção de proteína em porcentagem no leite (Vijayakumar *et al.*, 2019) e angulosidade em vacas da raça Holandesa (Kolbehdari *et al.*, 2008).

O gene *SCG3* (Secretogranin III), codifica a proteína Secretogranina III, que apresenta expressão principalmente no sistema neuroendócrino desempenhando função de armazenamento e transporte de neurotransmissores (Wang *et al.*, 2021). Estudos recentes apontam ação desse gene na angiogênese (Dai *et al.*, 2022). Em humanos foi observado que esse gene apresenta um desequilíbrio de ligação com o fenótipo de obesidade (Tanabe *et al.*, 2007). Além disso, em diferentes espécies de bovinos houve uma associação do gene a fase de puberdade (Dias *et al.*, 2017; Keogh; Kenny, 2022; Sánchez *et al.*, 2021).

O gene *FLT1* (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1), membro da família Kinase, possui função na angiogênese (Bergfelder-Drüing *et al.*, 2015; Picking *et al.*, 2020; Rotta *et al.*, 2015; Sağsöz; Saruhan, 2011). Além disso, estudos recentes realizados com gado da raça Holandesa, associaram esse gene a outras características como profundidade do úbere, ligamento central, força leiteira, nascimento de natimortos (Liu *et al.*, 2021) e resposta imunológica inata (Yin; Halli; König, 2022). Tais achados levam-nos a considerar esse gene como candidato na formação das características estudadas, principalmente as relacionadas a conformação do sistema mamário.

3 CONCLUSÃO

Através das análises GWAS foram identificados 36 SNPs significativos para as cinco características avaliadas. Esses SNPs estão associados a 27 genes com enriquecimento das vias metabólicas, sendo encontrados 14 genes candidatos, além de quatro genes que foram considerados candidatos para algumas vias por possuírem interação gênica e associados a importantes vias metabólicas para a formação de estrutura e composição corporal.

Como principais destaques, o gene *FGF23* foi identificado como participante do processo de osteogênese. Os genes *CCDN2*, *TMOD2*, *TMOD3* e *CTBP2* foram associados à via da miogênese. Os genes *C5H12orf4*, *FGF6*, *EMILIN1* e *ABHD1* foram associados ao tamanho corporal, crescimento e ganho de peso em bovinos. Os genes *FGF23*, *SCG3* e *FLT1* foram associados a angiogênese. Já os genes *HELB* e *TIGAR* foram identificados como genes que possuem atuação na adaptação dos animais a diferentes climas e altitudes.

Deste modo, as regiões genômicas encontradas foram de grande importância para a compreensão do funcionamento molecular relaciona as características de conformação em bovinos da raça Holandesa localizados no Brasil, podendo ser úteis para melhorar as predições genômicas de características de interesse econômico em bovinos de leite.

REFERÊNCIAS

- ABDELMANOVA, A. *et al.* Whole Genome Study Of Single Nucleotide Polymorphisms' Associations With Withers Height In Local And Transboundary Breeds In Russia. **AGRICULTURAL BIOLOGY**, v. 56, n. 6, p. 1111–1122, 2021.
- ACOSTA-BAENA, N. *et al.* CTBP1 and CTBP2 mutations underpinning neurological disorders: a systematic review. **Neurogenetics**, v. 23, n. 4, p. 231–240, 1 out. 2022.
- AGLAN, H. S. *et al.* Regulation of Nrf2 and NF-κB during lead toxicity in bovine granulosa cells. **Cell and Tissue Research**, v. 380, n. 3, p. 643–655, 1 jun. 2020.
- AGUILAR, I. *et al.* Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score1. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 743–752, 2010.
- AGUILAR I. *et al.* PREGSF90 – POSTGSF90: Computational Tools for the Implementation of Single-step Genomic Selection and Genome-wide Association with

Ungenotyped Individuals in BLUPF90 Programs. **10th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production PREGSF90**, 2014.

AGUILAR, I. *et al.* Frequentist p-values for large-scale-single step genome-wide association, with an application to birth weight in American Angus cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 51, n. 1, 20 jun. 2019.

AN, B. *et al.* Genome-wide association study reveals candidate genes associated with body measurement traits in Chinese Wagyu beef cattle. **Animal Genetics**, v. 50, n. 4, p. 386–390, 1 ago. 2019.

ARMAND, A. S.; LAZIZ, I.; CHANOINE, C. FGF6 in myogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 8, p. 773–778, ago. 2006.

BADDELA, V. S. *et al.* HIF1 driven transcriptional activity regulates steroidogenesis and proliferation of bovine granulosa cells. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.

BAI, Y. *et al.* Interference With ACSL1 Gene in Bovine Adipocytes: Transcriptome Profiling of mRNA and lncRNA Related to Unsaturated Fatty Acid Synthesis. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 8, 16 dez. 2021.

BAO, Y. *et al.* Actin capping proteins, CapZ (β -actinin) and tropomodulin in amphioxus striated muscle. **Gene**, v. 510, n. 1, p. 78–86, 15 nov. 2012.

BENSAAD, K.; CHEUNG, E. C.; VOUSDEN, K. H. Modulation of intracellular ROS levels by TIGAR controls autophagy. **EMBO Journal**, v. 28, n. 19, p. 3015–3026, 2009.

BERGFELDER-DRÜING, S. *et al.* A genome-wide association study in large white and landrace pig populations for number piglets born alive. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, 17 mar. 2015.

BERNARD, C. *et al.* Changes in muscle gene expression related to metabolism according to growth potential in young bulls. **Meat Science**, v. 82, n. 2, p. 205–212, jun. 2009.

BLAU, J. E.; COLLINS, M. T. The PTH-Vitamin D-FGF23 axis. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 2, p. 165–174, 23 ago. 2015.

BOT, S. *et al.* Multiple-interactions among EMILIN1 and EMILIN2 N- and C-terminal domains. **Matrix Biology**, v. 41, p. 44–55, 1 jan. 2015.

BRYCKAERT, M. *et al.* Regulation of proliferation-survival decisions is controlled by FGF1 secretion in retinal pigmented epithelial cells. **Oncogene**, v. 19, p. 4917–4929, 2000.

BUTT, C. *et al.* VEGF, FGF1, FGF2 and EGF gene polymorphisms and psoriatic arthritis. **BMC Musculoskeletal Disorders**, v. 8, 2007.

CAMPOS, C. *et al.* Dietary lipid levels have a remarkable impact on the expression of growth-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). **Journal of Experimental Biology**, v. 213, n. 2, p. 200–209, 15 jan. 2010.

- CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS Results: A Review of Statistical Methods and Recommendations for Their Application. **American Journal of Human Genetics**, v. 86, n. 1, p. 6–22, 2010.
- CAPUANO, A. *et al.* Diagnostic Exome Sequencing Identifies a Novel Gene, EMILIN1, Associated with Autosomal-Dominant Hereditary Connective Tissue Disease. **Human Mutation**, v. 37, n. 1, p. 84–97, 1 jan. 2016.
- CATILLO, G. *et al.* Identification of genomic regions harboring diversity between Holstein and two local endangered breeds, Modenese and Maremmana. **Livestock Science**, v. 216, p. 75–83, 1 out. 2018.
- CHEBII, V. J. *et al.* Genomics of adaptations in ungulates. **Animals**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021.
- CHEN, Z. *et al.* The Monocyte-Derived Exosomal CLMAT3 Activates the CtBP2-p300-NF- κ B Transcriptional Complex to Induce Proinflammatory Cytokines in ALI. **Molecular Therapy - Nucleic Acids**, v. 21, p. 1100–1110, 4 set. 2020.
- CHIUMIA, D. *et al.* Initiation of conceptus elongation coincides with an endometrium basic fibroblast growth factor (FGF2) protein increase in heifers. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, 1 mar. 2020.
- COCHRAN, S. D. *et al.* Discovery of single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with fertility and production traits in Holstein cattle. **BMC Genetics**, v. 14, 7 jun. 2013.
- COOKE, F. N. T. *et al.* Several fibroblast growth factors are expressed during pre-attachment bovine conceptus development and regulate interferon-tau expression from trophectoderm. **Reproduction**, v. 137, n. 2, p. 259–269, 2009.
- CUNNINGHAM, F. *et al.* Ensembl 2022. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D988-D995, 2022.
- DAI, C. *et al.* Safety and Efficacy of Systemic Anti-Scg3 Therapy to Treat Oxygen-Induced Retinopathy. **Frontiers in Bioscience - Landmark**, v. 27, n. 4, 1 abr. 2022.
- DAI, W. *et al.* Complementary transcriptomic and proteomic analyses reveal regulatory mechanisms of milk protein production in dairy cows consuming different forages. **Scientific Reports**, v. 7, 14 mar. 2017.
- DAI, W. *et al.* Understanding the regulatory mechanisms of milk production using integrative transcriptomic and proteomic analyses: Improving inefficient utilization of crop by-products as forage in dairy industry. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 29 maio 2018.
- DESHMUKH, S. S. **Advances in Management of Animal Genetic Resources**. [s.l.] Hyderabad: National Institute of Agricultural Extension Management (MANAGE), & ICAR-National Bureau of Animal Genetic Resources, 2022.

- DIAS, F. C. F. *et al.* Transcriptome analysis of granulosa cells after conventional vs long FSH-induced superstimulation in cattle. **BMC Genomics**, v. 19, n. 1, 16 abr. 2018.
- DIAS, M. M. *et al.* SNP detection using RNA-sequences of candidate genes associated with puberty in cattle. **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 1, 22 mar. 2017.
- DIEPEVEEN, E. T.; ROTH, O.; SALZBURGER, W. Immune-Related functions of the hivep gene family in east african cichlid fishes. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 3, n. 12, p. 2205–2217, 2013.
- DU, J. *et al.* Overexpression of cholinergic receptor nicotinic gamma subunit inhibits proliferation and differentiation of bovine preadipocytes. **Animal Bioscience**, v. 36, n. 2, p. 200–208, 1 fev. 2023.
- DÜRR, U. *et al.* Isolation and characterization of the Xenopus HIVEP gene family. **European Journal of Biochemistry**, v. 271, n. 6, p. 1135–1144, mar. 2004.
- EINSPANIER, R. *et al.* The mammalian oviduct: Aspects on auto-and paracrine mechanisms. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 3–4, p. 125–128, 2000.
- FANG, L. *et al.* Comprehensive analyses of 723 transcriptomes enhance genetic and biological interpretations for complex traits in cattle. **Genome Research**, v. 30, n. 5, p. 790–801, 1 maio 2020.
- FATH, T. *et al.* Tropomodulins are negative regulators of neurite outgrowth. **European Journal of Cell Biology**, v. 90, n. 4, p. 291–300, abr. 2011.
- FORTES, M. R. S. *et al.* Genome-wide association study for inhibin, luteinizing hormone, insulin-like growth factor 1, testicular size and semen traits in bovine species. **Andrology**, v. 1, n. 4, p. 644–650, 2013.
- GARRICK D. J. Equivalent mixed model equations for genomic selection. **Journal of animal Science**, 85:376, 2007.
- GEBREYESUS, G. *et al.* Multi-population GWAS and enrichment analyses reveal novel genomic regions and promising candidate genes underlying bovine milk fatty acid composition. **BMC Genomics**, v. 20, n. 1, 6 mar. 2019.
- GHOREISHIFAR, S. M. *et al.* Signatures of selection reveal candidate genes involved in economic traits and cold acclimation in five Swedish cattle breeds. **Genetics Selection Evolution**, v. 52, n. 1, 4 set. 2020.
- GOKHIN, D. S. *et al.* Calpain-mediated proteolysis of tropomodulin isoforms leads to thin filament elongation in dystrophic skeletal muscle. **Molecular Biology of the Cell**, v. 25, n. 6, p. 852–865, 15 mar. 2014.
- HAN, P. *et al.* Regulation and action of Early Growth Response 1 in bovine granulosa cells. **Reproduction**, v. 154, n. 4, p. 547–557, 2017.
- HATZIRODOS, N. *et al.* Transcript abundance of stromal and thecal cell related genes during bovine ovarian development. **PLoS ONE**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2019.

- HAZESLIP, L. *et al.* Genome maintenance by DNA helicase B. **Genes**, v. 11, n. 5, 1 maio 2020.
- HERZOG, K. *et al.* Effects of intravenous infusion of E. Coli lipopolysaccharide in early pregnant cows. **Reproduction**, v. 157, n. 1, p. 65–76, 2019.
- HSU, Y. C. *et al.* Ciliogenic RFX transcription factors regulate fgf1 gene promoter. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 113, n. 7, p. 2511–2522, jul. 2012.
- HUANG, D. W. *et al.* Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, 4(1), 44-57, 2009.
- IGOSHIN, A. V. *et al.* Genome-wide association study for body weight in cattle populations from Siberia. **Animal Genetics**, v. 50, n. 3, p. 250–253, 1 jun. 2019.
- IMEL, E. A. *et al.* FGF23, Hypophosphatemia, and Emerging Treatments. **JBMR Plus**, v. 3, n. 8, 1 ago. 2019.
- JAHUEY-MARTÍNEZ, F. J. *et al.* Genome wide association analysis of growth traits in charolais beef cattle. **J. Anim. Sci**, v. 94, p. 4570–4582, 2016.
- JIANG, J. *et al.* Functional annotation and Bayesian fine-mapping reveals candidate genes for important agronomic traits in Holstein bulls. **Communications Biology**, v. 2, n. 1, 1 dez. 2019.
- JIANG, Z.; PRICE, C. A. Differential actions of fibroblast growth factors on intracellular pathways and target gene expression in bovine ovarian granulose cells. **Reproduction**, v. 144, n. 5, p. 625–632, nov. 2012.
- JANNOT, A.; EHRET, G; PERNEGER, T. $P < 5 \times 10^{-8}$ has emerged as a standard of statistical significance for genome-wide association studies. **Journal of clinical epidemiology**, v. 68, n. 4, p. 460-465, 2015.
- KANG, H.-C. *et al.* Analysis of the relationship between the end weight trait and the gene ADGRL2 in purebred landrace pigs using a Genome-wide association study. **Korean Journal of Agricultural Science**, v. 45, n. 2, 2018.
- KANO, C.; HANAOKA, F.; WANG, J. Y. Analysis of mice deficient in both REV1 catalytic activity and POLH reveals an unexpected role for POLH in the generation of C to G and G to C transversions during Ig gene hypermutation. **International Immunology**, v. 24, n. 3, p. 169–174, 1 mar. 2012.
- KEOGH, K.; KENNY, D. A. Gene co-expression networks contributing to reproductive development in Holstein-Friesian bull calves. **Animal**, v. 16, n. 5, 1 maio 2022.
- KIM, S. J. *et al.* Cattle genome-wide analysis reveals genetic signatures in trypanotolerant N'Dama. **BMC Genomics**, v. 18, n. 1, 12 maio 2017.
- KINOSHITA, Y.; FUKUMOTO, S. X-linked hypophosphatemia and FGF23-related hypophosphatemic diseases: Prospect for new treatment. **Endocrine Reviews**, v. 39, n. 3, p. 274–291, 1 jun. 2018.

- KOLBEHDARI, D. *et al.* A whole-genome scan to map quantitative trait loci for conformation and functional traits in Canadian holstein bulls. **Journal of Dairy Science**, v. 91, n. 7, p. 2844–2856, 2008.
- KONG, D. *et al.* MiR-17 and miR-19 cooperatively promote skeletal muscle cell differentiation. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 76, n. 24, p. 5041–5054, 1 dez. 2019.
- KOVI, R. C. *et al.* An ARF/CtBP2 complex regulates BH3-only gene expression and p53-independent apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 17, n. 3, p. 513–521, mar. 2010.
- KUO, D. S.; LABELLE-DUMAIS, C.; GOULD, D. B. Col4a1 and col4a2 mutations and disease: Insights into pathogenic mechanisms and potential therapeutic targets. **Human Molecular Genetics**, v. 21, n. R1, out. 2012.
- LAGOU, V. *et al.* Genetic Architecture of Adaptive Immune System Identifies Key Immune Regulators. **Cell Reports**, v. 25, n. 3, p. 798- 810.e6, 16 out. 2018.
- LAZIZ, I. *et al.* Sprouty gene expression is regulated by nerve and FGF6 during regeneration of mouse muscles. **Growth Factors**, v. 25, n. 3, p. 151–159, jun. 2007.
- LIN, S. *et al.* Establishment and transcriptomic analyses of a cattle rumen epithelial primary cells (REPC) culture by bulk and single-cell RNA sequencing to elucidate interactions of butyrate and rumen development. **Heliyon**, v. 6, n. 6, 1 jun. 2020.
- LINDBERG, K. *et al.* Arterial Klotho Expression and FGF23 Effects on Vascular Calcification and Function. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, 5 abr. 2013.
- LINKE, V. *et al.* A large-scale genome–lipid association map guides lipid identification. **Nature Metabolism**, v. 2, n. 10, p. 1149–1162, 1 out. 2020.
- LIU, A. *et al.* Genome-wide Association Studies for Female Fertility Traits in Chinese and Nordic Holsteins. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017.
- LIU, D. *et al.* Genome-wide selection signatures detection in Shanghai Holstein cattle population identified genes related to adaption, health and reproduction traits. **BMC Genomics**, v. 22, n. 1, 1 dez. 2021.
- LIU, G. *et al.* Enhancer looping protein LDB1 regulates hepatocyte gene expression by cooperating with liver transcription factors. **Nucleic acids research**, v. 50, n. 16, p. 9195–9211, 9 set. 2022.
- LIU, R. *et al.* Different expression of lipid metabolism-related genes in Shandong black cattle and Luxi cattle based on transcriptome analysis. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 1 dez. 2020.
- LIU, S. *et al.* Integrative transcriptomics and proteomics analysis of longissimus dorsi muscles of Canadian double-musced Large White pigs. **Gene**, v. 577, n. 1, p. 14–23, 2016.
- LUO, H. *et al.* Genetic parameters for rectal temperature, respiration rate, and drooling score in Holstein cattle and their relationships with various fertility, production, body

conformation, and health traits. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4390–4403, 1 abr. 2021.

MAIORANO, A. M. *et al.* Signatures of selection in Nelore cattle revealed by whole-genome sequencing data. **Genomics**, v. 114, n. 2, 1 mar. 2022.

MAKALOWSKA, I.; LIN, C. F.; MAKALOWSKI, W. Overlapping genes in vertebrate genomes. **Computational Biology and Chemistry**, v. 29, n. 1, p. 1–12, fev. 2005.

MARETE, A. *et al.* Genome-wide association study for milking speed in French Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 101, n. 7, p. 6205–6219, 1 jul. 2018.

MARTÍNEZ-ROCHA, R. *et al.* Assessment of Genetic Diversity, Runs of Homozygosity, and Signatures of Selection in Tropical Milking Criollo Cattle Using Pedigree and Genomic Data. **Genes**, v. 13, n. 10, 1 out. 2022.

MASSENDER, E. *et al.* Genome-wide association study for milk production and conformation traits in Canadian Alpine and Saanen dairy goats. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 2, p. 1168–1189, 1 fev. 2023.

MASUDA, K. *et al.* DNA polymerases η and θ function in the same genetic pathway to generate mutations at A/T during somatic hypermutation of Ig genes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 24, p. 17387–17394, 15 jun. 2007.

MASUDA, Y. Introduction to BLUPF90 suite programs Concise version. University of Georgia. April 2019. Pp. 180–181. <[http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=tutorial_blupf90 .pdf](http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=tutorial_blupf90.pdf)>.

MATTINZOLI, D. *et al.* FGF23-regulated production of Fetuin-A (AHSG) in osteocytes. **Bone**, v. 83, p. 35–47, 1 fev. 2016.

MELNIK, B. C.; SCHMITZ, G. Milk Exosomal microRNAs: Postnatal Promoters of β Cell Proliferation but Potential Inducers of β Cell De-Differentiation in Adult Life. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 19, 1 out. 2022.

MENGISTIE, D.; SUK KIM, K.; SAMUEL, B. Genome-Wide Signature of Positive Selection in Ethiopian Indigenous and European Beef Cattle Breeds. **Research Square**, 2022.

MEUWISSEN, M. E. C. *et al.* The expanding phenotype of COL4A1 and COL4A2 mutations: Clinical data on 13 newly identified families and a review of the literature. **Genetics in Medicine**, v. 17, n. 11, p. 843–853, 1 nov. 2015.

MIGLIOR, F. *et al.* A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 10251–10271, 1 dez. 2017.

MINUTI, A. *et al.* Evaluation of circulating leukocyte transcriptome and its relationship with immune function and blood markers in dairy cows during the transition period. **Functional and Integrative Genomics**, v. 20, n. 2, p. 293–305, 1 mar. 2020.

- MISZTAL, I. *et al.* BLUPF90 suite of programs for animal breeding. **The 11th World Congress of Genetics Applied to Livestock Production**, n. February, p. 11.751, 2018.
- MISZTAL, I. *et al.* Manual for BLUPF90 family programs. **University of Georgia**, n. May, 2018.
- MOROZ, N. *et al.* Mutations changing tropomodulin affinity for tropomyosin alter neurite formation and extension. **PeerJ**, v. 2013, n. 1, 2013.
- NAIR, R.; GUPTA, P.; SHANMUGAM, M. Mitochondrial metabolic determinants of multiple myeloma growth, survival, and therapy efficacy. **Frontiers in Oncology**, v. 12, 16 set. 2022.
- NAVAL-SÁNCHEZ, M. *et al.* Selection signatures in tropical cattle are enriched for promoter and coding regions and reveal missense mutations in the damage response gene HELB. **Genetics Selection Evolution**, v. 52, n. 1, 27 maio 2020.
- NOLTE, W.; THALLER, G.; KUEHN, C. Selection signatures in four German warmblood horse breeds: Tracing breeding history in the modern sport horse. **PLoS ONE**, v. 14, n. 4, 1 abr. 2019.
- OKUMU, L. A. *et al.* Temporal regulation of fibroblast growth factors and their receptors in the endometrium and conceptus during the pre-implantation period of pregnancy in cattle. **Reproduction**, v. 147, n. 6, p. 825–834, 1 jun. 2014.
- ONAL, M. *et al.* A Novel Distal Enhancer Mediates Inflammation-, PTH-, and Early Onset Murine Kidney Disease-Induced Expression of the Mouse Fgf23 Gene. **JBMR Plus**, v. 2, n. 1, p. 31–46, 1 jan. 2018.
- PAAKALA, E. *et al.* Variation in the actual preferences for AI bull traits among Finnish dairy herds. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 135, n. 6, p. 410–419, 1 dez. 2018.
- PALOMBO, V. *et al.* Single-step genome wide association study identifies qtl signals for untrimmed and trimmed thigh weight in italian crossbred pigs for dry-cured ham production. **Animals**, v. 11, n. 6, 1 jun. 2021.
- PFARRER, C. *et al.* Fibroblast Growth Factor (FGF)-1, FGF2, FGF7 and FGF Receptors are Uniformly Expressed in Trophoblast Giant Cells During Restricted Trophoblast Invasion in Cows. **Placenta**, v. 27, n. 6–7, p. 758–770, jun. 2006.
- PICKING, E. M. *et al.* Technical Note: Relationship between placentome location and gene expression in bovine pregnancy. **Journal of Animal Science**, v. 98, n. 6, p. skaa176, 2020.
- PINTO DE MELO, T. *et al.* Genome-wide association study provides strong evidence of genes affecting the reproductive performance of Nellore beef cows. **PLoS ONE**, v. 12, n. 5, 1 maio 2017.
- POLLNER, R. *et al.* Cooperative and competitive interactions of regulatory elements are involved in the control of divergent transcription of human Col4A1 and Col4A2 genes. **FEBS Letters**, v. 405, p. 31–36, 1997.

- PONSUKSILI, S. *et al.* Porcine muscle sensory attributes associate with major changes in gene networks involving CAPZB, ANKRD1, and CTBP2. **Functional and Integrative Genomics**, v. 9, n. 4, p. 455–471, 2009.
- QUINTANA, A. M. *et al.* Mutations in THAP11 cause an inborn error of cobalamin metabolism and developmental abnormalities. **Human Molecular Genetics**, v. 26, n. 15, p. 2838–2849, 1 ago. 2017.
- RANDELL, A.; DANESHTALAB, N. Elastin microfibril interface–located protein 1, transforming growth factor beta, and implications on cardiovascular complications. **Journal of the American Society of Hypertension**, v. 11, n. 7, p. 437–448, 1 jul. 2017.
- ROTTA, P. P. *et al.* Effects of day of gestation and feeding regimen in Holstein × Gyr cows: III. Placental adaptations and placentome gene expression. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 5, p. 3224–3235, 1 maio 2015.
- SAATCHI, M. *et al.* Large-effect pleiotropic or closely linked QTL segregate within and across ten US cattle breeds. **BMC Genomics**, v. 15, n. 1, 6 jun. 2014.
- SAĞSÖZ, H.; SARUHAN, B. G. The expression of vascular endothelial growth factor and its receptors (flt1/fms, flk1/KDR, flt4) and vascular endothelial growth inhibitor in the bovine uterus during the sexual cycle and their correlation with serum sex steroids. **Theriogenology**, v. 75, n. 9, p. 1720–1734, 2011.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2. ed. [s.l.] Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SÁNCHEZ, J. M. *et al.* A high plane of nutrition during early life alters the hypothalamic transcriptome of heifer calves. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2021.
- SANI, M. B. *et al.* Gene-Set Enrichment Analysis for Identifying Genes and Biological Activities Associated with Growth Traits in Dromedaries. **Animals**, v. 12, n. 2, 1 jan. 2022.
- SAWA, A. *et al.* Relationship between Conformation Traits and Lifetime Production Efficiency of Cows. **ISRN Veterinary Science**, v. 2013, p. 1–4, 26 jun. 2013.
- SCHMIDTMANN, C. *et al.* Genetic analysis of production traits and body size measurements and their relationships with metabolic diseases in German Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, 1 jan. 2022.
- SHAHZAD, K. *et al.* The effect of calving in the summer on the hepatic transcriptome of Holstein cows during the peripartur period. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 8, p. 5401–5413, 1 ago. 2015.
- SHAMSI, F. *et al.* FGF6 and FGF9 regulate UCP1 expression independent of brown adipogenesis. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.
- SHARMA, A. *et al.* Effects of Dietary Fatty Acids on Bovine Oocyte Competence and Granulosa Cells. **Frontiers in Endocrinology**, v. 11, 25 fev. 2020.

- SHERMAN, B. T. *et al.* DAVID: a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update). **Nucleic acids research**, v. 50, n. W1, p. W216-W221, 2022.
- SIMON-MOLAS, H. *et al.* The Expression of TP53-Induced Glycolysis and Apoptosis Regulator (TIGAR) Can Be Controlled by the Antioxidant Orchestrator NRF2 in Human Carcinoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, 1 fev. 2022.
- STOBDAN, T. *et al.* Heterozygous Tropomodulin 3 mice have improved lung vascularization after chronic hypoxia. **Human Molecular Genetics**, v. 31, n. 7, p. 1130–1140, 1 abr. 2022.
- SUÁREZ-VEGA, A. *et al.* Characterization and comparative analysis of the milk transcriptome in two dairy sheep breeds using RNA sequencing. **Scientific Reports**, v. 5, 18 dez. 2015.
- SUN, L. *et al.* Whole-Genome Analyses Reveal Genomic Characteristics and Selection Signatures of Lincang Humped Cattle at the China–Myanmar Border. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 22 mar. 2022.
- SZKLARCZYK, Damian *et al.* The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, v. 51, n. D1, p. D638-D646, 2023.
- TAHERABADI, S. J. *et al.* Effect of Exercise Training on Tropomodulin-2 Gene Expression in Cerebellum of Diabetic Rats. **IRANIAN JOURNAL OF DIABETES AND OBESITY**, v. 11, 2019.
- TAHERABADI, S. J.; RAHMATI, M. Exercise Training Enhances Expression of Tropomodulin-2 and ADP-Ribosylation Factor 6 in the Cerebellum of Male Wistar Rats. **Zahedan Journal of Research in Medical Sciences**, v. 21, n. 4, 28 set. 2019.
- TANABE, A. *et al.* Functional single-nucleotide polymorphisms in the secretogranin III (SCG3) gene that form secretory granules with appetite-related neuropeptides are associated with obesity. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 92, n. 3, p. 1145–1154, 2007.
- TANG, J. *et al.* Structure, regulation, and biological functions of TIGAR and its role in diseases. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 42, n. 10, p. 1547–1555, 1 out. 2021.
- TIZIOTO, P. C. *et al.* Gene expression differences in Longissimus muscle of Nelore steers genetically divergent for residual feed intake. **Scientific Reports**, v. 6, 22 dez. 2016.
- TOLKATCHEV, D. *et al.* Structural insights into the tropomodulin assembly at the pointed ends of actin filaments. **Protein Science**, v. 30, n. 2, p. 423–437, 1 fev. 2021.
- UCHIDA, S. *et al.* CRT1 Nuclear Translocation Following Learning Modulates Memory Strength via Exchange of Chromatin Remodeling Complexes on the Fgf1 Gene. **Cell Reports**, v. 18, n. 2, p. 352–366, 10 jan. 2017.

- UEDA, S. *et al.* Gene expression analysis provides new insights into the mechanism of intramuscular fat formation in Japanese black cattle. **Genes**, v. 12, n. 8, 1 ago. 2021.
- VALDEZ-TORRES, J. M. *et al.* QTL analysis associated to single nucleotide polymorphisms (SNP) involved in the dairy phenotype of Holstein cattle. **Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias**, v. 11, n. 4, p. 1192–1207, 2021.
- VAN HATEREN, N.; SHENTON, T.; BORYCKI, A. G. Expression of avian C-terminal binding proteins (Ctbp1 and Ctbp2) during embryonic development. **Developmental Dynamics**, v. 235, n. 2, p. 490–495, fev. 2006.
- VIJAYAKUMAR, P. *et al.* Meta-analysis of mammary RNA seq datasets reveals the molecular understanding of bovine lactation biology. **Genome**, v. 62, n. 7, p. 489–501, 2019.
- WANG, H. *et al.* Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics Research**, v. 94, n. 2, p. 73–83, abr. 2012.
- WANG, Y. *et al.* SCG3 Protein Expression in Glioma Associates With less Malignancy and Favorable Clinical Outcomes. **Pathology and Oncology Research**, v. 27, 26 fev. 2021.
- WATHES, D. C. *et al.* Relationships between metabolic profiles and gene expression in liver and leukocytes of dairy cows in early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 3, p. 3596–3616, 1 mar. 2021.
- WEI, Y. *et al.* MicroRNA-2400 promotes bovine preadipocyte proliferation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 478, n. 3, p. 1054–1059, 2016.
- XIE, J. *et al.* Effect of concentrate supplementation on the expression profile of miRNA in the ovaries of yak during non-breeding season. **Animals**, v. 10, n. 9, p. 1–17, 1 set. 2020.
- XU, Y. *et al.* Characterization and expression analysis of FGF6 (fibroblast growth factor 6) genes of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) reveal their regulation on muscle growth. **Fish Physiology and Biochemistry**, v. 45, n. 5, p. 1649–1662, 1 out. 2019.
- YAMASHIRO, S. *et al.* Tropomodulins: Pointed-end capping proteins that regulate actin filament architecture in diverse cell types. **Cytoskeleton**, v. 69, n. 6, p. 337–370, 2012.
- YAN, Z. *et al.* Identification of whole-genome significant single nucleotide polymorphisms in candidate genes associated with body conformation traits in Chinese Holstein cattle. **Animal Genetics**, v. 51, n. 1, p. 141–146, 1 fev. 2020.
- YENUGANTI, V. R.; VIERGUTZ, T.; VANSELOW, J. Oleic acid induces specific alterations in the morphology, gene expression and steroid hormone production of cultured bovine granulosa cells. **General and Comparative Endocrinology**, v. 232, p. 134–144, 1 jun. 2016.
- YIN, T.; HALLI, K.; KÖNIG, S. Direct genetic effects, maternal genetic effects, and maternal genetic sensitivity on prenatal heat stress for calf diseases and corresponding

genomic loci in German Holsteins. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 8, p. 6795–6808, 1 ago. 2022.

YIN, T.; KÖNIG, S. Genome-wide associations and detection of potential candidate genes for direct genetic and maternal genetic effects influencing dairy cattle body weight at different ages. **Genetics Selection Evolution**, v. 51, n. 1, 6 fev. 2019.

YOSHIOKA, S. *et al.* Proliferation of luteal steroidogenic cells in cattle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 27 dez. 2013.

ZARE, Y. *et al.* Genome-wide association analysis and genomic prediction of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infection in US Jersey cattle. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, 11 fev. 2014.

ZAVADILOVÁ, L.; ŠTÍPKOVÁ, M. Genetic correlations between longevity and conformation traits in the Czech Holstein population. **Czech J. Anim. Sci.**, v. 57, n. 3, p. 125–136, 2012.

ZHOU, D. *et al.* The MyoD1 Promoted Muscle Differentiation and Generation by Activating CCND2 in Guanling Cattle. **Animals**, v. 12, n. 19, 1 out. 2022.

ZHOU Y *et al.* Construction of a recombinant human FGF1 expression vector for mammary gland-specific expression in human breast cancer cells. **Mol Cell Biochem**, v. 354, p. 39–46, 2011.