

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

RITA CAROLINA GAIA

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

PONTA GROSSA

2023

RITA CAROLINA GAIA

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

Dissertação apresentada para
obtenção do título de mestre na
Universidade Estadual de Ponta
Grossa, Zootecnia (Produção
Animal).

Orientador: Prof. Dr. Victor Breno
Pedrosa

PONTA GROSSA

2023

G137 Gaia, Rita Carolina
Estudos de associação genômica ampla para características de qualidade do leite em bovinos da raça holandesa do Brasil / Rita Carolina Gaia. Ponta Grossa, 2023.
79 f.

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

Orientador: Prof. Dr. Víctor Breno Pedrosa.

1. Genes. 2. GWAS. 3. Leite - qualidade. 4. Leite - gordura. 5. Leite - proteína. I. Pedrosa, Víctor Breno. II. Universidade Estadual de Ponta Grossa. Produção Animal. III.T.

CDD: 636



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA

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

TERMO

TERMO DE APROVAÇÃO

RITA CAROLINA GAIA

“ESTUDOS DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DO LEITE 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, 03 de novembro 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 **Adriana Aparecida Telles, Secretário(a)**, em 08/11/2023, às 13:50, 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 08/11/2023, às 13:55, conforme Resolução UEPG CA 114/2018 e art. 1º, III, "b", da Lei 11.419/2006.



Documento assinado eletronicamente por **Victor Breno Pedrosa, Professor(a)**, em 08/11/2023, às 13:56, 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 09/11/2023, às 22:51, 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 **1689018** e o código CRC **6F99331C**.

23.000062250-2

1689018v2

AGRADECIMENTOS

Nos momentos mais difíceis é que mais sentimos a presença de Deus em nossas vidas. Nessa jornada em várias oportunidades observei a bondade de Deus. Em cada sentimento de gratidão pude sentir que Ele sempre esteve ao meu lado. Agradeço aos Santos e Anjos do Senhor por nunca me abandonarem, por me ensinarem a ser mais forte e resiliente a cada desafio. Sou grata por cada momento de felicidade e mais grata ainda por cada adversidade, pois todos os momentos lapidaram a pessoa que sou hoje.

Nas dificuldades da vida minha vó sempre foi um exemplo de força, por isso agradeço por todos os ensinamentos, pela paciência, pelo amor e por todos os agrados feitos com carinho para me cuidar. Agradeço também a minha família por todo suporte, apoio, amor e carinho. Minha família com 9 mulheres que serão sempre exemplo de força, persistência e dedicação. Obrigada por me ensinarem a ser uma pessoa melhor a cada dia, eu amo vocês.

Agradeço ao Professor Victor Breno Pedrosa por todo auxílio, por todos os ensinamentos, pela paciência e por todos os conselhos. Foram anos de dedicação e de instruções valiosas. Graças a toda ajuda e incentivo posso celebrar o final de mais uma jornada. Foi um privilégio ter um orientador solícito, sábio e paciente. Com certeza sempre será uma inspiração na minha vida.

Agradeço todos meus amigos pelo suporte e, de maneira especial, agradeço a minha amiga Emanuelli de Fátima Pereira por me ensinar que a vida sempre tem um lado bom e por me ensinar quão valiosa é a amizade nos momentos difíceis. Agradeço por ser minha amiga e um pouco minha psicóloga, minha mãe, minha irmã... por ser minha família, mesmo não tendo meu sangue.

Não poderia deixar de agradecer aos meus animais de estimação Cherie e Haley, por estarem comigo sempre, por me mostrarem todos os dias o que é amor de verdade, por serem uma luz para me guiar nos momentos de desânimo e pela força para sempre seguir em frente. Agradeço a Deus por me dar esses dois anjos.

Agradeço também a Associação Paranaense de Bovinos da Raça Holandesa (APCBRH), pelo apoio durante a fase do mestrado e pelos colegas que sempre me apoiaram e me encorajaram. Toda ajuda contribuiu para minha formação pessoal e profissional.

Finalizando, agradeço ao CNPq e CAPES pela concessão da bolsa e recursos para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos sou eternamente grata.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará com você por onde você andar.”

Josué 1:9

RESUMO

Com o desenvolvimento acelerado da indústria visando cada vez mais qualidade e rendimento, foi necessário buscar ferramentas inovadoras para que os rebanhos consigam acompanhar as exigências de mercado com rentabilidade e bem-estar. Com os estudos de associação do genoma (GWAS) há relatos de muitos marcadores moleculares que contribuem para a produção leiteira, e características de gordura e proteína do leite, na Raça Holandesa. Ao longo dos anos, vários estudos de GWAS identificaram genes relevantes para produção de leite e sólidos em diferentes populações da raça Holandesa. Entretanto, ainda não há muitas informações sobre o genoma desses animais no Brasil, onde estes são mantidos sob condições de criação, manejo e clima distintos dos demais locais onde os estudos da genômica já estão mais avançados. Por isso, neste estudo foram encontradas regiões genômicas importantes para porcentagem de gordura e proteína, bem como, produção de gordura de proteína em quilos, nos bovinos da raça Holandesa criados no Brasil. Neste estudo, analisaram-se dados de produção de leite em 2.339 vacas Holandesas em quatro estados brasileiros entre 2021 e 2022, com 84.411 marcadores após controle de qualidade, utilizando o GGP Bovine 100k SNP Chip. A abordagem ssGWAS foi aplicada com a família de programas BLUPF90, seguida pela exploração de regiões genômicas com SNPs significativos (P -value $<5 \times 10^{-8}$) e identificação de genes associados, complementadas por análises de enriquecimento e redes gênicas utilizando-se as ferramentas DAVID e STRING. Os genes *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *SLC52A2* e *TSNARE1* foram encontrados em todas as características analisadas. E os genes que tiveram maior pico nos gráficos de Manhattan Plot foram os genes *SLC52A2* e *DGAT1*. Para produção de proteína em quilos foram encontrados 17 cromossomos em 30 genes diferentes, já para PTAProdução de gordura em quilos foram encontrados 27 genes em 16 cromossomos. No que diz respeito a porcentagem de proteína, foram encontrados 12 genes em 3 cromossomos e para porcentagem de gordura foram encontrados 48 genes em 23 cromossomos. Na análise dos parâmetros funcionais, foi observado que os genes *CSN1S1*, *CSN2*, *PLEC*, *SVEP1*, *MAML3*, *MRTFA* e *MRTFB* desempenham uma função predominante nos processos biológicos relacionados à característica de proteína em quilos. No que diz respeito à característica de proteína em porcentagem, foram identificados como mais relevantes os genes *EPPK1*, *PLEC*, *VPS28*, *ADGRB1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *MAPK15*, *TRAPPC9*, *GHR*, *HSTN*, *CPSF1*, *ZC3H3* e *SLC4A4*. Para produção de gordura em quilos, foram encontrados 35 genes, sendo o de maior evidencia o gene *PLEC* e dos 42 genes para porcentagem de gordura os genes com maior incidência foram *AGO2* e *AGO3*. Estes genes podem estar relacionados nas funções dos processos biológicos, funções relacionadas do componente celular e função molecular. Funções diretas ou indiretas, para produção leiteira ainda não foram estabelecidas na literatura para os genes *AGO2*, *AGO3*, *ARHGAP39*, *C25H16ORF82*, *CDH3*, *CMYA5*, *DENND3*, *EEF1D*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000038214*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000051599*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000055067*, *EXOC3*, *FBXO43*, *GLT6D1*, *GNAI3*, *GPAA1*, *GRHL2*, *GUCA1A*, *IQANK1*, *IVNS1APB*, *KCNA4*, *KIAA0753*, *KMT2E*, *LRRC1*, *MAF1*, *MAPK15*, *MLIP*, *MRTFB*, *NADSYN*, *NCALD*, *OPCML*, *OR2D37*, *OSCP1*, *OSR2*, *PIK3C2G*, *PTK2*, *PTPN14*, *RAB2A*, *RAP1GAP2*, *RCN3*, *RERG*, *RGMA*, *RNF1144B*, *RNF19A*, *RTRAF*, *SEMA3A*, *SH2D4B*, *SPAG1*, *SPIN1*, *STK40*, *TNRC6B*, *UBXN2A*, *ZBTB46* e *ZNF691*. Portanto, estes genes podem colaborar para o melhoramento genético da raça Holandesa do Brasil, sendo expressos nos rebanhos leiteiros criados em ambientes tropicais e sub tropicais. Este estudo desempenhou um papel

importante ao investigar a composição genética dos bovinos leiteiros da raça Holandesa criados em condições ambientais brasileiras. Essa pesquisa visou obter um maior conhecimento das variantes genéticas favoráveis que podem contribuir para o aumento da produtividade leiteira nacional.

Palavras-chave: Genes; GWAS; gordura; leite; proteína

ABSTRACT

With the accelerated development of the industry, increasingly aiming for quality and performance, it was necessary to seek innovative tools so that herds can keep up with market demands with profitability and well-being. With genome-wide association studies (GWAS) there are reports of many molecular markers that contribute to milk production, and milk fat and protein characteristics, in the Holstein Breed. Over the years, several GWAS studies have identified genes relevant to milk and solid production in different Holstein populations. However, there is still not much information about the genome of these animals in Brazil, where they are kept under breeding, management and climate conditions that are different from other places where genomic studies are already more advanced. Therefore, in this study, important genomic regions were found for the percentage of fat and protein, as well as the production of protein fat in kilos, in Holstein cattle raised in Brazil. In this study, milk production data was analyzed in 2,339 Holstein cows in four Brazilian states between 2021 and 2022, with 84,411 markers after quality control, using the GGP Bovine 100k SNP Chip. The ssGWAS approach was applied with the BLUPF90 family of programs, followed by the exploration of genomic regions with significant SNPs (P-value $<5 \times 10^{-8}$) and identification of associated genes, complemented by enrichment analyzes and gene networks using DAVID tools and STRING. The *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *SLC52A2* and *TSNARE1* genes were found in all analyzed traits. And the genes that had the highest peak in the Manhattan Plot graphs were the *SLC52A2* and *DGAT1* genes. For protein production in kilos, 17 chromosomes were found in 30 different genes, while for PTA fat production in kilos, 27 genes were found in 16 chromosomes. Regarding the protein percentage, 12 genes were found on 3 chromosomes and for fat percentage, 48 genes were found on 23 chromosomes. In the analysis of functional parameters, it was observed that the genes *CSN1S1*, *CSN2*, *PLEC*, *SVEP1*, *MAML3*, *MRTFA* and *MRTFB* play a predominant role in biological processes related to the kilo protein characteristic. With regard to the protein characteristic in percentage, the genes *EPPK1*, *PLEC*, *VPS28*, *ADGRB1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *MAPK15*, *TRAPPC9*, *GHR*, *HSTN*, *CPSF1*, *ZC3H3* and *SLC4A4* were identified as most relevant. For fat production in kilos, 35 genes were found, the most evident being the *PLEC* gene and of the 42 genes for fat percentage, the genes with the highest incidence were *AGO2* and *AGO3*. These genes may be related in the functions of biological processes, related functions of the cellular component and molecular function. Direct or indirect functions for milk production have not yet been established in the literature for the genes *AGO2*, *AGO3*, *ARHGAP39*, *C25H16ORF82*, *CDH3*, *CMYA5*, *DENND3*, *EEF1D*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000038214*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000051599*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000055067*, *EXOC3*, *FBXO43*, *GLT6D1*, *GNAI3*, *GPAA1*, *GRHL2*, *GUCA1A*, *IQANK1*, *IVNS1APB*, *KCNA4*, *KIAA0753*, *KMT2E*, *LRRC1*, *MAF1*, *MAPK15*, *MLIP*, *MRTFB*, *NADSYN*, *NCALD*, *OPCML*, *OR2D37*, *OSCP1*, *OSR2*, *PIK3C2G*, *PTK2*, *PTPN14*, *RAB2A*, *RAP1GAP2*, *RCN3*, *REERG*, *RGMA*, *RNF1144B*, *RNF19A*, *RTRAF*, *SEMA3A*, *SH2D4B*, *SPAG1*, *SPIN1*, *STK40*, *TNRC6B*, *UBXN2A*, *ZBTB46* and *ZNF691*. Therefore, these genes can contribute to the genetic improvement of the Brazilian Holstein breed, being expressed in dairy herds raised in tropical and subtropical environments. This study played an important role in investigating the genetic composition of Holstein dairy cattle raised in Brazilian environmental conditions. This research aimed to obtain greater knowledge of favorable genetic variants that can contribute to increasing national dairy productivity.

Keywords: Genes; GWAS; fat; milk; protein

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de produção de proteína do leite em quilos da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)	35
Figura 2. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica porcentagem de proteína do leite da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)	37
Figura 3. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de produção de gordura do leite em quilos da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)	38
Figura 4. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de porcentagem de gordura do leite da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)	40
Figura 5. Rede de interação gênica para genes associados à produção de proteína em vacas holandesas	48
Figura 6. Rede de interação gênica para genes associados à produção de gordura em vacas holandesas	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em quilos de proteína em vacas Holandesas.....	36
Tabela 2. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em porcentagem de proteína em vacas Holandesas.....	37
Tabela 3. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção de quilos de gordura em vacas Holandesas	39
Tabela 4. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em porcentagem de gordura em vacas Holandesas.....	41
Tabela 5. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para quilos de proteína em vacas Holandesas.....	43
Tabela 6. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para porcentagem de proteína em vacas Holandesas	44
Tabela 7. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para quilo de gordura em vacas Holandesas.	45
Tabela 8. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para porcentagem de gordura em vacas Holandesas	46

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA	14
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	16
1.2.1 Melhoramento Genético, Genômica e GWAS	16
1.2.2 Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs), Locus de característica quantitativa (QTLs) e Ontologia Gênica.....	18
1.2.3 Influência do Ambiente	19
1.2.4 Raça Holandesa	21
1.2.5 Sólidos do leite.....	21
REFERÊNCIAS	23
CAPÍTULO 2 – ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO GENÔMICA AMPLA PARA CARACTERÍSTICAS DE QUALIDADE DO LEITE EM BOVINOS DA RAÇA HOLANDESA DO BRASIL	27
2.1 INTRODUÇÃO	29
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	31
2.2.1 Banco de dados fenotípicos e genotípicos.....	31
2.2.2 Controle de qualidade de dados	31
2.2.3 Estudo de associação genômica em etapa única (ssGWAS).....	31
2.3 RESULTADOS	34
2.3.1 Produção de Proteína (Kg)	34
2.3.2 Porcentagem de Proteína	36
2.3.3 Produção de Gordura (Kg).....	38
2.3.4 Porcentagem de Gordura.....	39
2.3.5 Análises Funcionais e Rede de Interação Gênica	42
2.4 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS	69

CAPÍTULO 1 – REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

A pecuária brasileira se destaca, pois em 2021 o efetivo bovino foi de aproximadamente 224 milhões de cabeças, e neste mesmo ano, a produção leiteira foi de 35 milhões de litros de leite, segundo informações dos indicadores agropecuários (IBGE, 2021). Porém, o último censo agropecuário em 2017, houve uma média de 2.621 litros de leite vaca/ano (IBGE, 2017). A cadeia produtiva do leite compreende uma das principais atividades econômicas do Brasil, sendo indispensável para geração de renda e empregos (ROCHA et al., 2020).

Apesar de apresentar grande destaque nos momentos atuais, a cadeia produtiva de leite começou a se desenvolver acentuadamente após a década de 90, antes disso, a atividade leiteira era direcionada ao mercado interno (VILELA et al., 2002; ROCHA et al., 2018). Para se manter nessa posição, o país aumentou consideravelmente sua produção durante os anos, apresentando 33,8 bilhões de litros de leite produzido em 2018, com consumo per capita de leite e derivados de 169 litros por habitante em 2019, aumentando 1% em relação a 2018 (EMBRAPA, 2020).

Um dos motivos que fez com que a produtividade dos rebanhos leiteiros aumentasse sensivelmente nos últimos anos foi adoção de novas ferramentas tecnológicas no melhoramento genético, como a genômica. Durante muitos anos foi possível melhorar os rebanhos usando exclusivamente usando informações de pedigree e o fenótipo dos animais, porém, com o avanço da tecnologia conseguimos aliar essas informações juntamente com os dados do DNA dos rebanhos para realização de um processo de seleção mais acurado (VANRADEN, 2020). Neste contexto, pode-se utilizar associações entre marcadores moleculares e fenótipos para desvendar regiões genômicas ligadas a características de interesse econômico em bovinos leiteiros e outras espécies de interesse zootécnico (WANG et al., 2018).

Os estudos de associação do genoma amplo (GWAS – *Genome Wide Association Study*) são utilizados para identificar variantes genéticas associadas a fenótipos (MORTEZAEI; TAVALLAEI., 2021). O processo de genotipagem dos animais permitiu a identificação de Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP – *Single*

Nucleotide Polymorphism), variantes pontuais encontradas ao longo do DNA, que podem estar associadas a características de interesse, como a qualidade do leite (IUNG et al., 2019).

Nos últimos anos a seleção animal visou principalmente o aumento da produção de leite (BRITO et al., 2021), entretanto, é indispensável que características relacionadas a qualidade do leite estejam nos objetivos de seleção de uma propriedade com o intuito de aumentar a lucratividade. A seleção para a qualidade do leite e índices de gordura e proteína são de extrema importância, pois há descontos e bonificações na maioria dos laticínios brasileiros, para os produtores que atingirem boas porcentagens de sólidos, pois com uma boa qualidade leiteira os produtos finais apresentam melhor rentabilidade na indústria (SANTOS; GUERIOS, 2020).

A produção, gordura e proteína do leite são características que podem variar entre as raças de bovinos e é determinante para estabelecer a qualidade leiteira (TOPNO et al., 2023). Além das raças serem distintas geneticamente, há fatores ambientais e de manejo que também podem afetar a produção e a composição do leite, independentemente da raça. Por essa razão, é relevante avaliar o genoma da raça Holandesa brasileira e os genes expressos para composição leiteira em bovinos criados em condições de manejo e ambiente pertencentes ao território brasileiro. Conhecer a estrutura molecular e os genes associados ao aumento do potencial genético suficiente para garantir níveis satisfatórios de gordura e proteína, é fundamental para melhorar o potencial de ganho genético para as características em questão (SIQUEIRA et al., 2019).

O objetivo do presente trabalho foi identificar regiões genômicas e genes associados a características de gordura e proteína do leite em bovinos da raça Holandesa criados no Brasil. Adicionalmente, foram realizadas análises funcionais para melhor conhecimento dos processos e vias metabólicas relacionados aos genes significativos identificados.

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Melhoramento Genético, Genômica e GWAS

Desde os primórdios, os criadores de animais fazem a seleção visando a melhoria de certas características, inicialmente avaliação se dava pela aparência do animal, com o passar do tempo, iniciou-se a seleção através da produção, aliada ao pedigree (VANRADEN, 2020). Atualmente, através da genômica, a escolha de animais superiores pode ser realizada com mais acurácia (COLE; VANRADEN, 2018). Uma das vantagens da utilização de tal tecnologia, é a possibilidade de selecionar animais de maneira eficiente e rápida, atendendo as exigências de mercado, diminuindo o intervalo entre as gerações e aumentando a previsão genética de animais jovens (SCHEFERS, WEIGEL., 2012; BRITO et al., 2021).

Ganhos significativos foram atribuídos a seleção por meio de fenótipo e genética clássica (fenótipo + pedigree), todavia, com a seleção genômica através dos SNPs localizados ao longo do genoma é possível aumentar a precisão da seleção e acelerar o ganho genético (SNELLING et al, 2013). Com a seleção através da genética clássica era necessário, para se ter maior confiabilidade, um número grande de animais registrados e com controle de produção. Porém, com o avanço da era genômica atingimos a acurácia esperada das informações em tempo reduzido, é possível a identificação de marcadores moleculares que possuem influência nas características de produção economicamente importantes e ainda, faz com que a tomada de decisão pelos criadores seja feita de maneira mais rápida e eficaz (COLE; VANRADEN, 2018).

Outras vantagens do uso da genômica são a possibilidade de selecionar animais jovens diminuindo o intervalo de gerações, além da obtenção de bons resultados para as características com baixa herdabilidade, garantindo assim mais acurácia nas informações (LUND et al., 2011). Por essa razão, a genômica contribui expressivamente, principalmente quando não há informações prévias de dados fenotípicos e garante acurácia para características de baixa herdabilidade. Portanto, com a genômica conseguimos maiores taxas de ganho genético, intervalo de gerações mais curtos e, até mesmo, identificação de genes que podem causar distúrbios (COLE; VANRADEN, 2018).

Existem características notórias referentes a rentabilidade leiteira que são controladas não somente por um, mas por uma série de genes que influenciam positiva ou negativamente na produção e o mérito genético (COLE; VANRADEN, 2018). As características quantitativas como, produção de leite e sólidos, são controladas por vários pares de genes, e para que esses genes fossem estudados de maneira isolada foi necessário o desenvolvimento dos estudos de associação para relacionar regiões do genoma com fenótipos específicos (OLIVEIRA et al, 2019). Os estudos de GWAS são muito utilizados para detectar essas características mais complexas e visam detectar associações por meio de SNPs no desequilíbrio de ligação (TEISSIER et al, 2018).

Com os avanços da tecnologia foi possível sequenciar o genoma bovino e identificar as variações genéticas na forma de SNPs (polimorfismos de nucleotídeo único) e com desequilíbrio de ligações foi possível fazer a seleção genômica, pois para fazer a associação de características complexas é necessário a genotipagem através dos SNPs e mapear o efeito do locus nas características quantitativas (QTLs) (NAYERI et al, 2016). Através do GWAS (*Genome-Wide Association Study*) conseguimos verificar mudanças no DNA que podem corresponder a expressão de um fenótipo de interesse, localizar genes assimilando os mesmo com uma função biológica, por meio de diferenças nas frequências alélicas (UFFELMANN et al., 2021). Através da precisão dos estudos de genoma amplo, é possível selecionar os animais de maneira mais eficaz, pois através dessa metodologia há possibilidade de aumentar a confiabilidade dos valores genéticos e aumentar o ganho genético por intervalo de tempo (OLIVEIRA et al., 2019). O uso do GWAS permite verificar os efeitos dos marcadores moleculares utilizando como referência as informações de fenótipo, genótipo e pode utilizar também o conhecimento sobre o pedigree dos animais, o que resulta em maior acurácia para analisar o efeito dos SNPs (BUABAN, LENGNUDUM, BOONKUM, PHAKDEEDINDAN., 2022).

A seleção genômica através do GWAS depende de um desequilíbrio de ligação entre os marcadores moleculares e loci de características quantitativas (QTL - *Quantitative Trait Loci*) (BOLORMAA et al., 2013). Através dessa metodologia é possível identificar SNPs que podem estar localizados em genes ou regiões específicas, e detectar os QTLs apontando regiões no genoma importantes para as características de interesse que influenciam a produção leiteira (COLE et al., 2011).

1.2.2 Polimorfismos de Nucleotídeos Únicos (SNPs), Locus de característica quantitativa (QTLs) e Ontologia Gênica

As variantes mais comuns estudadas por meio do GWAS são os SNPs que podem estar associados entre si e possuir relações estatisticamente significativas com as características de interesse econômico (UFFELMANN et al., 2021). Além disso, a maioria dos procedimentos usados para avaliação genômica são baseados em painéis de genotipagem com milhares de SNPs (TEISSIER et al., 2018). Existem marcadores de baixa densidade, com 2.900 SNPs, e marcadores de alta densidade, com 777.962 SNPs (WIGGANS et al., 2017). No presente trabalho que foi usado um painel com 100.000 marcadores moleculares.

O uso dos SNPs para indicar o valor genético na seleção genômica, foi descrito pela primeira vez por Meuwissen et al. (2001) e já naquela época foi proposto que as informações relacionadas ao DNA dos animais levariam a um ganho genético mais rápido do que aquelas obtidas somente por meio de dados fenotípicos. Os SNPs são relacionados a mudanças em um único par de bases no DNA, gerando um marcador molecular que pode estar relacionado a uma função biológica (BUSH; MOORE, 2012).

Com a evolução da genômica foi possível a identificação de marcadores moleculares encontrados no DNA dos animais e através dos SNPs reconhecemos QTLs que influenciam o fenótipo (BUSH; MOORE, 2012). Os QTLs fazem uma associação entre dois alelos que estão próximos dentro de um cromossomo e que podem ser herdados juntos (PEARSON; MANOLIO, 2008). Com o estudo dos QTLs é possível analisar características mais complexas e os fenótipos de uma progênie através da identificação de regiões do genoma que haja marcadores significativos e é controlado pela ação de alelos em múltiplos loci (SHIMOYAMA et al., 2012). Os SNPs afetam diretamente a previsão genômica das características, e ainda, e associando os QTLs e os desequilíbrios de ligação é possível prever quando um SNP é herdado e correlacionado em uma população (BUSH; MOORE, 2012).

Outra tecnologia extremamente importante e utilizada atualmente é a ontologia gênica (OG). Através da OG é possível associar os genes e suas possíveis funções, sendo um conhecimento computacional sobre os produtos gênicos (THOMAS, 2017). Os genes geram respostas que podem desencadear um processo bioquímico relacionado a função molecular, processo biológico ou componente celular (PLESSIS

et al. 2011). A ontologia gênica relaciona os RNAs e proteínas ao conjunto de genes (ZHAO et al, 2020). Esse recurso é mantido por um consórcio de especialistas e abrange genes de inúmeros organismos, inclusive os vírus (Nucleic Acids Research, 2021).

1.2.3 Influência do Ambiente

Os bovinos já vem sendo genotipados com intensidade em outros países, como Estados Unidos, Canadá, Holanda, entre outros (WELLER et al., 2017). Com a disseminação da inseminação artificial, ocorre o registro de filhas de touros em diversas partes do mundo, criadas em ambientes diferentes e sob condições climáticas distintas, portanto, isso pode causar uma variação fenotípica devido ao ambiente ser antagônico (BOHLOULI et al., 2019). Estudos de GWAS demonstram que há interação do genótipo conforme a estação do ano e há SNPs que mudam seus efeitos durante determinado período, por conta do clima e umidade (LU et al., 2021). Portanto, é interessante relacionar os efeitos dos SNPs encontrados na raça Holandesa brasileira, onde os animais estão inseridos em locais mais quentes. Sabe-se que há grande influência do ambiente para expressão dos fenótipos dos animais, por conta disso, é de extrema importância a realização da genotipagem dos animais da raça holandesa no Brasil, onde há um clima predominantemente tropical, a fim de ter conhecimento sobre das características estudadas em países distintos.

Vacas leiteiras submetidas a altas temperaturas, assim como é o clima predominante no Brasil, podem apresentar diminuição na produção e qualidade leiteira, além de que as vacas de alta produção possuem maior atividade metabólica para que haja a produção e isso gera um acréscimo de calor corporal (BOHLOULI et al., 2022). Além de tudo, a intensa seleção para produção de leite e sólidos aumentou a sensibilidade das vacas em relação ao calor, juntamente a um maior requerimento para a produção (SIGDEL et al., 2019).

O estresse calórico afeta intensamente o rendimento e a produtividade dos animais, além disso, vacas leiteiras podem sofrer prejuízos na produção de leite e sólidos (BIFFANI et al., 2016). Ademais, a herdabilidade para as características de produção de leite são menores em animais presentes em locais de climas quentes, em relação aos ambientes temperados (BOHLOULI et al., 2019). O leite é essencial a saúde humana, porém, mudanças genéticas ou ambientais podem fazer com que haja

variações na composição do leite (LU et al., 2021). Em grande parte do Brasil há sistemas de pastejo e ambientes que não possuem condições extremamente favoráveis para a produção leiteira, por essa razão o ambiente deve ser levado em consideração no que diz respeito os objetivos de seleção (OTTO et al., 2020). Em vista disso, é de extrema relevância analisar a expressão genética das características de qualidade leiteira em ambientes com temperaturas elevadas na maior parte do ano e verificar quais marcadores seriam notórios nesses locais. Com isso é possível aprimorar a genética dos bovinos leiteiros em países tropicais e subtropicais, para que os animais sejam mais rentáveis e para que a população tenha produto final mais nutritivo e com boa qualidade.

Bohlouli et al. (2022), demonstraram que vários genes têm influência do ambiente, inclusive o gene *DGAT1* que possui grande importância para a produção de leite e sólidos, pois ele também influenciou o metabolismo energético das vacas em lactação. Também Sigdel et al. 2019, avaliaram a seleção genética para a termorregulação e a influência dos genes nessa característica, mostrando que é necessário levar em consideração o ambiente na seleção genética, pois há relação de certos genes com a temperatura ambiente e corporal.

Com o estresse térmico há redução na produção leiteira e prejuízos econômicos para os produtores e para a indústria, além disso, pode afetar a secreção de hormônios, desenvolvimento mamário, lactogênese, reprodução e saúde da vaca (TAO et al, 2018). As condições ambientais, bem como temperatura, podem afetar a expressão gênica das características de produção (IUNG et al, 2019). A genotipagem de alto rendimento e as novas ferramentas genômicas auxiliam no entendimento dos mapas genômicos a fim de que haja alto desempenho dos animais mesmo em ambientes distintos (CALUS et al., 2013; LIU et al., 2020). É necessário a identificação de regiões do genoma que podem ter uma expressão diferente em bovinos brasileiros decorrente do clima tropical e subtropical para que haja uma compreensão do fenótipo e para que haja mais eficiência na seleção.

1.2.4 Raça Holandesa

A raça holandesa é conhecida pela alta produção leiteira e performance superior (HOLSTEIN ASSOCIATION USA, 2023). O gado holandês (*Holstein-Friesian*) é uma raça de origem europeia (*Bos taurus*) amplamente utilizada no mundo e possui aptidão para produção de leite, foi domesticada aproximadamente 2000 anos atrás na Holanda (ABCBRH, 2011). É uma raça largamente utilizada no Brasil, possui uma das maiores produções de proteína e gordura, que consequentemente gera maior lucro, e o período de lactação desse animal é mais longo quando comparado a outras raças (VIANA, 2021). Essa raça é amplamente utilizada como matriz em cruzamentos, a fim de transmitir o gene expressivo de alta produção para as futuras linhagens (ISOLA, 2020).

1.2.5 Sólidos do leite

Os objetivos de seleção de uma propriedade devem ser traçados sabendo que para que uma característica seja melhorada é necessário tempo, mas que seu efeito é permanente. Com essa perspectiva analisada precisamos levar em consideração as exigências do mercado consumidor, para que a próxima geração selecionada geneticamente venha a trazer benefícios lucrativos aos produtores. Atualmente, o mercado busca um leite com melhor qualidade e a indústria visa um leite com maiores teores de sólidos para o processamento (DE CÓRDOVA CUCCO et al., 2017).

O leite compreende a combinação de diversos componentes sólidos em água, tais componentes são denominados sólidos totais (ST), além disso, a maioria das características físicas, como estrutura e cor do produto lácteo, são determinadas pelas micelas de caseína e glóbulos de gordura (MCCARTHY, SINGH, 2009; LUCEY, LONTRA, HORNE, 2017). A composição do leite pode variar de acordo com o estágio de lactação em que a vaca se encontra, como o colostro no período periparto, que apresenta maior concentração de proteína, enquanto o teor de lactose é menor quando comparado ao leite normal (NAKAMURA et al., 2003; TSIOLPAS et al., 2007). Adicionalmente, essa composição é sujeita a alterações de acordo com a alimentação, raça do animal, saúde da glândula mamária, temperatura ambiental e

intervalo entre as ordenhas (CAVALCANTI, 2021). Além disso, quanto maior a concentração de proteína, maior será o teor de gordura no leite, pois são parâmetros diretamente proporcionais (JENKINS, MCGUIRE, 2006).

Os teores de proteína e gordura no leite são determinantes para a lucratividade, pois estão relacionados com a produção de queijo e bonificações dadas pela indústria, por isso há interesse em encontrar variantes genéticas que contribuam para a eficiência dos sólidos e para que estas sejam incluídas nos critérios de seleção (AMALFITANO et al., 2020). O conjunto das moléculas de gordura, são responsáveis pela consistência e a cor dos produtos láteos, sendo essenciais para a manufatura de diversos produtos derivados do leite, representando uma maior concentração de elementos sólidos dos queijos (RAVASH et al., 2022).

O leite contém gordura, proteína e muitos componentes importantes para a dieta humana, porém a genética do animal pode diferir a composição do leite (LU; WANG; BOVENHUIS, 2021). A gordura do leite uma fonte importante de energia e sabor ao leite cru e derivados e o estudo de GWAS é de suma importância para analisar a contribuição genética para a variabilidade da gordura leiteira (PALOMBO et al., 2018). Os programas de melhoramento genético do gado leiteiro têm como objetivo aumentar a produção de leite e aprimorar sua composição, incluindo teor de proteína e gordura (PEÑAGARICANO, 2020). Há interesse na seleção de animais que possuem variantes genéticas favoráveis associadas a uma maior produção de leite e melhores características de qualidade (LIU et al., 2020). Por essa razão, é relevante o estudo da composição genética dos bovinos leiteiros Holandeses criados em condições ambientais brasileira, para que haja maior conhecimento de variantes que sejam favoráveis para o aumento do rendimento leiteiro nacional.

REFERÊNCIAS

ABCBRH. **A origem da raça no mundo**, 2011.

ABIA. **Números do Setor – Faturamento**. Associação Brasileira das Indústrias de Alimentação, 2017.

AMALFITANO, Nicolò et al. Quantitative and qualitative detailed milk protein profiles of 6 cattle breeds: Sources of variation and contribution of protein genetic variants. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 12, p. 11190-11208, 2020.

BIFFANI, S., BERNABUCCI, U., VITALI, A., LACETERA, N., & NARDONE, A. Effect of heat stress on nonreturn rate of Italian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 7, p. 5837-5843, 2016.

BOHLOULI, M. et al. Genome-wide associations for heat stress response suggest potential candidate genes underlying milk fatty acid composition in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 3323-3340, 2022.

BOHLOULI, M., ALIJANI, S., NADERI, S., YIN, T., & KÖNIG, S. Prediction accuracies and genetic parameters for test-day traits from genomic and pedigree-based random regression models with or without heat stress interactions. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 1, p. 488-502, 2019.

BOLORMAA, Sunduimijid et al. Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using genome-wide association studies. **Genetics Selection Evolution**, v. 45, n. 1, p. 1-12, 2013.

BRITO, L. F. et al. Genetic selection of high-yielding dairy cattle toward sustainable farming systems in a rapidly changing world. **Animal**, v. 15, p. 100292, 2021.

BUABAN, S. et al. Genome-wide association study on milk production and somatic cell score for Thai dairy cattle using weighted single-step approach with random regression test-day model. **Journal of Dairy Science**, 105(1), 468-494. 2022.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-wide association studies. **PLoS computational biology**, v. 8, n. 12, p. e1002822, 2012.

CALUS, M. P. L.; DE HAAS, Y.; VEERKAMP, R. F. Combining cow and bull reference populations to increase accuracy of genomic prediction and genome-wide association studies. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6703-6715, 2013.

CAVALCANTI, Gabriel Gomes. **Fatores que interferem na produção de sólidos totais do leite bovino**. Trabalho de conclusão de curso (Zootecnia) - Pontifícia Universidade Católica de Goiás. 2021.

COLE, J. B.; VANRADEN, P. M. Symposium review: Possibilities in an age of genomics: The future of selection indices. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 3686-3701, 2018.

COLE, John B. et al. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary US Holstein cows. **BMC genomics**, v. 12, n. 1, p. 1-17, 2011.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Cadeia Produtiva do leite no Brasil: produção primária**, 2020.

DE CÓRDOVA CUCCO, D. et al. Estudo das correlações entre as PTAs (capacidades previstas de transmissão) de touros da raça Holandês com avaliação genética disponíveis no Brasil: características de produção, reprodução e conformação. **Livestock Research for Rural Development**, v. 29, p. 1, 2017.

HOLSTEIN ASSOCIATION USA. Disponível em: <<https://www.holsteinusa.com/>>. Acesso em: junho de 2023.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Censo agropecuário, 2017**. Disponível em: <<https://biblioteca.ibge.gov.br/index.php/biblioteca-catalogo?view=detalhes&id=73096>>. Acesso em: dezembro, 2022.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Painel de Indicadores, 2021**. Indicadores agropecuários. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/indicadores#ipp>>. Acesso em: junho, 2023.

ISOLA, José Victor Vieira. **Raça holandesa: história e características**. Milkpoint, 2020.

IUNG, L. H. S. et al. Genome-wide association study for milk production traits in a Brazilian Holstein population. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 6, p. 5305-5314, 2019.

JENKINS, T. C.; MCGUIRE, M. A. Major advances in nutrition: impact on milk composition. **Journal of dairy science**, v. 89, n. 4, p. 1302-1310, 2006.

LIU, Liyuan et al. GWAS-based identification of new loci for milk yield, fat, and protein in Holstein cattle. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2048, 2020.

LU, Haibo; WANG, Yachun; BOVENHUIS, Henk. Phenotypic and genetic effects of season on milk production traits in dairy cattle in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4486-4497, 2021.

LUCEY, John A.; OTTER, Don; HORNE, David S. A 100-Year Review: Progress on the chemistry of milk and its components. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 12, p. 9916-9932, 2017.

LUND, M. S. et al. A common reference population from four European Holstein populations increases reliability of genomic predictions. **Rev. Genetics Selection Evolution**, v. 43, n.1, p.43, 2011.

MCCARTHY, O. J.; SINGH, H. Physico-chemical properties of milk. *Advanced Dairy Chemistry: Volume 3: Lactose, Water, Salts and Minor Constituents*, p. 691-758, 2009.

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

MORTEZAEI, Zahra; TAVALLAEI, Mahmood. Recent innovations and in-depth aspects of post-genome wide association study (Post-GWAS) to understand the genetic basis of complex phenotypes. **Heredity**, v. 127, n. 6, p. 485-497, 2021.

NAKAMURA, T. et al. Concentrations of sialyloligosaccharides in bovine colostrum and milk during the parturition and early lactation. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 4, p. 1315-1320, 2003.

- NAYERI, Shadi et al. Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2016.
- OLIVEIRA, H. R. et al. Genomic prediction of lactation curves for milk, fat, protein, and somatic cell score in Holstein cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 1, p. 452-463, 2019.
- OLIVEIRA, H. R. et al. Single-step genome-wide association for longitudinal traits of Canadian Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 11, p. 9995-10011, 2019.
- OTTO, Pamela I. et al. Single-step genome-wide association studies (GWAS) and post-GWAS analyses to identify genomic regions and candidate genes for milk yield in Brazilian Girolando cattle. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 11, p. 10347-10360, 2020.
- PALOMBO, V. et al. Genome-wide association study of milk fatty acid composition in Italian Simmental and Italian Holstein cows using single nucleotide polymorphism arrays. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 12, p. 11004-11019, 2018.
- PEARSON, T. A.; MANOLIO, T. A. How to interpret a genome-wide association study. **Jama**, v. 299, n. 11, p. 1335-1344, 2008.
- PEÑAGARICANO, Francisco. Genetics and genomics of dairy cattle. In: Animal Agriculture. **Academic Press**, 2020. p. 101-119.
- PLESSIS, L.; SKUNCA, N.; DESSIMOZ, C. The what, where, how and why of gene ontology—a primer for bioinformaticians. **Briefings in bioinformatics**, v. 12, n. 6, p. 723-735, 2011.
- RAVASH, Negar et al. Impact of high-pressure treatment on casein micelles, whey proteins, fat globules and enzymes activity in dairy products: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 62, n. 11, p. 2888-2908, 2022.
- ROCHA, D. T.; DE RESENDE, J. C.; MARTINS, P. do C. Evolução tecnológica da atividade leiteira no Brasil: uma visão a partir do Sistema de Produção da Embrapa Gado de Leite. 2018.
- ROCHA, D. T.; CARVALHO, G. R.; RESENDE, J. C. **Cadeia produtiva do leite no Brasil: produção primária**. 2020.
- SANTOS, José Henrique Amaro; GUERIOS, Euler Márcio Ayres. Principais fatores que influenciam na concentração de sólidos totais no leite de fêmeas bovinas. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 3, n. 1, p. 81-88, 2020.
- SCHEFERS, J. M.; WEIGEL, K. A. Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. **Animal Frontiers**, v. 2, n. 1, p. 4-9, 2012.
- SHIMOYAMA, Mary et al. Model Organism Databases in Behavioral Neuroscience. **International Review of Neurobiology**, v. 104, p. 25-46, 2012.
- SIGDEL, Anil et al. Whole genome mapping reveals novel genes and pathways involved in milk production under heat stress in US Holstein cows. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 928, 2019.

SIQUEIRA, L. B. et al. Metanálise das estimativas de herdabilidade do percentual de gordura e proteína do leite. **Rev. Uningá review**, v. 34, n. 1, p. 17-17, 2019.

SNELLING, W. M. et al. BREEDING AND GENETICS SYMPOSIUM: Networks and pathways to guide genomic selection-. **Journal of Animal Science**, v. 91, n. 2, p. 537-552, 2013.

TAO, S. et al. Symposium review: The influences of heat stress on bovine mammary gland function. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 6, p. 5642-5654, 2018.

TEISSIER, Marc et al. Use of meta-analyses and joint analyses to select variants in whole genome sequences for genomic evaluation: an application in milk production of French dairy cattle breeds. **Journal of dairy science**, v. 101, n. 4, p. 3126-3139, 2018.

The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D325-D334, 2021.

THOMAS, P. D. The gene ontology and the meaning of biological function. In: **The gene ontology handbook**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 15-24.

TOPNO, N. A. et al. Non-Synonymous Variants in Fat QTL Genes among High-and Low-Milk-Yielding Indigenous Breeds. **Animals**, v. 13, n. 5, p. 884, 2023.

TSIOULPAS, A.; GRANDISON, A. S.; LEWIS, M. J. Changes in physical properties of bovine milk from the colostrum period to early lactation. **Journal of dairy science**, v. 90, n. 11, p. 5012-5017, 2007.

UFFELMANN, Emil et al. Estudos de associação de todo o genoma. **Nature Reviews Methods Primers**, v. 1, n. 1, pág. 1-21, 2021.

VANRADEN, P. M. Symposium review: How to implement genomic selection. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5291-5301, 2020.

VIANA, Eduarda. **Conheça as principais raças e características das vacas leiteiras encontradas no Brasil e saiba escolher a que mais irá se adaptar ao seu sistema de produção**. Esteio Gestão Agropecuária, 2021.

VILELA, Duarte et al. Políticas para o leite no Brasil: passado, presente e futuro. **Simpósio Sobre Sustentabilidade da Pecuária Leiteira na Região Sul do Brasil**, v. 1, p. 1-26, 2002.

WANG, Xin et al. Genomic selection methods for crop improvement: Current status and prospects. **The Crop Journal**, v. 6, n. 4, p. 330-340, 2018.

WELLER, J. I.; EZRA, E.; RON, M. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 11, p. 8633-8644, 2017.

WIGGANS, G. R., COLE, J. B., HUBBARD, S. M., & SONSTEGARD, T. S. Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. **Annual review of animal biosciences**, v. 5, p. 309-327, 2017.

ZHAO, Yingwen et al. Uma revisão da literatura de predição de função gênica por modelagem de ontologia gênica. **Frontiers in Genetics**, v. 11, p. 400, 2020.

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

RESUMO

O melhoramento genético é essencial na busca por melhorias nos teores de gordura e proteína ao longo das gerações na produção de leite bovino. Através de estudos de GWAS, é possível identificar regiões genômicas relacionadas a características econômicas de grande importância, como a produção e a qualidade do leite, permitindo uma compreensão mais profunda da influência da estrutura genética na expressão das características desejadas. Nos ambientes tropicais e subtropicais, o conhecimento de marcadores genéticos significativos, obtido por meio de estudos de GWAS, é essencial para otimizar o potencial genético de vacas leiteiras e para a seleção de animais mais adaptados às adversidades ambientais, sendo de extrema relevância no presente estudo em bovinos da raça Holandesa criados no Brasil. Foram analisadas informações de produção de gordura e proteína do leite em 2.339 vacas Holandesas em quatro estados brasileiros entre 2021 e 2022, utilizando um painel genotípico de 100 mil marcadores SNP. A abordagem ssGWAS, integrando módulos da família BLUPF90, foi aplicada para identificar associações genômicas, explorando regiões com SNPs significativos, e posteriormente, análises de enriquecimento e construção de redes gênicas foram conduzidas para aprofundar a compreensão dos mecanismos biológicos associados. Os genes *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *SLC52A2* e *TSNARE1* foram encontrados em todas as características analisadas neste estudo, ou seja, produção de gordura e proteína em quilogramas, bem como a porcentagem de gordura e proteína. A porcentagem de gordura e proteína mostrou semelhanças em 2 genes específicos *GHR* e *NNT*. Em contraste, a quantidade de gordura e proteína em quilogramas (Kg) exibiu semelhança no gene *RBM19*. No que diz respeito às características da proteína, seja em quilogramas ou em porcentagem, os genes em comum incluem *HSTN*, *CSN1S1* e *CSN2*. Por outro lado, os genes que compartilham semelhanças em relação à gordura em quilos e porcentagem são *SLC15A5* e *REGG*. Foram identificados genes nunca previamente associados com a produção leiteira, como: *AGO2*, *AGO3*, *ARHGAP39*, *C25H16ORF82*, *CDH3*, *CMYA5*, *DENND3*, *EEF1D*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000038214*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000051599*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000055067*, *EXOC3*, *FBXO43*, *GLT6D1*, *GNAI3*, *GPAA1*, *GRHL2*, *GUCA1A*, *IQANK1*, *IVNS1APB*, *KCNA4*, *KIAA0753*, *KMT2E*, *LRRC1*, *MAF1*, *MAPK15*, *MLIP*, *MRTFB*, *NADSYN*, *NCALD*, *OPCML*, *OR2D37*, *OSCP1*, *OSR2*, *PIK3C2G*, *PTK2*, *PTPN14*, *RAB2A*, *RAP1GAP2*, *RCN3*, *REGG*, *RGMA*, *RNF1144B*, *RNF19A*, *RTRAF*, *SEMA3A*, *SH2D4B*, *SPAG1*, *SPIN1*, *STK40*, *TNRC6B*, *UBXN2A*, *ZBTB46* e *ZNF691*. O entendimento dos processos genéticos e a identificação dos genes de interesse expressos em condições ambientais específicas são essenciais para melhorar geneticamente os animais de forma eficaz, com o objetivo de promover características adaptativas e otimizar o desempenho produtivo, especialmente em ambientes desafiadores.

Palavras – chave: Brasil; genética; produção

ABSTRACT

Genetic improvement is essential in the search for improvements in fat and protein content over generations in bovine milk production. Through GWAS studies, it is possible to identify genomic regions related to economic characteristics of great importance, such as milk production and quality, allowing a deeper understanding of the influence of genetic structure on the expression of desired characteristics. In tropical and subtropical environments, knowledge of significant genetic markers, obtained through GWAS studies, is essential to optimize the genetic potential of dairy cows and to select animals more adapted to environmental adversities, being extremely relevant in the present study. In Holstein cattle raised in Brazil. Milk fat and protein production information was analyzed in 2.339 Holstein cows in four Brazilian states between 2021 and 2022, using a genotypic panel of 100.000 SNP markers. The ssGWAS approach, integrating modules from the BLUPF90 family, was applied to identify genomic associations, exploring regions with significant SNPs, and subsequently, enrichment analyzes and gene network construction were conducted to deepen the understanding of the associated biological mechanisms. The genes *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *SLC52A2* and *TSNARE1* were found in all traits analyzed in this study, that is, fat and protein production in kilograms, as well as the percentage of fat and protein. The percentage of fat and protein showed similarities in 2 specific genes *GHR* and *NNT*. In contrast, the amount of fat and protein in kilograms (Kg) exhibited similarity in the *RBM19* gene. When it comes to protein characteristics, whether in kilograms or percentage, the genes in common include *HSTN*, *CSN1S1* and *CSN2*. On the other hand, the genes that share similarities regarding fat in kilos and percentage are *SLC15A5* and *RERG*. Genes never previously associated with dairy production were identified, such as: *AGO2*, *AGO3*, *ARHGAP39*, *C25H16ORF82*, *CDH3*, *CMYA5*, *DENND3*, *EEF1D*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000038214*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000051599*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000055067*, *EXOC3*, *FBXO43*, *GLT6D1*, *GNAI3*, *GPAA1*, *GRHL2*, *GUCA1A*, *IQANK1*, *IVNS1APB*, *KCNA4*, *KIAA0753*, *KMT2E*, *LRRC1*, *MAF1*, *MAPK15*, *MLIP*, *MRTFB*, *NADSYN*, *NCALD*, *OPCML*, *OR2D37*, *OSCP1*, *OSR2*, *PIK3C2G*, *PTK2*, *PTPN14*, *RAB2A*, *RAP1GAP2*, *RCN3*, *RERG*, *RGMA*, *RNF1144B*, *RNF19A*, *RTRAF*, *SEMA3A*, *SH2D4B*, *SPAG1*, *SPIN1*, *STK40*, *TNRC6B*, *UBXN2A*, *ZBTB46* and *ZNF691*. Understanding genetic processes and identifying genes of interest expressed in specific environmental conditions are essential to effectively genetically improve animals, with the aim of promoting adaptive traits and optimizing productive performance, especially in challenging environments.

Keywords: Brazil; genetics; production

2.1 INTRODUÇÃO

O leite é um alimento de elevado valor nutricional e que fornece nutrientes essenciais para todas as fases da vida humana (GIVENS, 2020). Dessa forma, garantir uma produção leiteira de boa qualidade é indispensável para solidificar o consumo de leite proveniente de bovinos, o qual é responsável por nutrir bilhões de pessoas ao redor do mundo (SIQUEIRA et al., 2020). Além disso, os sólidos do leite possuem alto valor nutritivo e estão ligados a vitaminas e à prevenção de doenças, o que confirma a importância deste alimento para pessoas de todas as idades (ZANELA et al., 2018). Neste contexto, ressalta-se que o melhoramento genético é um fator determinante para obtenção de maiores indicadores de gordura e proteína do leite bovino ao longo das gerações, visto que a seleção e utilização de reprodutores de elevado desempenho para produção de sólidos do leite é essencial para elevar o ganho genético destas características (WANG et al., 2019).

Por meio de estudos de associação do genoma amplo (GWAS) conseguimos identificar regiões genômicas relacionadas a fenótipos de interesse econômico tais como os de características de produção e qualidade do leite (JIANG et al., 2019). Esta abordagem permite associar marcadores moleculares, como os do tipo SNP, com a alteração na produção leiteira, bem como em seu conteúdo (DIKMEN et al., 2015). Contudo, dentre os diversos estudos relacionados a GWAS na raça Holandesa, a grande maioria foi realizada em países com temperaturas e sistemas de produção diferentes daqueles encontrados no Brasil, geralmente em regiões de clima ameno e temperado (LU et al., 2021). Como o ambiente pode exercer papel fundamental na expressão gênica, é essencial que sejam realizados estudos em condições mais adversas como os tropicais e subtropicais, predominantes no país.

Estudos anteriores foram em grande maioria realizados em países em que as vacas são mantidas fechadas durante o inverno e com restrição ao pasto, diferentemente do que ocorre no Brasil (LU et al., 2021). Do mesmo modo, animais localizados em regiões tropicais e subtropicais, podem ser afetados negativamente, reduzindo a produção de leite e das suas características de qualidade, como gordura e proteína (SANTANA et al., 2017). Estudos prévios identificaram genes relacionados à produção leiteira, com função também relacionada com a temperatura retal em vacas, indicando que SNPs estão associados com diferenças na produção de leite causadas por estresse térmico (DIKMEN et al., 2015). Por essa razão, se faz

necessário uma análise mais detalhada por meio de pesquisas utilizando GWAS para encontrar genes e marcadores nos bovinos da raça Holandesa criados em condições tropicais e subtropicais do Brasil, pois entendendo os processos genéticos e conhecendo genes de interesse expressos sob condições ambientais específicas, o melhoramento genético dos animais é mais eficiente.

Através da pesquisa utilizando marcadores genéticos e variantes específicas de genes, é possível aprimorar a seleção de animais com alto potencial de produção de leite e características desejáveis na composição do leite, mesmo em diferentes condições climáticas e de manejo adversas. A identificação de genes candidatos relacionados a essas características permite uma seleção mais precisa, auxiliando os criadores a melhorar a eficiência da produção leiteira e a qualidade do produto final. As vacas leiteiras de alta produção encontram um desafio maior em ambientes adversos, pois devido à alta taxa metabólica para a eficiente produtividade, o animal fica mais sensível a regulação da temperatura corporal para homeostase e sujeito a sofrer mais em locais desafiadores (OTTO et al., 2019). Em países tropicais e subtropicais o conhecimento de SNPs significativos por meio dos estudos de GWAS são relevantes para que as vacas leiteiras expressem todo seu potencial genético e para que seja possível a seleção de animais mais adaptáveis as adversidades do meio.

Os estudos de GWAS contribuem com a identificação de regiões do genoma ligadas a características de interesse econômico, como as de qualidade do leite, buscando uma melhor compreensão da estrutura genética sobre a expressão do fenótipo (LU et al., 2020). Portanto, os principais objetivos deste trabalho foram 1) realizar análises de GWAS para identificar regiões genômicas relacionadas a produção de gordura e proteína do leite, em bovinos da raça Holandesa criados em regiões tropicais e subtropicais do Brasil; e 2) identificar possíveis genes candidatos e suas funções biológicas, além de detectar redes gênicas interligadas a características de qualidade do leite em bovinos da raça Holandesa.

2.2 MATERIAL E MÉTODOS

2.2.1 Banco de dados fenotípicos e genotípicos

Foram utilizados neste estudo informações de produção de gordura e proteína do leite em quilos e em porcentagem, 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 vacas primíparas, com dados corrigidos para 305 dias. As informações genotípicas foram provenientes de um painel de 100 mil marcadores do tipo SNP, comercialmente intitulado GGP Bovine 100k SNP Chip (Neogen Company, 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 et al., 1989). Após o controle de qualidade, realizado conforme descrição abaixo, restaram 84.411 marcadores para as análises de GWAS posteriores.

2.2.2 Controle de qualidade de dados

Para o controle de qualidade dos dados genotípicos 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) $< 0,05$; SNPs que falharam no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) ao nível de 10^{-5} e SNPs com alto desequilíbrio de ligação ($r^2 > 0,995$). Para as informações fenotípicas, dados que excederam três desvios padrão com relação à média, dentro do grupo de contemporâneo, foram consideradas outliers e removidas do banco de dados.

2.2.3 Estudo de associação genômica em etapa única (ssGWAS)

O método ssGWAS foi utilizado para realização das análises de associação genômica, por meio dos programas da família BLUPF90 (MISZTAL et al., 2014). 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 relacionado 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:

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

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, MISZTAL, AGUILAR, LEGARRA, MUIR., 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 relacionando 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 Anotação gênica e análises funcionais

As regiões genômicas contendo SNPs significativos (P -value $<5 \times 10^{-8}$) foram exploradas para identificação dos genes associados as características estudadas (JANNOT et al., 2015). A lista de genes candidatos foi determinada considerando-se a exata posição do marcador no genoma, por meio do banco de dados Ensembl Genes e o genoma referência de bovinos ARS-UCD1.2 (CUNNINGHAM, 2022). O número de QTLs anotado para cada gene principal foi obtido por meio do Animal QTL DB (www.animalgenome.org).

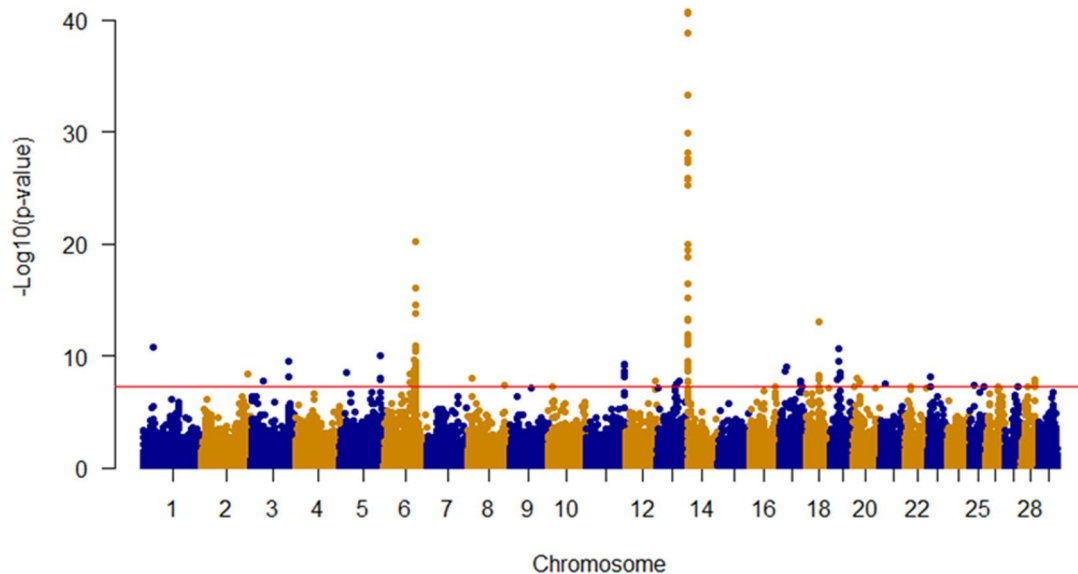
Visando o aprimoramento da compreensão envolta dos mecanismos e processos biológicos compartilhado por esses genes anotados, foram realizadas análises de enriquecimento, por meio das ferramentas de anotação funcional do minerador de banco de dados DAVID (SHERMAN et al, 2022; HUANG et al., 2009). Adicionalmente,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

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Produção de Proteína (Kg)

A partir das análises desempenhadas pelo estudo de GWAS houve a identificação de marcadores significativos que podem ser observados na Figura 1. A região genômica que apresentou maior pico foi no cromossomo 14 (BTA14), esse comumente relacionado ao gene *DGAT1* (posição 609870 pb).

Figura 1. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de produção de proteína do leite em quilos da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)



Fonte: A autora, 2023

Outras regiões genômicas significativas foram encontradas em 17 cromossomos distintos (BTA2, BTA3, BTA5, BTA6, BTA8, BTA11, BTA12, BTA13, BTA14, BTA17, BTA18, BTA19, BTA20, BTA21, BTA23, BTA25, BTA28) associadas à produção de proteína. Ao total, tais regiões revelaram 30 diferentes genes conforme apresentado na Tabela 1. Os genes relacionados com a produção de proteína em quilos são *CDH3*, *CPSF1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CYHR1*, *DGAT1*, *ENSBTA00000053188*, *ENSBTAG00000055067*, *GNAI3*, *HSTN*, *LRRC1*, *MAML3*, *MLIP*, *MRTFA*, *MRTFB*, *NPFFR2*, *NRG3*, *PAEP*, *PTAFR*, *RBM19*, *RGMA*, *SCARA5*, *SLC30A5*, *SLC52A2*, *SVEP1*, *TNRC6B*, *TRPV3*, *TSNARE1*, *ZBTB46* e *ZNF691*. Dos genes associados a marcadores significativos, alguns estavam presentes em regiões de QTLs relacionadas previamente na literatura, numericamente a saber: 3 em BTA 5, 88 em BTA 6, 70 em BTA 11, 2 em BTA 13, 372 em BTA 14, 15 em BTA 17 e 42 em BTA 28.

Tabela 1. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em quilos de proteína em vacas Holandesas

BTA	POSIÇÃO (pb)	log -10	GENES	QTL
2	125215960	8,43	<u>PTAFR</u>	
3	103393004	8,12	<u>ZNF691</u>	
3	33860700	7,80	<u>GNAI3</u>	
5	111807008	10,03	<u>MRTFA</u>	2
5	111553050	8,02	<u>TNRC6B</u>	1
6	85424759	20,19	<u>CSN1S1</u>	22
6	85450410	16,06	<u>CSN2</u>	55
6	87314427	9,03	<u>NPFFR2</u>	9
6	85470165	8,83	<u>HSTN</u>	2
8	10929511	8,01	<u>SCARA5</u>	
8	100103184	7,33	<u>SVEP1</u>	
11	103257948	9,14	<u>PAEP</u>	70
12	80653811	7,71		
13	54027332	7,49	<u>ZBTB46</u>	2
14	609870	40,72	<u>DGAT1</u>	304
14	550784	40,59	<u>CPSF1</u>	12
14	580019	40,56	<u>SLC52A2</u>	1
14	487527	27,65	<u>CYHR1</u>	20
14	2019390	25,94	<u>TSNARE1</u>	35
17	18980582	9,07	<u>ENSBTAG00000055067</u>	
17	17698911	8,68	<u>MAML3</u>	13
17	60492777	7,73	<u>RBM19</u>	1
17	60795229	7,44	<u>RBM19</u>	1
18	35979599	7,92	<u>CDH3</u>	
19	24262976	10,59	<u>TRPV3</u>	
20	10663562	8,02	<u>SLC30A5</u>	
20	16639450	7,62	<u>ENSBTAG00000053188</u>	
21	13990258	7,47	<u>RGMA</u>	
23	6493652	8,08	<u>MLIP</u>	
23	6756584	7,30	<u>LRRC1</u>	
25	13272209	7,41	<u>MRTFB</u>	
28	37297081	7,66	<u>NRG3</u>	42

Fonte: A autora, 2023

2.3.2 Porcentagem de Proteína

Para porcentagem de proteína os QTLs encontrados para cada BTA foram: 96 em BTA 6, 372 em BTA 14 e 180 em BTA 20. Foram encontrados 12 genes (*CPSF1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CYHR1*, *DGAT1*, *ENSBTAG00000038214*, *GHR*, *HSTN*, *NNT*,

SLC4A4, *SLC52A2*, *TSNARE1*), localizados nos cromossomos BTA6, BTA14 e BTA20, apresentados na Tabela 2, a seguir.

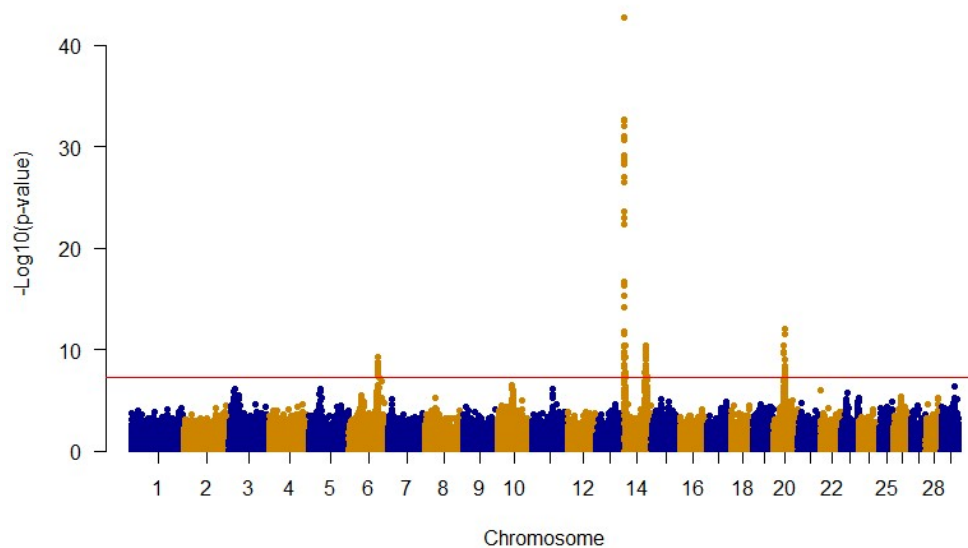
Tabela 2. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em porcentagem de proteína em vacas Holandesas

BTA	POSIÇÃO (pb)	log -10	GENES	QTL
6	85470165	8,744	<i>HSTN</i>	2
6	85451221	8,63	<i>CSN2</i>	55
6	85274240	8,35	<i>ENSBTAG00000038214</i>	
6	85424759	8,14	<i>CSN1S1</i>	22
6	86618893	8,10	<i>SLC4A4</i>	16
14	580019	42,72	<i>SLC52A2</i>	1
14	609870	32,63	<i>DGAT1</i>	304
14	550784	32,59	<i>CPSF1</i>	12
14	2019390	30,65	<i>TSNARE1</i>	35
14	487527	28,63	<i>CYHR1</i>	20
20	32018037	11,99	<i>GHR</i>	168
20	31178183	10,38	<i>NNT</i>	12

Fonte: A autora, 2023

As regiões genômicas associadas a porcentagem de proteína, podem ser observadas na Figura 2. A região de maior relação com a característica de porcentagem de proteína foi localizada no cromossomo 14, na posição de 580019 pb. Essa região está relacionada ao gene *SLC52A2* (Figura 2).

Figura 2. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica porcentagem de proteína do leite da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)

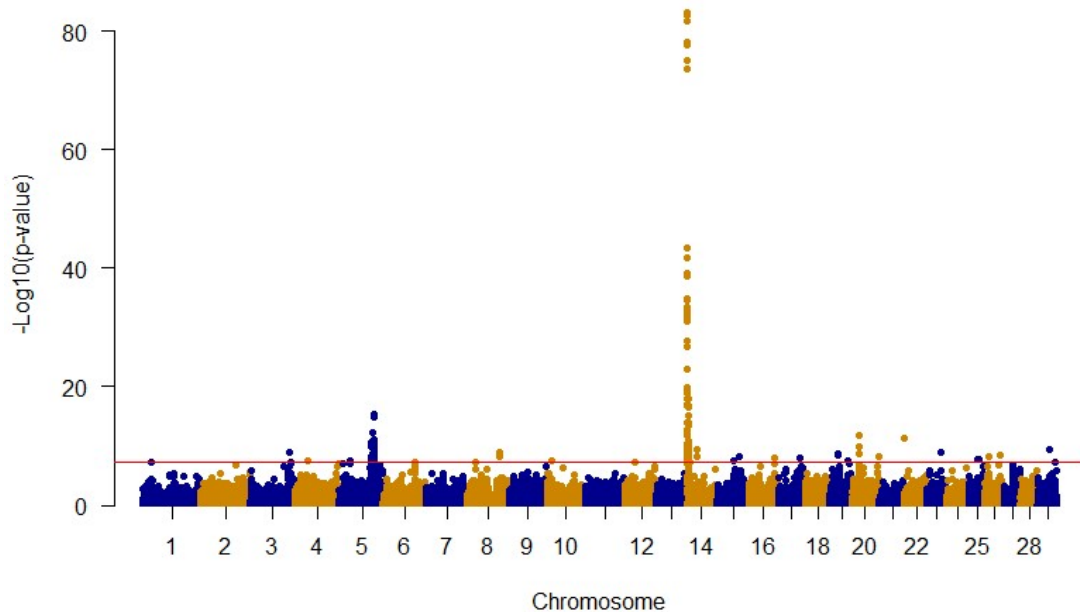


Fonte: A autora, 2023

2.3.3 Produção de Gordura (Kg)

No que diz respeito a produção de gordura em quilos, foram encontrados genes significativos nos cromossomos BTA3, BTA4, BTA5, BTA8, BTA10, BTA14, BTA15, BTA16, BTA17, BTA19, BTA20, BTA22, BTA23, BTA25, BTA26 e BTA29, também, os QTLs encontrados em cada BTA foram: 38 em BTA 5, 1 em BTA 8, 1 em BTA 10, 372 em BTA 14 e 1 em BTA 17, podendo ser acessados na Tabela 3. Foram encontrados 27 genes, sendo eles: *ACTA2*, *AHSP*, *C25H16arf82*, *CMYA5*, *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *ENSBTA0000053760*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000053188*, *EPS8*, *EXOC3*, *KIAA0753*, *LDHB*, *MGST1*, *OPCML*, *OR2D37*, *PPT1*, *PTPN14*, *RBM19*, *RERG*, *RNF1144B*, *SEMA3A*, *SLC15A5*, *SLC52A2*, *SPIN1* e *TSNARE1*. Assim como na porcentagem de proteína, o gene com maior pico, foi encontrado no cromossomo 14, na posição 580019 pb e está relacionado ao gene *SLC52A2* (Figura 3).

Figura 3. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de produção de gordura do leite em quilos da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)



Fonte: A autora, 2023

Tabela 3. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção de quilos de gordura em vacas Holandesas

BTA	POSIÇÃO (pb)	log-10	Genes	QTL
3	106010224	8.93	<u>PPT1</u>	
4	36408002	7.55	<u>SEMA3A</u>	
5	93516066	15.45	<u>MGST1</u>	11
5	93627442	15.35	<u>SLC15A5</u>	5
5	88557863	8.17	<u>LDHB</u>	
5	94720983	7.81	<u>RERG</u>	6
5	94308747	7.35	<u>EPS8</u>	16
8	89675148	8.24	<u>SPIN1</u>	1
8	90078400	8.15	<u>ENSBTAG00000025756</u>	
10	10746309	7.45	<u>CMYA5</u>	1
14	580019	83.04	<u>SLC52A2</u>	1
14	550784	83.03	<u>CPSF1</u>	12
14	609870	83.03	<u>DGAT1</u>	304
14	2019390	82.72	<u>TSNARE1</u>	35
14	487527	77.71	<u>CYHR1</u>	20
15	46100916	7.52	<u>OR2D37</u>	
16	69148336	8.09	<u>PTPN14</u>	
17	60492777	8.02	<u>RBM19</u>	1
19	25250953	8.43	<u>KIAA0753</u>	
20	16257634	11.71		
20	16311925	9.78	<u>ENSBTAG00000053188</u>	
20	16639450	8.76	<u>ENSBTAG00000053188</u>	
20	71674625	8.16	<u>EXOC3</u>	
22	52575	11.37	<u>ENSBTAG00000053760</u>	
23	39111036	9.03	<u>RNF1144B</u>	
25	24615711	7.86	<u>C25H16orf82</u>	
25	27555271	7.72	<u>AHSP</u>	
26	10653831	8.22	<u>ACTA2</u>	
29	34333891	9.35	<u>OPCML</u>	

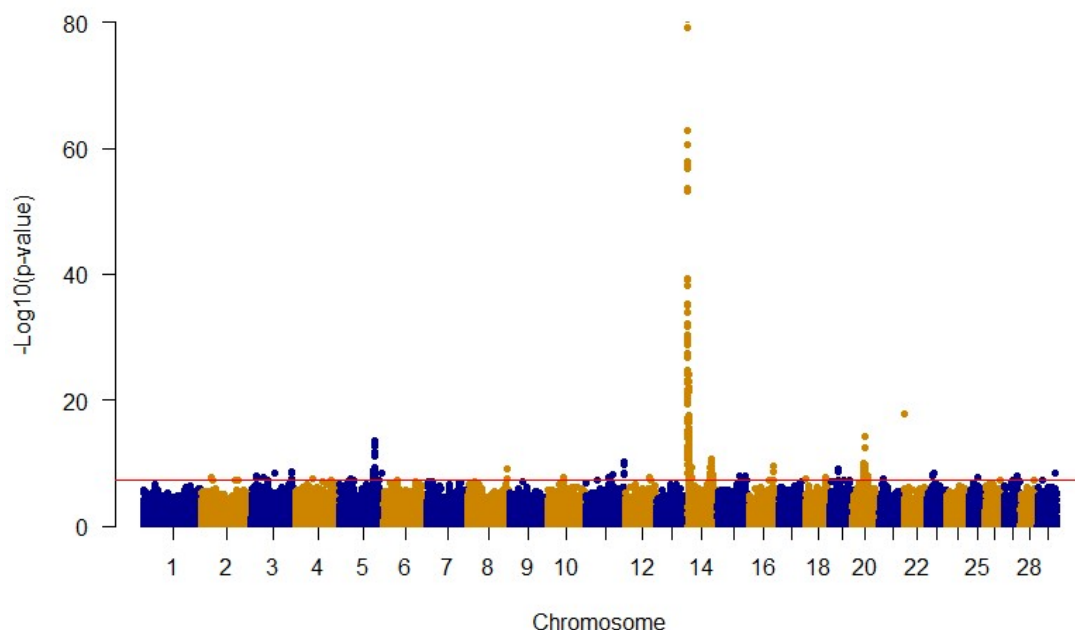
2.3.4 Porcentagem de Gordura

O maior pico para porcentagem de gordura, assim como em produção de gordura e porcentagem de proteína, se refere ao gene *SLC52A2* (Figura 4). Para esta característica foram encontrados 48 genes distintos, em 23 cromossomos (Tabela 4). Os genes são: *AGO3*, *BRINP1*, *C25H16orf82*, *C6*, *CCL28*, *CD82*, *CPSF1*, *CSF3R*, *CYHR1*, *DGAT1*, *ELAPOR1*, *ENSBTAG00000022427*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000053760*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000051599*, *EXOC4*,

FAM13A, GHR, GINS4, GLT6D1, GON4L, GUCA1A, HCN1, ITGAE, IVNS1APB, KAT6A, KCNA4, KMT2E, LRP2, MGST1, MOCS1, NADSYN, NELL2, NNT, OSCP1, PAEP, PIK3C2G, RAP1GAP2, RCN3, RERG, RTRAF, SH2D4B, SLC15A5, SLC52A2, TNKS, TSNARE1 e *UBXN2A*. Alguns dos genes vinculados a marcadores significativos estavam localizados em regiões de QTLs associadas aos seguintes BTAs: 2 em BTA 2, 2 em BTA 3, 15 em BTA 4, 45 em BTA 5, 4 em BTA 6, 71 em BTA 11, 372 em BTA 14, 1 em BTA 19, 226 em BTA 20, 18 em BTA 23 e 4 em BTA 27.

De maneira resumida, os genes mais importantes, que apresentaram maior pico, para as características avaliadas (gordura Kg e % e Proteína Kg e %), foram encontrados no cromossomo 14 e podem ser nomeados como *SLC52A2* e *DGAT1*. Dos genes encontrados nas análises, 5 deles são comuns para as 4 características analisadas: *CPSF1, CYHR1, DGAT1, SLC52A2* e *TSNARE1*. Além disso, gordura e proteína em porcentagem (%) apresentaram similaridade em 2 genes: *GHR* e *NNT*. Já gordura e proteína em quilos (Kg) apresentaram similaridade somente no gene *RBM19*. Para as características de proteína, tanto em quilos como em porcentagem, os genes em comum são: *HSTN, CSN1S1* e *CSN2*. Os genes para gordura (Kg e %) similares foram: *SLC15A5* e *RERG*.

Figura 4. Manhattan plot do estudo de associação genômica amplo (GWAS) para a característica de porcentagem de gordura do leite da raça Holandesa, considerando P-value $<5 \times 10^{-8}$ (linha vermelha)



Fonte: A autora, 2023

Tabela 4. Descrição dos principais SNPs para a característica de produção em porcentagem de gordura em vacas Holandesas

BTA	POSIÇÃO (pb)	log-10	Genes	QTL
2	27018016	7.84	<u>LRP2</u>	2
3	109426963	8.62	<u>CSF3R</u>	
3	109459766	8.60	<u>OSCP1</u>	
3	109773240	8.42	<u>AGO3</u>	
3	14998951	7.89	<u>GON4L</u>	2
3	34201135	7.64	<u>ELAPOR1</u>	
4	46212366	7.50	<u>KMT2E</u>	
4	97342492	7.32	<u>EXOC4</u>	15
5	93516066	13.65	<u>MGST1</u>	11
5	93627442	8.09	<u>SLC15A5</u>	5
5	91533235	8.02	<u>PIK3C2G</u>	14
5	94720983	7.93	<u>RERG</u>	6
5	35855408	7.33	<u>NELL2</u>	9
6	35909397	7.37	<u>FAM13A</u>	4
8	108975271	9.09	<u>BRINP1</u>	
8	108938597	7.59	<u>BRINP1</u>	
10	44811185	7.77	<u>RTRAF</u>	
11	103259232	10.23	<u>PAEP</u>	70
11	103273276	8.38	<u>GLT6D1</u>	1
11	103239603	8.21	<u>ENSBTAG00000048091</u>	
11	75068176	8.16	<u>UBXN2A</u>	
12	68572875	7.84	<u>ENSBTAG00000054671</u>	
14	580019	81.58	<u>SLC52A2</u>	1
14	609870	81.06	<u>DGAT1</u>	304
14	550784	80.98	<u>CPSF1</u>	12
14	2019390	60.59	<u>TSNARE1</u>	35
14	487527	57.51	<u>CYHR1</u>	20
15	74629039	7.99	<u>CD82</u>	
15	60261924	7.89	<u>KCNA4</u>	
16	66282178	8.69	<u>IVNS1APB</u>	
18	55988661	7.71	<u>RCN3</u>	
19	24405079	9.07	<u>ITGAE</u>	1
19	23765194	7.39	<u>RAP1GAP2</u>	
20	32018037	14.27	<u>GHR</u>	168
20	31178183	10.05	<u>NNT</u>	12
20	31373420	9.36	<u>CCL28</u>	5
20	33341878	7.54	<u>C6</u>	11
20	29362772	7.53	<u>HCN1</u>	30
21	9641396	7.48		
22	52575	17.77	<u>ENSBTAG00000053760</u>	
23	13850106	8.09	<u>MOCS1</u>	16
23	15898280	7.93	<u>GUCA1A</u>	2
25	24615711	7.65	<u>C25H16orf82</u>	

26	42681843	7.35	<u>ENSBTAG00000051599</u>	
27	36866734	7.95	<u>KAT6A</u>	
27	36466414	7.78	<u>GINS4</u>	3
27	25562534	7.37	<u>TNKS</u>	1
28	36164984	7.34	<u>SH2D4B</u>	
29	48340327	8.46	<u>NADSYN</u>	
29	13321733	7.37	<u>ENSBTAG00000022427</u>	

Fonte: A autora, 2023

2.3.5 Análises Funcionais e Rede de Interação Gênica

As análises funcionais, por meio da ontologia gênica, demonstraram 7 genes para produção de proteína em quilos, 14 genes para porcentagem de proteína, 35 genes para produção de gordura em quilos e 42 genes para porcentagem de gordura. Os genes estão envolvidos em processos do sistema biológico, molecular, celular e nas funções do organismo.

Para proteína em quilos os genes (*CSN1S1*, *CSN2*, *PLEC*, *SVEP1*, *MAML3*, *MRTFA*, *MRTFB*) demonstraram na maior parte função nos processos biológicos (PB), mas também apresentou funções relacionadas ao componente celular (CC) e função molecular (MF), sendo que os genes *CSN1S1*, *CSN2* foram encontrados com maior quantidade e estão relacionados em funções como resposta à progesterona e estradiol, funções celulares do complexo de Golgi e função antioxidante (Tabela 5). Dos genes para proteína em porcentagem (*EPPK1*, *PLEC*, *VPS28*, *ADGRB1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *MAPK15*, *TRAPPC9*, *GHR*, *HSTN*, *CPSF1*, *ZC3H3*, *SLC4A4*) a maior parte também apresentou funções relacionadas aos processos biológicos do organismo e os genes mais encontrados também foram *CSN1S1*, *CSN2* (Tabela 6).

Tabela 5. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para quilos de proteína em vacas Holandesas

GO	Descrição	P-value	Genes	
GO:1903494	Resposta à desidroepiandrosterona	9,3x10 ⁻³	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	PB
GO:1903496	Resposta à 11-desoxicorticosterona	9,3x10 ⁻³	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	PB
GO:0051145	Diferenciação de células musculares lisas	2,0x10 ⁻²	<u>MRTFA,</u> <u>MRTFB</u>	PB
GO:0032570	Resposta à progesterona	2,6x10 ⁻²	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	PB
GO:0032355	Resposta ao estradiol	3,3x10 ⁻²	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	PB
GO:0010467	Expressão genética	8,2x10 ⁻²	<u>PLEC,</u> <u>SVEP1</u>	PB
GO:0098869	Desintoxicação celular oxidante	8,9x10 ⁻²	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	PB
GO:0005796	Lúmen de Golgi	1,3x10 ⁻²	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	CC
GO:0016209	Atividade antioxidante	2,9x10 ⁻²	<u>CSN1S1,</u> <u>CSN2</u>	MF
GO:0003713	Atividade do coativador de transcrição	3,7x10 ⁻²	<u>MAML3,</u> <u>MRTFA,</u> <u>MRTFB</u>	MF

Fonte: A autora, 2023

Tabela 6. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para porcentagem de proteína em vacas Holandesas

GO	Descrição	P-value	Genes	
GO:1903494	Resposta à desidroepiandrosterona	2,5x10 ⁻⁵	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3</u>	PB
GO:1903496	Resposta à 11-desoxicorticosterona	2,5x10 ⁻⁵	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3</u>	PB
GO:0032570	Resposta à progesterona	2,3x10 ⁻⁴	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3</u>	PB
GO:0032355	Resposta ao estradiol	3,8x10 ⁻⁴	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3</u>	PB
GO:0045104	Organização do citoesqueleto do filamento	2,7x10 ⁻²	<u>EPPK1, PLEC</u>	PB
GO:0031397	Regulação negativa da ubiquitinação de proteínas	6,5x10 ⁻²	<u>VPS28, ADGRB1</u>	PB
GO:0042060	Cicatrização de feridas	7,8x10 ⁻²	<u>EPPK1, PLEC</u>	PB
GO:0098869	Desintoxicação celular oxidante	7,8x10 ⁻²	<u>CSN1S1, CSN2</u>	PB
GO:0005796	Lúmen de Golgi	5,0x10 ⁻⁵	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3</u>	CC
GO:0030056	Hemidesmossoma	8,2x10 ⁻³	<u>EPPK1, PLEC</u>	CC
GO:0005794	Aparelho de Golgi	1,8x10 ⁻²	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3, MAPK15,</u> <u>TRAPPC9</u>	CC
GO:0005576	Região extracelular	2,4x10 ⁻²	<u>CSN1S1, CSN2,</u> <u>CSN3, GHR,</u> <u>HSTN</u>	CC
GO:0005847	Complexo de fator de especificidade de clivagem de mRNA e poliadenilação	2,7x10 ⁻²	<u>CPSF1, ZC3H3</u>	CC
GO:0005515	Ligação proteica	2,6x10 ⁻³	<u>CSN2, CSN3,</u> <u>SLC4A4,</u> <u>TRAPPC9</u>	MF
GO:0016209	Atividade antioxidante	2,3x10 ⁻²	<u>CSN1S1, CSN2</u>	MF

Fonte: A autora, 2023

Já dos 35 genes expressos para produção de gordura em quilos (*DENND3*, *PPT1*, *EPPK1*, *PLEC*, *ACTA2*, *EPS8*, *VPS28*, *ADGRB1*, *AGO2*, *ARHGAP39*, *PTK2*, *PTPN14*, *IQANK1*, *MAF1*, *RBM19*, *AHSP*, *LDHB*, *MAPK15*, *PIK3C2G*, *CPSF1*, *ZC3H3*, *KIAA0753*, *RERG*, *CMYA5*, *EEF1D*, *GPAA1*, *SPIN1*, *CYHR1*, *EXOC3*, *RAB2A*, *TRAPPC9* e *SEMA3A*) o gene que mais se evidenciou foi o *PLEC*, e a maior parte dos genes apresentou função de componente celular (CC), depois PB e os genes *PS8*, *PLEC* e *PTK2* expressaram função de MF (Tabela 7). Diferentemente dos 42 genes para porcentagem de gordura (*GRHL2*, *MAPK15*, *TNKS*, *VPS28*,

ADGRB1, IVNS1APB, AGO2, AGO3, PLEC, STK40, EPPK1, BRINP1, LRP2, HCN1, RAP1GAP2, RERG, UBXN2A, EEF1D, GPAA1, GHR, KAT6A, MOCS1, PTK2, SPAG1, GLT6D1, GUCA1A, PIK3C2G, TSNARE1, MGST1, RCN3, TRAPPC9, CPSF1, ZC3H3, CSF3R, ITGAE, NCALD, PAEP, FBXO43, CYHR1, KMT2E, OSR2 e RNF19A) que expressaram mais funções de PB e os genes com maior incidência foram *AGO2* e *AGO3* envolvidos com a clivagem de mRNA e funções relacionadas ao RNA e a função celular (Tabela 8).

Tabela 7. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para quilo de gordura em vacas Holandesas.

GO	Descrição	P-value	Genes	
GO:0030163	Processo catabólico de proteínas celulares	1,8 x 10 ⁻²	<u><i>DENND3, PPT1</i></u>	PB
GO:0045104	Organização do citoesqueleto do filamento intermediário	3,7 x 10 ⁻²	<u><i>EPPK1, PLEC</i></u>	PB
GO:0048741	Desenvolvimento da fibra muscular esquelética	4,8 x 10 ⁻²	<u><i>ACTA2, PLEC</i></u>	PB
GO:0008344	Comportamento locomotor adulto	8,7 x 10 ⁻²	<u><i>EPS8, PPT1</i></u>	PB
GO:0031397	Regulação negativa da ubiquitinação de proteínas	8,7 x 10 ⁻²	<u><i>VPS28, ADGRB1</i></u>	PB
GO:0030425	Dendrito	1,2 x 10 ⁻²	<u><i>ADGRB1, AGO2, PPT1, PLEC</i></u>	CC
GO:0030056	Hemidesmossoma	1,2 x 10 ⁻²	<u><i>EPPK1, PLEC</i></u>	CC
GO:0005856	Citoesqueleto	2,3 x 10 ⁻²	<u><i>ARHGAP39, PLEC, PTK2, PTPN14</i></u>	CC
GO:0005737	Citoplasma	2,4 x 10 ⁻²	<u><i>IQANK1, MAF1, RBM19, ARHGAP39, VPS28, ACTA2, AHSP, EPS8, EPPK1, LDHB, MAPK15, PIK3C2G, PLEC, PTPN14</i></u>	CC
GO:0005925	Adesão focal	3,5 x 10 ⁻²	<u><i>ADGRB1, PLEC, PTK2</i></u>	CC
GO:000584	Complexo de fator de especificidade de clivagem de mRNA e poliadenilação	3,8 x 10 ⁻²	<u><i>CPSF1, ZC3H3</i></u>	CC
GO:0005829	Citosol	4,7 x 10 ⁻²	<u><i>KIAA0753, RERG, VPS28, AGO2, CMYA5, EEF1D, GPAA1, PPT1, PLEC, PTK2, SPIN1</i></u>	CC
GO:0048471	Região perinuclear do citoplasma	5,7 x 10 ⁻²	<u><i>ADGRB1, CYHR1, EXOC3, PLEC</i></u>	CC

GO:0005794	Aparelho de Golgi	$5,8 \times 10^{-2}$	<u>RAB2A, EXOC3,</u> <u>MAPK15, PPT1,</u> <u>TRAPPC9</u>	CC
GO:0030424	Axônio	$6,2 \times 10^{-2}$	<u>PPT1, PLEC, SEMA3A</u>	CC
GO:0005903	Borda em escova	$7,3 \times 10^{-2}$	<u>EPS8, PLEC</u>	CC
GO:0003779	Ligação de actina	$7,5 \times 10^{-2}$	<u>EPS8, PLEC, PTK2</u>	MF

Fonte: A autora, 2023

Tabela 8. Funções biológicas relevantes identificadas a partir da análise de anotação para porcentagem de gordura em vacas Holandesas

GO	Descrição	P-value	Genes	
GO:0051973	Regulação positiva da atividade da telomerase	$5,7 \times 10^{-3}$	<u>GRHL2, MAPK15,</u> <u>TNKS</u>	PB
GO:0031397	Regulação negativa da ubiquitinação de proteínas	$1,1 \times 10^{-2}$	<u>VPS28, ADGRB1,</u> <u>IVNS1APB</u>	PB
GO:0035279	Clivagem de mRNA envolvida no silenciamento de genes por miRNA	$1,1 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	PB
GO:0060396	Via de sinalização do receptor do hormônio do crescimento	$1,9 \times 10^{-2}$	<u>GHR, PTK2</u>	PB
GO:0070922	Carregamento miRNA em RISC envolvido no silenciamento de genes por miRNA	$2,6 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	PB
GO:0010501	Desbobinamento da estrutura secundária do RNA	$3,0 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	PB
GO:0035264	Crescimento do organismo multicelular	$3,4 \times 10^{-2}$	<u>GRHL2, PLEC,</u> <u>STK40</u>	PB
GO:0035278	Inibição de tradução mediada por miRNA	$4,1 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	PB
GO:0031054	Processamento pré-miRNA	$4,5 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	PB
GO:1904355	Regulação positiva do nivelamento dos telômeros	$5,9 \times 10^{-2}$	<u>MAPK15, TNKS</u>	PB
GO:0045104	Organização do citoesqueleto do filamento intermediário	$6,3 \times 10^{-2}$	<u>EPPK1, PLEC</u>	PB
GO:0030425	Dendrito	$8,2 \times 10^{-4}$	<u>BRINP1, LRP2,</u> <u>ADGRB1, AGO2,</u> <u>HCN1, PLEC</u>	CC
GO:0005829	Citosol	$1,0 \times 10^{-2}$	<u>RAP1GAP2, RERG,</u> <u>UBXN2A, VPS28,</u> <u>AGO2, AGO3,</u> <u>EEF1D, GPAA1,</u> <u>GHR, IVNS1APB,</u> <u>KAT6A, MOCS1,</u> <u>PLEC, PTK2,</u> <u>STK40, SPAG1,</u> <u>TNKS</u>	CC
GO:0030056	Hemidesmossoma	$1,8 \times 10^{-2}$	<u>EPPK1, PLEC</u>	CC
GO:0070578	Complexo de carregamento RISC	$2,7 \times 10^{-2}$	<u>AGO2, AGO3</u>	CC

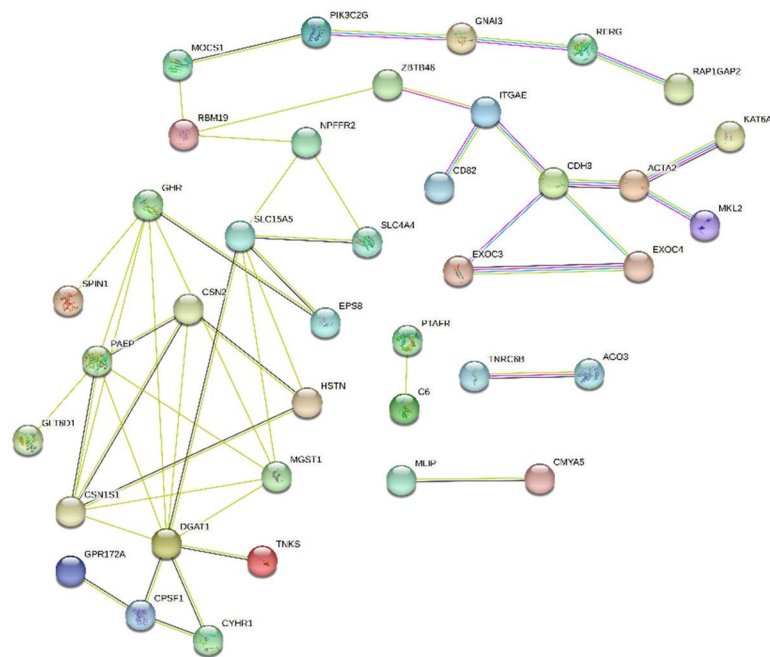
GO:0016020	Membrana	4,0 x 10 ⁻²	<u><i>EPPK1, GLT6D1, GHR, GUCA1A, PIK3C2G, PLEC, TSNARE1</i></u>	CC
GO:0016442	Complexo RISC	4,1 x 10 ⁻²	<u><i>AGO2, AGO3</i></u>	CC
GO:0005783	Retículo endoplasmático	5,6 x 10 ⁻²	<u><i>BRINP1, LRP2, UBXN2A, MGST1, RCN3, TRAPPC9</i></u>	CC
GO:0005847	Complexo de fator de especificidade de clivagem de mRNA e poliadenilação	5,9 x 10 ⁻²	<u><i>CPSF1, ZC3H3</i></u>	CC
GO:0005925	Adesão focal	7,6 x 10 ⁻²	<u><i>ADGRB1, PLEC, PTK2</i></u>	CC
GO:0009897	Lado externo da membrana de plasma	8,4 x 10 ⁻²	<u><i>LRP2, CSF3R, GHR, ITGAE</i></u>	CC
GO:0090624	Atividade de endoribonuclease, clivando mRNA emparelhado com miRNA	6,1 x 10 ⁻³	<u><i>AGO2, AGO3</i></u>	MF
GO:0005515	Ligação proteica	2,4 x 10 ⁻²	<u><i>GUCA1A, NCALD, PAEP, TRAPPC9</i></u>	MF
GO:0046872	Ligação de íons metálicos	5,7 x 10 ⁻²	<u><i>FBXO43, AGO2, AGO3, CYHR1, ITGAE, KMT2E, MOCS1, OSR2, RNF19A, ZC3H3</i></u>	MF
GO:0035198	Ligação miRNA	7,4 x 10 ⁻²	<u><i>AGO2, AGO3</i></u>	MF
GO:0000993	Ligação ao núcleo da RNA polimerase II	8,0 x 10 ⁻²	<u><i>AGO2, AGO3</i></u>	MF

Fonte: A autora, 2023

Nas redes de interação gênica podemos observar o relacionamento entre os genes de interesse que são referentes as características de proteína e gordura do leite. Nessa representação cada gene está ligado ao outro por linhas conforme sua correlação, sendo que a coloração entre as linhas pode ser intensa e distinta conforme a ligação entre eles.

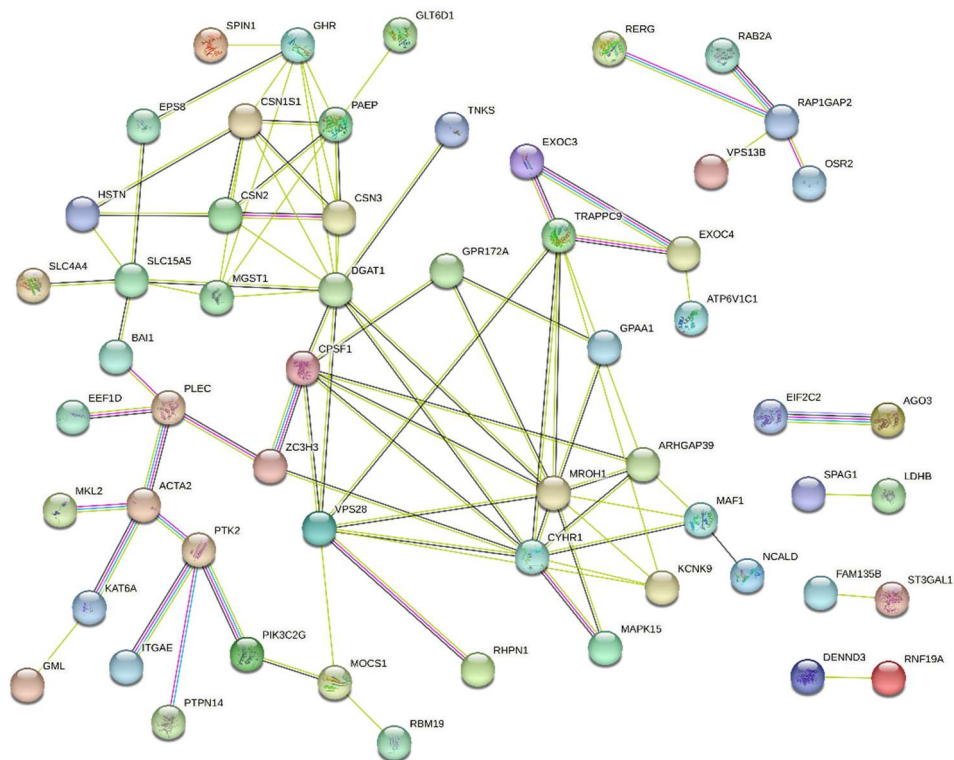
Para a característica de proteína foram destacados 38 genes que possuem relação significativa, sendo que *CSN1S1* e *CSN2* vistos com maior incidência para proteína, também demonstraram estar altamente correlacionados entre si (Figura 5). Já para a característica de gordura do leite foram correlacionados 57 genes com interação, sendo o gene *PLEC* altamente correlacionado com *ACTA2*, *ZC3H3* e *EEF1*, e o gene *AGO3* relacionado com *EIF2C2* (Figura 6).

Figura 5. Rede de interação gênica para genes associados à produção de proteína em vacas holandesas



Fonte: A autora, 2023

Figura 6. Rede de interação gênica para genes associados à produção de gordura em vacas holandesas



Fonte: A autora, 2023

2.4 DISCUSSÃO

Verificou-se que os genes *CDH3*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000055067*, *GNAI3*, *LRRC1*, *MLIP*, *MRTFB*, *RGMA*, *TNRC6B*, *ZBTB46* e *ZNF691* ainda não obtiveram funções diretas ou indiretas relevantes nos trabalhos encontrados para produção de proteína em quilos e o gene *ENSBTAG00000038214* para porcentagem de proteína. Portanto, como estes genes foram encontrados no presente estudo em animais da raça holandesa brasileira é possível que sejam genes candidatos para os bovinos leiteiros criados em clima tropical.

Para gordura em quilos os genes que não apresentaram funções específicas na literatura para produção leiteira foram *C25H16ORF82*, *CMYA5*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000053188*, *EXOC3*, *KIAA0753*, *OPCML*, *OR2D37*, *PTPN14*, *RERG*, *RNF1144B*, *SEMA3A* e *SPIN1*. Já para porcentagem de gordura foram os genes *AGO3*, *C25H16ORF82*, *ENSBTAG00000048091*,

ENSBTAG00000051599, ENSBTAG00000054671, GLT6D1, GUCA1A, IVNS1APB, KCNA4, KMT2E, NADSYN, OSCP1, PIK3C2G, RAP1GAP2, RCN3, RERG, RTRAF, SH2D4B e *UBXN2A*. É importante verificar quais genes foram encontrados exclusivamente em território brasileiro para que seja possível otimizar a produção, fortalecer a capacidade adaptativa das populações animais às condições específicas de cada região e promover um melhoramento genético assertivo.

Dos genes encontrados na ontologia gênica, os genes *MRTFB* e *MAPK15*, encontrados na pesquisa atual para proteína em quilos e em porcentagem, respectivamente, não obtiveram resultados específicos de forma direta ou indireta na pesquisa bibliográfica para produção leiteira. Assim sendo, é possível considerar que são genes candidatos para proteína do leite em bovinos da raça Na ontologia os genes encontrados para gordura em quilos (*AGO2, ARHGAP39, CMYA5, DENND3, EEF1D, EXOC3, GPAA1, IQANK1, KIAA0753, MAF1, MAPK15, PIK3C2G, PTK2, PTPN14, RAB2A, RERG, SEMA3A, SPIN1*) e em porcentagem (*AGO2, AGO3, EEF1D, FBXO43, GLT6D1, GPAA1, GRHL2, GUCA1A, IVNS1APB, KMT2E, MAPK15, NCALD, OSR2, PIK3C2G, PTK2, RAP1GAP2, RCN3, RERG, RNF19A, SPAG1, STK40* e *UBXN2A*) não apresentaram resultados conclusivos de maneira direta ou indireta durante a revisão bibliográfica centrada na produção de leite. Dessa forma, a descoberta destes genes em animais da raça holandesa brasileira, sugere que eles podem ser considerados como potenciais genes candidatos para bovinos leiteiros adaptados a ambientes de clima tropical da holandesa criados em condições ambientais brasileira.

Os genes *CYHR1* e *CPSF1* foram associados aos componentes de gordura do leite em bovinos leiteiros Holandeses na Dinamarca e na China (NAYERI et al., 2017). Além disso, os genes *CPSF1, CYHR1* e *DGAT1* também foram relacionados para produção de gordura na raça Holandesa no Canadá (OLIVEIRA et al., 2019). Há regiões importantes no BTA14, que corresponde aos genes *DGAT1, FOXH1* e *CYHR1*, foram associados aos ácidos graxos (CRUZ et al., 2019) e os genes *DGAT1* e *SLC52A2* também foram associados ao percentual de gordura do leite (ARIYARATHNE et al., 2021). Encontrar o mesmo gene em diferentes trabalhos científicos fornece robustez e contribui com a validação da pesquisa, bem como, orienta pesquisas futuras. Dessa forma é essencial localizar genes em diferentes metodologias, pois, contribui com a confiabilidade do trabalho apresentado. Além disso, os genes descritos (*CPSF1, CYHR1, DGAT1, FOXH1, CYHR1, SLC52A2*),

contribuíram nos trabalhos apresentados para qualidade do leite, corroborando com o presente trabalho onde estes genes são relevantes para produção leiteira brasileira.

Para iniciar, o gene *PTAFR* encontrado no cromossomo 2 (BTA 2), está relacionado com a resposta imune em bovinos e seu desempenho produtivo (VANVANHOSSOU et al., 2020). Este gene foi identificado em 2014 em estudos de bovinos Nelore criados no Brasil sob condições tropicais e exerceu função nos ovários de bovinos e células da granulosa (SOMAVILLA et al., 2014). Campos et al. (2017), relataram a expressão desse gene na raça Caracu brasileira na reprodução bovina e para produção de leite e carne na raça. Além disso, é descrita a ação de *PTAFR* com a saúde uterina e expressão no epitélio endometrial em bovinos da raça holandesa (PETER et al., 2015). Estudos recentes também relacionaram o gene *PTAFR* com a mastite bovina (YANG et al., 2022). Há comprovações que este gene também está relacionado com a via de sinalização do cálcio e que sua expressão gênica aumentou em condições de estresse térmico em bovinos da raça Holandesa e Jersey (KIM et al., 2020). É importante relacionar este gene com as características reprodutivas, pois essa fase da vida do gado leiteiro é essencial para que haja uma boa lactação. Além disso, por estar relacionado com a mastite está diretamente relacionado com a qualidade leiteira. Ademais, encontrar a expressão desse gene em bovinos brasileiros é importante para reforçar sua relevância para a produção animal. No presente estudo, o gene *PTAFR* foi associado a produção em quilos de proteína em vacas da raça Holandesa criadas sob condições tropicais.

O gene *MRTFA* foi encontrado no presente estudo com associação para a produção de proteína em quilos em bovinos da raça Holandesa. Este gene interage com o fator de transcrição da miocardina (produz as proteínas contráteis), contribui com a diferenciação das células musculares lisas e pode estar ligado a actina (presente nas células do tecido mamário, impulsiona o leite pelos ductos e canais mamários durante a ordenha). Também, assim como no presente estudo, o gene *MRTFA* também foi relacionado com a produção de leite e proteínas em bovinos (FANG et al., 2020). Com isso podemos salientar que este gene é importante para a qualidade leiteira, pois está relacionado com a proteína do leite e mostra relevância para o sucesso da ordenha.

Os genes *CSN1S1* e *CSN2* genes pertencem a família da caseína e estão situados no cromossomo 6 dos bovinos. As caseínas consistem em quatro genes diferentes (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *CSN3*) que são responsáveis pela codificação

de proteínas, inclusive as proteínas do leite, que contribuem para o valor nutricional e a funcionalidade do leite (MAHMOUDI et al., 2020). Segundo KOLENDA et al., (2021), os genes da proteína do leite mais conhecidos são 4 genes da caseína (*CSN1S1*, *CSN1S2*, *CSN2*, *CSN3*) e o gene da β -lactoglobulina, também chamado de gene da proteína endometrial associada ao progestágeno (*PAEP*), também relacionado no presente estudo.

O gene *CSN1S1* apresentou grande relevância no trabalho, e está descrito na ontologia gênica como sendo contribuinte ao *Bos taurus* com ação direta a resposta a progesterona e estradiol, além disso, possui atividade antioxidante e é estabilizante de proteínas (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009). Também foi relacionado com a atividade citoplasmática e a membrana da glândula mamária lactante, além disso, pode ter ação no sistema reprodutor feminino e na capacidade do leite de transportar fosfato e cálcio (KARLSSON, et al., 2021). *CSN1S1* foi um dos genes com maior significância e estudos de 2003 já relacionavam sua ação para produção de proteína e gordura, porcentagem de proteína e gordura e produção leiteira (PRINZENBERG et al., 2003). Este gene também foi descrito com efeito na raça Holandesa para parâmetros de produção e qualidade do leite (DOKSO et al., 2013) e estudos mais recentes de 2019 também relacionam o gene com a composição da proteína do leite em bovinos (ZHOU et al., 2019).

O gene *CSN2* corresponde a família das caseínas e é responsável por codificar a beta caseína (SAFRAN et al., 2021). Há estudos que mostram a influência do gene *CSN2* nas frações de caseína e principalmente, beta caseína, que irá otimizar a fabricação de derivados lácteos (AMALFITANO et al., 2022). Também conhecido como gene kappa-caseína, o gene *CSN3*, é de extrema importância para o setor da bovinocultura leiteira, uma das principais proteínas encontradas no leite, e afeta a produção de leite e suas características de composição (MAHMOUDI et al., 2020). Também é extremamente necessário para as características de produção de leite e para a composição da proteína do leite (BONFATTI et al., 2010). A Kappa-caseína é responsável por estabilizar as micelas de caseína, que são agregados formados por proteínas de caseína no leite (SUMMER et al., 2010) e seu impacto na composição e qualidade do leite é importante na lucratividade da indústria, pois possui importante função na síntese de proteínas, o que pode contribuir para o preço do leite e rendimento de derivados na indústria (AMALFITANO et al., 2022). Há estudos que mostram que em estresse calórico leve o desempenho das vacas diminuiu, mas que

a expressão dos genes *CSN3* e *CSN2* não foram afetados, e ainda, a expressão da *kappa-caseína* não foi afetada pelo estresse calórico (CORAZZIN et al., 2020).

Relacionado tanto para porcentagem de proteína, como proteína em quilos no presente trabalho, o gene *HSTN* está relacionado com a expressão da β -caseína e é regulado, assim como os demais genes da caseína, durante a lactação (ELSIK et al., 2009). Portanto podemos destacar que os genes *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3* são de extrema importância para as características de qualidade do leite, pois foram encontrados como relevantes em diversos estudos, como os descritos anteriormente nesse trabalho, e ainda podem estar relacionados com as condições ambientais em que os bovinos leiteiros são mantidos. Além disso, apesar de não haver muitos estudos sobre o gene *HSTN*, ele também foi relacionado no presente trabalho com a qualidade leiteira e no estudo citado de ELSIK et al., em 2009, este gene é expresso durante a lactação, portanto pode ter impacto direto com a produção leiteira.

Também associado neste trabalho com a produção de proteína em quilos, o gene *NPFFR2* também foi associado com a codificação de neuropeptídeos, além disso, pode ser encontrado na membrana plasmática e nos filamentos de actina, e pode ser associado a respostas imunes e a células da glândula mamária (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; KARLSSON, et al., 2021). Os filamentos de actina são importantes para a contração das células e na glândula mamária contribui com a secreção do leite (HAAKSMA et al., 2011) e por estar relacionado com a imunidade esse gene também é importante para a resistência a mastite (ZHANG et al., 2016). Além disso, é relevante para a longevidade, produção leiteira e componentes do leite (LOZADA-SOTO et al., 2022). Também foi considerado como um gene candidato para ácidos graxos poliinsaturados (BOHLOULI et al., 2022), que são nutrientes essenciais e que desempenham um papel vital na saúde humana. Por essa razão, este gene é relevante no presente estudo, pois há estudos que corroboram com sua importância para a qualidade leiteira, produção animal eficiente e até mesmo expressa fatores importantes para a saúde da população.

Na ontologia gênica o gene *SCARA5* foi descrito no processo biológico de resposta ao calor (GO:0034605), pois pode estar relacionado a mudança de estado ou atividade de uma célula com um estímulo de temperatura em *Bos taurus* (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009). Estudos recentes também relacionaram este gene ao processo biológico de resposta ao calor e na resposta aos efeitos do estresse calórico de bovinos (MENGISTIE et al., 2022). É importante

relacionar os genes com os efeitos calóricos, pois vacas leiteiras expostas ao estresse calórico tendem a reduzir a produção de leite. Isso ocorre devido à diminuição da ingestão de alimentos, ao aumento das perdas de água e eletrólitos e aos efeitos negativos sobre a fisiologia mamária (LEIRA et al., 2018). Este gene também foi definido como um gene regulado por hormônios femininos e por sinais maternos (LESAGE-PADILLA et al., 2017) e ocorre expressão na prenhez, no estroma de bovinos e após a gestação tem expressão nas células imunes (MANSOURI-ATTIA et al., 2009). Portanto, este gene demonstrou ser importante para a produção leiteira e como há relação deste gene com a temperatura e a resposta ao calor em bovinos, é importante correlacionar seus efeitos em bovinos leiteiros criados no Brasil em clima tropical e subtropical. Além de tudo, é foi demonstrado que há relevância deste gene para questões reprodutivas, dessa maneira está indiretamente relacionado com o sucesso da lactação.

O gene *SVEP1* é considerado um dos componentes relacionados a resposta imune (PARREIRA et al., 2020), sendo então um gene indiretamente relacionado com a mastite. Também foi relacionado a ontologia gênica do *Bos taurus* como fator importante para a ligação dos íons de cálcio (GO:0005509), e a organização das *tight junction* (estruturas celulares fazem uma barreira epitelial no tecido mamário e estão envolvidas na regulação da passagem seletiva de substâncias do sangue para o leite) (GO:0000107) (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009), à vista disso tem relação com o sucesso da lactação.

No presente estudo o gene *PAEP*, foi associado com a produção de proteína em quilos e com a porcentagem de gordura. Este gene foi associado a características de composição de proteínas, biossíntese de ácido carboxílico e metabolismo de ácidos graxos (SANCHEZ et al., 2019). Também KNUTSEN e colaboradores, em 2018, relacionaram o gene *PAEP* com o teor de ácidos graxos do leite bovino e a β -lactoglobulina (KNUTSEN et al., 2018). O gene *PAEP* também codifica a proteína do soro do leite, β -lactoglobulina, e foi relacionado a produção leiteira e a qualidade do leite em bovinos leiteiros Holandeses da Polônia (KOLENDA et al., 2021). Fato também afirmado em estudos de 2022, onde este gene também foi associado a produção de leite e a β -lactoglobulina, como visto em estudos anteriores, e foi relacionado a um transportador intracelular de ácidos graxos do leite (BOHLOULI et al., 2022). Os ácidos graxos e as proteínas do soro do leite são componentes essenciais do leite e desempenham funções vitais na nutrição, portanto, o

melhoramento genético pode ser feito relacionando as características importantes para a saúde humana e para os laticínios.

Os genes *DGAT1*, *CPSF1*, *SLC52A2*, *CYHR1* e *TSNARE1* foram relacionados no presente trabalho com a produção de proteína no leite, e entre eles, os genes *DGAT1* e *CPSF1* são relacionados na literatura com as características de produção leiteira (NAYERI et al., 2016). Além disso, um dos genes com maior relevância nos bovinos leiteiros é o gene *DGAT1*, que vem sendo estudado há anos e trabalhos de 2002 já debatiam o efeito deste gene na população de bovinos na Nova Zelândia, relacionando seu efeito a produção e composição do leite de bovinos (SPELMAN et al., 2002; GRISART et al., 2002). Após isso, estudos relacionaram seu efeito a síntese de triglicerídeos, teor de gordura no leite e gordura intramuscular de bovinos criados na Argentina e Bolívia (RIPOLI et al., 2006). Também observaram a ação do *DGAT1* em bovinos leiteiros do Reino Unido e analisaram sua ação na produção leiteira e os componentes do leite (BANOS et al., 2008). Estas informações comprovam que há anos o efeito do gene *DGAT1* vem sendo estudado nos rebanhos leiteiros de todo o mundo e que sua ação é importante para a produção leiteira. Estudos recentes continuam corroborando que o gene *DGAT1* é essencial para produção de leite, por isso há um senso comum que este gene é um importante marcador para produção leiteira bovina e que pode ser usado em programas de seleção para aumentar a rentabilidade e acelerar os índices de ganho genético (SAMUEL et al., 2022). Também foi associado em outros estudos como importante na síntese dos triglicerídeos do leite (SIGDEL et al., 2019). No presente estudo houve um pico expressivo no cromossomo 14 bovino, figura 1, assim como em um recente estudo de 2023, onde este pico também se referia ao *DGAT1* e esta relação foi positiva para composição de proteína e gordura do leite (JAYAWARDANA et al., 2023). Também foi associado a produção de leite, a porcentagem de proteína e gordura (BAKHSHALIZADEH et al., 2021). O gene *DGAT1* também foi associado a homeostase de ácidos graxos (GO:0055089) (ARIYARATHNE et al., 2021) e correspondeu a maior parte da variabilidade da composição de ácidos graxos do leite da raça Holandesa (CRUZ et al., 2019). Assim como em outros estudos, o gene *DGAT1* foi encontrado no presente trabalho com ação importante para os compostos leiteiros e está presente em bovinos Holandeses criados em solo brasileiro. Este gene foi associado no presente trabalho tanto para produção da proteína em quilos e porcentagem e para quilos de gordura e

porcentagem, afirmando que é um gene importante para as características de produção leiteira.

Os genes *DGAT1* e *CPSF1* foram descritos como significativos para porcentagem de gordura e proteína (JAYAWARDANA et al., 2023). Entretanto, o gene *CPSF1* apresentou significância para a produção leiteira e para porcentagem de proteína, além disso, também apresentou efeito associado ao escore de células somáticas (COCHRAN, COLE, NULL & HANSEN., 2013). Dessa forma, estes genes mostram sua importância para a qualidade do leite.

Há estudos que relacionam o gene *DGAT1* e *GHR* a produção leiteira (NAYERI et al., 2016). Além disso, estes genes estão altamente relacionados com a tolerância ao calor e produção leiteira (CHERUIYOT et al., 2021). Porém, o gene *GHR* se refere como sendo receptor do hormônio do crescimento, além disso, este gene está relacionado com a produção e composição do leite (VIITALA et al., 2006). Em bovinos da raça Holandesa tem sido amplamente estudado devido ao seu potencial efeito na produção de leite e características relacionadas (RAHMATALLA et al., 2011). Este gene está diretamente ligado a produção de proteína e gordura do leite, além de codificar a proteína receptora do hormônio do crescimento, que está diretamente relacionado ao desenvolvimento e crescimento de tecidos, incluindo a glândula mamária (COBANOGLU et al., 2021). Também desempenha um papel significativo na produção e composição do leite e está envolvido no crescimento e desenvolvimento da glândula mamária e na manutenção da lactação (SIGDEL et al., 2019). Além disso, o gene *GHR* foi relacionado a tolerância ao calor em bovinos, bem como o gene *NPFFR2*, também encontrado no presente estudo, o que é relevante considerando o clima tropical e subtropical brasileiro, pois bovinos da raça Holandesa tendem a diminuir a produção e composição leiteira em climas mais quentes (CHERUIYOT et al., 2021). Também, *GHR*, é importante na ligação do hormônio do crescimento ao receptor estimula a produção do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (IGF-1) no fígado, que é um mediador chave dos efeitos de promoção do crescimento do GH (LIU et al., 2021). O IGF-1 tem sido objeto de estudo há anos devido ao seu efeito na produção animal e no gado leiteiro, pois está relacionado a uma melhor eficiência produtiva, maior produção leiteira, rendimento de proteína e gordura do leite, e pode desempenhar um papel importante na regulação da lactação (MULLEN et al., 2011). Também os genes *DGAT1*, *GHR* e *EPS8* são associados aos indicadores de produtividade de leite e quantidade de gordura do leite em vacas (SERMYAGIN et al.,

2020). Especificamente o gene *EPS8* foi associado com o rendimento de gordura (ILIE et al., 2021).

Estudos recentes relacionaram o gene *CPSF1* com a poliadenilação do mRNA e no transporte da riboflavina, sendo esta essencial para o metabolismo de proteínas e gorduras (JAYAWARDANA et al., 2023). No presente trabalho, além desse gene ser associado com gordura do leite, ele também foi encontrado tendo influência sobre a porcentagem e produção em quilos de proteína. Este gene e o gene *DGAT1* também foram considerados como genes candidatos para CCS na raça Holandesa canadense (OLIVEIRA et al., 2019). Estes dois genes foram importantes em todas as características analisadas neste trabalho, portanto, podem ser considerados importantes no melhoramento genético para melhorar a qualidade nutricional do leite, atendendo às demandas do mercado e fornecendo produtos lácteos com maior valor agregado.

O gene *SLC52A2* também foi associado no presente trabalho para todas as características analisadas e o efeito desse gene também foi observado em 2020 em bovinos da raça Holandesa da China para características de rendimento de gordura, percentual de gordura, rendimento de leite, percentual de proteína e mérito do queijo (WANG et al., 2020). Este gene está associado ao transporte da riboflavina (GO:0032217) (GO:0032218) (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009). A riboflavina contribui com o metabolismo celular de proteínas e gorduras (ARIYARATHNE et al., 2021). Também há estudos que relatam que a riboflavina (*SLC52A2*) contribui com a expressão da gordura do leite materno de humanos e em camundongos, é regulada que durante a lactação e um importante transportador na glândula mamária lactante no que diz respeito a proteína (WU et al., 2016). Este gene também foi relacionado com a glândula mamária de vacas leiteiras e com seu conteúdo de ácidos graxos (LU et al., 2022). Outro estudo de 2023 relacionou o *SLC52A2* com a produção de leite e percentual de proteína na raça Holandesa (TENG et al., 2023). Portanto, este gene foi relevante para o trabalho, pois apresentou relevância para todas as características analisadas, de proteína e gordura no leite, e os trabalhos descritos acima reforçam a significância desse gene para a qualidade leiteira. Dessa forma, pode-se concluir que este gene é expressivo para a bovino cultura leiteira.

O gene *TSNARE1* também foi encontrado em todas as características analisadas no presente estudo envolvendo proteína e gordura do leite e há trabalhos

que relacionam sua ação com a temperatura retal em bovinos da raça Holandesa em lactação e ao transporte intracelular de proteínas (LUO et al., 2021; LUO et al., 2022), portanto é um gene importante para ser observado em bovino Holandeses criados em condições tropicais e subtropicais. Foi relacionado também com a porcentagem de gordura em bovinos da raça Holandesa dos Estados Unidos (PRAKAPENKA et al., 2021). Este gene, juntamente com o gene *TRAPPC9*, estão associados a produção de leite e de ácidos graxos em diferentes fases da lactação (BOHLOULI et al., 2022). Conseqüentemente, este gene é importante para as características leiteiras, visto que foi relacionado em outros trabalhos, assim como no presente estudo, com a porcentagem de gordura. Também, por estar relacionado com os ácidos graxos, este gene pode afetar tanto as características físicas quanto as propriedades nutricionais do leite. Desse modo, o gene *TSNARE1* é considerado importante para a qualidade leiteira, principalmente, em bovino Holandeses criados no Brasil.

O gene *MAML3* está relacionado nos mamíferos e *Bos taurus* com os receptores de Notch (GO:0007221), esta estrutura contribui para que haja comunicação entre as células, ou seja, é necessário para que ocorra uma sinalização para o destino das células como a vasculogênese e hematopoiese (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009; WU et al., 2002; BARON, 2003; SPRINZAK, BLACKLOW., 2021). Por essa razão, este gene pode ter efeito indireto na lactação, visto que é necessário bons vasos sanguíneos e sangue com os nutrientes passando pelas células da glândula mamária para que haja a produção de leite (METCALF et al., 1992). Já o gene *RBM19* está descrito como regulatório no desenvolvimento embrionário de bovinos (GO:0040019) e com função na ligação de RNA (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009). Também foi associado com características reprodutivas de bovinos, regulação positiva do desenvolvimento embrionário e na codificação da ligação de RNA (SILVA et al., 2022). Há descrição desse gene também na morfologia da glândula mamária de bovinos (PAUSCH et al., 2016). Dessa forma, este gene é importante para a lactação e conseqüentemente, para a qualidade leiteira, pois durante a gestação ocorre mudanças hormonais que estimulam o crescimento e a diferenciação das células secretoras de leite nas glândulas mamárias (HANNAN et al., 2023). Portanto, o desenvolvimento embrionário prepara as glândulas mamárias para a lactação e pode haver um efeito indireto desse gene com a produção leiteira e de sólidos.

Já no cromossomo 19, o gene *TRPV3* está relacionado com a atividade dos canais de cálcio (GO:0005262) em *Bos taurus* (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009). Também foi relatado que o *TRPV3* contribui com o transporte de íons, e em bovinos a absorção dos íons de cálcio é de suma importância, pois em baixas quantidades pode causar distúrbios metabólicos, como a febre do leite (BRAUN et al., 2019). Durante o parto em bovinos, é comumente observada uma rápida diminuição dos níveis de cálcio (Ca^{2+}) no sangue e esse fenômeno parece estar associado à dificuldade em mobilizar uma quantidade suficiente de Ca^{2+} dos ossos (LIEBE et al., 2022). Como o gene *TRPV3* está relacionado aos canais do cálcio, ele também mostra que é relevante para a produção leiteira, pois o cálcio é importante para o processo do parto nas vacas e para a lactação, bem como sua diminuição pode causar hipocalcemia e maior risco de outras doenças metabólicas, como a cetose e a deslocamento de abomaso (ZHANG et al., 2020). Com isso podemos relacionar este gene com a qualidade leiteira, pois somente vacas saudáveis tem condições para garantir uma produção leiteira satisfatória e com boa qualidade.

O gene *SLC30A5* está relacionado com o transporte de zinco, além disso, está relacionado com o sequestro de vesículas de zinco que são secretas na glândula mamária e sua ação também está ligada a hormônios relacionados a secreção do leite (KUMAR et al., 2015). Este mesmo trabalho também indica que níveis reduzidos de *SLC30A5* gera uma redução de zinco no leite materno. Este gene também foi indicado como importante para codificação do transporte e para a absorção de zinco dietético na fase embrionária (AZIMI et al., 2022). O zinco é essencial para várias funções fisiológicas, incluindo o desenvolvimento e funcionamento do sistema imunológico, crescimento e reprodução, além disso, é necessário para a síntese de proteínas (LODDE et al., 2020). Por conseguinte, podemos dizer que esse gene tem efeito indireto para a produção leiteira bovina, visto que, o sistema imunológico ajuda a prevenir enfermidades no gado leiteiro que podem afetar a produtividade e qualidade.

O gene *NRG3*, no cromossomo 25, está relacionado com o desenvolvimento do placódio mamário, que é a estrutura que dará origem ao broto mamário em *Bos taurus* (GO:0060596) (ASHBURNER et al., 2000; CARBON et al., 2009) e em humanos também foi relatado como determinante para o desenvolvimento da glândula mamária (HOWARD et al., 2006). Também foi descrito como importante para desenvolvimento de glândula mamária de bovinos (OGOREVC et al., 2009). Como este gene está relacionado com o desenvolvimento da glândula mamária, pode-se

relacionar seu efeito na lactação, pois para que haja uma produção leiteira de sucesso é necessário boas estruturas mamárias. Tal fato também pode ser relacionado com a produção de gordura e proteína no leite que contribui com a qualidade leiteira, visto que, para que haja bons índices dos sólidos do leite é necessário um adequado desenvolvimento da glândula mamária.

O gene *NNT*, nicotinamida nucleotídeo transidrogenase, associado neste trabalho com porcentagem de gordura e proteína, seria relacionado com uma proteína da membrana interna mitocondrial, que está envolvido no metabolismo energético celular, e é relatado com efeito importante para a regulação dos níveis de NADPH mitocondrial, regulação das funções mitocondriais, ao estresse oxidativo e tem relação na produção da ATP (RAO et al., 2020). O ATP é crucial na lactação, fornecendo a energia necessária para a síntese, transporte, secreção e ejeção do leite, pois sem o ATP, as células mamárias não seriam capazes de realizar as atividades metabólicas e contráteis necessárias para a produção e liberação do leite, gordura e proteína. Há poucos relatos na literatura da expressão desse gene em bovinos. Em ovinos este gene foi relacionado com a resposta imune e foi considerado um gene candidato com resposta ao estresse térmico (DI GERLANDO et al., 2022). Também foi expresso em suínos apresentando resposta celular ao estresse e na taxa de respiração associado ao estresse calórico (KIM et al., 2018). Por conta disso, este gene pode ser relevante para a produção leiteira e para a qualidade do leite em bovinos criados em condições tropicais e subtropicais. No cromossomo 6, o gene *SLC4A4*, foi descrito no presente trabalho como importante na porcentagem de proteína. Também foi caracterizado como importante transportador de glicose, que é fundamental quando absorvido na glândula mamária para que haja produção leiteira (PEDROSA et al., 2021). E por fim, foi descrito como importante para produção de leite e proteína (JIANG et al., 2019).

O gene *PLEC* está descrito como significativo para a porcentagem e rendimento de proteína e foi evidenciado como um gene próximo ao *DGAT1*, que afeta volume de leite e a porcentagem de gordura em bovinos, além disso, este gene também está associado em sua função biológica com a manutenção e estabilidade das células, migração, formação de barreiras físicas (RAVEN et al., 2013). Há outras evidências da alta relação deste gene com a proteína no gado Holandês e também pode ser correlacionado com produção leiteira e gordura (PEDROSA et al., 2021). O gene *PLEC*, juntamente com o gene *VPS28*, foram descritos com influência para produção leiteira, porcentagem de proteína e gordura (WANG et al., 2019). Além

disso, juntamente com o *DGAT1* e *TRAPPC9*, o gene *PLEC* também está associado com a produção de leite, o que acaba sendo notório é que a presença de *PLEC* e *TRAPPC9*, também foi evidente em bovinos da raça Holandesa na China criados em condições tropicais e subtropicais (YANG et al., 2021). Os genes *DGAT1* e *PLEC* estão associados como fundamentais na lactação, sendo *DGAT1* relevante para o metabolismo lipídico, codificação da síntese de triacilglicerol e para o metabolismo energético de vacas de lactação de alta produção (BOHLOULI et al., 2022). Sendo assim, há evidências que este gene é importante para a produção de leite, gordura e proteína, em bovinos da raça Holandesa.

Há relatos da expressão do gene *EPPK1*, gene da epiplaquina, para resposta ao estresse térmico nos ácidos graxos insaturados em bovinos leiteiros (BOHLOULI et al., 2022). Já o gene *VPS28* foi expresso na glândula mamária na raça Holandesa da China e está associado a produção de gordura do leite (LIU, ZHANG., 2019). Este gene também foi associado com a produção leiteira em condições de estresse térmico e é considerado uma proteína envolvida na resistência ao choque térmico (SIGDEL et al., 2019). Além disso, este gene desempenha um papel nos processos celulares dentro da glândula mamária e na produção leiteira (JIANG et al., 2014). Já o gene *ADGRB1*, receptor acoplado à proteína G de adesão B1, tem atividade no receptor de sinalização transmembrana, e foi relacionado com a produção de lactose em bovinos (COSTA et al., 2019). Este gene foi considerado candidato para nitrogênio ureico no leite, sendo que com a diminuição de nitrogênio ureico é possível melhorar a saúde das vacas e diminuir a poluição ambiental, além disso, este gene foi relacionado com o metabolismo ou ligação de proteínas e com a angiogênese (formação de vasos sanguíneos) (MA et al., 2023). Entender a ação dos genes em bovinos leiteiros é fundamental para o melhoramento genético e aprimoramento das características desejáveis, já que por meio do uso das ferramentas de genoma, é possível identificar bovinos com genes favoráveis contribuindo para o desenvolvimento de rebanhos mais produtivos, saudáveis e adaptados às necessidades da indústria leiteira. Os genes descritos podem ter função direta ou indireta na produção leiteira, pois de certa forma todos contribuem na lactação.

Relacionado ao zinco, o gene *ZC3H3*, é conhecido por desempenhar diversos papéis em processos celulares, além disso, está relacionado com a porcentagem de gordura e proteína do leite e produção leiteira (ZHANG et al., 2019; JAYAWARDANA et al., 2023). E o gene *TRAPPC9* possui relevância na regulação da diferenciação

celular e controle dos mecanismos do sistema imune (BOHLOULI et al., 2022), por isso também foi associado como um gene candidato para resistência à mastite (WANG et al., 2015) e conseqüentemente, contribui com a qualidade do leite. Além disso, foi associado com características de produção leiteira na raça Holandesa e houve maior expressão desse gene na glândula mamária de vacas em lactação do que em outros tecidos (PERIPOLLI et al., 2018). Estudos recentes corroboram com as informações descritas acima, pois evidenciaram que o gene *TRAPPC9* está relacionado com a mastite bovina, é expresso com maior proporção na glândula mamária e está ligado ao sistema imunológico (KHAN et al., 2023). Em suma, compreender o efeito dos genes na produção leiteira oferece aos produtores a oportunidade de selecionar animais com maior potencial produtivo, melhorando a eficiência e a qualidade do leite.

Estudos relacionaram o gene *CPSF1* ao rendimento e percentual de gordura em bovinos Holandeses, sua ação foi significativa tanto em produção leiteira como em produção de gordura (COCHRAN et al., 2013). Este gene também foi associado a porcentagem de gordura em estudos de 2021 (BAKHSHALIZADEH et al., 2021). Outro estudo do mesmo ano também relacionou este gene com a produção de gordura (PETERS et al., 2021). Já o gene *PPT1*, também conhecido como palmitoil-proteína tioesterase 1, foi identificado em células responsáveis pelos folículos ovarianos de bovinos, especificamente nos oócitos maduros (UZBEKOVA et al., 2021). Este gene também foi relacionado com adaptações térmicas em bovinos (IGOSHIN et al., 2021) e no presente trabalho foi relacionado com a produção de gordura em quilos. Também o gene *ENSBTAG0000022427* foi relatado em um estudo com bovinos próximo ao gene *TENM4* desempenha um papel no mesoderma embrionário (REINARTZ; DISTL, 2017). É importante relacionar o efeito dos genes encontrados no presente estudo, com os demais trabalhos relacionados já existentes, dessa forma é possível evidenciar que estes genes são importantes para a fisiologia bovina e conseqüentemente, ajudarão para a qualidade da lactação. Como no caso dos genes envolvidos com a reprodução descritos na literatura, pois de certa forma os mesmos contribuirão com os hormônios gestacionais e pré-parto para que a glândula mamaria seja desenvolvida e para que haja produção de leite (HANNAN et al., 2023). Além de tudo, é importante encontrar na literatura genes relacionados com adaptações térmicas, pois é necessário que os bovinos Holandeses criados em condições

brasileiras tropicais e subtropicais, tenham genes que contribuam para a produção leiteira nesses ambientes.

O gene *CYHR1* foi associado no presente trabalho para produção da proteína em quilos e porcentagem, e para quilos de gordura e porcentagem. Foi associado também em outro estudo com a produção de leite e percentual de gordura (BAKSHSHALIZADEH et al., 2021). Já o gene *MGST1* foi relacionado em vários estudos como relevante nos bovinos e no presente estudo foi relacionado com a produção em quilos e porcentagem de gordura no leite. Este gene foi associado com a expressão de ácidos graxos e foi destacado como importante na composição da gordura do leite em bovinos da raça Holandesa (CRUZ et al., 2019). Também há outros estudos relacionando sua função com a composição de gordura e produção leiteira (LITTLEJOHN et al., 2016; RAVEN et al., 2016) também associando este gene e estas características em bovinos da Nova Zelândia (ARIYARATHNE et al., 2021). Assim, o *MGST1*, desempenha um papel relevante no processo de formação da gordura do leite e glândula mamária (KORKUĆ et al., 2023). Além disso, este gene já foi encontrado em bovinos da raça Holandesa criados no Brasil e a proteína codificada por este gene desempenha um papel fundamental na proteção contra o estresse oxidativo e está envolvida no metabolismo da glutathione (IUNG et al., 2019). O gene *SLC15A5* (família portadora de soluto 15 membro 5), foi relacionado neste trabalho com as características de gordura no leite, e em outros estudos está relacionado ao transporte transmembrana (GO:0055085), responsável pelo transporte de proteínas (KORKUĆ et al., 2023). Além disso, os genes *SLC15A5*, *MGST1* e *SLC4A4* foram descritos com alta significância para as características de leite, e principalmente o gene *SLC15A5* para expressão de gordura na raça Holandesa (PEDROSA et al., 2021). Há estudos mais antigos que também relacionam os genes *MGST1* e *SLC15A5* com a produção de leite (MARETE et al., 2018) e com a produção de gordura em vacas Holandesas (JIANG et al., 2019). Todos os genes evidenciados foram relevantes na literatura para a composição leiteira e qualidade do leite, pois influenciam de certa forma a produção de leite e gordura. É importante encontrar os genes na literatura com funções semelhantes das encontradas no presente trabalho para que haja maior confiabilidade das informações.

O gene *LDHB* é responsável por codificar a proteína LDH-B, desempenha na homeostase da glicose em bovinos (VAUGHN et al., 2022). Este gene juntamente com o gene *DGAT1* foram relatados como relevantes para o metabolismo de lipídios, e

principalmente, o gene *LDHB*, demonstrou regulação durante a lactação das vacas (FANG et al., 2019) e neste estudo foi importante para quilos de gordura no leite. Também um estudo mostrou que este gene tem relação com o estresse térmico e exposição ao calor (KANG, SHIM., 2021). O gene *ACTA2*, α -actina 2, é conhecida proteína de ligação relacionada com função celular e foi relacionado com o rendimento de proteína (RAVEN et al., 2013) apesar de no presente trabalho estar relacionado com a gordura do leite. Além disso, este gene foi estudado em camundongos e foi evidenciado que a ausência da expressão desse gene compromete a capacidade contrátil das células mioepiteliais mamárias, afeta a eficiência da ejeção do leite e desempenha um papel funcional importante no aumento da geração de força contrátil necessária para a ejeção adequada do leite (HAAKSMA et al., 2011).

O gene *LRP2* foi muito relacionado na literatura em bovinos leiteiros. Está relacionado à lipoproteína de baixa densidade e está relacionado com doenças metabólicas (CHEN et al., 2021) e está relacionado com o metabolismo lipídico, o que o torna particularmente interessante, uma vez que o metabolismo dos lipídios pode ser afetado durante um desequilíbrio energético grave, o que torna esse gene candidato para verificar os efeitos metabólicos do balanço energético negativo (FÁTIMA et al., 2014). As doenças metabólicas e o balanço energético negativo podem resultar em uma redução na produção de leite, comprometendo a lucratividade e a eficiência da produção leiteira, portanto, este gene tem influência sobre a lactação e conseqüentemente, na composição leiteira. A regulação fisiológica da expressão do gene *LRP2* no tecido mamário de vacas leiteiras fornece um suporte adicional para a função específica desse gene no desenvolvimento e na função das glândulas mamárias (WALL et al., 2013). No colostro humano e bovino, observa-se uma maior presença do gene *LRP2* em comparação ao leite e desempenha funções importantes no metabolismo, no desenvolvimento embrionário e no controle da resposta imunológica (SUN et al., 2023). Neste estudo o gene *LRP2* foi relacionado com a porcentagem de gordura, além de tudo, compreender a função dos genes em bovinos leiteiros é essencial para o melhoramento genético e o aprimoramento das características desejáveis.

O gene *CSF3R* demonstra uma associação de resposta ao estresse térmico em bovinos (CZECH et al., 2022) e foi relacionado ao sistema imunológico em bovinos (VERMA et al., 2018). Já o gene *ELAPOR1* foi associado com percentual de gordura em um estudo com bovinos (TIPLADY et al., 2021). Além disso, os dois últimos genes

descritos também foram relacionados com o teor de gordura do leite neste trabalho. Foi constatado que o gene *GON4L* está localizado em uma região que é associada com o teor de cálcio do leite durante as lactações da vaca e que em BTA3 há associação de produção de gordura, produção de proteína, percentual de gordura e o percentual de proteína, porcentagem de lactose do leite e teor de ácidos graxos, porém, o gene *GON4L* foi associado diretamente com percentual de proteína (ATASHI et al., 2022). Já o gene *ENSBTAG00000053760*, foi relacionado com o percentual de gordura em bovinos Holandeses (TENG et al., 2023), porém, não há muitas evidências sobre a ação desse gene na literatura. Portanto, esses genes foram considerados relevantes para o estudo, uma vez que demonstraram importância para as características analisadas, tanto em relação à proteína quanto à gordura do leite. Os estudos mencionados anteriormente reforçam a significância desses genes para a qualidade do leite na raça Holandesa brasileira, de maneira direta ou indireta.

Estudos também mostram que o gene *EXOC4* tem expressão tanto nas raças Angus e Charolês, como na raça Holandesa, associados a duração da gestação (PURFIELD et al., 2019). Já o gene *NELL2* foi relacionado em um estudo de vacas leiteiras sob condição de estresse térmico, onde foi relacionado com a fertilização e o desenvolvimento embrionário (SIGDEL et al., 2020). Um estudo foi conduzido para examinar a expressão gênica na glândula mamária bovina em resposta à ordenha realizada quatro vezes ao dia, começando no quarto dia de lactação, onde vários genes que controlam a proliferação de vasos sanguíneos foram afetados pelo aumento da frequência de ordenha, entre esses genes, o gene *NELL2*, conhecido por promover a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), mostrou regulação negativa, ou seja, sua expressão foi reduzida em resposta ao aumento da frequência de ordenha (CONNOR et al., 2008). E o gene *AHSP*, proteína estabilizadora da α -hemoglobina, desempenha um papel crucial na formação da hemoglobina (LI et al., 2021). A importância desse relato se faz, pois, a maior vascularização do tecido mamário também pode contribuir para a persistência da produção de leite e para o aumento do fornecimento de nutrientes encaminhado para a glândula mamária através do sangue. Com isso é possível garantir uma produção leiteira de qualidade.

Descrito em um estudo de bovinos como um gene candidato, o gene *FAM13A*, exerce um efeito constante durante a primeira e a segunda lactação, mas possui efeitos mais pronunciados durante a fase intermediária da terceira lactação (OLIVEIRA et al., 2019). Isso indica que esses genes podem desempenhar um papel

fundamental na regulação da produção de leite ao longo das lactações. Também o gene *FAM13A* apresentou um papel na susceptibilidade à mastite em vacas Jersey (XIA et al., 2017). Além disso, um estudo investigou a relação entre a concentração de ureia e a expressão do gene *BRINP1* em células endometriais bovinas, este gene foi considerado como um gene candidato cuja expressão no endométrio mostrou correlação com a concentração plasmática de ureia em vacas leiteiras e a expressão de *BRINP1* caiu à medida que a concentração de ureia aumentou (CHENG et al., 2015). Uma concentração plasmática de ureia equilibrada está relacionada a diversos benefícios para as vacas leiteiras, como indicador de uma boa saúde metabólica, produção de leite favorável e bons índices de fertilidade, porém, níveis anormais de ureia podem estar associados a problemas de saúde, como acidose ruminal, desequilíbrios nutricionais e redução na eficiência reprodutiva. Vacas que apresentam algum problema de saúde tem sua produção reduzida, bem como a diminuição nos índices de gordura e proteína do leite. Dessa forma é importante analisar na literatura o efeito dos genes e associar com os resultados encontrados no presente trabalho.

O gene *CD82* foi associado com oócitos imaturos e maduros em bovinos e foi encontrado em tecido ovariano (JANKOVIČOVÁ et al., 2023) o desenvolvimento embrionário e a lactação estão interligados, pois o desenvolvimento adequado do embrião é essencial para que a lactação ocorra normalmente. Além disso, este gene foi regulado positivamente em novilhas com baixa fertilidade (KILLEEN et al., 2016), também foi relacionado com a expressão gênica na glândula mamária (GUTIERREZ-GIL et al., 2014), sendo que a glândula mamária é essencial para a lactação, desempenhando funções vitais na produção, secreção e composição do leite. O gene *MOCS1*, etapa 1 da síntese do cofator de molibdênio (HU et al., 2022), foi associado com a porcentagem de gordura e proteína na produção leiteira em bovinos da raça Holandesa (JIANG et al., 2019). O gene *ITGAE*, encontrado em um estudo com bovinos, é responsável por codificar uma cadeia alfa de integrina específica, a qual é predominantemente expressa na superfície dos linfócitos T intraepiteliais intestinais, essenciais para a vigilância imunológica e para a ativação das respostas imunes contra patógenos (COPPIETERS et al., 2009), também esse gene desempenha um papel crucial na resposta imunológica contra doenças parasitárias (TWOMEY et al., 2019). Essa ação é necessária, pois vacas doentes têm maior probabilidade de apresentar uma diminuição na produção de leite devido a fatores como estresse e redução do consumo de alimentos. Dessa forma se concluiu que o efeito desses

genes tem certa influência na composição do leite e produção. Visto que para que haja uma produção leiteira eficiente é preciso que os componentes do leite apresentem índices adequados e, principalmente, que a vaca esteja com saúde e bem-estar.

O gene *CCL28* foi relacionado em um estudo em bovinos da raça Holandesa com a persistência na lactação e é essencial no direcionamento e no acúmulo de células secretoras de anticorpos na glândula mamária durante o período de lactação (DO et al., 2017; ILLA et al., 2021), também foi associado com a porcentagem de proteína no leite e com o controle da mastite, portanto, sua influência pode afetar indiretamente a produção de leite (PEDROSA et al., 2021) e foi relacionado com a resposta imune (GAO et al., 2013). Em um estudo envolvendo bovinos, o gene *C6* também foi associado a características relacionadas à resposta imune, e também foi associado com a fertilidade, além disso, foi observado que está envolvido na produção de anticorpos e na fagocitose de células bacterianas na glândula mamária (FREITAS et al., 2020). A imunidade da vaca desempenha um papel crucial na lactação, afetando a saúde do animal, a qualidade do leite, a resistência a doenças, o bem-estar e a longevidade. Dessa forma, estes genes apresentam influencia indireta na lactação e composição do leite.

O gene *HCN1*, canal 1 controlado por nucleotídeo cíclico ativado por hiperpolarização de potássio/sódio (MARINA et al., 2021) foi associado com a persistência de lactação (DO et al., 2017) e com a porcentagem de proteína em um estudo com a raça Holandesa (JIANG et al., 2019). O gene *KAT6A*, lisina acetiltransferase 6 A, é importante para os processos celulares (WANG et al., 2021) e foi relacionado com a porcentagem na gordura do leite de bovinos (LITTLEJOHN et al., 2014). Bem como o gene *GINS4*, que foi associado com a gordura e proteína do leite (LITTLEJOHN et al., 2014; WOLF et al., 2021) e o gene *TNKS* também está associado produção de leite e gordura (KORKUĆ et al., 2023).

Os genes descritos são responsáveis pela síntese e regulação dos componentes do leite e são importantes para que haja equilíbrio celular e adequada função do organismo. Além de tudo, compreender o efeito dos genes e sua expressão é crucial para que essas informações sejam utilizadas em programas de melhoramento genético para que haja mais produtividade nas indústrias brasileiras e refinamento da raça Holandesa nos rebanhos do Brasil.

2.4 CONCLUSÃO

Os estudos de GWAS na bovinocultura leiteira têm uma importância significativa para o melhoramento genético e o avanço da indústria leiteira. Neste estudo, a análise do genoma amplo revelou regiões genômicas de relevância significativa para características como porcentagem de gordura e proteína, além da produção de gordura e proteína em quilos, em bovinos da raça Holandesa criados no Brasil. Os genes *CPSF1*, *CYHR1*, *DGAT1*, *SLC52A2* e *TSNARE1* foram identificados como presentes em todas as características analisadas neste estudo, produção de gordura e proteína em quilos, e porcentagem de gordura e proteína. Além disso, observou-se que os genes *SLC52A2* e *DGAT1* apresentaram os picos mais proeminentes nos gráficos de Manhattan Plot. Para parâmetros funcionais os genes *CSN1S1*, *CSN2*, *PLEC*, *SVEP1*, *MAML3*, *MRTFA* e *MRTFB* foram identificados como tendo uma função predominante nos processos biológicos para a característica de proteína em quilos. Entre esses genes, *CSN1S1* e *CSN2* foram os mais frequentemente encontrados. Para a característica de proteína em porcentagem, os genes *EPPK1*, *PLEC*, *VPS28*, *ADGRB1*, *CSN1S1*, *CSN2*, *CSN3*, *MAPK15*, *TRAPPC9*, *GHR*, *HSTN*, *CPSF1*, *ZC3H3* e *SLC4A4* também demonstraram funções relacionadas a processos biológicos no organismo. Novamente, os genes mais frequentemente encontrados foram *CSN1S1* e *CSN2*. Essas descobertas destacam a relevância desses genes na determinação das características de proteína em quilos e porcentagem no leite bovino. No que diz respeito à produção de gordura em quilos, o gene *PLEC* foi o que mais se destacou, seguidos dos genes *PS8*, *PLEC* e *PTK2* que apresentaram uma função molecular. Por outro lado, em relação à porcentagem de gordura, os genes *AGO2* e *AGO3* mostraram uma incidência maior e estiveram envolvidos na clivagem do mRNA, bem como em funções relacionadas ao RNA e a processos biológicos e celulares. Essas descobertas ressaltam a importância desses genes na regulação da produção e composição da gordura no leite bovino. Também para a característica de proteína, os genes *CSN1S1* e *CSN2* apresentaram uma correlação significativa entre si. E para a característica de gordura do leite, os genes relevantes para esse estudo foram o gene *PLEC* que mostrou uma alta correlação com os genes *ACTA2* e *ZC3H3*.

Alguns genes foram encontrados exclusivamente nos rebanhos da raça holandesa brasileira para as características de produção leiteira *AGO2*, *AGO3*, *ARHGAP39*, *C25H16ORF82*, *CDH3*, *CMYA5*, *DENND3*, *EEF1D*, *ENSBTAG00000025756*, *ENSBTAG00000038214*, *ENSBTAG00000048091*, *ENSBTAG00000051599*, *ENSBTAG00000053188*, *ENSBTAG00000054671*, *ENSBTAG00000055067*, *EXOC3*, *FBXO43*, *GLT6D1*, *GNAI3*, *GPAA1*, *GRHL2*, *GUCA1A*, *IQANK1*, *IVNS1APB*, *KCNA4*, *KIAA0753*, *KMT2E*, *LRRC1*, *MAF1*, *MAPK15*, *MLIP*, *MRTFB*, *NADSYN*, *NCALD*, *OPCML*, *OR2D37*, *OSCP1*, *OSR2*, *PIK3C2G*, *PTK2*, *PTPN14*, *RAB2A*, *RAP1GAP2*, *RCN3*, *REERG*, *RGMA*, *RNF1144B*, *RNF19A*, *RTRAF*, *SEMA3A*, *SH2D4B*, *SPAG1*, *SPIN1*, *STK40*, *TNRC6B*, *UBXN2A*, *ZBTB46* e *ZNF691*. É de suma importância o conhecimento sobre SNPs significativos por meio de estudos de GWAS para que as vacas leiteiras possam expressar todo o seu potencial genético e para possibilitar a seleção de animais mais adaptáveis às adversidades ambientais. Essas descobertas ressaltam a importância dos genes na regulação da produção e composição da gordura no leite bovino. Nesse contexto, é crucial realização de análises por meio dos estudos de associação do genoma amplo, a fim de identificar genes e marcadores relevantes em bovinos da raça Holandesa criados no Brasil. Compreender os processos genéticos e conhecer os genes de interesse expressos em condições ambientais específicas permite um melhoramento genético mais eficiente dos animais, visando características adaptativas e desempenho produtivo otimizado nas condições ambientais desafiadoras.

REFERÊNCIAS

- 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, p. 1-8, 2019.
- AGUILAR, I. et al. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 2, p. 743–752, 2010.
- AMALFITANO, Nicolò et al. Role of *CSN2*, *CSN3*, and *BLG* genes and the polygenic background in the cattle milk protein profile. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 7, p. 6001-6020, 2022.

ARIYARATHNE, Hewa Bahithige Pavithra Chathurangi et al. Identification of genomic regions associated with concentrations of milk fat, protein, urea and efficiency of crude protein utilization in grazing dairy cows. **Genes**, v. 12, n. 3, p. 456, 2021.

ASHBURNER et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nat Genet.** May 2000;25(1):25-9.

ATASHI, Hadi et al. Genome-wide association study for selected cheese-making properties in Dual-Purpose Belgian Blue cows. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 11, p. 8972-8988, 2022.

AZIMI, Z. et al. Association of zinc level with DNA methylation and its consequences: A systematic review. **Heliyon**, p. e10815, 2022.

BAKHSHALIZADEH, S.; ZEREHDARAN, S.; JAVADMANESH, A. Meta-analysis of genome-wide association studies and gene networks analysis for milk production traits in Holstein cows. **Livestock Science**, v. 250, p. 104605, 2021.

BANOS, Georgios et al. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. **Journal of dairy science**, v. 91, n. 8, p. 3190-3200, 2008.

BARON, Martin. An overview of the Notch signalling pathway. In: **Seminars in cell & developmental biology**. Academic Press, 2003. p. 113-119.

BOHLOULI, M. et al. Genome-wide associations for heat stress response suggest potential candidate genes underlying milk fatty acid composition in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 4, p. 3323-3340, 2022.

BONFATTI, V. et al. Effects of β -k-casein (CSN2-CSN3) haplotypes and β -lactoglobulin (BLG) genotypes on milk production traits and detailed protein composition of individual milk of Simmental cows. **Journal of Dairy Science**, v. 93, n. 8, p. 3797-3808, 2010.

BRAUN, H.-S. et al. Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. **Animal**, v. 13, n. 3, p. 518-523, 2019.

CAMPOS, Bárbara Machado et al. Identification of artificial selection signatures in Caracu breed lines selected for milk production and meat production. **Livestock Science**, v. 206, p. 82-87, 2017.

CARBON, Seth et al. AmiGO: online access to ontology and annotation data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 2, p. 288-289, 2009.

CHEN, Xiaomeng et al. Long non-coding RNA AC012668 suppresses non-alcoholic fatty liver disease by competing for microRNA miR-380-5p with lipoprotein-related protein LRP2. **Bioengineered**, v. 12, n. 1, p. 6738-6747, 2021.

CHENG, Z. et al. Relationships between circulating urea concentrations and endometrial function in postpartum dairy cows. **Animals**, v. 5, n. 3, p. 748-773, 2015.

CHERUIYOT, Evans K. et al. New loci and neuronal pathways for resilience to heat stress in cattle. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 16619, 2021.

COBANOGLU, O. et al. Determination of the association of GHR/Alul gene polymorphisms with milk yield traits in Holstein and Jersey cattle raised in Turkey. **Archives Animal Breeding**, v. 64, n. 2, p. 417, 2021.

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, p. 1-23, 2013.

- CONNOR, Erin E. et al. Effects of increased milking frequency on gene expression in the bovine mammary gland. **BMC genomics**, v. 9, p. 1-14, 2008.
- COPPIETERS, Wouter et al. Mapping QTL influencing gastrointestinal nematode burden in Dutch Holstein-Friesian dairy cattle. **BMC genomics**, v. 10, p. 1-13, 2009.
- CORAZZIN, Mirco et al. Effect of heat stress on dairy cow performance and on expression of protein metabolism genes in mammary cells. **Animals**, v. 10, n. 11, p. 2124, 2020.
- COSTA, Angela et al. On the genomic regions associated with milk lactose in Fleckvieh cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 11, p. 10088-10099, 2019.
- CRUZ, Valdecy AR et al. Genome-wide association study for milk fatty acids in holstein cattle accounting for the *dgat1* gene effect. **Animals**, v. 9, n. 11, p. 997, 2019.
- CUNNINGHAM, Fiona et al. Ensembl 2022. **Nucleic acids research**, v. 50, n. D1, p. D988-D995, 2022.
- CZECH, Bartosz et al. Host transcriptome and microbiome interactions in Holstein cattle under heat stress condition. **Frontiers in Microbiology**, p. 4773, 2022.
- DI GERLANDO, Rosalia et al. Identification of copy number variations and genetic diversity in Italian insular sheep breeds. **Animals**, v. 12, n. 2, p. 217, 2022.
- DIKMEN, S. E. R. D. A. L. et al. Single nucleotide polymorphisms associated with thermoregulation in lactating dairy cows exposed to heat stress. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, 132(6), 409-419. 2015.
- DO, D. N. et al. Genome-wide association analysis and pathways enrichment for lactation persistency in Canadian Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 3, p. 1955-1970, 2017.
- DOKSO, A. et al. Effect of *CSN1S1* gene on qualitative and quantitative traits milk in Holstein cattle. In: Proceedings of the 24th International Scientific-Expert-Conference of Agriculture and Food Industry, Sarajevo, Bosnia and Herzegovina, 25-28 September 2013. **Faculty of Agriculture and Food Sciences**, University of Sarajevo, 2013. p. 52-54.
- ELSIK, C. G., TELLAM, R. L., WORLEY, K. C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution. **Science (New York, NY)**, v. 324, n. 5926, p. 522, 2009.
- FANG, Lingzhao et al. Comparative analyses of sperm DNA methylomes among human, mouse and cattle provide insights into epigenomic evolution and complex traits. **Epigenetics**, v. 14, n. 3, p. 260-276, 2019.
- FANG, Lingzhao 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, 2020.
- FATIMA, A. et al. The miRNAome of the postpartum dairy cow liver in negative energy balance. **BMC genomics**, v. 15, p. 1-8, 2014.
- FREITAS, P. H. F. et al. Time-dependent genetic parameters and single-step genome-wide association analyses for predicted milk fatty acid composition in Ayrshire and Jersey dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 6, p. 5263-5269, 2020.
- GAO, Yuanyuan et al. Bovine mammary gene expression profiling during the onset of lactation. **PLoS one**, v. 8, n. 8, p. e70393, 2013.

GARRICK, D. J. Equivalent mixed model equations for genomic selection. **Journal of animal Science**, 85:376, 2007.

GIVENS, D. I. MILK Symposium review: The importance of milk and dairy foods in the diets of infants, adolescents, pregnant women, adults, and the elderly. **Journal of dairy science**, v. 103, n. 11, p. 9681-9699, 2020.

GRISART, Bernard et al. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome research**, v. 12, n. 2, p. 222-231, 2002.

GUTIERREZ-GIL, Beatriz et al. Application of selection mapping to identify genomic regions associated with dairy production in sheep. **PLoS one**, v. 9, n. 5, p. e94623, 2014.

HAAKSMA, C. J.; SCHWARTZ, R. J.; TOMASEK, J. J. Myoepithelial cell contraction and milk ejection are impaired in mammary glands of mice lacking smooth muscle alpha-actin. **Biology of reproduction**, v. 85, n. 1, p. 13-21, 2011.

HANNAN, Fadil M. et al. Hormonal regulation of mammary gland development and lactation. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 19, n. 1, p. 46-61, 2023.

HAUG, A.; HØSTMARK, A. T.; HARSTAD, O. M. Bovine milk in human nutrition—a review. **Lipids in health and disease**, v. 6, n. 1, p. 1-16, 2007.

HOWARD, B.; ASHWORTH, A. Signalling pathways implicated in early mammary gland morphogenesis and breast cancer. **PLoS genetics**, v. 2, n. 8, p. e112, 2006.

HU, Lirong et al. Development and application of arachnomelia syndrome genetic detection in four Chinese dual-purpose cattle populations. **Research in Veterinary Science**, v. 152, p. 323-332, 2022.

HUANG, D. W.; SHERMAN, B. T.; LEMPICKI, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. **Nature protocols**, 4(1), 44-57. 2009.

IGOSHIN, Alexander et al. Whole-genome resequencing points to candidate DNA loci affecting body temperature under cold stress in Siberian cattle populations. **Life**, v. 11, n. 9, p. 959, 2021.

ILIE, Daniela Elena et al. Genome-wide association studies for milk somatic cell score in Romanian Dairy Cattle. **Genes**, v. 12, n. 10, p. 1495, 2021.

ILLA, S. K.; MUKHERJEE, S.; NATH, S.; MUKHERJEE, A. Genome-wide scanning for signatures of selection revealed the putative genomic regions and candidate genes controlling milk composition and coat color traits in Sahiwal cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 699422, 2021.

IUNG, L. H. S. et al. Genome-wide association study for milk production traits in a Brazilian Holstein population. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 6, p. 5305-5314, 2019.

JANKOVIČOVÁ, Jana et al. Distribution of tetraspanins in bovine ovarian tissue and fresh/vitrified oocytes. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 159, n. 2, p. 163-183, 2023.

JANNOT, A. S.; 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.

- JAYAWARDANA, J. M. D. R. et al. Genomic Regions Associated with Milk Composition and Fertility Traits in Spring-Calved Dairy Cows in New Zealand. **Genes**, v. 14, n. 4, p. 860, 2023.
- JIANG, Jicai et al. A large-scale genome-wide association study in US Holstein cattle. **Frontiers in genetics**, p. 412, 2019.
- JIANG, Li et al. Targeted resequencing of GWAS loci reveals novel genetic variants for milk production traits. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 2014.
- KANG, D.; SHIM, K. Early Heat Exposure Effects on Proteomic Changes of the Broiler Liver under Acute Heat Stress. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1338, 2021.
- KARLSSON, Max et al. A single-cell type transcriptomics map of human tissues. **Science advances**, v. 7, n. 31, p. eabh2169, 2021. Human Protein Atlas - proteatlas.org.
- KHAN, Muhammad Zahoor et al. Genetic polymorphisms in immune-and inflammation-associated genes and their association with bovine mastitis resistance/susceptibility. **Frontiers in Immunology**, v. 14, 2023.
- KILLEEN, Aideen P. et al. Endometrial gene expression in high-and low-fertility heifers in the late luteal phase of the estrous cycle and a comparison with midluteal gene expression. **Physiological genomics**, v. 48, n. 4, p. 306-319, 2016.
- KIM, Eun Tae et al. Common and differential dynamics of the function of peripheral blood mononuclear cells between Holstein and Jersey cows in heat-stress environment. **Animals**, v. 11, n. 1, p. 19, 2020.
- KIM, Kwan-Suk et al. Characterization of the acute heat stress response in gilts: III. Genome-wide association studies of thermotolerance traits in pigs. **Journal of animal science**, v. 96, n. 6, p. 2074-2085, 2018.
- KNUTSEN, Tim Martin et al. Unravelling genetic variation underlying de novo-synthesis of bovine milk fatty acids. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018.
- KOLENDA, Magdalena et al. Composite genotypes of progestogen-associated endometrial protein gene and their association with composition and quality of dairy cattle milk. **Animal Bioscience**, v. 34, n. 8, p. 1283, 2021.
- KORKUĆ, Paula et al. Whole-Genome Sequencing Data Reveal New Loci Affecting Milk Production in German Black Pied Cattle (DSN). **Genes**, v. 14, n. 3, p. 581, 2023.
- KUMAR, Loveleen et al. Altered expression of two zinc transporters, SLC30A5 and SLC30A6, underlies a mammary gland disorder of reduced zinc secretion into milk. **Genes & nutrition**, v. 10, n. 5, p. 1-16, 2015.
- LEIRA, Matheus Hernandes et al. Fatores que alteram a produção e a qualidade do leite: Revisão. **Pubvet**, v. 12, p. 172, 2018.
- LESAGE-PADILLA, Audrey et al. Maternal metabolism affects endometrial expression of oxidative stress and FOXL2 genes in cattle. **PLoS One**, v. 12, n. 12, p. e0189942, 2017.
- LI, Xinjian et al. Analysis of mRNA and long non-coding RNA expression profiles in developing yorkshire pig spleens. **Animals**, v. 11, n. 10, p. 2768, 2021.
- LIEBE, Franziska et al. Effects of butyrate- on ruminal Ca²⁺ transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 474, n. 3, p. 315-342, 2022.
- LITTLEJOHN, Mathew D. et al. Expression variants of the lipogenic AGPAT6 gene affect diverse milk composition phenotypes in *Bos taurus*. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e85757, 2014.

- LITTLEJOHN, Mathew D. et al. Sequence-based association analysis reveals an MGST1 eQTL with pleiotropic effects on bovine milk composition. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 25376, 2016.
- LIU, Lily; ZHANG, Qin. Identification and functional analysis of candidate gene VPS28 for milk fat in bovine mammary epithelial cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 510, n. 4, p. 606-613, 2019.
- LIU, X. et al. Sitosterol promotes milk protein and fat syntheses-related genes in bovine mammary epithelial cells. **Animals**, v. 11, n. 11, p. 3238, 2021.
- LODDE, Valentina et al. Zinc supports transcription and improves meiotic competence of growing bovine oocytes. **Reproduction**, v. 159, n. 6, p. 679-691, 2020.
- LOZADA-SOTO, Emmanuel A. et al. Genomic characterization of autozygosity and recent inbreeding trends in all major breeds of US dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 105, n. 11, p. 8956-8971, 2022.
- LU, H.; WANG, Y.; BOVENHUIS, H. Genome-wide association study for genotype by lactation stage interaction of milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 103, n. 6, p. 5234-5245, 2020.
- LU, H.; WANG, Y.; BOVENHUIS, H. Phenotypic and genetic effects of season on milk production traits in dairy cattle in the Netherlands. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4486-4497, 2021.
- LU, Xubin et al. Genetic Parameter Estimation and Genome-Wide Association Study-Based Loci Identification of Milk-Related Traits in Chinese Holstein. **Frontiers in Genetics**, v. 12, p. 2689, 2022.
- LUO, Hanpeng et al. Genomic analyses and biological validation of candidate genes for rectal temperature as an indicator of heat stress in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 4, p. 4441-4451, 2021.
- LUO, Hanpeng et al. Weighted single-step GWAS and RNA sequencing reveals key candidate genes associated with physiological indicators of heat stress in Holstein cattle. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1-13, 2022.
- MA, Longgang et al. Estimation of genetic parameters and single-step genome-wide association studies for milk urea nitrogen in Holstein cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 1, p. 352-363, 2023.
- MAHMOUDI, P. et al. A meta-analysis on association between CSN3 gene variants and milk yield and composition in cattle. **Animal genetics**, v. 51, n. 3, p. 369-381, 2020.
- MANSOURI-ATTIA, Nadéra et al. Gene expression profiles of bovine caruncular and intercaruncular endometrium at implantation. **Physiological genomics**, v. 39, n. 1, p. 14-27, 2009.
- MARETE, Andrew G. et al. A meta-analysis including pre-selected sequence variants associated with seven traits in three French dairy cattle populations. **Frontiers in genetics**, v. 9, p. 522, 2018.
- MARINA, H. et al. Genome-wide association studies (GWAS) and post-GWAS analyses for technological traits in Assaf and Churra dairy breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 11, p. 11850-11866, 2021.

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>.

MENGISTIE, Dejenie et al. Genome-wide signature of positive selection and linkage disequilibrium in Ethiopian indigenous and European beef cattle breeds. **Research Square**, 2022.

METCALF, J. A.; ROBERTS, S. J.; SUTTON, J. D. Variations in blood flow to and from the bovine mammary gland measured using transit time ultrasound and dye dilution. **Research in veterinary science**, v. 53, n. 1, p. 59-63, 1992.

MISZTAL, I. et al. Manual for BLUPF90 family of programs. Athens: University of Georgia. (2014). **Manual for BLUPF90 family of programs**.

MISZTAL, I. et al. **Manual for BLUPF90 family of programs**. v. 2018, 2018.

MULLEN, Michael Paul et al. Single nucleotide polymorphisms in the insulin-like growth factor 1 (IGF-1) gene are associated with performance in Holstein-Friesian dairy cattle. **Frontiers in genetics**, v. 2, p. 3, 2011.

NAYERI, S. et al. Genome-wide association study for lactation persistency, female fertility, longevity, and lifetime profit index traits in Holstein dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 2, p. 1246-1258, 2017.

NAYERI, Shadi et al. Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. **BMC genetics**, v. 17, n. 1, p. 1-11, 2016.

OGOREVC, Jernej et al. Database of cattle candidate genes and genetic markers for milk production and mastitis. **Animal genetics**, v. 40, n. 6, p. 832-851, 2009.

OLIVEIRA, H. R. et al. Genome-wide association for milk production traits and somatic cell score in different lactation stages of Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 8159-8174, 2019.

OLIVEIRA, H. R. et al. Single-step genome-wide association for longitudinal traits of Canadian Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 11, p. 9995-10011, 2019.

OTTO, Pamela I. et al. Genome-wide association studies for heat stress response in Bos taurus × Bos indicus crossbred cattle. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 9, p. 8148-8158, 2019.

PARREIRA, José Ricardo et al. Understanding seasonal weight loss tolerance in dairy goats: a transcriptomics approach. **BMC genomics**, v. 21, n. 1, p. 1-17, 2020.

PAUSCH, Hubert et al. A multi-trait meta-analysis with imputed sequence variants reveals twelve QTL for mammary gland morphology in Fleckvieh cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 48, n. 1, p. 1-9, 2016.

PEDROSA, Victor B. et al. Genomewide association analyses of lactation persistency and milk production traits in Holstein cattle based on imputed whole-genome sequence data. **Genes**, v. 12, n. 11, p. 1830, 2021.

PERIPOLLI, Elisa et al. Assessment of runs of homozygosity islands and estimates of genomic inbreeding in Gyr (Bos indicus) dairy cattle. **BMC genomics**, v. 19, p. 1-13, 2018.

PETER, S. et al. Puerperal influence of bovine uterine health status on the mRNA expression of pro-inflammatory factors. 2015.

- PETERS, Sunday O. et al. Comparative accuracies of genetic values predicted for economically important milk traits, genome-wide association, and linkage disequilibrium patterns of Canadian Holstein cows. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 2, p. 1900-1916, 2021.
- PRAKAPENKA, Dzianis et al. A Large-scale genome-wide association study of epistasis effects of production traits and daughter pregnancy rate in US Holstein cattle. **Genes**, v. 12, n. 7, p. 1089, 2021.
- PRINZENBERG, E. M. et al. Polymorphism of the bovine CSN1S1 promoter: linkage mapping, intragenic haplotypes, and effects on milk production traits. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 8, p. 2696-2705, 2003.
- PURFIELD, D. C. et al. Genomic regions associated with gestation length detected using whole-genome sequence data differ between dairy and beef cattle. **Frontiers in Genetics**, v. 10, p. 1068, 2019.
- RAHMATALLA, Siham A. et al. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. **Journal of applied genetics**, v. 52, p. 459-465, 2011.
- RAO, K. S. et al. Nicotinamide nucleotide transhydrogenase (NNT) regulates mitochondrial ROS and endothelial dysfunction in response to angiotensin II. **Redox Biology**, v. 36, p. 101650, 2020.
- RAVEN, L. A. et al. Genes of the RNASE5 pathway contain SNP associated with milk production traits in dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 45, p. 1-11, 2013.
- RAVEN, Lesley-Ann et al. Targeted imputation of sequence variants and gene expression profiling identifies twelve candidate genes associated with lactation volume, composition and calving interval in dairy cattle. **Mammalian genome**, v. 27, p. 81-97, 2016.
- REINARTZ, S.; DISTL, O. Breeding experiments and genome-wide association analysis elucidate two genetically different forms of non-syndromic congenital cleft lip and jaw in Vorderwald× Montbéliarde cattle. **Animal genetics**, v. 48, n. 5, p. 523-530, 2017.
- RIPOLI, M. V.; CORVA, P.; GIOVAMBATTISTA, G. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. **Research in veterinary science**, v. 80, n. 3, p. 287-290, 2006.
- SAFRAN, Marilyn et al. The genecards suite. **Practical guide to life science databases**, p. 27-56, 2021.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold spring harbor laboratory press, 1989.
- SAMUEL, Behailu et al. Genetic diversity of DGAT1 gene linked to milk production in cattle populations of Ethiopia. **BMC Genomic Data**, v. 23, n. 1, p. 64, 2022.
- SANCHEZ, Marie-Pierre et al. Sequence-based GWAS, network and pathway analyses reveal genes co-associated with milk cheese-making properties and milk composition in Montbéliarde cows. **Genetics Selection Evolution**, v. 51, n. 1, p. 1-19, 2019.
- SANTANA, M. L. et al. Genetics of heat tolerance for milk yield and quality in Holsteins. **Animal**, 11(1), 4-14. 2017.
- SERMYAGIN, A. A. et al. Genomic variability assess for breeding traits in holsteinized Russian Black-and-White cattle using GWAS analysis and ROH patterns. **Sel'skokhozyaistvennaya Biol**, v. 55, p. 257-274, 2020.

- SHERMAN, Brad 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.
- SIGDEL, A.; ABDOLLAHI-ARPAHAHI, R.; AGUILAR, I.; PEÑAGARICANO, F. Whole genome mapping reveals novel genes and pathways involved in milk production under heat stress in US Holstein cows. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 928, 2019.
- SIGDEL, A. et al. Genetic dissection of reproductive performance of dairy cows under heat stress. **Animal Genetics**, v. 51, n. 4, p. 511-520, 2020.
- SILVA, M. et al. Candidate genes for disease, reproduction, and meat quality traits in Portuguese native breeds. In: **WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION**, 12., 2022, Rotterdam. Proceedings, 2022.
- SIQUEIRA, Kennya Beatriz et al. Custo-benefício dos nutrientes dos alimentos consumidos no Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 25, n. 3, p. 1129-1135, 2020.
- SOMAVILLA, A. L. et al. A genome-wide scan for selection signatures in Nelore cattle. **Animal Genetics**, v. 45, n. 6, p. 771-781, 2014.
- SORDILLO, Lorraine M. Mammary gland immunobiology and resistance to mastitis. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice**, v. 34, n. 3, p. 507-523, 2018.
- SPELMAN, R. J. et al. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 12, p. 3514-3517, 2002.
- SPRINZAK, D.; BLACKLOW, S. C. Biophysics of Notch signaling. **Annual review of biophysics**, v. 50, p. 157-189, 2021.
- SUMMER, A. et al. Characterization of a monoclonal antibody for κ -casein B of cow's milk. **Journal of dairy science**, v. 93, n. 2, p. 796-800, 2010.
- SUN, Xueheng et al. Developmental changes in proteins of casein micelles in goat milk using data-independent acquisition-based proteomics methods during the lactation cycle. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 1, p. 47-60, 2023.
- 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.
- TENG, Jun et al. Longitudinal genome-wide association studies of milk production traits in Holstein cattle using whole-genome sequence data imputed from medium-density chip data. **Journal of Dairy Science**, v. 106, n. 4, p. 2535-2550, 2023.
- The Gene Ontology resource: enriching a GOld mine. **Nucleic acids research**, v. 49, n. D1, p. D325-D334, 2021.
- TIPLADY, Kathryn M. et al. Sequence-based genome-wide association study of individual milk mid-infrared wavenumbers in mixed-breed dairy cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 53, p. 1-24, 2021.
- TWOMEY, Alan J. et al. Genome-wide association study of endo-parasite phenotypes using imputed whole-genome sequence data in dairy and beef cattle. **Genetics Selection Evolution**, v. 51, p. 1-17, 2019.
- UZBEKOVA, Svetlana et al. Protein palmitoylation in bovine ovarian follicle. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 21, p. 11757, 2021.

- VANVANHOSSOU, Sèyi Fridaius Ulrich et al. A multi-breed GWAS for morphometric traits in four Beninese indigenous cattle breeds reveals loci associated with conformation, carcass and adaptive traits. **BMC genomics**, v. 21, p. 1-16, 2020.
- VAUGHN, Robert et al. Skeletal Muscle Expression of Actinin-3 (ACTN3) in Relation to Feed Efficiency Phenotype of F2Bos indicus-Bos taurus Steers. **Frontiers in Genetics**, v. 13, p. 63, 2022.
- VERMA, Preeti et al. Transcriptome analysis of circulating PBMCs to understand mechanism of high altitude adaptation in native cattle of Ladakh region. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-15, 2018.
- VIITALA, Sirja et al. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. **Genetics**, v. 173, n. 4, p. 2151-2164, 2006.
- WALL, E. H.; BOND, J. P.; MCFADDEN, T. B. Milk yield responses to changes in milking frequency during early lactation are associated with coordinated and persistent changes in mammary gene expression. **BMC genomics**, v. 14, p. 1-16, 2013.
- WANG, D. et al. Replication of genome-wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein by an efficient rotated linear mixed model. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 3, p. 2378-2383, 2019.
- WANG, Dan et al. Replication of genome-wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein by an efficient rotated linear mixed model. **Journal of dairy science**, v. 102, n. 3, p. 2378-2383, 2019.
- WANG, H. et al. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics research**, 94(2), 73-83. 2012.
- WANG, Tianzhen et al. Genome-wide association study of milk components in Chinese Holstein cows using single nucleotide polymorphism. **Livestock Science**, v. 233, p. 103951, 2020.
- WANG, Xiao et al. Genome-wide association study in Chinese Holstein cows reveal two candidate genes for somatic cell score as an indicator for mastitis susceptibility. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 1-9, 2015.
- WANG, Xiaogang et al. Copy number variations of the KAT6A gene are associated with body measurements of Chinese sheep breeds. **Animal Biotechnology**, p. 1-8, 2021.
- WANG, Yu et al. ZBTB46 is a shear-sensitive transcription factor inhibiting endothelial cell proliferation via gene expression regulation of cell cycle proteins. **Laboratory Investigation**, v. 99, n. 3, p. 305-318, 2019.
- WOLF, Manuel J. et al. Genome-wide association study using whole-genome sequence data for fertility, health indicator, and endoparasite infection traits in German black pied cattle. **Genes**, v. 12, n. 8, p. 1163, 2021.
- WU, Alex Man Lai et al. Riboflavin uptake transporter Slc52a2 (RFVT2) is upregulated in the mouse mammary gland during lactation. **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 310, n. 7, p. R578-R585, 2016.
- WU, Lizi et al. Identification of a family of mastermind-like transcriptional coactivators for mammalian notch receptors. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 21, p. 7688-7700, 2002.

- XIA, Jiangwei et al. Searching for new loci and candidate genes for economically important traits through gene-based association analysis of Simmental cattle. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-9, 2017.
- YANG, Jinyan et al. Characterization of peripheral white blood cells transcriptome to unravel the regulatory signatures of bovine subclinical mastitis resistance. **Frontiers in Genetics**, v. 13, 2022.
- YANG, Zhenwei et al. Identification of genetic markers associated with milk production traits in Chinese Holstein cattle based on post genome-wide association studies. **Animal Biotechnology**, v. 32, n. 1, p. 67-76, 2021.
- ZANELA, M. B., et al. Produção de leite seguro. 7 Dia de Campo do Leite: da Pesquisa para o Produtor, p. 46, 2018.
- ZHANG, F. et al. Research on the applications of calcium propionate in dairy cows: A review. **Animals**, v. 10, n. 8, p. 1336, 2020.
- ZHANG, Qianqian et al. Genome-wide association study for longevity with whole-genome sequencing in 3 cattle breeds. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 9, p. 7289-7298, 2016.
- ZHANG, Rui et al. Genome-wide association study identifies the PLAG1-OXR1 region on BTA14 for carcass meat yield in cattle. **Physiological genomics**, v. 51, n. 5, p. 137-144, 2019.
- ZHOU, Chenghao et al. Genome-wide association study for milk protein composition traits in a Chinese Holstein population using a single-step approach. **Frontiers in genetics**, v. 10, p. 72, 2019.