

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA E EVOLUÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E
BIOLOGIA MOLECULAR**

ANDRESSA OLIVEIRA DE LIMA

**VALIDAÇÃO DE SNPs ASSOCIADOS COM ÁREA DE OLHO DE
Lombo EM BOVINOS CANCHIM**

ORIENTADORA: Luciana Correia de Almeida Regitano

CO-ORIENTADORA: Fabiana Barichello Mokry

DEZEMBRO DE 2013

Validação de SNPs associados com área de olho de lombo em bovinos Canchim

Andressa Oliveira de Lima

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em
Genética Evolutiva e Biologia Molecular do Centro de
Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de
São Carlos para obtenção do título de Mestre em Genética
Evolutiva e Biologia Molecular.

ORIENTADORA: Luciana Correia de Almeida Regitano

CO-ORIENTADORA: Fabiana Barichello Mokry

São Carlos

2013

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

L732vs Lima, Andressa Oliveira de.
Validação de SNPs associados com área de olho de
lombo em bovinos Canchim / Andressa Oliveira de Lima. --
São Carlos : UFSCar, 2014.
89 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2014.

1. Bovino - genética. 2. Área de olho de lombo. 3. SNPs.
4. Haplótipos. 5. Canchim (Bovino). I. Título.

CDD: 575.1 (20ª)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA MOLECULAR**

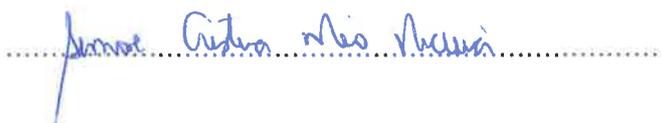
Dissertação de Mestrado de
ANDRESSA OLIVEIRA DE LIMA

Banca Examinadora

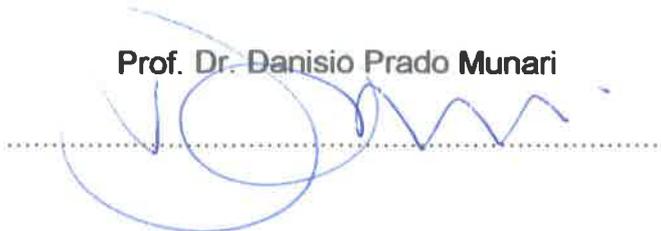
Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano



Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura



Prof. Dr. Danisio Prado Munari



Dedico

aos meus pais José e Ana Luiza pelo

apoio e grande esforço.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano pela orientação, oportunidade de desenvolver a pesquisa no laboratório de biotecnologia animal, paciência, amizade e pelos ensinamentos.

Ao Dr. Maurício Mudado pela amizade e ajuda nas análises de bioinformática.

À Dra. Fabiana Barichello Mokry pela orientação e auxílio nas análises estatísticas.

À Capes pela concessão de bolsa e financiamento do projeto de mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos pelos ensinamentos.

Aos meus queridos pais, José Garcia e Ana Luíza, que sempre me incentivaram e apoiaram em todos os momentos da minha vida, e aos meus irmãos, Leandro e Guilherme, pelo apoio e amizade.

Ao grupo de biotecnologia animal. Em especial à Flávia Bressani, Wilson Malagó e Gilberto Agostinho pelo auxílio na extração de DNA e padronizações das reações. Aos colegas Marina Ibelli, Adriana Somavilla, Suellen Mello, Poliana Tizioto, Priscila Neubern, Marcela Rissato, Vitor Catoia, Wellison Diniz, Daniela Moré, Alexandre Lima, Vanessa Candiotti e Kamila Oliveira por toda a colaboração na execução desse trabalho e pela amizade.

Ao meu querido namorado Fernando Minussi pelo apoio e incentivo principalmente na fase final do período do mestrado.

Aos meus amigos Marina Rocha, Taíse Silva, Rafael Xavier e Danilo Evangelista pela amizade e incentivo.

Resumo

A bovinocultura de corte brasileira se destaca na economia nacional, sendo o Brasil atualmente um dos principais produtores e exportadores de produtos cárneos de origem bovina, apresentando o maior rebanho comercial do mundo. No entanto, a maioria dos rebanhos bovinos são caracterizados por animais com maior adaptabilidade a ambientes tropicais e baixa qualidade de carcaça e carne. Cruzamentos entre raças taurinas e zebuínas originaram a raça Canchim, sendo esta vantajosa em relação à produtividade, conformação da carcaça e resistência ao calor e a parasitas. Com as novas tecnologias de genotipagem e computacionais se renovou o interesse em viabilizar o uso da informação de marcadores genéticos do tipo SNP em programas de seleção e melhoramento. O mercado interno mais exigente e maior competição entre países exportadores justificam estudos em características de carcaça, como área de olho de lombo (AOL), que pode proporcionar maior rendimento em cortes de alto valor agregado. Diante deste contexto, o objetivo desse trabalho foi validar SNPs selecionados por estudo prévio de associação genômica ampla (GWAS) para área de olho de lombo, realizada por Random Forest em uma população composta por 400 animais Canchim e genotipados em BovineHD BeadChip (Illumina®) e que resultou em um conjunto de 197 SNPs. Inicialmente estudou-se o desequilíbrio de ligação no genoma bovino da raça Canchim e realizou-se anotação das regiões associadas. A mineração desse conjunto resultou em 4 SNPs, os quais foram selecionados para as análises de validação e localizam-se nos cromossomos BTA4, BTA10, BTA22 e BTA27. Os marcadores selecionados foram genotipados pela técnica RFLP-PCR em uma população de 712 bovinos da raça Canchim. Analisou-se o efeito desses marcadores sobre o valor genético aditivo (VGA) de AOL por meio de análise de variância que indicou a influência dos SNPs localizados nos BTA4 e BTA27. Além disso, tais SNPs significativos nas análises de validação foram analisados quantos aos efeitos aditivos e de dominância pelo teste Wald F, tendo sido observado efeito

de dominância significativo no SNP do BTA4 e efeito aditivo significativo no SNP do BTA 27. A análise de associação haplotípica com área de olho de lombo realizada na região 34989224pb a 36989224pb no BTA27 por meio de análise de regressão logística indicaram duas regiões nos genes *SFRP1* e *ANK1* associadas com a característica.

Palavras-chave: Área de olho de lombo. SNPs. Haplótipos. Canchim.

Abstract

The Beef cattle production is a very important economic activity for Brazil, which is a global producer and exporter of bovine-derived products and currently contains the world's largest beef cattle herd. However, the majority Brazilian cattle are adapted to a tropical climate and have low meat and carcass quality. The crossbreeding between Charolais and Zebu animals resulted in development of Canchim breed. This breed shows better resistance to high temperatures and parasites, as well as better meat and carcass quality. New genotyping and computational technologies can enable the use of single nucleotide polymorphism (SNP) in breeding programs. The high demand for meat quality and the aggressive competition among other beef exporting countries justifies studies focused on improving carcass traits, such as ribeye area (REA), which can provide more efficiency production of meat cuts for consumption. The objective in this study was to validate SNPs selected in a previous genome-wide association study (GWAS) for REA performed by Random Forest methodology in 400 animals genotyped with the BovineHD BeadChip (Illumina®) which yielded a set of 197 SNPs. First, we analyzed the *linkage disequilibrium (LD)*, and then we annotated the associated regions. After verifying this set of SNPs, we selected four SNPs located on BTA4, BTA10, BTA22 and BTA27 for validation purposes. These SNPs were genotyped by RFLP-PCR in approximately 712 bovine. We analyzed the genetic effect of these SNPs the using GLM procedure in SAS ($P \leq 0,05$), which identified SNPs in BTA4 and BTA27 as contributing some genetic effect on REA. Furthermore, we found significant additive effect ($P \leq 0,05$) for the SNP on BTA 27, and a significant dominance effect for the SNP in BTA 4 using the ASReml software. The GWAS for REA identified one region between 34989224pb and 36989224pb using haplotype association analysis with the PLINK software that indicated two regions ($P \leq 0,05$) in the *SFRP1* and *ANK1* genes associated with REA.

Key words: Ribeye area. SNPs. Haplotype. Canchim.

Lista de Figuras

Figura 1- Touro da raça Canchim.....	15
Quadro 1- Esquema de acasalamentos para obtenção de bovinos da raça Canchim.....	15
Figura 2- Descrição dos pontos anatômicos de uma imagem de ultrassonografia obtida na região da 12° e a 13° costelas mensuradas no músculo <i>Longissimus dorsi</i>	17
Figura 3- Distribuição dos haplótipos por cromossomo em bovinos da raça Canchim.....	41
Figura 4- Distribuição do total de SNPs e total dos SNPs em desequilíbrio de ligação por cromossomo em bovinos da Raça Canchim.....	41
Figura 5- Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA4).....	47
Figura 6- Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA10).....	48
Figura 7- Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA22).....	49
Figura 8- Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA27).....	50
Figura 9- Distribuição das médias de VGA por classe genotípica.....	56
Figura 10- Distribuição das médias de VGA por classe genotípica.....	58
Figura 11- Representação gráfica da distribuição das combinações haplotípicas na região de 2Mb do BTA 27 selecionada para os estudos de associação com a característica área de olho de lombo (AOL).....	59
Figura 12- representação gráfica da distribuição dos SNPs na região de 2Mb do BTA 27 selecionada para os estudos de associação de SNPs com a característica área de olho de lombo (AOL).....	59
Figura 13- Imagem da região em desequilíbrio de ligação que abrange o SNP BovineHD2700010252 (rs137209591) localizada entre 35933406pb a 359444602pb.....	60

Lista de Tabelas

Tabela 1- Descrição dos genes, vias metabólicas e regiões de QTL relacionadas com os quatro SNPs selecionados para validação.....	42
Tabela 2- Estrutura dos dados para AOL na população de validação dos bovinos da raça Canchim.....	44
Tabela 3- O resumo das descrições das posições e localizações dos SNPs, sequência dos <i>primers</i> e enzimas de restrições.....	46
Tabela 4- Frequência alélica e genotípica em percentagem observados na população de validação de bovinos da raça Canchim.....	50
Tabela 5- Frequência alélica e genotípica em percentagem observados na amostra da população de 400 animais de bovinos da raça Canchim selecionados para os estudos de associação genômica ampla para AOL.....	51
Tabela 6- Resumos das análises de variância em função dos marcadores rs43382671(BTA4), rs110494060(BTA10), rs137808561(BTA22) e rs135145718(BTA27) com o valor genético aditivo (VGA) para área de olho de lombo em bovinos da raça Canchim.....	52
Tabela 7- Resumo da análise do efeito de substituição alélica e efeito de dominância para o SNP rs4338267(BTA4).....	55
Tabela 8- Resumo da análise do efeito de substituição alélica e do efeito de dominância para o SNP rs135145718(BTA27).....	57

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	12
1.1 Introdução.....	12
1.2 Objetivo geral	13
1.3 Revisão Bibliográfica	14
1.3.1 A raça Canchim.....	14
1.3.2 Área de olho lombo (AOL).....	16
1.3.3 Marcadores moleculares em programas de melhoramento animal.....	18
1.3.4 Marcadores moleculares do tipo SNP (Single-nucleotide polymorphism).....	18
1.3.5 Genotipagem de SNPs	19
1.3.6 Reação em cadeia da polimerase – PCR.....	20
1.3.7 Genotipagem por RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism)	21
1.3.7 Desequilíbrio de ligação- LD (<i>Linkage disequilibrium</i>).....	22
1.3.8 Estudo de Associação Genômica Ampla - (Genome- wide Association Studies).....	23
1.3.9 Anotação do genoma e Regiões de QTL (Quantitative Trait Locus) no genoma.....	25
2. VALIDAÇÃO DE SNPs ASSOCIADOS COM A CARACTERÍSTICA DE ÁREA DE OLHO DE LOMBO EM UMA POPULAÇÃO DE BOVINOS DA RAÇA CANCHIM	26
2.1 Introdução.....	26
2.2 Justificativa.....	27
2.4 Objetivos.....	27
2.5 Material e métodos	28
2.5.1 Animais e mensuração de AOL	28
2.5.2 Estimativa do valor genético animal.....	28
2.5.3 Animais genotipados em chip HD Illunina.....	29
2.5.4 Extração de DNA.....	29
2.5.4.1 Amostras de sangue.....	30
2.5.4.2 Amostras de sêmen	31
2.5.5 Quantificação e avaliação da qualidade das amostras de DNA	32
2.5.6 Análises de controle de qualidade e GWAS para AOL.....	32
2.5.7 Mineração do conjunto de SNPs associados com AOL.....	32
2.5.7.1 Reconstrução e visualização dos haplótipos.....	33
2.5.7.2 Anotação do genoma.....	33
2.5.7.3 Critério de escolha dos SNPs informativos	34

2.5.8 Escolha dos animais da população de validação.....	34
2.5.9 Validação da associação dos SNPs com AOL.....	35
2.5.9.1 Genotipagem dos SNPs selecionados	35
2.5.10 Otimização das condições de PCR e ensaio de digestão para a genotipagem por RFLP-PCR.....	36
2.5.10.1 SNP(BTA4)- <i>rs43382671</i>	36
2.5.10.2 SNP(BTA10)- <i>rs110494060</i>	36
2.5.10.3 SNP(BTA22)- <i>rs137808561</i>	36
2.5.10.4 SNP(BTA27)- <i>rs135145718</i>	37
2.5.11 Influência dos SNPs selecionados sobre a característica AOL.....	37
2.5.11.1 Análise do efeito de substituição alélica	38
2.5.12 Análise de associação dos haplótipos com (AOL)	38
2.6 Resultados e Discussão.....	40
2.6.1 Mineração do conjunto de SNPs associados à AOL.....	40
2.6.2 Estatística descritiva de AOL.....	43
2.6.3 Otimização das condições dos ensaios de digestão para genotipagem por RFLP-PCR	45
2.6.3.1 SNP (BTA4)- <i>rs43382671</i>	47
2.6.3.2 SNP(BTA10)- <i>rs110494060</i>	48
2.6.3.3 SNP(BTA22)- <i>rs137808561</i>	48
2.6.3.4 SNP(BTA27)- <i>rs135145718</i>	49
2.6.4 Frequências alélicas e genotípicas para os 4 SNPs de validação.....	50
2.6.5 Influência dos marcadores sobre área de olho de lombo	51
2.6.5.1 GENE <i>HDAC9</i> - <i>rs4338267</i> (BTA4)	54
2.6.5.1.1 Efeito de substituição alélica e de dominância.....	55
2.6.5.1.2 Comparação entre as médias genotípicas do marcador sobre AOL.....	56
2.6.5.2 Região intergênica no BTA 27- <i>rs135145718</i>	57
2.6.5.2.1 Efeito de Substituição alélica e efeito de dominância	57
2.6.5.2.2 Comparação entre as médias genotípicas do marcador sobre AOL.....	57
2.6.6 Análise da associação das combinações haplotípicas com AOL.....	58
2.7 Conclusão	62
3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXO 1	71
ANEXO 2	81
ANEXO 3	84
ANEXO 4	87

1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O Brasil possui o maior rebanho bovino mundial com 185,8 milhões de cabeças, é o segundo maior produtor, com 7,9 milhões de toneladas de equivalente-carcaça/ano, e o segundo maior exportador mundial, com 1,4 milhões de toneladas de equivalente carcaça/ano (ANUALPEC, 2012). Além disso, os rebanhos bovinos comerciais são predominantemente constituídos por material genético de origem zebuína (*Bos indicus*) que apresentam maior adaptabilidade a ambientes tropicais e baixa qualidade e rendimento de carne e carcaça.

Com o intuito de combinar a rusticidade das raças zebuínas com o maior rendimento de carcaça da raça Charolesa foram realizados cruzamentos entre os dois grupos genéticos(VIANA et al., 1978; ALENCAR, 1988). Esses cruzamentos resultaram na raça sintética Canchim, que apresenta bom desenvolvimento a pasto, bom ganho de peso, eficiência alimentar e rendimento de carne e carcaça (BARBOSA, 2004).

A pecuária nacional se caracteriza pela produção de carne bovina a pasto, que proporciona redução nos custos de produção e permite atender a demanda interna com excedentes para exportação, porém deixa a desejar em questões relacionadas à qualidade. Por essa razão, melhorias são necessárias para que a produção brasileira tenha os seus produtos cárneos bovinos valorizados e reconhecidos no mercado mundial (FELÍCIO, 2000).

Os programas de seleção que privilegiem componentes de carcaça e características como, ganho de peso, espessura de gordura subcutânea, rendimento de carcaça, área de olho de lombo e marmoreiro podem contribuir para melhoria da raça e obtenção de produtos de

maior qualidade. Uma característica de carcaça importante é a área de olho de lombo, avaliada no músculo *Longissimus dorsi* em animais vivos por meio de ultrassom, e está relacionada com deposição muscular na carcaça (GUEDES, 2005). Investimento em seleção nessa característica poderá contribuir com maiores rendimentos em cortes de alto custo, proporcionando melhoria de carcaça.

Os marcadores genéticos do tipo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) ganharam destaque no meio científico por apresentarem alta densidade de marcadores ao longo do genoma e proporcionaram tecnologias de genotipagem em larga escala, possibilitando o uso dessas informações em programas de melhoramento genético (BORÉM; CAIXETA, 2009).

Portanto, a inclusão de marcadores do tipo SNPs em programas de seleção de animais superiores aliados a registros fenotípicos pode contribuir para o aumento na acurácia dos valores genéticos e, por consequência, maiores ganhos genéticos por intervalo de tempo.

1.2 Objetivo geral

Validar SNPs selecionados por Random Forest em estudo prévio de associação genômica ampla (GWAS) para área de olho de lombo (AOL) em uma amostra de população de bovinos Canchim;

1.3 Revisão Bibliográfica

1.3.1 A raça Canchim

A pecuária Brasileira é caracterizada por rebanhos predominantemente originários de raças Zebuínas e estima-se que 80% do rebanho brasileiro possui material genético de *Bos indicus* (MARIANTE et al., 1984). Esse fato ocorre devido a maior rusticidade e adaptabilidade ao clima tropical, porém esses animais são inferiores aos bovinos de raças europeias quanto à precocidade e rendimento de carne. Entretanto, vale ressaltar que bovinos de origem europeia (*Bos taurus*) apenas expressam o seu potencial produtivo em regiões temperadas e, conseqüentemente, irão apresentar baixo rendimento em regiões de climas tropicais (ALENCAR, 1988).

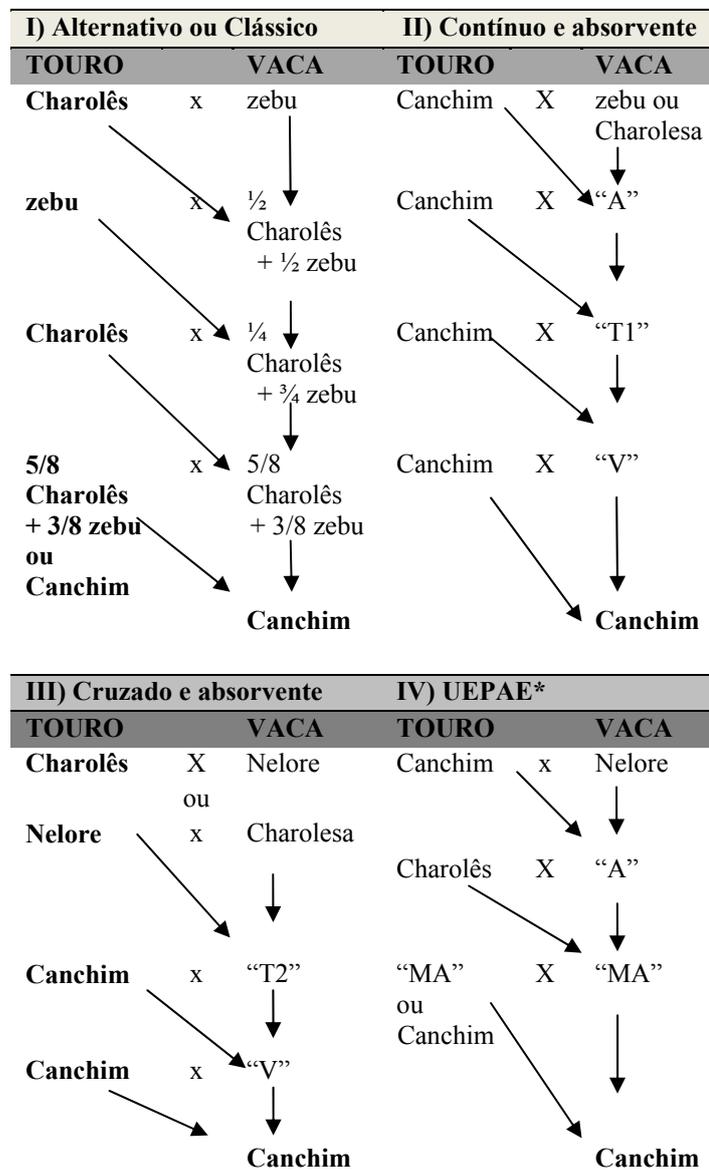
Com o intuito de combinar as vantagens de bovinos taurinos (raça Charolesa) e zebuínos (Nelore, Indubrasil e Guzerá), cruzamentos entre animais de ambas as origens formaram a raça sintética Canchim (Quadro 1) (ALENCAR, 1988; ALENCAR, 1994), e iniciaram-se em meados de 1940 pelo médico veterinário e zootenista Dr Antonio Teixeira Vianna, na antiga fazenda de criação de São Carlos (Unidade de Execução e Pesquisa de Âmbito Estadual de São Carlos-UEPAE) (VIANA et al., 1978; ALENCAR, 1988). A raça Charolesa foi escolhida por apresentar grande rendimento de carne, alto peso ao abate e velocidade de crescimento (VIANA et al., 1978; DANIEL PEROTTO, 2000). Foram obtidos bovinos com composição genética 5/8 Charolês + 3/8 Zebu que apresentam maior precocidade, ótima conformação para corte, resistência ao calor e a parasitas, além de uniformidade de pelagem (Figura 1) (VIANA et al., 1978; ALENCAR, 1988).

Figura 1- Touro da raça Canchim



Fonte: ABCCAN

Quadro 1: Esquema de acasalamentos para obtenção de bovinos da raça Canchim



Fonte: Adaptado de <http://www.abccan.com.br/canchim/index.php/a-raca.html>.

* Unidade de Execução de Pesquisa de Âmbito Estadual

O esquema I de acasalamentos (alternado) foi o utilizado para a formação inicial da raça e, produziu animais Canchim com média de 62,5% de genes da raça Charolesa e 37,5% de genes zebus em quatro gerações (Quadro 1). O esquema II (contínuo) utilizava continuamente o touro Canchim com o objetivo de absorver a raça zebuína ou Charolesa e produziu animais com 58,59% ou 64,84% de genes charoleses e 35,16% ou 41,41% de genes zebuínos em quatro gerações. O terceiro esquema (cruzado) permitia usar o touro Canchim, Charolês ou zebu, dependendo de como é iniciado o esquema, e os produtos apresentavam 59,37% de genes Charoleses e 40,63% de genes zebuínos em três gerações (ALENCAR, 1988). O esquema IV (UEPAE), o qual é o mais utilizado atualmente, produz animais Canchim com 64,06% a 65,62% de genes da raça Charolesa, dependendo da raça do touro utilizada em três gerações. O animal MA (filho de touro Charolês e vaca $\frac{1}{2}$ Canchim + $\frac{1}{2}$ zebu) possui 65,62% de genes do Charolês.

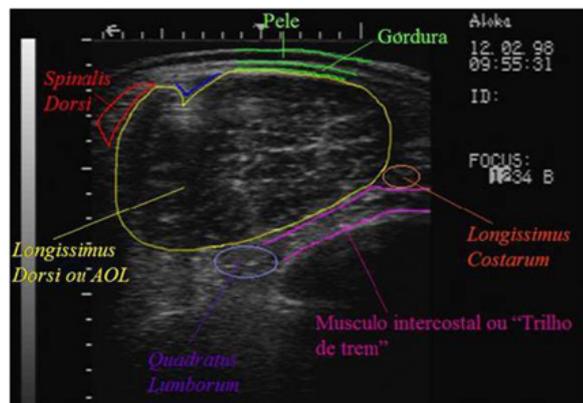
1.3.2 Área de olho lombo (AOL)

A área de olho de lombo, assim como a espessura de gordura subcutânea e a porcentagem intramuscular de gordura, são componentes de carcaça avaliados por meio de equipamento de ultrassonografia em animais vivos (WILLIAMS, 2002).

O ultrassom permite que a avaliação dessas características de carcaça em animais vivos seja um procedimento não invasivo, que não deixa resíduos nos cortes animais (YOKOO et al., 2009). A área de olho de lombo é uma característica de carcaça mensurada no músculo *Longissimus dorsi* entre a 12^a e 13^a costela e está relacionada com o desenvolvimento muscular (Figura 2) (SCHOONOVER; STRATTON, 1957), sendo essa

mensuração a mais utilizada para estimar o rendimento da produção e o rendimento de carne na carcaça (WILLIAMS, 2002; MEIRELLES et al., 2011).

Figura 2- Descrição dos pontos anatômicos de uma imagem de ultrassonografia obtida na região da 12^o e a 13^o costelas mensuradas no músculo *Longissimus dorsi*. O delineamento em amarelo evidencia área de olho de lombo



Fonte: ANCP

A mensuração da área de olho de lombo por ultrassonografia em animais vivos é muito susceptível a erros e ocasiona perda na acurácia, fato que está relacionado com a experiência do técnico de coleta de imagens a campo e o técnico de laboratório. Além disso, a definição e a qualidade da imagem são influenciadas por erros de predição. A qualidade da imagem pode confundir a análise dos pontos anatômicos e proporcionar erros no delineamento do músculo e gerar viés na estimação de AOL. Para reduzir erros na medida se recomenda que um único técnico realize a mensuração em animais do mesmo grupo de contemporâneos (MERCADANTE et al., 2010).

Essa tecnologia quando realizada por um técnico bem treinado e equipamento bem calibrado pode resultar em alto potencial de precisão na determinação da área de olho de lombo mensurada em animais vivos e permite decisões na seleção de bovinos (GREINER et al., 2003).

1.3.3 Marcadores moleculares em programas de melhoramento animal

Os avanços na biologia molecular nos últimos anos possibilitaram que a junção das informações do DNA, por meio de associação de marcadores moleculares com os fenótipos, facilitem a identificação e a seleção de animais com genótipos favoráveis de forma mais eficiente (COUTINHO et al., 2010). Os variantes presentes na estrutura do DNA em uma determinada região do genoma podem ser utilizados como marcadores para alelos de genes que influenciam as características de interesse. Essa possibilidade de selecionar indivíduos que apresentam alelos favoráveis a um determinado fenótipo baseada na informação do DNA é denominada de seleção assistida por marcadores (MAS) (MARTINEZ; MACHADO, 2002).

O uso de marcadores moleculares pode proporcionar oportunidades para melhorar a resposta à seleção principalmente para características que apresentam dificuldades de serem melhoradas por seleção convencional, devido à baixa herdabilidade, dificuldades na mensuração do fenótipo, alto custo de obtenção da característica e fenótipos mensurados após o abate do animal (DEKKERS, 2004). A disponibilidade de painéis de alta densidade e baixos custos na genotipagem de milhares de marcadores moleculares renovou o interesse de incorporar essa informação em programas de melhoramento genético animal (DEKKERS, 2007).

1.3.4 Marcadores moleculares do tipo SNP (Single-nucleotide polymorphism)

Os polimorfismos moleculares de base única (SNP) são mutações de bases nitrogenadas (adenina, citosina, guanina ou timina) que ocorrem de duas maneiras distintas. As mais frequentes são mutações transicionais quando há troca de bases nitrogenadas da mesma categoria química, purina por purina ou pirimidina por pirimidina. A substituição

também pode ser entre categorias químicas diferentes, pirimidina por purina, ou vice-versa, e é conhecida como transversão. Normalmente os SNPs são bi-alélicos e podem ser localizados em regiões codificadoras e regulatórias, no entanto, a maioria ocorre em regiões de introns ou intergênicas com a grande maioria apresentando função desconhecida (CAETANO, 2009). Para ser considerado polimorfismo de base única deve apresentar frequência do alelo menos frequente igual ou superior a 1% na população de estudo (VIGNAL et al., 2002).

A genotipagem de milhares de SNPs em chips de alta densidade contribui para estudos de associações e identificações de regiões genômicas, as quais podem conter elementos funcionais e regulatórios e auxiliar na detecção de doenças (VIGNAL et al., 2002; MEUWISSEN, 2013). Além disso, pode contribuir para a identificação de mutações causais responsáveis pela variação de características poligênicas de interesse na pecuária de corte bovina.

Os avanços tecnológicos na genotipagem e sequenciamento com alto desempenho, desenvolvidos por empresas como Illumina e Affymetrix, e com redução nos custos contribuíram para a identificação e caracterização de milhares de SNPs em todo o genoma, proporcionando impacto principalmente na genética quantitativa, genética de populações e molecular devido à quantidade de dados gerados. Para bovinos, além de chips com densidade de 50k (50,609 SNPs; Illumina BovineSNP50), a Illumina também disponibiliza chips com mais de 770,962 SNPs (Illumina BovineHD BeadChip). Esses chips permitem grande variabilidade de aplicações incluindo a seleção genômica e a identificação de loci de características quantitativas (QTLs) (ZHANG et al., 2012).

1.3.5 Genotipagem de SNPs

A genotipagem geralmente consiste na geração de produtos alelos específicos para um determinado SNP seguido da posterior detecção do genótipo. Em grande maioria, essas técnicas exigem inicialmente a amplificação por PCR possibilitando o aumento do número de cópias das moléculas de DNA para a sua posterior detecção por discriminação alélica. Algumas tecnologias de identificação do genótipo baseam-se em clivagem enzimática do DNA, utilizando as enzimas endonucleases que clivam o DNA genômico a partir do reconhecimento de sequências específicas, o que resulta em fragmentos de diferentes tamanhos e a identificação dos alelos por diferenças de tamanhos (KIM; MISRA, 2007).

A análise da maioria de marcadores moleculares se baseia na técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR), que permitiu a automação e as simplificações das etapas de obtenção dos padrões moleculares. Os segmentos de DNA específicos são replicados *in vitro* resultando na produção de milhares de cópias da sequência, produzindo a quantidade suficiente para visualização do DNA sem necessidade de métodos indiretos (REGITANO; VENERONI, 2009).

1.3.6 Reação em cadeia da polimerase – PCR

A reação em cadeia da polimerase (PCR) amplifica um determinado fragmento de DNA de interesse por procedimento enzimático *in vitro*. As aplicações da PCR incluem a clonagem direta de DNA genômico e cDNA, mutagênese *in vitro*, engenharia do DNA, genética forense (“*genetic fingerprinting*”), identificação de agentes infecciosos, diagnóstico de doenças genéticas, análise de variação alélicas, genotipagem e estudo do transcriptoma (AUSUBEL, 2002).

O sucesso desse procedimento deve-se à descoberta da enzima celular DNA polimerase que replica o DNA, utilizando oligonucleotídeos iniciadores (“primers”) para síntese da nova fita (MULLIS, 1990) e à descoberta e do isolamento da DNA polimerase termoestável de bactérias termófilas *Thermus aquaticus* (*Taq* DNA polimease) (WHITE, 1993). A PCR inicia-se com a desnaturação das fitas de DNA e é seguido pela hibridização dos pequenos oligonucleotídeos nas fitas recém-desnaturadas limitando a região de amplificação e, finalmente, a extensão do fragmento pela adição de dNTPs pela enzima *Taq* DNA polimerase (MULLIS, 1990; AUSUBEL, 2002). Cada uma das fitas recém-síntetizadas atua como molde para novas sínteses de modo exponencial, porém há uma limitação dos reagentes necessários para amplificação e, assim, após em torno de 20 a 30 ciclos a amplificação atinge um platô.

1.3.7 Genotipagem por RFLP-PCR (Restriction fragment length polymorphism)

A genotipagem por RFLP-PCR consiste na identificação dos genótipos de interesse pelo padrão de restrição das endonucleases. Quando um polimorfismo em estudo encontra-se em um sítio de reconhecimento de uma enzima, que possui em torno de 4 a 6 pares de base (pb) e determina a presença ou a ausência do sítio de clivagem da enzima de restrição, o alelo pode ser identificado devido aos diferentes tamanhos dos fragmentos gerados (POURZAND; CERUTTI, 1993).

A técnica de RFLP-PCR envolve 3 etapas: amplificação por PCR do fragmento de DNA que apresenta a mutação em estudo, a incubação da enzima de restrição com o produto de PCR por 3-24 horas e a visualização dos fragmentos de restrição por eletroforese

(HAMAJIMA et al., 2000). Essa técnica não necessita de sondas, porém é aplicável a um número limitado de SNPs (KIM; MISRA, 2007).

1.3.7 Desequilíbrio de ligação- LD (*Linkage disequilibrium*)

O desequilíbrio de ligação (LD) é uma medida de associação não-aleatória entre genes e/ou alelos que depende das frequências gaméticas da população e é importante para estudos populacionais e pode ser mensurado por r^2 ou por D' (ARDLIE et al., 2002; CARDON & ABECASIS, 2003) e foi proposta inicialmente por Lewontin (1964).

As medias de r^2 e D' apresentam propriedades diferentes (ARDLIE et al., 2002), porém ambas as medidas consideram os valores do intervalo de 0 (o par de loci não está em desequilíbrio de ligação) a 1 (o par de loci está em completo desequilíbrio de ligação) (KHATKAR et al., 2008). A medida de D' é fortemente dependente do tamanho da amostra e das frequências alélicas e, por essas razões, as estimativas por D' podem se mostrar superestimadas e por essa razão, não se recomenda os estudos da extensão do LD ao longo do genoma baseados nessa medida (ARDLIE et al., 2002; HAYES, 2011). Por outro lado, a mensuração por r^2 proposta por Hill e Robertson (1968) é menos dependente das frequências alélicas (HAYES, 2011).

A estrutura do LD em populações pode contribuir para inferir com maior precisão informações sobre a história da população, informações sobre taxas de recombinações, taxas de mutações e identificação de efeitos demográficos podem contribuir para estudos de regiões cromossômicas no genoma associadas a determinado fenótipo de importância econômica ou relacionadas a doença (WALL & PRITCHARD, 2003; VILLA-ANGULO et al., 2009).

Associação não aleatória entre SNPs, aliada ao desenvolvimento de genotipagem em alta densidade, possibilitou estudos de associação genômica ampla (GWAS) e se baseia no fato de mutações funcionais, as quais afetam determinada característica e susceptibilidade a doenças, se encontraram em desequilíbrio de ligação (LD) com marcadores moleculares (SNPs) que apresentam efeito aparentemente não significativo no fenótipo (VISSCHER et al., 2012).

O desequilíbrio de ligação é utilizado nos estudos de associação ampla do genoma (GWAS) (KRUGLYAK, 2008), pois a densidade de marcadores necessária para essas análises depende da distribuição do LD ao longo do genoma. A extensão do LD é dependente de fatores como o tamanho efetivo da população, o qual influencia no total de blocos em LD e na frequência de recombinação entre marcadores em uma população (SERVICE et al., 2006). O padrão e a extensão do LD podem variar entre diferentes populações (KRUGLYAK, 2008). Regiões com alto níveis de LD possibilitam menor número de SNPs para as análises de GWAS (SERVICE et al., 2006). Em populações bovinas o LD decai em função do aumento da distância do loci (DE ROOS et al., 2008).

1.3.8 Estudos de Associação Genômica Ampla - (Genome- wide Association Studies)

O estudo de associação genômica ampla (GWAS) contribui para identificação de regiões que influenciam características de importância agropecuária. Esse estudo usa as variações na sequência em todo o genoma (SNPs), em conjunto com o fenótipo, e atua na identificação de genes e/ ou elementos regulatórios importantes para as características de interesse econômico, uma metodologia de suma importância para o estudo de mecanismos genéticos de características complexas (ZHANG et al., 2012).

O GWAS depende do fato que os alelos de um locus marcador estão em LD com mutações causais, de tal modo que essa associação se perpetue nos indivíduos da população após várias gerações. Porém, a principal limitação desse estudo é a exigência de um número de marcadores que seja suficiente para aumentar a possibilidade de identificar esses marcadores em LD com mutações causais. A densidade ideal de marcadores para que a análise seja bem sucedida depende da extensão do LD em todo o genoma bovino (KHATKAR et al., 2008)

Na literatura é possível encontrar relatos dos estudos de associação genômica ampla para área de olho de lombo (AOL) utilizando Illumina BovineSNP50 BeadChip em diferentes raças de bovinos. Estudos com animais da raça *Bos taurus coreanae* (Hanwoo) avaliados após o abate, identificaram SNPs associados no BTA6 e BTA16, sendo esse último SNP relatado no gene *dishevelled homolog 1 (DVL1)* (KIM et al., 2011). Outro relato identificou um conjunto de 11 SNPs associado à AOL ($P < 0,0005$) utilizando novilhos da raça japonesa (raça Wagyu) por análises de regressão linear (WATANABE et al., 2013). Ainda foram identificados SNPs significativos nos BTA6, BTA8 e BTA20 utilizando medidas de AOL na carcaça de animais de diversas raças (LU et al., 2013). Foram relatadas regiões associadas à AOL obtida por medida de ultrassom no BTA1, BTA2, BTA4, BTA5, BTA9, BTA18, BTA20, BTA21 e BTA24 em novilhos da raça Brangus (PETERS et al., 2012).

Além disso, alguns estudos publicados descrevem QTLs (Quantitative Trait Loci) associados com área de olho de lombo, Lee e colaboradores (2012) identificaram QTL no BTA23 em novilhos da raça coreana Hanwoo e na raça japonesa Wagyu, Mizoshita et al (2004) identificaram QTLs para AOL no BTA4. O estudo de Nalaila et al (2012) que utilizaram medidas de ultrassom de carcaça em bovinos cruzados identificaram 14 QTLs associados com AOL em diferentes cromossomos (BTA1, BTA3, BTA5, BTA6, BTA7,

BTA9, BTA10, BTA11, BTA17, BTA18, BTA21, BTA27, BTA28 e BTA29), e esses QTLs juntos exploraram aproximadamente 5,71% da variância fenotípica.

1.3.9 Anotação do genoma e banco de dados para QTL (Quantitative Trait Loci)

O sequenciamento genômico mostrou que grande fração de genes específicos de funções biológicas fundamentais é compartilhada por diversos eucariontes. O conhecimento do papel biológico dos genes de determinado organismo pode fornecer evidências da atuação dos mesmos genes em organismos diferentes. Avanços na tecnologia de sequenciamento possibilitaram alto rendimento em dados e conseqüentemente a necessidade de automatizar a busca por anotações que abrangem não apenas um grande conjunto de genes, mas também todo o genoma (MAO et al., 2005).

O Gene Ontology (GO) proporciona controle comum de vocabulário para facilitar a comunicação e partilha de informações entre diferentes grupos de pesquisa e permite a comparação de anotações não apenas em diferentes organismos, mas também em diferentes conjuntos de genes. O GO se organiza em termos funcionais em 3 categorias: processo biológico, função molecular e componente celular (ASHBURNER et al., 2000; MAO et al., 2005).

Os bancos de dados de QTLs foram criados para disponibilizar informações públicas de QTLs de animais, e assim permitem que pesquisadores possam localizar e comparar QTL nas espécies. Esses bancos de dados facilitam que as sequências genômicas disponíveis possam ser integradas não apenas com mapas genéticos existentes, mas também permitem a integração desses dados com importantes QTL e dados fenotípicos (POLINENI et al., 2006).

2. VALIDAÇÃO DE SNPs ASSOCIADOS COM ÁREA DE OLHO DE LOMBO EM DE BOVINOS CANCHIM

2.1 Introdução

A raça Canchim é constituída por animais que apresentam precocidade, ótima conformação para corte, resistência ao calor e a parasitos, além de uniformidade de pelagem (VIANA et al., 1978; ALENCAR, 1988), o que facilita a criação desses bovinos a pasto o que proporciona menor custo de produção, porém para que a bovinocultura de corte nacional continue sendo competitiva entre os principais países exportadores é necessário investir na melhoria da qualidade carne e carcaça. A área de olho de lombo (AOL) que é um componente de carcaça relacionada com o desenvolvimento muscular pode contribuir com melhoria nas questões relacionadas com qualidade.

Os estudos de associação genômica ampla (GWAS) podem contribuir para a identificação de regiões cromossômicas que influenciam no ganho de área de olho de lombo (AOL) em bovinos Canchim, mas para que esses estudos possam efetivamente contribuir em programas de seleção animal é necessário realizar a validação dos resultados de GWAS. A análise de validação tem por finalidade aumentar a confiabilidade das associações encontradas em determinada população em estudo. Além disso, é possível identificar possíveis fontes de viés nos resultados iniciais (MCCARTHY et al., 2008). Diante desse contexto, a validação de SNPs deve ser realizada em uma amostra independente da população, assim reduzindo a possibilidade de viés nas análises. Essa análise é particularmente importante quando a associação foi identificada utilizando amostragem de extremos na população, visto que os

efeitos genéticos estimados em uma amostra da população com fenótipos extremos podem ser superestimados (LANDER & BOTSTEIN, 1989; BARENDSE et al., 2007).

No entanto, estudos de validação são fortemente dependentes da disponibilidade de animais com registros fenotípicos e da estrutura do pedigree da população, não existindo estratégia padrão que possa ser aplicada em todas as situações, mas ainda assim se deve delinear estratégias de validação caso específicas(GONDRO, 2013).

2.2 Justificativa

Considerando-se o aumento da competição entre países exportadores e da maior exigência do mercado consumidor, aliados à renovação no interesse de adoção de marcadores moleculares em programas de seleção genética animal, é de suma importância projetos que visam à identificação e à validação de marcadores genéticos associados a características de carcaça, como a área de olho de lombo.

2.4 Objetivos

- Selecionar SNPs informativos em um conjunto de marcadores previamente associados à AOL por Random Forest em uma população de bovinos Canchim,
- Validar os SNPs selecionados em uma amostra independente da população de bovinos da raça Canchim,
- Estimar os efeitos genéticos aditivos e de dominância dos SNPs validados em uma amostra independente da população de bovinos Canchim.

2.5 Material e métodos

2.5.1 Animais e mensuração de AOL

Um total de 1.652 bovinos dos grupos genéticos Canchim (5/8 Charolês + 3/8 zebu) e MA (filho de touro Charolês e vaca 1/2 Canchim + 1/2 zebu), machos e fêmeas, nascidos entre 2003 e 2008, provenientes de 50 touros e criados em regime de pastagem em sete fazendas (SP e GO), foram utilizados para obtenção das medidas de ultrassom para AOL e coletar de sangue para extração de DNA.

As imagens de ultrassom para AOL foram colhidas entre os anos de 2005 e 2010. As medidas AOL (cm²), foram obtidas por equipamento de ultrassom com transdutor linear de 3,5 MHz ASP 30C/18 cm, específico para avaliação de carcaça, posicionando transversalmente no músculo *longissimus dorsi* na região entre 12^a e 13^a costelas. Essas medidas foram realizadas até abril de cada ano, quando os animais apresentavam em média 19 meses de idade.

2.5.2 Estimativa do valor genético animal

Inicialmente, com o intuito de verificar a influência dos efeitos ambientais e genéticos na característica foram realizadas análises de variância pela metodologia de quadrados mínimos. Portanto, foram formados 31 grupos de contemporâneos (GC) incluindo as seguintes variáveis: fazenda, ano e sexo. Os GC com menos de duas observações foram excluídos.

O valor genético animal foi estimado utilizando modelo animal com efeitos fixos de grupo de contemporâneos (fazenda, ano e sexo) e a idade animal, o peso e a heterozigose

individual como covariáveis (efeito linear), além dos efeitos aleatórios genético aditivo direto e residual. As análises foram realizadas pelo método da máxima verossimilhança restrita utilizando o software MTDFREML (BOLDMAN et al., 1995)

O modelo estatístico, na forma matricial, foi o seguinte:

$$y = X\beta + Za + e,$$

em que: y = vetor das variáveis dependentes; β = vetor de efeitos fixos (grupo de contemporâneos e covariáveis); a = vetor de efeitos genéticos aditivos diretos; e = vetor de erros aleatórios residuais associados às observações; e X e Z = são as respectivas matrizes de incidência para cada efeito.

Após a obtenção dos valores genéticos aditivos (VGA) dos animais, utilizou-se abordagem proposta por Garrick et al (2009), e obteve-se os valores genéticos desregredidos (VGD), sendo esses últimos utilizados nas análises de GWAS por Random Forest.

2.5.3 Animais genotipados em chip HD Illumina

Por ocasião da amostragem para genotipagem em chip HD o banco de dados foi constituído por 987 animais da raça Canchim e MA com fenótipo para AOL. Os valores genéticos desses animais foram estimados segundo modelo descrito anteriormente, e foram selecionados 400 animais com extremos de resíduos dos valores genéticos para AOL.

As amostras de DNA desses animais foram extraídas e diluídas para obtenção de concentração final de 50ng/ μ l. Essas amostras foram genotipadas em chips BovineHD BeadChip (Illumina®), que contém aproximadamente 770 mil SNPs, por uma empresa prestadora de serviços.

2.5.4 Extração de DNA

As amostras de DNA de sangue e de sêmen dos animais foram extraídas pelo método de precipitação por sal, conforme o protocolo descrito por Regitano et, al. (2001).

2.5.4.1 Amostras de sangue

Amostras de 5 ml de sangue foram colhidas por punção na veia jugular em tubos contendo 50 µl de EDTA potássico (K₃) a 15% e mantidas em refrigeração até a realização da extração.

Inicialmente, para obtenção das células de leucócitos, as células vermelhas foram gradualmente desintegradas em tampão constituído por Tris-HCl 10mM pH 7,6, MgCl₂ 5mM e NaCl 10mM. O resíduo celular pelletizado foi centrifugado por 10 minutos a 700 xg. O processo foi repetido por 3 vezes até obtenção somente das células brancas.

Os *pellets* (sedimentos de células brancas) foram armazenados em tubos de 1,5 ml e em seguida ressuspensos em 500µl de solução com a seguinte composição: Tris-HCl 10mM pH 8, EDTA 10mM pH 8, NaCl 100mM, 0,5% de SDS e 2 µg de proteinase K. Após esse procedimento os *pellets* foram incubados a 55 °C até que a dissolução do mesmo fosse completa (em torno de 6 horas ou “*overnight*”). Foram adicionados, após a incubação, 240µl de NaCl 5M e 210µl de TE (Tris-HCl 10mM pH 7,6 + EDTA 1mM pH 8) e em seguida os tubos foram agitados por inversão até formarem pequenos coágulos de proteínas. Os tubos foram incubados em gelo por 10 minutos e centrifugados por 15 minutos a 16.000xg, para promover a precipitação das proteínas.

O sobrenadante contendo o DNA foi separado das células brancas e dividido em 2 tubos de 1,5 ml, posteriormente foram adicionados 1 ml de etanol 100% (absoluto) gelado em cada tubo e misturados por inversão. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 15

minutos e retirou-se o sobrenadante. Foi adicionado 500 µl de etanol 70% gelado e foram centrifugados por 5 minutos a 16.000xg.

Nos tubos foram adicionados 250 µl de TE+RNase (10 µg de RNase por ml de amostra) e foram incubados por 1h a 37°C ou na geladeira “*overnight*”. Finalmente, essas amostras foram armazenadas em freezer a -20°C.

2.5.4.2 Amostras de sêmen

As amostras obtidas de palhetas de sêmen foram descongeladas em microtubos de 1,5 ml, centrifugadas por 8 minutos a 5.000xg, e os sobrenadantes foram descartados. Os *pellets* das amostras foram lavados 4 vezes em 1ml de solução PBS 1X (KCl 2,5mM; KH₂PO₄ 1,5mM; 137mM; Na₂HPO₄ 8mM; pH 7,0). A seguir o *pellet* foi ressuscitado 1 µl de PBS 1X e foram adicionado 400 µl de solução de lise (2-mercaptoetanol 2%, Tris-HCl pH 8 10mM, NaCl 100mM, EDTA pH 8 e SDS 0,5%). As amostras foram incubadas por 30 minutos a 50°C e após esse procedimento foi adicionada a Proteínase-K (200µg/ml). Em seguida as amostras foram vortexadas e incubadas por 16 horas a 50°C.

Para precipitação das proteínas por sal, adicionaram-se 90µl de TE e 160µl de NaCl 5M. Os tubos foram agitados por inversão, e as amostras foram incubadas em gelo por 15 minutos e centrifugadas, a 16.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi transferido para tubos limpos, e acrescentou-se 1 ml de etanol absoluto a cada tubo. As amostras foram agitadas por inversão e centrifugadas a 16.000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o *pellet* lavado com etanol 70% e, em seguida, centrifugado a 16.000xg por 5 minutos. Finalmente o sobrenadante foi descartado, o sedimento foi secado, ressuscitado em 100 µl de TE + RNase e incubado por 1 hora a 37°C. As amostras foram armazenadas em freezer -20°C.

2.5.5 Quantificação e avaliação da qualidade das amostras de DNA

Para a quantificação do DNA foi utilizado o espectrofotômetro NanoDrop®. Os ácidos nucleicos absorvem luz no comprimento de onda de 260nm e as proteínas absorvem luz no comprimento de onda de 280nm, portanto, a relação A_{260}/A_{280} é utilizada como parâmetro para avaliação da qualidade das amostras. As amostras que apresentaram valores abaixo de 1,8 foram desconsideradas por apresentarem alta contaminação por proteínas.

A integridade do DNA extraído também foi verificada por eletroforese em gel de agarose 1%.

2.5.6 Análises de controle de qualidade e GWAS para AOL

Os parâmetros utilizados para as análises de controle de qualidade dos SNPs e o estudo de associação genômica ampla utilizando a metodologia de Random Forest para área de olho de lombo foi realizada conforme descrito em MOKRY et al. (2013a).

No entanto, como foi adotada a estratégia de extremos de resíduos dos valores genéticos para AOL optou-se por realizar a associação seguindo-se abordagem de caso-controle, para a qual os valores genéticos desregredidos (VGD) foram divididos em duas categorias: $VGD \leq 0$ foram considerados 0 e $VGD > 0$ foram considerados 1.

2.5.7 Mineração do conjunto de SNPs associados com AOL

Após as análises de controle de qualidade e o GWAS para AOL foram estabelecidos critérios para mineração do conjunto de SNPs resultantes das análises de associação a serem validados, como descritos a seguir:

2.5.7.1 Reconstrução e visualização dos haplótipos

Inicialmente, para verificar a localização dos SNPs em blocos de LD ao longo do genoma, foi necessário inferir a fase de ligação dos SNPs, ou seja, estimar a combinação dos alelos em indivíduos não relacionados, os quais são transmitidos preferencialmente associados ao longo das gerações. A fase de ligação foi inferida utilizando o software fastPHASE (SCHEET; STEPHENS, 2006). Em seguida, para construção e visualização dos blocos em LD foi utilizado o programa Haploview (BARRETT et al., 2005).

2.5.7.2 Anotação do genoma

Após as análises descritivas da estrutura dos blocos em LD, com auxílio da ferramenta online GBrowser (*Generic Genome Browser*) (STEIN et al., 2002) foram localizadas as regiões dos SNPs associados à AOL no genoma bovino. Esse software permite a visualização da região de interesse no genoma bovino versão UMD_3.1_*Bos taurus* e identifica os genes e QTLs presentes nessa região. Além disso, buscou-se a informação de QTLs no banco de dados públicos, disponível na internet, o QTLdb (HU et al., 2007). Após isso, elaborou-se uma lista com todos os genes identificados e utilizou-se o software online DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (DENNIS et al., 2003) para identificar quais genes estão relacionados com vias metabólicas e processos biológicos envolvidos com a formação de AOL.

2.5.7.3 Critério de escolha dos SNPs informativos

Os critérios para a seleção dos SNPs informativos foram?

- SNPs localizados dentro de haplótipos associados à AOL;
- SNPs de maior importância segundo os critérios do Random Forest;
- SNPs dentro de genes.

Essas estratégias foram propostas para reduzir as chances de selecionar SNPs que apresentam associações espúrias com a característica e marcadores com baixo poder estatístico para a detecção do efeito sobre AOL.

O critério do desequilíbrio de ligação foi adotado, pois, os haplótipos podem estar em maior desequilíbrio de ligação com QTLs (quantitative trait loci) e o aumento do LD pode proporcionar aumento no poder do teste estatístico (HAYES, 2011).

2.5.8 Escolha dos animais da população de validação

A partir da população de 1.652 bovinos da raça Canchim foram escolhidos 712 animais, os 400 animais utilizados no GWAS foram excluídos na formação da amostra de validação.

A escolha desses animais baseou-se na acurácia do valor genético estimado para cada animal. Após a quantificação das amostras de DNA dos animais com maior acurácia, as que se apresentaram com a concentração abaixo de 40 ng/μl foram descartadas. Posteriormente, as amostras com concentração acima de 50 ng/μl foram diluídas em água para obtenção da concentração final de 40 ng/μl.

2.5.9 Validação da associação dos SNPs com AOL

2.5.9.1 Genotipagem dos SNPs selecionados

Os 712 animais da população de validação foram genotipados pela técnica de RFLP-PCR para os SNPs resultantes das análises de mineração.

Os primers foram desenhados com auxílio de ferramentas disponíveis online como o Primer-BLAST (YE et al., 2012), e a avaliação da qualidade dos *primers* delineados foi feita pelo software online NetPrimer (PREMIER Biosoft International). Além disso, para estabelecer um ensaio de identificação do genótipo nos animais por padrão de restrição, o software online NEBcutter (VINCZE et al., 2003) foi utilizado para identificar a presença do sítio de restrição para clivar o DNA na região do polimorfismo.

2.5.10 Otimização das condições de PCR e ensaio de digestão para a genotipagem por RFLP-PCR

Foram realizados diversos testes com diferentes concentrações de reagentes e gradientes de temperatura de hibridização dos *primers* com a finalidade de estabelecer um ensaio de PCR para amplificação das regiões dos SNPs de interesse. Além disso, foram realizados vários ensaios para estabelecer a concentração e temperatura de incubação da enzima de restrição para cada SNP selecionado.

2.5.10.1 SNP(BTA4)- rs43382671

A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos a 94°C, 65,5°C e 72°C por 45 segundos cada e a última etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente a especificidade da amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. A digestão do produto amplificado foi realizada pela enzima de restrição NlaVI, com incubação por 3 horas.

2.5.10.2 SNP(BTA10)- rs110494060

A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida por 35 ciclos a 94°C, 64°C e 72°C por 45 segundos cada e a última etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente a especificidade da amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. A digestão do produto amplificado foi realizada pela enzima de restrição EarI, com a etapa de incubação de 3 horas.

2.5.10.3 SNP(BTA22)- rs137808561

A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C, 52°C e 72°C por 45 segundos cada e a última etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente a especificidade da amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. A digestão do produto amplificado foi realizada pela enzima de restrição BccI, com incubação por 3 horas.

2.5.10.4 SNP(BTA27)- *rs135145718*

A amplificação do fragmento foi realizada nas seguintes etapas: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido por 40 ciclos a 94°C, 59°C e 72°C por 45 segundos cada e a última etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente a especificidade da amplificação foi verificada em eletroforese em gel de agarose 1%. A digestão do produto amplificado foi realizada pela enzima de restrição *TfiI*, com incubação por 3 horas.

2.5.11 Influência dos SNPs selecionados sobre a característica AOL

A verificação da influência dos marcadores SNPs foi testada por meio de análise de variância dos genótipos dos SNPs sobre o valor genético (VGA) pelo método de quadrados mínimos. Utilizou-se o procedimento “GLM” no programa SAS (SAS/SAT 9.3) para as análises de variância.

O modelo estatístico utilizado foi:

$$y_{ij} = \mu + G_i + e_{ij}$$

y_{ij} = Valor genético aditivo

μ = média geral de VGA

G_i = efeito fixo do genótipo do marcador

e_{ij} = efeito residual

Quando houve efeito significativo da influência do marcador sobre VGA foi realizado teste “t” de comparação de médias entre as classes de genótipos, ao nível de significância de 5%, pelo procedimento “GLM” no software SAS (SAS/SAT 9.3).

2.5.11.1 Análise do efeito de substituição alélica

Após as análises de influência dos SNPs sobre VGA, prosseguiu-se com as análises para estimar o efeito de substituição alélica, como desvio em relação ao alelo de maior frequência, para os marcadores com efeito significativo ($P \leq 0,05$) utilizando o software ASREML (GILMOUR, 2009).

Considerando os genótipos A_1A_1 , A_1A_2 e A_2A_2 dos SNPs avaliados, os desvios dos valores genéticos genotípicos podem ser calculados na seguinte forma: o desvio do valor do genótipo A_1A_1 em relação à média por $\mathbf{a} = ((A_1A_1 + A_2A_2)/2)$ e o desvio do genótipo heterozigoto em relação a média por $\mathbf{d} = (A_1A_2 - ((A_1A_1 + A_2A_2)/2))$.

O efeito de substituição alélica é a expressão da diferença entre dois alelos e pode ser calculado pela equação $\alpha = a + d(q - p)$, em que p é a frequência alélica de A_1 e q é a frequência alélica de A_2 (FALCONER; MACKAY, 1996). Além disso, foi considerado o efeito de dominância na estimação do efeito de substituição alélica do SNP.

2.5.12 Análise de associação dos haplótipos com AOL

As análises de GWAS para área de olho de lombo pela metodologia de Random Forest identificaram um conjunto de 9 SNPs significativos na região que abrange 30412901 pb a

36000462 pb do BTA 27, sendo que 7 desses marcadores encontram-se no mesmo haplótipo, que se localiza na região intergênica entre 35987333pb a 36003793pb.

Considerando que a região do conjunto de SNPs no BTA 27, correspondia a uma região de “deserto gênico”, ou seja, não encontramos genes ou elementos regulatórios descritos em literatura, estendeu-se 1 Mb para ambos os lados do SNP abrangendo uma região de 2 Mb, com a finalidade de investigar nessa região os genes e/ou regiões regulatórias que influenciam a característica. Para esse estudo, foi realizada análise de associação haplotípicas, e associação por SNPs com AOL.

Inicialmente foram realizadas as análises de controle de qualidade no software PLINK (PURCELL et al., 2007), considerando os seguintes parâmetros: $MAF < 0,01$ e $HWE < 0,00001$. Além disso, foram excluídos os indivíduos que apresentaram mais de 10 % de genótipos perdidos e SNPs com taxa de genotipagem inferior a 95%. Em seguida foram inferidas as fases de ligações dos SNPs pelo software Beagle versão 3.3.2 (BROWNING; BROWNING, 2007) e a construção e visualização dos haplótipos pelo software Haploview.

Adotou-se os 400 animais selecionados pelos extremos de resíduos dos valores genéticos e genotipados em chip HD Illumina. Utilizou-se a abordagem caso-controle para as análises de associação com os valores genéticos desregredidos (VGD). As análises foram realizadas no software PLINK usando o método de regressão logística. Os valores de P foram corrigidos pelo procedimento permutação $\max(T)$ para as análises das combinações haplotípicas e correção de Bonferroni para as análises de SNP único.

O procedimento de permutação $\max(T)$ calcula estimativas de P empíricas a partir da permutação dos valores de P, assim formando um conjunto empírico de significância (EMP1). Esses valores são corrigidos por meio de comparação de múltiplos testes, e formando um

segundo conjunto de significância empírica (EMP2). Essas estimativas são pontuais e desta forma, são realizadas para cada marcador (haplótipo) presente na análise (PURCELL, 2010).

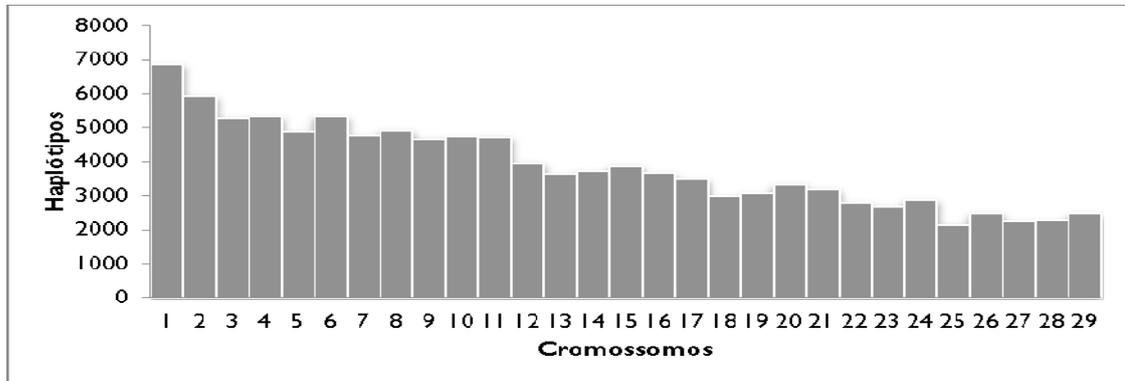
Finalmente, as regiões associadas à AOL (combinações haplotípicas e SNPs únicos) foram localizadas utilizando o software online GBrowser no genoma bovino. Os QTLs presentes nessa região foram identificados utilizando o banco de dados online QTL database (QTLdb), e os genes identificados foram listados e submetidos ao software online Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) para identificar quais genes estão relacionados com vias metabólicas e processos biológicos envolvidos com a formação de AOL.

2.6 Resultados e Discussão

2.6.1 Mineração do conjunto de SNPs associados à AOL

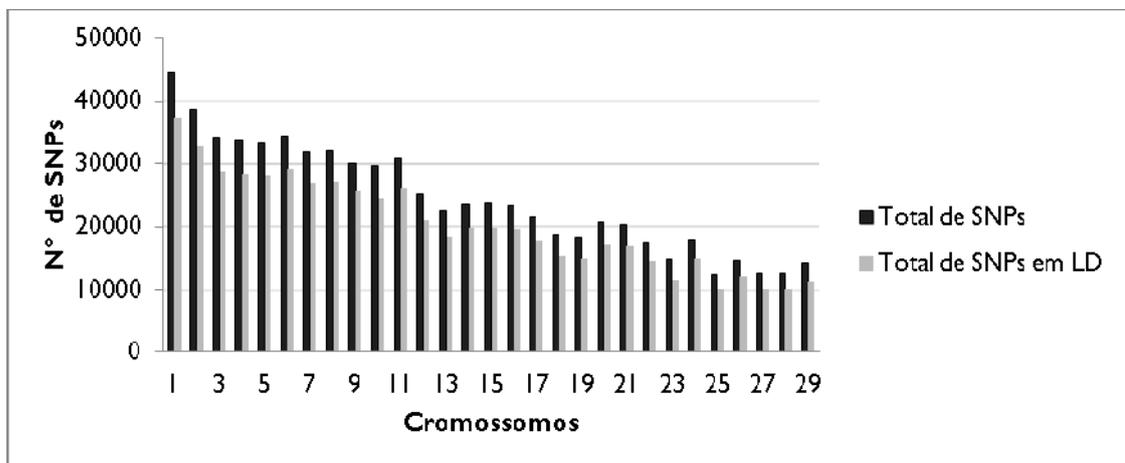
A descrição da estrutura do desequilíbrio de ligação realizada para a mineração do conjunto de SNPs, mostrou média de 3.878 blocos em LD por cromossomo, formados em média por 5 SNPs. A distribuição dos haplótipos por cromossomo e a distribuição dos SNPs em haplótipos por cromossomo encontram-se nas Figuras 3 e 4, respectivamente.

Figura 3: Distribuição dos haplótipos por cromossomo em bovinos da raça Canchim.



Fonte: Arquivo pessoal

Figura 4: Distribuição do total de SNPs e total dos SNPs em desequilíbrio de ligação (LD) por cromossomo em bovinos da Raça Canchim.



Fonte: Arquivo pessoal

O estudo de associação ampla genômica para área de olho de lombo pela abordagem de Random Forest resultou em um conjunto com 197 SNPs e, nas regiões desses marcadores foram anotados os QTLs e as vias metabólicas envolvidos com área de olho de lombo. A lista com a descrição da posição, identificação de genes e QTLs e a quantidade de SNPs por bloco em LD para o conjunto de 197 SNPs encontra-se no Anexo1.

Após a mineração dos 197 SNPs, 5 SNPs foram selecionados conforme os critérios previamente descritos. Esses marcadores estão localizados nos genes: *ACTN1*(BTA10), *HDAC9*(BTA4), *NEB*(BTA2), *CMTM7*(BTA22) e na região intergênica no BTA27. O marcador rs135145718 (BTA27) não atendeu o critério de se localizar dentro de gene, porém nessa região encontramos sete dos SNPs selecionados no GWAS por Random Forest localizados em um bloco em LD formado por nove SNPs. O SNP no gene *NEB* foi eliminado das análises de validação por não se conseguir estabelecer ensaio padronizado para a genotipagem. A descrição dos genes, vias metabólicas e regiões de QTL relacionados com os quatro SNPs selecionados estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos genes, vias metabólicas e regiões de QTL relacionadas com os quatro SNPs selecionados para validação.

Nome SNP	Gene	Nº de SNPs*	Vias metabólicas	QTLs**	Referência QTL
rs43382671	<i>HDAC9</i>	2	-Processo Biológico: -regulação e desenvolvimento de tecidos musculares e estriado, regulação e desenvolvimento de órgão muscular, regulação e desenvolvimento de células musculares.	PC, EGS, PM, MA	(YOKOUCHI et al., 2009) (HOU et al., 2010)
rs110494060	<i>ACTN1</i>	6	-Processo biológico: regulação da atividade de ATPase; -Componente celular: miofibrilas, sarcômeros, fibras contráteis; -Função molecular: ligação da actina e ligação catiônica.	PC, MA	(MCCLURE et al., 2010)
rs137808561	<i>CMTM7</i>	3	-Função molecular: atividades das citocinas; -Componente Celular: integrante de membrana	PC	(MCCLURE et al., 2010)

rs135145718	-----	9	-----	AOL, PC, MA	(MCCLURE et al., 2010)
-------------	-------	---	-------	----------------	---------------------------

*Número de SNPs no haplótipo.

Legendas: PC= peso de carcaça, EGS= espessura de gordura subcutânea, PM= percentagem de carne na carcaça, MA=marmoreio, AOL= área de olho de lombo.

** Quantitative trait loci

O SNP rs43382671(BTA4) encontra-se em uma região de QTL associada com as características peso de carcaça, espessura de gordura subcutânea, porcentagem de carne e marmoreio (YOKOUCHI et al., 2009; HOU et al., 2010). O gene *HDAC9* participa de funções biológicas relacionadas com a musculatura e pertence a classe II das desacetilases (*HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC8 e HDAC9*) as quais são altamente expressas em músculo esquelético e atuam na inibição da expressão de *MEFE2*- genes dependentes (BASSEL-DUBY; OLSON, 2006).

O rs110494060(BTA10) localiza-se no gene *α -actinin 1 (ACTN1)*. É uma isoforma encontrada em tecidos não musculares (AMSILI et al., 2008) como os filamentos de actina e participa na estrutura e regulação do citoesqueleto. Os citoesqueletos participam na locomoção e transporte intracelular de organelas e processos celulares como a mitose e meiose (SJOBLOM et al., 2008). O rs137808561 (BTA22) localiza-se no gene *CMTM7*, que pertence à família *CMTM (Chemokine-Like Factor Superfamily Member)* que desempenham funções importantes no sistema imunológico (HAN, 2010).

Os SNPs rs110494060(BTA10), rs137808561 (BTA22) e rs135145718 (BTA27) também se localizam em regiões de QTLs associados com peso de carcaça e, o SNP no BTA27, em região de QTL associado com área de olho de lombo (MCCLURE et al., 2010).

2.6.2 Estatística descritiva de AOL

A análise descritiva para os dados da característica AOL na população de validação de bovinos da raça Canchim encontra-se na Tabela 2.

Tabela 2: Estrutura dos dados para área de olho de lombo (AOL) na amostra de validação dos bovinos da raça Canchim.

Característica	N	Média	Desvio Padrão	CV(%)*	Mínimo	Máximo
AOL (cm ²)	712	47,88	9,14	19,10	27,8	82,8

*coeficiente de variação

Zuin et al.(2012) e Caetano et al. (2013) utilizando animais da raça Nelore com média de 18 meses de idade observaram coeficiente de variação semelhante ao desse estudo, 19,80% e 19,31% respectivamente. Porém, as médias foram superiores $52,93 \pm 10,48 \text{ cm}^2$ e $52,75 \pm 10,18 \text{ cm}^2$; respectivamente. Além disso, o estudo de Lima Neto et al (2009) relataram valores semelhantes aos trabalhos citados acima, com média de $58,10 \pm 11,62 \text{ cm}^2$ e coeficiente de variação de 19,2 % em animais em torno de 17,6 meses de idade da raça Guzerá. O estudo de (TIZIOTO, 2010) utilizou animais da raça Nelore com média de 18 meses de idade e relatou média semelhante à do presente estudo $47,09 \pm 6,35 \text{ cm}^2$.

Para bovinos da raça Charolesa, de origem europeia, Johnston et al., (1992) estudando AOL na carcaça, relataram média de $82,60 \pm 9,44 \text{ cm}^2$ resultado superior a esse estudo. Além disso, Turner et al., (1990) estudando a raça Hereford relataram média superior a esse estudo ($86 \pm 7,5 \text{ cm}^2$) e CV inferior (8,14%).

As diferenças de médias encontradas neste trabalho em relação aos demais podem ser devido aos diferentes grupos genéticos e condições ambientais.

2.6.3 Otimização das condições dos ensaios de digestão para genotipagem por RFLP-PCR

A descrição dos SNPs resultantes das análises de mineração encontra-se na tabela 3.

Tabela 3- Resumo das descrições das posições e localizações dos SNPs, sequência dos *primers* e enzimas de restrições para genotipagem para PCR-RFLP

Nome SNP***	P*	Posição (pb)	Gene	BTA	Primers	pb**	Enzima de restrição	Sítio de restrição
rs43382671	A/G	27450468	<i>HDAC9</i>	4	5'-GGAGCCTTCTATCTGAGACATGATCTG-3' 5'-CGTGAATGTTTATGGTTTCAGAACTGC-3'	774	<i>BspLI (NlaIV)</i>	5'...G G N ↓ N C C...3' 3'...C C N ↑ N G G...5'
rs110494060	A/G	81043741	<i>ACTN1</i>	10	5'-GCAAGCAAGCAAGAAAGTCTCC-3' 5'-CGTATCTGAGGACAGCGTCAT-3'	874	<i>Eam1104I (EarI)</i>	5'...C T C T T C (N) ₁ ↓ ...3' 3'...G A G A A G (N) ₄ ↑ ...5'
rs137808561	A/C	6912776	<i>CMTM7</i>	22	5'-GCTATGGGGTGCAGTCACAC-3' 5'-GTGATGACGTGTAACACCTCTAC-3'	970	<i>Bcc1</i>	5'...C C A T C (N) ₄ ↓ ... 3' 3'...G G T A G(N) ₅ ↑ ... 5'
rs135145718	G/T	35989224	—	27	5'-CAGCAGAGCCTCGATCAGTCT -3' 5'-CGACTTAGCAGACTAACATTGCAG-3'	1287	<i>(PfeI) TfiI</i>	5'...G ↓ A W T C...3' 3'...C T W A ↑ G...5'

*P= variação do polimorfismo, **pb= tamanho do fragmento, ***nome do SNP: BovineHD0400007983= rs43382671, BovineHD1000023097= rs110494060, BovineHD2200002100= rs137808561, BovineHD2700010279= rs135145718.

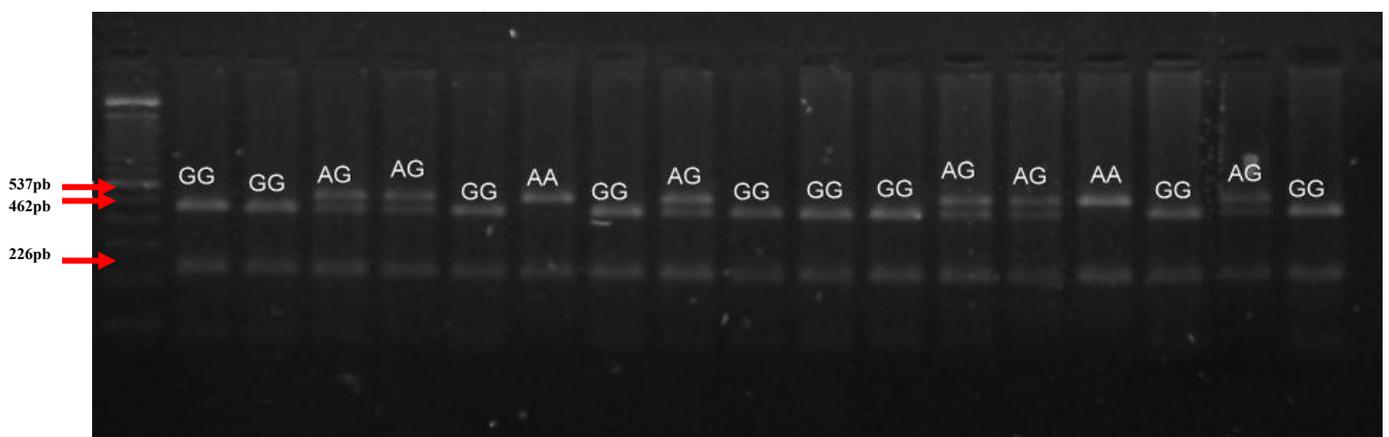
As concentrações ideais da PCR foram estabelecidas com: tampão da reação 1X, 0,165 μ M para cada *primer*, 0,2mM para cada dNTP, 1,5mM de MgCl₂, 0,65U de enzima *Taq* Polimerase e 120 ng de DNA em volume final de 15 μ L.

As concentrações ideais para o ensaio de digestão de enzimas para os SNPs rs43382671 (BTA4), rs135145718 (BTA27) e rs110494060(BTA10) foram: tampão da reação 1X e 1 U de enzima. Para rs137808561(BTA22) a concentração ideal do tampão e enzima de digestão foi 1X e 1,3 U de enzima, respectivamente.

2.6.3.1 SNP (BTA4)- rs43382671

Os animais que possuem o alelo A apresentam padrão de restrição com 2 fragmentos (537 e 226 pares de base) e, nos animais que possuem alelo G, o padrão de restrição é composto por 3 fragmentos (462, 226 e 75 pares de base). A análise do genótipo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. Para confirmar o padrão de restrição foram utilizadas amostras de animais com genótipos conhecidos (Figura 5).

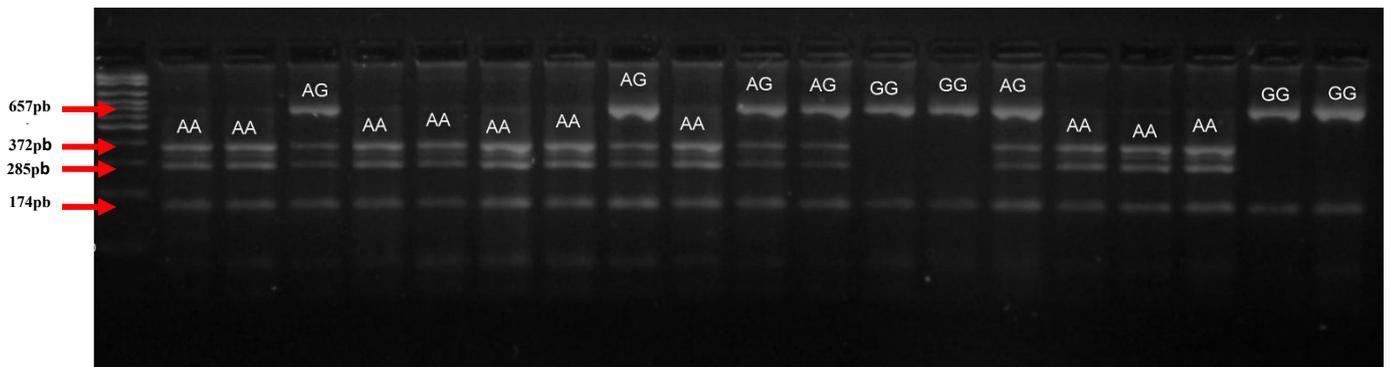
Figura 5: Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA4), os animais com alelo A apresentam os fragmentos de tamanhos de 537 e 226 pares de base (pb) e animais com o alelo G apresentam os fragmentos de tamanhos de 462, e 226 pb.



2.6.3.2 *SNP(BTA10)-rs110494060*

Os animais que possuem o alelo A apresentam padrão de restrição com 4 fragmentos (372, 285, 174 e 43 pares de base) e, nos animais que possuem alelo G, o padrão de restrição é composto por 3 fragmentos (657, 174 e 43 pares de base). A análise do genótipo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. Para confirmar o padrão de restrição foram utilizadas amostras de animais com genótipos conhecidos (Figura 6).

Figura 6: Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA10), os animais com alelo A apresentam os fragmentos de tamanhos de 372, 285 e 174 pares de base (pb) e animais com o alelo G apresentam os fragmentos de tamanhos de 657 e 174 pb.

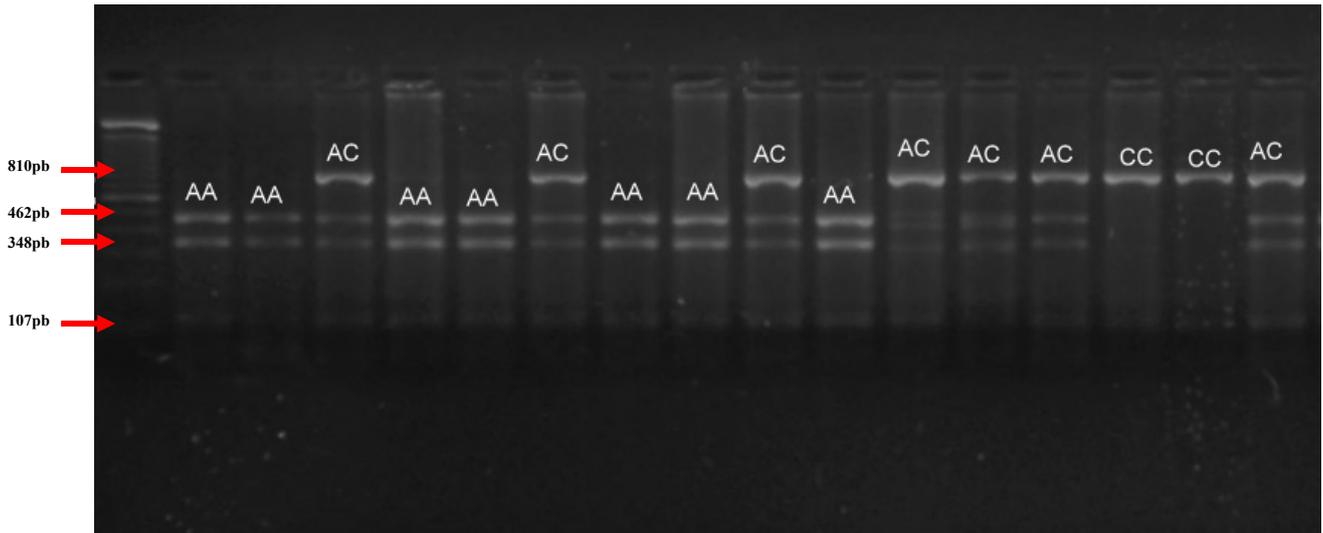


Fonte: arquivo pessoal

2.6.3.3 *SNP(BTA22)-rs137808561*

Os animais que possuem o alelo A apresentam padrão de restrição com 4 fragmentos (462, 348, 107 e 47 pares de base) e, nos animais que possuem alelo C, o padrão de restrição é composto por 3 fragmentos (810, 107 e 47 pares de base). A análise do genótipo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. Para confirmar o padrão de restrição foram utilizadas amostras de animais com genótipos conhecidos (Figura 7).

Figura 7: Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA22), os animais com alelo A apresentam os fragmentos de tamanhos de 462, 348 e 107 pares de base (pb) e animais com o alelo C apresentam os fragmentos de tamanhos de 810 e 107 pb.

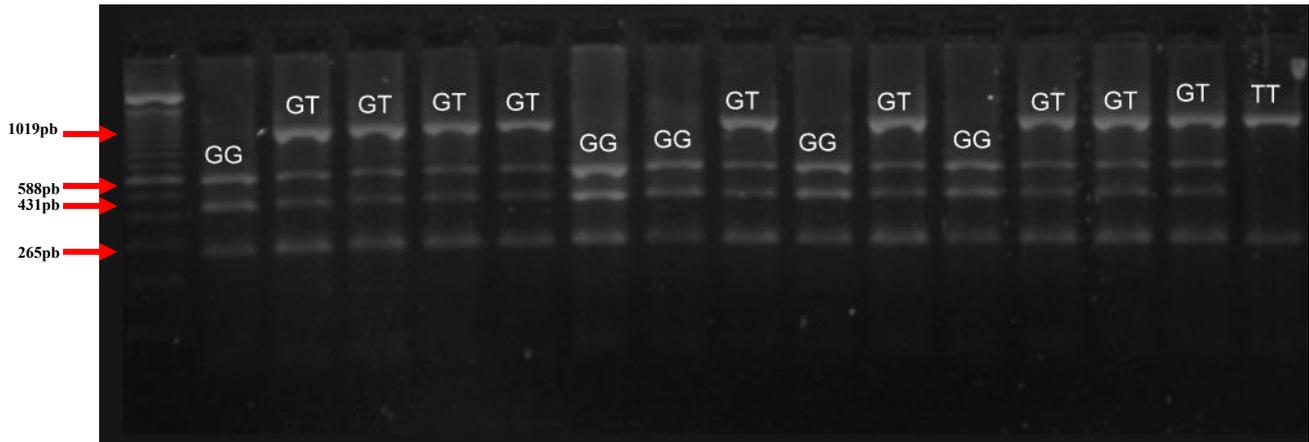


Fonte: arquivo pessoal

2.6.3.4 SNP(BTA27)- *rs135145718*

Os animais que possuem o alelo G apresentam padrão de restrição com 3 fragmentos (588, 431 e 265 pares de base) e, nos animais que possuem alelo T, o padrão de restrição é composto por 2 fragmentos (1019 e 265 pares de base). A análise do genótipo foi realizada por eletroforese em gel de agarose 3%. Para confirmar o padrão de restrição foram utilizadas amostras de animais com genótipos conhecidos (Figura 8).

Figura 8: Imagem do gel de Agarose 3% mostrando o padrão de restrição para o SNP (BTA27), os animais com alelo G apresentam os fragmentos de tamanhos de 588, 431 e 265 pares de base (pb) e animais com o alelo C apresentam os fragmentos de tamanhos de 1019 e 265 pb.



Fonte: arquivo pessoal

2.6.4 Frequências alélicas e genotípicas para os 4 SNPs de validação

Foram estimadas as frequências alélicas e genotípicas para cada SNP genotipado na população (Tabela 4).

Tabela 4: Frequência alélica e genotípica em porcentagem observados na amostra de validação de bovinos da raça Canchim.

SNP	Polimorfismo	Localização do SNP	Frequências (%)				
			Alélicas		Genotípicas		
rs43382671	A/G	Intron	A	G	AA	AG	GG
			21,00	79,00	6,58	29,18	64,23
rs110494060	A/G	Intron	A	G	AA	AG	GG
			66,00	34,00	44,39	43,30	12,31
rs137808561	A/C	Intron	A	C	AA	AC	CC
			51,00	49,00	25,88	50,08	24,04
rs135145718	G/T	Intergênica	G	T	GG	GT	TT
			72,00	28,00	54,18	35,55	10,27

As frequências genóticas e alélicas dos quatro SNPs selecionados na amostra da população de 400 animais da raça Canchim utilizados no estudo de associação genômica ampla para AOL se encontram na Tabela 5.

Tabela 5: Frequência alélica e genotípica em percentagem observados na amostra da população de 400 animais de bovinos da raça Canchim selecionados no estudo de associação genômica ampla para AOL.

SNP	Polimorfismo	Localização do SNP	Frequências (%)				
			Alélicas		Genóticas		
rs43382671	A/G	Intron	A	G	AA	AG	GG
			21,90	79,81	5,06	33,67	61,27
rs110494060	A/G	Intron	A	G	AA	AG	GG
			72,91	27,09	53,67	38,48	7,84
rs137808561	A/C	Intron	A	C	AA	AC	CC
			45,95	54,05	24,56	42,78	32,66
rs135145718	G/T	Intergênica	G	T	GG	GT	TT
			72,16	27,84	51,90	40,51	7,59

Observamos que para a amostra de validação apenas o rs43382671(BTA4) e o rs135145718(BTA27) apresentam as frequências alélicas semelhantes a amostra com 400 animais dos estudos iniciais. Estas diferenças entre as frequências alélicas podem ser relacionadas à distribuição da característica na população, visto que os dados de AOL para esses 400 animais foram selecionados pelo extremo dos resíduos dos valores genéticos e os dados da amostra de validação apresenta distribuição normal.

2.6.5 Influência dos marcadores sobre área de olho de lombo

Após as análises de frequências alélicas e genótípicas dos SNPs e todos superiores a 1%, analisamos a influência dos marcadores sobre os valores genéticos dos animais por análise de variância pelo procedimento GLM no SAS. Os resultados dessas análises encontram-se na Tabela 6.

Tabela 6: Resumo das análises de variância para efeito de classes de genótipos dos marcadores tipo SNP selecionados para validação sobre o valor genético (VGA) para área de olho de lombo em bovinos da raça Canchim.

Fonte de variação	N	Grau de liberdade	Valor de P	R ²
rs43382671(BTA4)	699	2	0,0013	0,0189
rs110494060(BTA10)	642	2	0,72	0,00099
rs137808561(BTA22)	599	2	0,20	0,0053
rs135145718(BTA27)	526	2	0,048	0,011

Das análises de variância realizadas para cada SNP, apenas os SNPs rs4338267(BTA4) e rs135145718(BTA27) apresentaram efeito significativo sobre VGA ($P \leq 0,05$), e com a amostra utilizada os SNPs rs110494060(BTA10) e rs137808561(BTA22) não apresentaram efeito significativo sobre VGA de AOL ($P > 0,05$) embora tenham sido

previamente selecionados pelo estudo de associação genômica ampla (GWAS) pela metodologia de Random Forest. Esse resultado demonstra a importância de submeter os achados de GWAS à validação.

A abordagem caso-controle investiga a possibilidade de associação entre determinada característica de interesse a um marcador. Desta maneira, amostras são selecionadas pelo extremo de valores fenotípicos ou genéticos e divididos em dois subgrupos distintos, espera-se que a diferença na frequência alélica de determinado variante presente nos subgrupos estejam associada com a característica em investigação, porém esse efeito significativo pode não ser ocasionado pelo marcador em estudo, mas pela estrutura da população (CARDON; BELL, 2001; CARDON; PALMER, 2003). Desta forma, a estratificação da população pode ocasionar viés nas análises de associação caso-controle devido à heterogeneidade nas frequências alélicas (THOMAS; WITTE, 2002).

Além disso, o tamanho amostral pode influenciar nos resultados das análises de associações, visto que quanto menor o efeito do marcador, maior deverá ser o tamanho amostral para detectar esse efeito (LANDER; BOTSTEIN, 1989) e sendo limitante para a maioria das características complexas que apresentam pequeno efeito sobre a maioria dos fenótipos de interesse (HIRSCHHORN; DALY, 2005). Portanto, o tamanho amostral deve ser aumentado até conseguirmos poder estatístico suficiente para detecção do efeito, e o tamanho ideal depende da magnitude da proporção da variância fenotípica e o loci individual que controla a mesma (ANDERSSON, 2009).

No presente estudo a população de validação representa a distribuição normal na qual os efeitos gênicos ficam mais “diluídos” quando comparados à amostragem de extremos utilizada no GWAS. Sendo assim, é possível que o tamanho amostral necessário para identificar efeitos significativos fosse superior do utilizado.

No estudo de associação genômica ampla para AOL pela abordagem Random Forest foi adotado o valor genético desregredidos (VGD) pela metodologia de Garrick et al., (2009) que visa minimizar o efeito da média dos ancestrais.

Nos valores genéticos estimados por BLUP a informação da progênie é viesada para a média dos pais (MRODE; THOMPSON, 2005). Por essa razão, há dois motivos para que os valores genéticos sejam desregredidos: nem todos os animais apresentam informações dos pais, de forma que esse viés varia entre os indivíduos, e em segundo lugar, se os pais estiverem segregando um grande efeito, apenas metade da prole receberá o alelo favorável, mas ambos descendentes (favorável e desfavorável) são “encolhidos” para a média dos pais (GARRICK et al., 2009).

Utilizamos os valores genéticos para as análises de validação, pois a seleção de reprodutores superiores é baseada nos valores da DEP (Diferença esperada na progênie), o qual é derivado diretamente do VGA(CARDOSO, 2009). Além disso, um estudo de Mokry et al. (2013b) nesses mesmos animais da raça Canchim, demonstrou que um conjunto de 21 SNPs, que explicavam aproximadamente 53% da variância do valor genético deregredidos para espessura de gordura subcutânea (EGS), apresentou acurácia de predição de 68% para VGA de EGS. Sendo assim, SNPs prospectados em dados de VGA derregredido teriam boa capacidade de predição de VGA.

2.6.5.1 GENE HDAC9- rs4338267(BTA4)

As histonas desacetilases têm papel importante no “empacotamento” do DNA na cromatina, atuam na desestabilização da interação histona-histona e histona-DNA e limitam o acesso dos fatores de transcrição na região promotora, desta maneira participam na condensação da cromatina inibindo o processo de transcrição (MCKINSEY et al., 2002).

O gene *HDAC9* pertence a classe II das *HDACs* (histonas desacetilases), sendo essa classe composta pelas *HDAC4* a *HDAC9*. Uma das funções das *HDACs* é a participação nas vias que regulam a diferenciação das células musculares. Para ativar a formação do músculo é necessário a interação do gene *MyoD* com os membros do *MEF2* (membros do fator de enhancer miócito 2). As *HDACs* interferem com essa interação e promove na inibição da miogênese. A classe II de *HDACs* atuam especificamente suprimindo a atividade da *MEF2* e essa inibição é relevante na diferenciação do tecido muscular (MCKINSEY et al., 2001; MCKINSEY et al., 2002).

2.6.5.1.1 Efeito de substituição alélica e de dominância

A significância do efeito de substituição alélica e de dominância para o SNP rs4338267(BTA4) foi avaliada pelo teste Wald F utilizando o software ASReml (tabela 7). Houve efeito significativo do desvio de dominância para esse SNP ($P \leq 0,05$), em detrimento ao efeito aditivo, sugerindo maior proporção de influência de efeitos genéticos não aditivos desse SNP sobre a característica. As variações genéticas não aditivas (dominância e epistasia) podem apresentar importante contribuição para variação da característica fenotípica (SU et al., 2012) e são geralmente desconsideradas pelos modelos de avaliação genética.

Tabela 7: Resumo da análise do efeito de substituição alélica e do efeito de dominância para o SNP rs4338267(BTA4)

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Valor de P	Efeito aditivo	Efeito de dominância
<i>rs4338267(BTA4)</i> *D	1	0,038	----	-0,44± 0,21
<i>rs4338267(BTA4)</i> **A	1	0,256	----	----

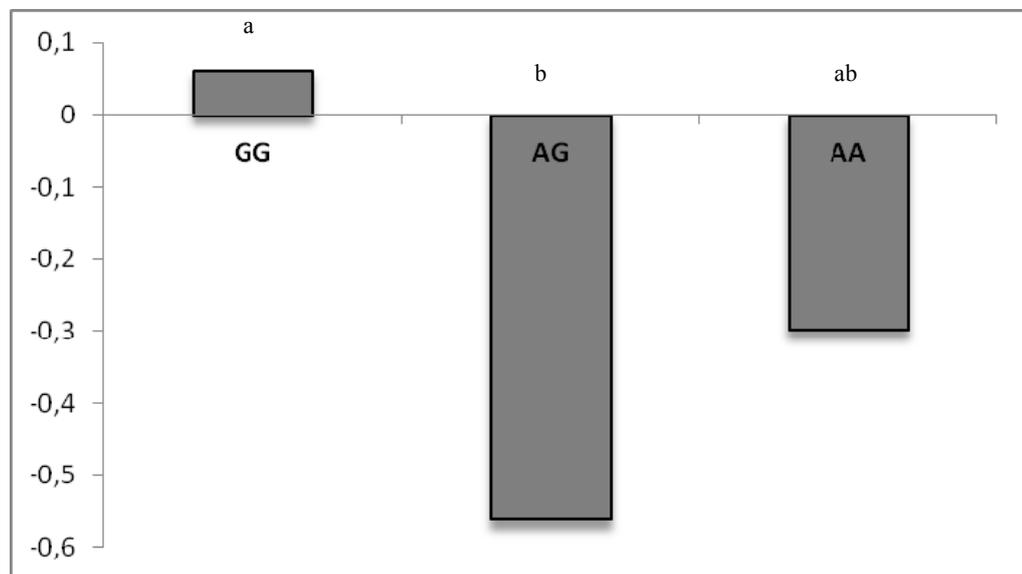
*efeito de dominância

** efeito aditivo

2.6.5.1.2 Comparação entre as médias genóticas do marcador sobre AOL

A comparação entre as médias por classe de genótipo foi realizada pelo teste de t ao nível de significância de 5% pelo procedimento “GLM” do SAS, mostrou diferença significativa entre as médias de VGA dos genótipos GG e AG.

Figura 9: Distribuição das médias de VGA por classe genotípica



*média: AA= -0,298; AG= -0,563; GG=0,061.

** as médias com letras iguais não se diferenciam entre si pelo teste t a 5% de significância.

Fonte: arquivo pessoal

Os resultados sugerem a influência dos efeitos genéticos não aditivos na variação genotípica desse marcador e aumentam a evidência do efeito de dominância do SNP.

Vuocolo et, al. (2012) analisou a expressão do gene *HDAC9* a partir de células de músculo de ovelhas que apresentavam hipertrofia muscular (*Callipyge*) e observaram a supressão da expressão no heterozigoto paternal, evidenciando o efeito negativo desse gene na regulação da miogênese.

2.6.5.2 Região intergênica no BTA 27- rs135145718

2.6.5.2.1 Efeito de Substituição alélica e efeito de dominância

O efeito de substituição alélica e de dominância para o SNP rs135145718(BTA27) foi avaliado pelo teste Wald F utilizando o software ASRepl (Tabela 8).

Tabela 8: Resumo da análise do efeito de substituição alélica e do efeito de dominância para o SNP rs135145718(BTA27)

Fonte de Variação	Grau de liberdade	Valor de P	Efeito aditivo	Efeito de dominância
rs135145718(BTA27)*D	1	0,823	----	----
rs135145718(BTA27)**A	1	0,043	0,309± 0,15	----

*efeito de dominância

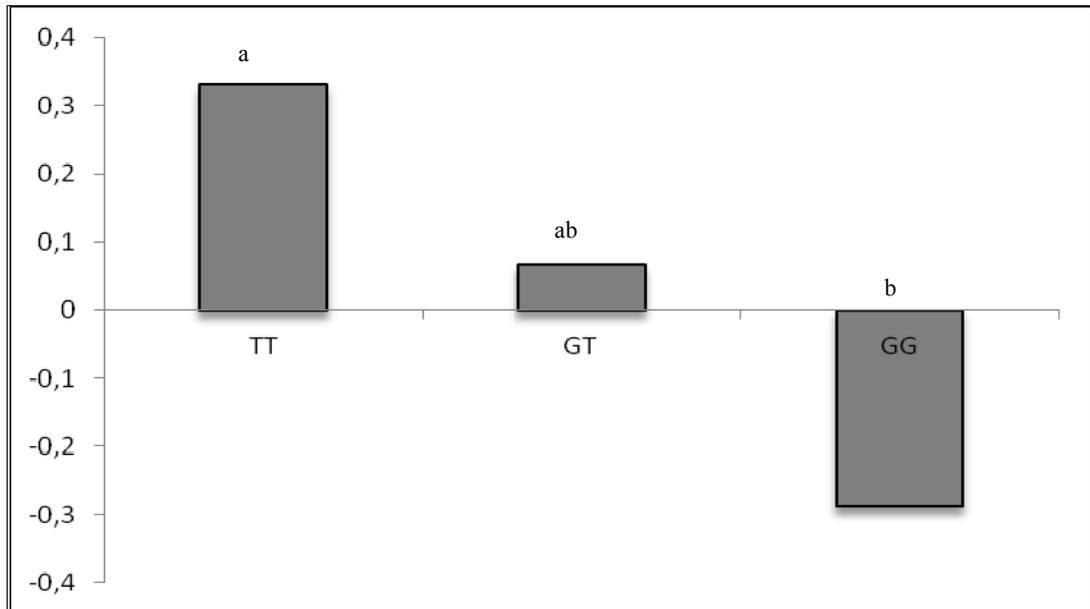
**efeito aditivo

Análise de substituição alélica indicou efeito significativo ($P \leq 0,05$) para o efeito aditivo do SNP rs135145718(BTA27) e sugere maior influência na variância genética aditiva. Esse marcador pode ser possível candidato para utilização em programas de melhoramento genético animal. No processo de transmissão do material genético, os descendentes recebem apenas um dos alelos dos genótipos dos pais e por essa razão o valor genético depende do efeito individual do alelo e não dos efeitos genéticos ocasionados por interação entre o par de alelos(KINGHORN et al., 2006).

2.6.5.2.2 Comparação entre as médias genóticas do marcador sobre AOL

A comparação entre as médias por cada classe de genótipo foi realizada pelo teste de t ao nível de significância de 5% pelo procedimento “GLM” do SAS e mostrou diferença significativa entre as médias de VGA dos genótipos TT e GG.

Figura 10: Distribuição das médias de VGA por classe genotípica



*média: GG= -0,286; GT= 0,067; TT= 0,331.

** as médias com letras iguais não se diferenciam entre si pelo teste t a 5% de significância.

Fonte: arquivo pessoal

A distribuição da média de VGA por classe genotípica sugere a herança genética aditiva desse marcador. Além disso, esse resultado sugere que o genótipo TT pode contribuir com maior área de olho de lombo para bovinos da raça Canchim.

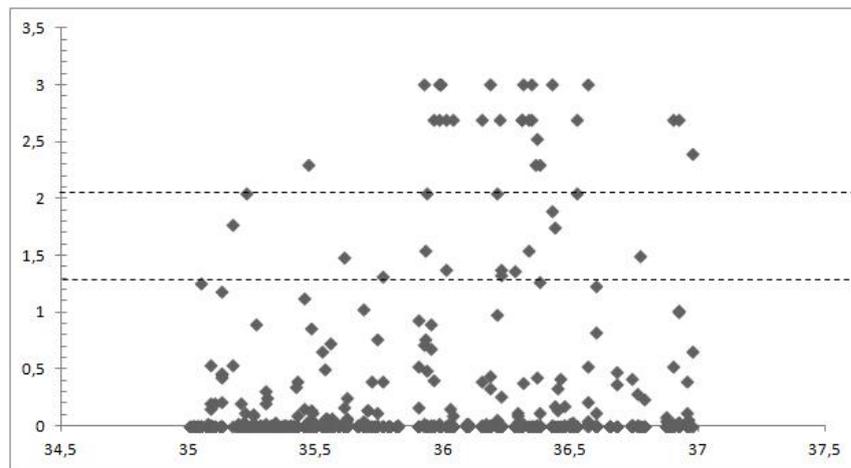
2.6.6 Estudo da associação de haplótipos com a característica AOL

As reconstruções dos blocos de desequilíbrio de ligação resultaram em 124 haplótipos e 659 combinações haplotípicas. A análise de associação de haplótipos com AOL resultou em 43 combinações haplotípicas associadas ($EMP2 \leq 0,05$) e a análise de associação por SNP resultou em 55 SNPs associados à característica ($P \leq 0,05$). A representação gráfica da distribuição das associações haplotípicas e associações de SNPs únicos se encontram nas Figuras 11 e 12 respectivamente.

Os resultados de ambas as análises foram visualizados no software online GBrowser e identificamos genes e QTLs presentes nessas regiões. Nos Anexo 2, Anexo 3 e Anexo 4 se

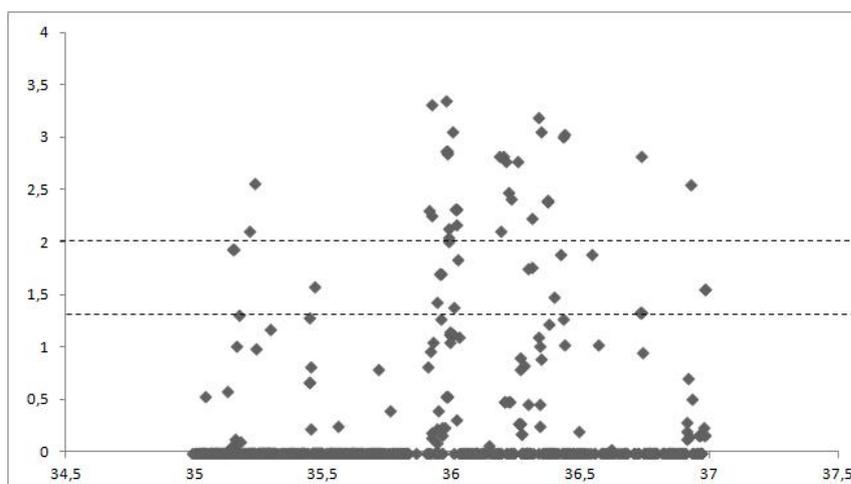
encontram os resultados das duas análises de associações com AOL e genes e QTLs identificados.

Figura 11: Distribuição das combinações haplotípicas na região de 2Mb do BTA 27 selecionada para os estudos de associação com a característica área de olho de lombo (AOL). A distribuição haplotípicas em função da localização em mega bases (Mb) (eixo x) pelo os valores empíricos de P ($-\log_{10}(\text{EMP}2)$) (eixo y). As linhas pontilhadas indicam as regiões que apresentavam os níveis de significância $\alpha=0,05$ (1,3) e $\alpha=0,01$ (2,0).



Fonte: Arquivo pessoal

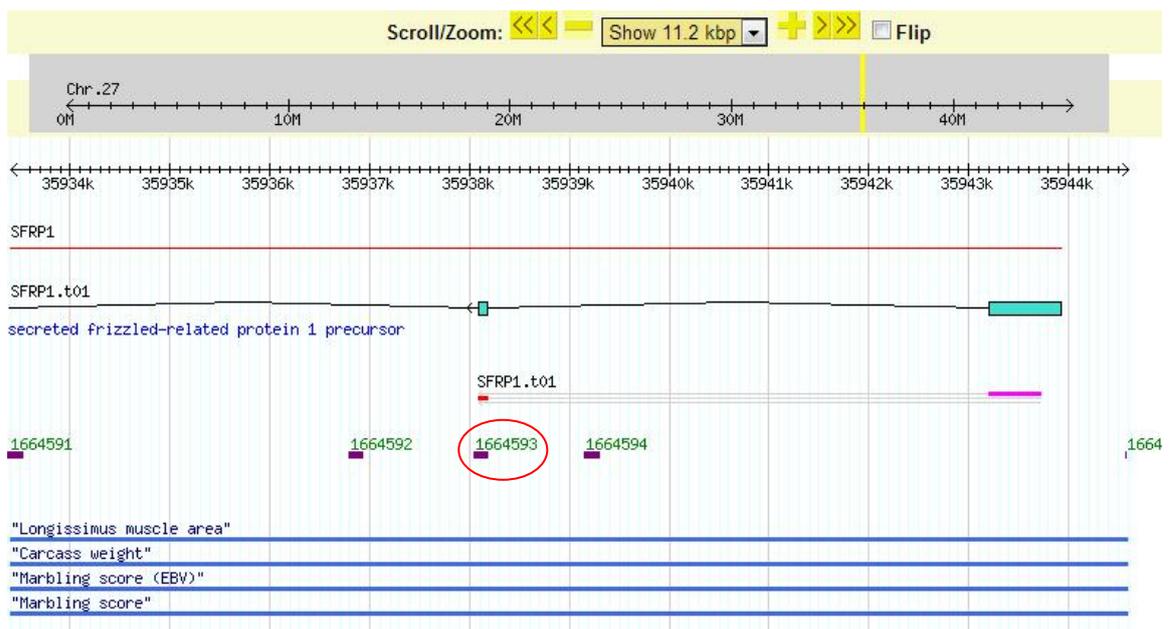
Figura 12: Distribuição dos SNPs na região de 2Mb do BTA 27 selecionada para os estudos de associação com a característica área de olho de lombo (AOL). A distribuição dos SNPs em função da localização em mega bases (Mb) (eixo x) pelo os valores de P ($-\log_{10}(P)$) (eixo y). As linhas pontilhadas indicam as regiões que apresentavam os níveis de significância $\alpha=0,05$ (1,3) e $\alpha=0,01$ (2,0).



Fonte arquivo pessoal

Os resultados das associações haplotípicas e de SNP único indicaram duas regiões semelhantes associadas com AOL. Na primeira região no BTA 27 que abrange a área localizada entre 35,91 Mb a 36,007 Mb encontramos a presença do gene *SFRP1*. Além disso, o SNP selecionado para análise de validação encontra-se no haplótipo localizado na região 35985713pb a 36001607pb com duas combinações haplotípicas associadas com AOL ($EMP2 \leq 0,05$). O SNP rs137209591(BTA27) associado com AOL ($P \leq 0,05$) também foi observado em desequilíbrio de ligação com outros 4 SNPs (Figura 13) e uma das combinações haplotípicas associada a AOL ($EMP2 \leq 0,05$) e próximo a região de exon do gene *SFRP1*.

Figura 13: Imagem da região em desequilíbrio de ligação que abrange o SNP BovineHD2700010252 (rs137209591) localizada entre 35933406pb a 35944602pb.



Fonte: arquivo pessoal

Esses resultados sugerem que o gene *SFRP1* possa apresentar uma mutação que influencie a característica em estudo. No entanto, necessita-se de estudos mais aprofundados para investigar a presença de mutações causais que estejam influenciando a variação de AOL.

O gene *SFRP1* pertence a família das *SRFPs* (*Secreted frizzled-related protein*), que são reguladores extracelulares da via canônica de sinalização Wnt (DESCAMPS et al., 2008), atuando na inibição dessa via de sinalização na fase de formação dos mioblastos (AKIMOTO et al., 2005).

As células musculares e adipócitos são derivadas das células mensesquimais (MSCs), e a via de sinalização Wnt é importante para a decisão na formação de célula muscular ou de gordura. Além disso, na regeneração muscular a atividade da via canônica sinalizadora Wnt é suprimida durante a fase da miogênese (ROSS et al., 2000).

Na segunda região no BTA 27 localizada entre 36,27 Mb a 36,42 Mb encontram-se os genes *LOC784372* proteínas *homeobox Nkx-6.3-like*, *AGPA76*, *ANK1* e *miR-486* (miRNA). Observamos também várias combinações haplotípicas significativas para AOL (Anexo 2) presentes no gene *ANK1* (*ankyrin 1, erythrocytic*).

O gene *ANK1* pertence à família das anquirinas que são proteínas envolvidas na ligação do citoesqueleto às membranas de organelas intracelulares e, desta maneira, possuem locais de ligação para as proteínas de membranas e as proteínas do citoesqueleto. Além disso, as anquirinas encontram-se nas miofibrilas esqueléticas (RUBTSOV & LOPINA, 2000). Relatos de Gallagher e Forget (1998), mostrou a anquirina do tipo 1 presentes em células musculares e cerebrais.

O micro-RNA (miR-486) localizado no gene *ANK1*, controla diretamente a transcrição de diferentes genes e fatores regulatórios envolvidos com a formação de músculo, tais como o gene *MyoD* (SMALL et al., 2010). Portanto, está envolvido na diferenciação dos mioblastos e desempenha papel importante na diferenciação do músculo esquelético (DEY et al., 2011).

2.7 Conclusão

De quatro SNPs apontados por metodologia de associação em escala genômica, os dois SNPs rs4338267(BTA4) e rs135145718(BTA27) tiveram suas associações com área de olho de lombo em animais Canchim. O SNP rs4338267(BTA4) apresenta efeito de dominância e influência genética não-aditiva sobre os valores genéticos de AOL, enquanto que o SNP rs135145718(BTA27) apresenta efeito significativo de substituição alélica (efeito aditivo), sendo promissor candidato para utilização em programa de seleção genética para a raça Canchim com o objetivo de melhorar a área de olho de lombo. As análises de associações de haplótipos e de SNP único na região do BTA 27 indicaram duas regiões nos genes *SRFPI* e *ANKI* que podem estar envolvidas no metabolismo de área de olho de lombo. Esse resultado reforça a importância da validação dos resultados de GWAS.

Os resultados encontrados nesse estudo podem contribuir para programas de seleção de carcaça em bovinos da raça Canchim, porém outros estudos mais aprofundados nas regiões relatadas são de suma importância para viabilizar essas informações para programas de melhoramento de carcaça de bovinos da raça Canchim.

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIMOTO, T. et al. Mechanical stretch inhibits myoblast-to-adipocyte differentiation through Wnt signaling. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 329, n. 1, p. 381-5, 2005.
- ALENCAR, M.M. **Bovino - Raça Canchim: Origem e desenvolvimento EMBRAPA-DPU**, Brasília, p.102, 1988.
- ALENCAR, M.M. Utilização do touro Canchim em cruzamento comercial. **EMBRAPA – CPPSE.Documentos**, v.24, p.20, 1994.
- AMSILI, S. et al. UDP-N-acetylglucosamine 2-epimerase/N-acetylmannosamine kinase (GNE) binds to alpha-actinin 1: novel pathways in skeletal muscle? **PLoS One**, v. 3, n. 6, p. 2477, 2008.
- ANDERSSON, L. Genome-wide association analysis in domestic animals: a powerful approach for genetic dissection of trait loci. **Genetica**, v. 136, n. 2, p. 341-9, 2009.
- ANUALPEC. Anuário da Pecuária Brasileira. **São Paulo**, v. Informa Economics FNP, 2012, p. 378, 2012.
- ARDLIE, K.G.; KRUGLYAK, L.; SEIELSTAD, M. Patterns of linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Rev Genet**, v. 3, n. 4, p. 299-309, 2002.
- ASHBURNER, M. et al. Gene Ontology: tool for the unification of biology. **Nature Genetics**, v. 25, n. 1, p. 25-29, 2000.
- AUSUBEL, F.M. et al. Short protocols in molecular biology: A compendium of methods from current protocols in molecular biology. **New York: John Wiley and Sons**. p.1512, 2002.
- BARBOSA, P.F. A raça Canchim em cruzamentos para a produção de carne bovina **EMBRAPA - Pecuária Sudeste**. Circular técnica, v.36, p. 29, 2004.
- BARENDSE, W. et al. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v. 176, n. 3, p. 1893-905, 2007.
- BARRETT, J.C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-5, 2005.
- BASSEL-DUBY, R.; OLSON, E.N. Signaling pathways in skeletal muscle remodeling. **Annu Rev Biochem**, v. 75, p. 19-37, 2006.
- BOLDMAN, K.G.; KRIESE, L.A.; VAN VLECK, L.D. A manual for use of MTDFREML. A set of programs to obtain estimates of variances and covariances [DRAFT]. Lincoln: Department of Agriculture, Agricultural Research Service. p.120, 1995.

- BORÉM, A.; CAIXETA, E.T. Marcadores Moleculares. v.2º, p.532, Viçosa, 2009.
- BROWNING, S.R.; BROWNING, B.L. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 5, p. 1084-97, 2007.
- CAETANO, A.R. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia** v. 38, p. 64-71, 2009.
- CAETANO, S.L. et al. Estimates of genetic parameters for carcass, growth and reproductive traits in Nellore cattle. **Livestock Science**, v. 155, n. 1, p. 1-7, 2013.
- CARDON, L.R.; ABECASIS, G.R. Using haplotype blocks to map human complex trait loci. **Trends Genet**, v. 19, n. 3, p. 135-40, 2003.
- CARDON, L.R.; BELL, J.I. Association study designs for complex diseases. **Nat Rev Genet**, v. 2, n. 2, p. 91-9, 2001.
- CARDON, L.R.; PALMER, L.J. Population stratification and spurious allelic association. **Lancet**, v. 361, n. 9357, p. 598-604, 2003.
- CARDOSO, F.F. Ferramentas e Estratégias para o Melhoramento Genético de Bovinos de Corte. Bagé: EMBRAPA **Pecuária Sul Documentos**, v.83. p.42, 2009.
- COUTINHO, L.L.; ROSÁRIO, M.F.D.; JORGE, E.C. Biotecnologia animal. estudos avançados, v. 24, n. 70, p. 123-147, 2010.
- PEROTTO, D.; ABRAHÃO, J.J.S.; MOLETTA, J. L. Características Quantitativas de Carcaça de Bovinos Zebu e de Cruzamentos Bos taurus x Zebu. **Revista Brasileira de Zootecnia**, p. 2019-2029, 2000.
- DE ROOS, A.P. et al. Linkage disequilibrium and persistence of phase in Holstein-Friesian, Jersey and Angus cattle. **Genetics**, v. 179, n. 3, p. 1503-12, 2008.
- DEKKERS, J.C. Commercial application of marker- and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **J Anim Sci**, v. 82 E-Suppl, p. 313-328, 2004.
- DEKKERS, J.C. Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 124, n. 6, p. 331-341, 2007.
- DENNIS, G., JR. et al. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. **Genome Biol**, v. 4, n. 5, p. P3, 2003.
- DESCAMPS, S. et al. Inhibition of myoblast differentiation by Sfrp1 and Sfrp2. **Cell Tissue Res**, v. 332, n. 2, p. 299-306, 2008.
- DEY, B.K.; GAGAN, J.; DUTTA, A. miR-206 and -486 induce myoblast differentiation by downregulating Pax7. **Mol Cell Biol**, v. 31, n. 1, p. 203-14, 2011.

FALCONER, D.; MACKAY, T., Eds. **Introduction to quantitative genetics**. U.K: Longman Group Ltd, v.4, p.456, 1996.

FELÍCIO, P.E. Qualidade de carne Nelore e mercado mundial. In: SEMINÁRIO DO PMGRN: COMEMORAÇÃO DOS 32 ANOS DO GEMAC, 9., 2000. **Palestras...** Ribeirão Preto. Faculdade de medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2000. p.1-10.

GALLAGHER, P.G.; FORGET, B.G. An alternate promoter directs expression of a truncated, muscle-specific isoform of the human ankyrin 1 gene. **J Biol Chem**, v. 273, n. 3, p. 1339-48, 1998.

GARRICK, D.J.; TAYLOR, J.F.; FERNANDO, R.L. Deregressing estimated breeding values and weighting information for genomic regression analyses. **Genet Sel Evol**, v. 41, p. 55, 2009.

GILMOUR, A.R.G., B.J.; CULLIS, B.R.; THOMPSON, R., Ed. **ASReml User Guide Release 3.0**. UK: Hemel Hempstead. 2009

GONDRO, C.W., J. V. D.; HAYES, B. Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction. *Methods in Molecular Biology*. **Humana Press**. p.1019-566, 2013.

GREINER, S.P. et al. The relationship between ultrasound measurements and carcass fat thickness and lonizissimus muscle area in beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 81, n. 3, p. 676-682, 2003.

GUEDES, C.F. Desempenho produtivo e características de carcaça das progênies de touros representativos da raça Nelore e de diferentes grupos genéticos. 2005. p.72. **Dissertação (mestrado em Zootecnia)**. Pirassununga, SP. Universidade de São Paulo - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2005.

HAMAJIMA, N. et al. Polymerase chain reaction with confronting two-pair primers for polymorphism genotyping. **Japanese Journal of Cancer Research**, v. 91, n. 9, p. 865-868, 2000.

HAN, W.W.Y.L. et al. CMTM, a novel family of proteins linking classical chemokines and TM4SF with multiple important functions. In: INTERNATIONAL CONGRESS OF IMMUNOLOGY, 14.,2010,Japan. **Anais...** Kobe, Japan, 2010.

HAYES, B. **Ben Hayes - Courses notes**. Toulouse, France, 2011. p.110.

HILL, W.G.; ROBERTSON, A. Linkage disequilibrium in finite populations. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 38, n. 6, p. 226-231, 1968.

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

HOU, G.Y. et al. Genetic polymorphisms of the CACNA2D1 gene and their association with carcass and meat quality traits in cattle. **Biochem Genet**, v. 48, n. 9-10, p. 751-9, 2010.

- HU, Z.L.; FRITZ, E.R.; REECY, J.M. AnimalQTLdb: a livestock QTL database tool set for positional QTL information mining and beyond. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 604-609, 2007.
- JOHNSTON, D.J. et al. Estimates of genetic parameters for growth and carcass traits in Charolais cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 72, n. 3, p. 493-499, 1992.
- KHATKAR, M.S. et al. Extent of genome-wide linkage disequilibrium in Australian Holstein-Friesian cattle based on a high-density SNP panel. **BMC Genomics**, v. 9, p. 187, 2008.
- KIM, S.; MISRA, A. SNP genotyping: Technologies and biomedical applications. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 9, p. 289-320, 2007.
- KIM, Y. et al. Genome-wide association study reveals five nucleotide sequence variants for carcass traits in beef cattle. **Anim Genet**, v. 42, n. 4, p. 361-5, 2011.
- KINGHORN, B. et al. Melhoramento animal: uso de novas tecnologias. **FEALq**, p.367, Piracicaba, 2006.
- KRUGLYAK, L. The road to genome-wide association studies. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 4, p. 314-8, 2008.
- LANDER, E.S.; BOTSTEIN, D. Mapping Mendelian Factors Underlying Quantitative Traits Using Rflp Linkage Maps. **Genetics**, v. 121, n. 1, p. 185-199, 1989.
- LEE, S.H. et al. Genome wide QTL mapping to identify candidate genes for carcass traits in Hanwoo (Korean Cattle). **Genes & Genomics**, v. 34, n. 1, p. 43-49, 2012.
- LEWONTIN, R.C. The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. **Genetics**, v. 49, n. 1, p. 49-67, 1964.
- LIMA NETO, H.R. et al. Parâmetros genéticos para características de carcaça avaliadas por ultrassonografia em bovinos da raça Guzerá. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 61, p. 251-258, 2009.
- LU, D. et al. Genome-wide association analyses for carcass quality in crossbred beef cattle. **BMC Genet**, v. 14, n. 1, p. 80, 2013.
- MAO, X.Z. et al. Automated genome annotation and pathway identification using the KEGG Orthology (KO) as a controlled vocabulary. **Bioinformatics**, v. 21, n. 19, p. 3787-3793, 2005.
- MARIANTE, A.S. et al. Resultados do controle de desenvolvimento ponderal. Raça Nelore. **Documentos EMBRAPA - CNPGC**. Campo Grande, v.25, p.76, 1984.
- MARTINEZ, M.L.; MACHADO, M.A. Programa genoma brasileiro de bovinos e suas perspectivas de aplicações práticas. In : IV SIMPÓSIO NACIONAL DE MELHORAMENTO ANIMAL, 4.,2002, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBMA, 2002.

- MCCARTHY, M.I. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nat Rev Genet**, v. 9, n. 5, p. 356-69, 2008.
- MCCLURE, M.C et al. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Anim Genet**, v. 41, n. 6, p. 597-607, 2010.
- MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. Control of muscle development by dueling HATs and HDACs. **Curr Opin Genet Dev**, v. 11, n. 5, p. 497-504, 2001.
- MCKINSEY, T.A.; ZHANG, C.L.; OLSON, E.N. Signaling chromatin to make muscle. **Curr Opin Cell Biol**, v. 14, n. 6, p. 763-72, 2002.
- MEIRELLES, S.L. et al. Candidate gene region for control of rib eye area in Canchim beef cattle. **Genet Mol Res**, v. 10, n. 2, p. 1220-6, 2011.
- MERCADANTE, M.E.Z. et al. Repetibilidade da mensuração de imagens das características de carcaça obtidas por ultrassonografia em fêmeas Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 39, p. 752-757, 2010.
- MEUWISSEN, T.H., B; GODDARD, M. Accelerating improvement of livestock with genomic selection. **Annual Review of Animal Biosciences**, v. 1 p. 221-237, 2013.
- MIZOSHITA, K. et al. Quantitative trait loci analysis for growth and carcass traits in a half-sib family of purebred Japanese Black (Wagyu) cattle. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 12, p. 3415-3420, 2004.
- MOKRY, F.B. et al. Genome-wide association study for backfat thickness in Canchim beef cattle using Random Forest approach. **BMC Genet**, v. 14, p. 47, 2013a.
- MOKRY, F.B. et al. Predictive ability and genotype frequencies of a set of SNPs for backfat thickness in Canchim. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOCTENIA, 50, 2013, Campinas. **Anais...** Campinas, SP, 2013b
- MRODE, R.; THOMPSON, R. Linear models for the prediction of animal breeding values. Cambridge: **Cabi Publishing**. 2005, p.344.
- MULLIS, K.B. The unusual origin of the polymerase chain reaction. **Sci Am**, v. 262, n. 4, p. 56-61, 64-5, 1990.
- NALAILA, S.M. et al. Whole-genome QTL scan for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle using Bayesian shrinkage method. **J Anim Breed Genet**, v. 129, n. 2, p. 107-19, 2012.
- PETERS, S.O. et al. Bayesian genome-wide association analysis of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. **J Anim Sci**, v. 90, n. 10, p. 3398-409, 2012.
- POLINENI, P. et al. The bovine QTL viewer: a web accessible database of bovine Quantitative Trait Loci. **Bmc Bioinformatics**, 7:283, 2006.

POURZAND, C.; CERUTTI, P. Genotypic mutation analysis by RFLP/PCR. **Mutat Res**, v. 288, n. 1, p. 113-21, 1993.

PURCELL, S. PLINK (1.07).Reference manual. **Disponível em:** <<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/pdf.shtml>>. Acesso em 15 out. 2013.2010.

PURCELL, S. et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. **Am J Hum Genet**, v. 81, n. 3, p. 559-75, 2007.

REGITANO, L.C.A.; COUTINHO, L.L. **Biotecnologia molecular aplicada a produção animal**. Brasília Embrapa Informação tecnológica, p.36, 2001.

REGITANO, L.C.A.; VENERONI, G.B. Marcadores moleculares e suas aplicações no melhoramento animal. In: Simpósio de Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal.,2, 2009, São Carlos. **Anais...** Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, 2009.

ROSS, S.E. et al. Inhibition of adipogenesis by Wnt signaling. **Science**, v. 289, n. 5481, p. 950-3, 2000.

RUBTSOV, A.M.; LOPINA, O.D. Ankyrins. **FEBS Lett**, v. 482, n. 1-2, p. 1-5, 2000.

SCHEET, P.; STEPHENS, M. A fast and flexible statistical model for large-scale population genotype data: applications to inferring missing genotypes and haplotypic phase. **Am J Hum Genet**, v. 78, n. 4, p. 629-44, 2006.

SCHOONOVER, C.O.; STRATTON, P.O. A photographic grid used to measure rib eye areas. **Journal of Animal Science**, v. 16, n. 4, p. 957-960, 1957.

SERVICE, S. et al. Magnitude and distribution of linkage disequilibrium in population isolates and implications for genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v. 38, n. 5, p. 556-60, 2006.

SJOBLOM, B.; SALMAZO, A.; DJINOVIC-CARUGO, K. Alpha-actinin structure and regulation. **Cell Mol Life Sci**, v. 65, n. 17, p. 2688-701, 2008.

SMALL, E.M. et al. Regulation of PI3-kinase/Akt signaling by muscle-enriched microRNA-486. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 107, n. 9, p. 4218-23, 2010.

STEIN, L.D. et al. The generic genome browser: a building block for a model organism system database. **Genome Res**, v. 12, n. 10, p. 1599-610, 2002.

SU, G. et al. Estimating additive and non-additive genetic variances and predicting genetic merits using genome-wide dense single nucleotide polymorphism markers. **PLoS One**, v. 7, n. 9, p. e45293, 2012.

THOMAS, D.C.; WITTE, J.S. Point: population stratification: a problem for case-control studies of candidate-gene associations? **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 11, n. 6, p. 505-12, 2002.

- TIZIOTO, P.C. Genes Candidatos para característica de produção de carne em famílias de referência da raça Nelore. 2010. p.105. **Dissertação (Mestrado em genética e evolução)**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2010.
- TURNER, J.W.; PELTON, L.S.; CROSS, H.R. Using live animal ultrasound measures of ribeye area and fat thickness in yearling Hereford bulls. **J Anim Sci**, v. 68, n. 11, p. 3502-6, 1990.
- VIANA, A.T.; GOMES, F.P.; SANTIAGO, M. Formação do gado Canchim pelo cruzamento Charolês-Zebu. **São Paulo, Livraria Nobel**, v. 2.ed., p. 193 1978.
- VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol**, v. 34, n. 3, p. 275-305, 2002.
- VILLA-ANGULO, R. et al. High-resolution haplotype block structure in the cattle genome. **BMC Genet**, v. 10, p. 19, 2009.
- VINCZE, T.; POSFAI, J.; ROBERTS, R.J. NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. **Nucleic Acids Res**, v. 31, n. 13, p. 3688-91, 2003.
- VISSCHER, P.M. et al. Five years of GWAS discovery. **Am J Hum Genet**, v. 90, n. 1, p. 7-24, 2012.
- VUOCOLO, T. et al. Histone deacetylase 9 is a negative regulator of myogenesis. In: CONFERENCE OF THE INTERNATIONAL SOCIETY OF ANIMAL GENETICS, 33., 2012, Australia. **Anais...** Cairns, Australia, 2012.
- WALL, J.D.; PRITCHARD, J.K. Haplotype blocks and linkage disequilibrium in the human genome. **Nat Rev Genet**, v. 4, n. 8, p. 587-97, 2003.
- WATANABE, T. et al. Estimation of variance components for carcass traits in Japanese Black cattle using 50K SNP genotype data. **Anim Sci J**, 2013.
- WHITE, B.A., Ed. PCR protocols: current methods and applications: Totowa: **Humana Press**, 1993, p.391.
- WILLIAMS, A.R. Ultrasound applications in beef cattle carcass research and management. **Journal of Animal Science** v. 80, p. 183-188, 2002.
- YE, J. et al. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **Bmc Bioinformatics**, v. 13, p. 134, 2012.
- YOKOO, M.J.I. et al. Correlações genéticas entre escores visuais e características de carcaça medidas por ultrassom em bovinos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 44, p. 197-202, 2009.
- YOKOUCHI, K. et al. Identification of a 3.7-Mb region for a marbling QTL on bovine chromosome 4 by identical-by-descent and association analysis. **Anim Genet**, v. 40, n. 6, p. 945-51, 2009.

ZHANG, H. et al. Progress of genome wide association study in domestic animals. **J Anim Sci Biotechnol**, v. 3, n. 1, p. 26, 2012.

ZUIN, R.G. et al. Genetic analysis on growth and carcass traits in Nelore cattle. **Meat Sci**, v. 91, n. 3, p. 352-7, 2012.

ANEXO 1

Descrição da posição, genes, vias metabólicas, QTLs é número de SNPs por bloco realizado para o conjunto de 197 SNPs selecionados pelo estudo genômica ampla (GWAS) por Random Forest

Nome	Chr*	pb**	Gene	Via metabólica	QTL	Genes no bloco	Nº de SNPs***
ARS-BFGL-NGS-114975	1	156710174			PC		5
BovineHD0100001866	1	5743074	<i>GRIK1</i>	Canais de Ca ⁺⁺	EG12, AOL, MA		
BovineHD0100002558	1	8077272			EG12, AOL, MA		
BovineHD0100025647	1	90152511			MA, PC		
BovineHD0100031666	1	111959466			MA, PC, AOL		8
BovineHD0100031667	1	111960607			MA, AOL, PC		8
BovineHD0100039253	1	137488635	<i>TMEM108</i>	Proteína transmembrana , local de glicosilação, peptídeo sinal, transmembrana,	MA, PC, AOL		16
BovineHD0100041864	1	144974912			MA, PC, AOL		
BovineHD0100045805	1	156709560			EG12, AOL, PC		5
ARS-BFGL-NGS-16565	2	59842148	<i>LOC100336727/</i> <i>THSD7B</i>		AOL, MA, PC		2
BovineHD0200004387	2	15435147			AOL, MA, PC		11
BovineHD0200008334	2	28464136			AOL, MA, PC		
BovineHD0200012572	2	43526782			PC, AOL, MA	<i>LOC615401</i>	6
BovineHD0200012958	2	44678511	<i>NEB</i>	Músculo esquelético humano, filamento actina, diferenciação células musculares, sârcomero, desenvolvimento do músculo estriado	PC, AOL, MA		3

BovineHD0200014288	2	49510774			AOL, MA, PC		16
BovineHD0200015081	2	52893032	<i>GTDC1</i>	Glicosiltransferase	AOL, PC, EGS		14
BovineHD0200017023	2	59847088	<i>LOC100336727/</i> <i>THSD7B</i>		AOL, MA, PC		2
BovineHD0200029047	2	101226841			AOL, MA, PC, YG		2
BovineHD0200032254	2	111954903			AOL, YG, PC, MA		6
BovineHD0200033325	2	115604080			PC,AOL,YG		5
BovineHD0300001597	3	5166709			PC, MA, AOL,		10
BovineHD0300001627	3	5276417			PC AOL, MA		
BovineHD0300002921	3	8828101	<i>CD244</i>	Glicoproteína imunoglobulina ,membrana , fosfoproteína, transmembrana	PC, AOL, MA	<i>LY9</i>	16
BovineHD0300002924	3	8837781	<i>LY9</i>	Glicoproteína ,imunoglobulina ,membrana, transmembrana Desenvolvimento muscular,	PC, AOL, MA	<i>CD244</i>	16
BovineHD0400007983	4	27450468	<i>LOC535415 /</i> <i>HDAC9</i>	desenvolvimento esqueleto do tecido muscular, diferenciação celular e fibras musculares	PC, EGS		2
BovineHD0400011755	4	42939320	<i>MAGI2</i>	Junção célula, membrana celular, membrana, fosfoproteína ,canais de Ca ⁺⁺	MA,EGS		
BovineHD0400015741	4	57740293	<i>IMMP2L</i>		AOL, MA		5
BovineHD0400015743	4	57747079	<i>IMMP2L</i>		AOL ,MA		5
BovineHD0400015761	4	57788092	<i>IMMP2L</i>		AOL, MA		7
BovineHD0400022952	4	83021304			MA, EGS		2
BovineHD0400028669	4	102022791	<i>DGKI</i>	Metabolismo de lipídios e sistema de sinalização fosfatidilinositol	MA, EGS		4
BovineHD0400034243	4	117400491	<i>DPP6</i>	Glicoproteína , membrana , transmembrana	MA		3
ARS-BFGL-NGS-15778	5	111227019			YG, MA, EG12, AOL	<i>RP13,</i> <i>SYNGRI,MIR2440</i>	28

BovineHD0500009818	5	33845510			EG12, MA, AOL		
BovineHD0500011124	5	38872418			MA, AOL, PC		8
BovineHD0500022525	5	79487407			EG12, MA, AOL		5
BovineHD0500022526	5	79491524			EG12, MA, AOL		5
BovineHD0500031730	5	110042959			MA		17
BovineHD0500032149	5	111248857			EG12, MA, AOL	<i>RP13,</i> <i>SYNGR1, MIR2440</i>	28
BovineHD0500034608	5	118823710			MA, PC		2
BovineHD0500035142	5	120396268			MA, PC		7
BTA-105159-no-rs	5	33195704	<i>FAM113B</i>		MA, AOL		13
BovineHD0600000710	6	2831836			EG12, MA, AOL		11
BovineHD0600000712	6	2845181			EG12, MA, AOL		11
BovineHD0600000715	6	2859886			EG12, MA, AOL		11
BovineHD0600017060	6	61852559	<i>LIMCHI</i>	Citoesqueleto, organizaçã actina, processo de filament , organização do citoesqueleto de actina	LMA, EG12 ,AOL, PC, MA		2
BovineHD0600027384	6	98468713					4
BovineHD0600029032	6	104158730	<i>SPARCLI</i>	ion cálcio ligação , ligação iônica , ligação catiônica , ligação de íons metálicos ,			8
BovineHD0600030529	6	108349063					4
BovineHD0600030533	6	108355687					7
BovineHD0600030994	6	110084640					
BovineHD0600031308	6	110816447			MA		10
BovineHD0600031312	6	110833182			MA		10
BovineHD0600031332	6	110897291			MA		7
BovineHD0700014459	7	49959857			PC, MA ,AOL		
BovineHD0700014522	7	50132651	<i>SPOCK1</i>	ion cálcio ligação , ligação iônica , ligação catiônica , ligação de íons metálicos	PC, MA, AOL		5

BovineHD0700014523	7	50134479	<i>SPOCK1</i>		PC, MA, AOL	
BovineHD0700014535	7	50147404	<i>SPOCK1</i>		PC, MA, AOL	3
BovineHD0700014540	7	50159011	<i>SPOCK1</i>		PC, MA, AOL	5
BovineHD0700014541	7	50161838	<i>SPOCK1</i>		PC, MA, AOL	5
BovineHD0700014988	7	51633261			PC, MA, AOL	35
BovineHD0700027861	7	95680433	<i>LOC617002/ FAM172A</i>		PC, MA, AOL	9
BovineHD0700027865	7	95701642	<i>LOC617002</i>		PC, MA, AOL	9
BovineHD0700027871	7	95717540	<i>LOC617002</i>		PC, MA, AOL	2
BovineHD0700027877	7	95743183	<i>LOC617002</i>		PC, MA, AOL	8
BovineHD0800021617	8	71834271			MA, AOL	
BovineHD0800024912	8	83770543			MA, PC, AOL	6
BovineHD0900003767	9	14438706			PC, AOL	5
BovineHD0900004482	9	16587726			PC, AOL	2
BovineHD0900006075	9	22556971			PC, EG12, AOL, MA	2
BovineHD0900023809	9	84990122			PC, EG12, AOL, MA	9
BovineHD0900024519	9	87305688	<i>UST</i>	Complexo de golgi	PC, EG12, AOL, MA	5
BovineHD0900025311	9	89646128	<i>RMND1</i>		PC, EG12, AOL, MA	
BovineHD0900028713	9	99305818	<i>PARK2</i>		PC, EG12, AOL, MA	4
BovineHD1000020059	10	70063979			PC, MA	
BovineHD1000023097	10	81043741	<i>ACTN1</i>	Citoesqueleto , actina de filamentos, canais de Ca ⁺⁺	PC, MA	6
BovineHD1000023098	10	81044854	<i>ACTN1</i>		PC, MA	6
BovineHD1000023101	10	81047217	<i>ACTN1</i>		PC, MA	10
BovineHD1000023109	10	81062389	<i>ACTN1</i>		PC, MA	10
BovineHD1000023110	10	81062892	<i>ACTN1</i>		PC, MA	10
BovineHD1000025021	10	87980445	<i>TTL5</i>	Formação da tubulina	PC, MA	2

BovineHD1000026779	10	92684667			PC	2
BovineHD1000029754	10	102264104	<i>FOXN3</i>		PC	
Hapmap29139-BTA-125963	10	98387803			PC	7
BovineHD1100011631	11	39334719				2
BovineHD1100013368	11	45992076	<i>LOC786288</i>		AOL	4
BovineHD1100013369	11	45993389	<i>LOC786288</i>		AOL	4
BovineHD1100013370	11	45998779	<i>LOC786288</i>		AOL	4
BovineHD1100013371	11	46001215	<i>LOC786288</i>		AOL	4
BovineHD1100013373	11	46012595	<i>LOC786288</i>		AOL	5
BovineHD1100024651	11	85810300			PC, MA	
BovineHD1100028280	11	97248250	<i>FAM125B</i>		MA, LMA	4
BovineHD1200001075	12	3458969			AOL	2
BovineHD1200017847	12	65214502			AOL	2
BovineHD1200018761	12	68619002	<i>GPC6</i>		AOL	8
BovineHD1300000218	13	1084410	<i>PLCBI</i>	Canais de cálcio		6
BovineHD1300000219	13	1085078	<i>PLCBI</i>			6
BovineHD1300007886	13	27187312			EG12, PC, AOL	3
BovineHD1300007954	13	27402877			EG12, PC, AOL	3
BovineHD1300007969	13	27453682			EG12, PC, AOL	9
BovineHD1300024080	13	82872457			AOL, EG12	3
BovineHD1400018257	14	65309416			MA, LMA, EG12, PC	9
BovineHD1400019603	14	69833026	<i>PGCP</i>	Regeneração de tecidos	MA, LMA, EG12	5
ARS-BFGL-NGS-21920	15	33698965				
BovineHD1500003750	15	15192535			AOL	12
BovineHD1500003751	15	15193545			AOL	12
BovineHD1500005076	15	20046191			AOL, PC, EG12	13

BovineHD1500005112	15	20253317			AOL, PC, EG12	
				Regulação do filamento de actina		
BovineHD1500005247	15	20660975	<i>RDX</i>	polimerização, regulação do citoesqueleto de actina	AOL, PC, EG12	37
ARS-BFGL-BAC-35318	16	66863251			EG12, MA, AOL, PC	3
BovineHD1600002707	16	10052406	<i>LOC100335602</i>		EG12, PC	
BovineHD1600005045	16	18601168			EG12, MA	2
BovineHD1600014390	16	51755944			EG12, MA, AOL, PC	<i>C16H1orf86 e MORN1</i> 54
BovineHD1600014397	16	51791137	<i>SKI</i>		EG12, MA, AOL, PC	54
BovineHD1600014413	16	51856590	<i>PRKCZ</i>	Actina filamentos, membrana plasmática, citoesqueleto de actina	EG12, MA, AOL, PC	54
BovineHD1600014415	16	51860583	<i>PRKCZ</i>		EG12, MA, AOL, PC	54
BovineHD1600018971	16	66863928			EG12, MA, AOL, PC	3
Hapmap54214- rs29016172	16	22035867	<i>SPATA17</i>	Citoesqueleto	EG12, MA	5
BovineHD1700002880	17	10232184	<i>ARHGAP10</i>	citoesqueleto organização , atividade proteína Rho GTPase		
BovineHD1700011769	17	42311210			MA, PC, EG12	5
BovineHD1700011775	17	42332273			MA, PC, EG12	
ARS-BFGL-NGS-86697	18	1260166				2
BovineHD1800000609	18	2250000	<i>LOC100295570</i>			2
BovineHD1800005343	18	17186146			PC, AOL	4
BovineHD1800007810	18	25392261			PC, AOL	8
BovineHD1800009699	18	32081148			PC, AOL	17
ARS-BFGL-NGS- 109169	19	20066365			EG12	4

BovineHD1900000740	19	3170767				6
BovineHD1900000744	19	3185896	<i>LOC100138652</i>		EG12	6
BovineHD1900001679	19	6550911	<i>LOC616574</i>			7
BovineHD1900004113	19	15293355	<i>FNDC8</i>	Fibronectina		5
BovineHD1900004114	19	15294517	<i>FNDC8</i>			5
BovineHD1900014684	19	52409573	<i>RPTOR</i>		MA, AOL	7
BovineHD1900019078	19	61719375	<i>MAP2K6</i>	Proteína fosforilação de aminoácidos, processo metabólico, contração muscular, contração do músculo estriado	MA, AOL	2
BovineHD2000000777	20	2198653			PC	
BovineHD2000007465	20	24829891	<i>ARL15</i>	Regulamento do citoesqueleto de actina	PC	7
BovineHD2000007480	20	24848472	<i>ARL15</i>		PC	122
BovineHD2000007804	20	26082984	<i>ITGA2</i>	Canais de Ca ⁺⁺ , regulação da contração muscular, regulação da actina	PC	13
BovineHD2000007807	20	26084882	<i>ITGA2</i>		PC	13
BovineHD2000007810	20	26086790	<i>ITGA2</i>		PC	13
BovineHD2000007812	20	26088005	<i>ITGA2</i>		PC	2
BovineHD2000007936	20	26664825			PC	2
Hapmap36588-SCAFFOLD90561_9460	20	2289049	<i>KCNIP1</i>	Citoesqueleto e canais iônicos	PC	
BovineHD2100002861	21	11506475				2
BovineHD2100005036	21	17877544	<i>AGBL1</i>	Canais de Ca ⁺⁺	PC, EG12	3
BovineHD2100006932	21	23615969	<i>HOMER2</i>	Ligação à actina e ligação das proteínas ao citoesqueleto	PC, EG12	10
BovineHD2100006940	21	23648620	<i>HOMER2</i>		PC, EG12	6
BovineHD2100013783	21	48103620	<i>LOC100335581</i>		AOL	6

BovineHD2200000226	22	919612	<i>EGFR</i>	Regulação do citoesqueleto de actina		4
BovineHD2200000230	22	928517	<i>EGFR</i>			2
BovineHD2200001886	22	6349069	<i>OSBPL10</i>	Transporte lipídico	PC	4
BovineHD2200001996	22	6614506			PC	10
BovineHD2200002100	22	6912776	<i>CMTM7</i>	Atividade das citocininas, domínio Marvel e Comportamento locomotor	PC	3
BovineHD2200002101	22	6914240	<i>CMTM7</i>		PC	3
BovineHD2200006863	22	23262506	<i>TRNT1</i>		PC, MA	2
BovineHD2200015114	22	53279724	<i>LOC788394</i>		PC, MA, PC, EG12	5
BovineHD2200015533	22	54606198			PC, MA, EG12	
BovineHD2200016931	22	58427133			PC, MA, EG12, AOL	5
BovineHD2300008113	23	28671895	<i>TRIM31</i>	Transporte lipídico e Canais de Ca ⁺⁺	PC, EG12, MA, AOL	
BovineHD2300014142	23	48673836	<i>F13A1</i>	Canais de Ca ⁺⁺ e Coagulação	PC, EG12, MA, AOL	3
BovineHD4100016472	24	19619591			MA	
BTB-00893323	24	62052361	<i>BCL2</i>	Células mesenquimais, regulação de células do músculo lisas, desenvolvimento do músculo estriado,	PC, MA, EG12, AOL	
BovineHD2500003338	25	11939350	<i>LOC100139490/SHISA9</i>		MA	3
BovineHD2500007326	25	25827637	<i>GSG1L</i>		PC	
BovineHD2500008249	25	29677084	<i>LOC505622/WBSCR17</i>		PC	4
BovineHD2500008256	25	29692087	<i>LOC505622</i>		PC	
BovineHD2600005533	26	21374520			MA, PC	3
BovineHD2600006715	26	25630789	<i>SORCS3</i>		AOL, PC, MA	2
BovineHD2600006739	26	25653762	<i>SORCS3</i>		AOL, PC, MA	5
BTA-113604-no-rs	26	8356096			AOL	

BovineHD2700007596	27	27072916		MA, PC, EG12, AOL	2	
BovineHD2700008400	27	30412901		MA, PC, EG12, AOL	2	
BovineHD2700008873	27	31702799		MA, PC, EG12, AOL	5	
BovineHD2700010277	27	35987333		MA, EG12	9	
BovineHD2700010278	27	35988420		MA, EG12	9	
BovineHD2700010279	27	35989224		MA, EG12	9	
BovineHD2700010280	27	35990090		MA, EG12	9	
BovineHD2700010281	27	35997113		MA, EG12	9	
BovineHD2700010283	27	35999221		MA, EG12	9	
BovineHD2700010284	27	36000462		MA, EG12	9	
BovineHD2700010997	27	38187844		MA, EG12		
ARS-BFGL-NGS-15178	28	41426446		EG12, AOL	5	
BovineHD2800002771	28	9141281				
BovineHD2800004574	28	16427076		PC, EG12, MA	5	
BovineHD2800011670	28	41427072		AOL	5	
BovineHD2800011985	28	42513676	<i>LOC100336891</i>	AOL	2	
BovineHD4100018509	28	10495996	<i>RYR2</i>	Sinalização do Ca ⁺⁺ , contração músculo cardíaco, regulação da contração muscular estriado, sarcômero	PC	2
ARS-BFGL-NGS-90518	29	3245223		PC, LMA	4	
BovineHD2900000477	29	2049684	<i>FAT3</i>	Canais de Ca ⁺⁺		
BovineHD2900000480	29	2052795	<i>FAT3</i>		3	
BovineHD2900000943	29	3246646		PC, AOL, EG12	4	
BovineHD2900000948	29	3272827		PC, AOL, EG12	2	
BovineHD2900001684	29	6037824		PC, AOL, EG12	5	
BovineHD2900001688	29	6067675		PC, AOL, EG12		
BovineHD2900004101	29	13864804		PC, MA,	6	
BovineHD2900009045	29	30562496	<i>KIRREL3</i>	Diferenciação muscular e diferenciação	PC, EG12, AOL	8

				músculo estriado		
BovineHD2900009046	29	30564223	<i>KIRREL3</i>		PC ,EG12 ,AOL	8

*Cromossomo, **Localização do SNP, ***Número de SNPs por bloco em LD.

Legenda: AOL= Área de olho de lombo, EG12= espessura de gordura subcutânea, PC= Peso corporal, LMA= Longissimus dorsi , MA= marmoreio, YG= grau de rendimento.

ANEXO 2

Resumo da análise de associações das combinações haplóticas com área de olho de lombo (AOL)

NSNP ¹	NHAP ²	CHR ³	BP1 ⁴	BP2 ⁵	SNP1 ⁶	SNP2 ⁷	HAPLOTIPO ⁸	P	EMPI ⁹	EMP2 ¹⁰
2	3	27	35168733	35170144	BovineHD2700009944	BovineHD2700009945	12	9,34E-005	0,000999	0,01698
5	7	27	35220792	35227033	BovineHD2700009964	BovineHD2700009969	11212	7,67E-005	0,000999	0,008991
11	10	27	35463818	35477969	BovineHD2700010084	BovineHD2700010096	11121121221	5,02E-005	0,000999	0,004995
6	7	27	35605105	35612873	BovineHD2700010149	BovineHD2700010155	112111	0,000162	0,000999	0,03297
8	8	27	35759290	35780742	BovineHD2700010208	BovineHD2700010217	12121211	0,000236	0,000999	0,04795
3	4	27	35918584	35921046	BovineHD2700010245	BovineHD2700010247	211	4,63E-009	0,000999	0,000999
2	3	27	35923934	35928412	BovineHD2700010248	BovineHD2700010249	22	0,00013	0,000999	0,02897
5	7	27	35933406	35944602	BovineHD2700010250	BovineHD2700010254	11222	7,08E-005	0,000999	0,008991
10	8	27	35959242	35979311	BovineHD2700010262	BovineHD2700010273	1222111112	2,16E-005	0,000999	0,001998
3	4	27	35982017	35984361	BovineHD2700010274	BovineHD2700010276	122	1,74E-008	0,000999	0,000999
3	4	27	35982017	35984361	BovineHD2700010274	BovineHD2700010276	211	6,80E-006	0,000999	0,001998
10	5	27	35985713	36001607	ARS-BFGL-NGS-9378	BovineHD2700010285	1221221222	4,33E-010	0,000999	0,000999
10	5	27	35985713	36001607	ARS-BFGL-NGS-9378	BovineHD2700010285	2112112111	2,64E-007	0,000999	0,000999
5	4	27	36007072	36016075	BovineHD2700013323	BovineHD2700010290	22121	6,98E-006	0,000999	0,001998

5	4	27	36007072	36016075	BovineHD2700013323	BovineHD2700010290	21212	0,000196	0,000999	0,04196
14	10	27	36035293	36087987	BovineHD2700010296	BovineHD2700010308	11121222221222	1,28E-005	0,000999	0,001998
5	8	27	36146647	36158919	BovineHD2700010324	BovineHD2700010327	12221	1,06E-005	0,000999	0,001998
7	8	27	36179183	36200086	BTA-62789-no-rs	BovineHD2700010337	2121111	2,19E-006	0,000999	0,000999
4	6	27	36208029	36219500	BovineHD4100018368	BovineHD2700010343	1122	7,99E-005	0,000999	0,008991
2	4	27	36220692	36222207	BovineHD2700010344	BovineHD2700010345	11	6,57E-006	0,000999	0,001998
19	11	27	36225899	36271313	BovineHD2700010346	BovineHD2700010364	2122221111211222212	0,000207	0,00999	0,04196
19	11	27	36225899	36271313	BovineHD2700010346	BovineHD2700010364	1222222222122111121	0,000234	0,00999	0,04695
7	7	27	36274982	36289617	BovineHD2700010365	BovineHD2700010371	2221211	0,000214	0,001998	0,04296
3	6	27	36304910	36308259	BovineHD2700010380	BovineHD2700010383	211	7,82E-006	0,000999	0,001998
3	6	27	36304910	36308259	BovineHD2700010380	BovineHD2700010383	222	1,55E-005	0,000999	0,001998
2	3	27	36311611	36330869	BovineHD2700013324	BovineHD2700010388	11	1,13E-006	0,000999	0,000999
3	5	27	36332275	36337263	BovineHD2700010389	BovineHD2700010392	121	0,000133	0,000999	0,02897
3	5	27	36332275	36337263	BovineHD2700010389	BovineHD2700010392	212	1,02E-005	0,000999	0,001998
2	4	27	36342691	36345584	ARS-BFGL-NGS-88722	BovineHD2700010397	21	1,89E-005	0,000999	0,001998
2	4	27	36342691	36345584	ARS-BFGL-NGS-88722	BovineHD2700010397	12	2,99E-006	0,000999	0,000999
2	4	27	36360221	36364149	BovineHD2700010402	BovineHD2700010403	22	4,51E-005	0,000999	0,004995
6	5	27	36365013	36370570	BovineHD2700010404	ARS-BFGL-NGS-100828	122121	3,54E-005	0,000999	0,002997
14	9	27	36373793	36419907	BovineHD2700010410	BovineHD2700010426	21121121221112	5,11E-005	0,000999	0,004995

6	6	27	36425988	36433735	BovineHD2700010428	ARS-BFGL-NGS-31584	222121	1,34E-006	0,000999	0,000999
6	6	27	36425988	36433735	BovineHD2700010428	ARS-BFGL-NGS-31584	221212	8,57E-005	0,000999	0,01299
3	4	27	36434349	36444126	BovineHD2700010433	BovineHD4100018372	112	9,93E-005	0,000999	0,01798
3	5	27	36522942	36541290	BovineHD2700010451	BovineHD2700010453	212	7,10E-006	0,000999	0,001998
3	5	27	36522942	36541290	BovineHD2700010451	BovineHD2700010453	211	7,94E-005	0,000999	0,008991
5	6	27	36565780	36585554	BovineHD2700010458	BovineHD2700010460	22111	2,44E-006	0,000999	0,000999
4	5	27	36767603	36780540	BovineHD2700010493	BovineHD2700010495	1211	0,000161	0,001998	0,03197
6	7	27	36899610	36912995	BovineHD2700010534	BovineHD2700010539	121112	4,34E-006	0,000999	0,001998
6	7	27	36923154	36947937	BovineHD2700010540	BovineHD2700010546	112222	2,67E-005	0,000999	0,001998
2	3	27	36977789	36981514	BovineHD2700010561	BovineHD2700010563	11	4,00E-005	0,000999	0,003996

¹-Número de SNPs no haplótipo; ²-Número de variações haplotípicas; ³-Cromossomo; ⁴-Posição inicial do haplótipo em pb ; ⁵- Posição final do Haplótipo em pb ; ⁶- Nome do primeiro SNP no haplótipo; ⁷-Nome do último SNP no haplótipo; ⁸- Combinações haplotípicas; ⁹- Valores de P empíricos (primeiro conjunto) ¹⁰-Valores de P empíricos (segundo conjunto)

ANEXO 3

Descrição da localização das combinações haplóticas significativas em genes e regiões de QTLs

NSNP ¹	BP1 ²	BP ³	SNP1 ⁴	SNP2 ⁵	Genes	QTL*
2	35168733	35170144	BovineHD2700009944	BovineHD2700009945		MA, AOL, PC
5	35220792	35227033	BovineHD2700009964	BovineHD2700009969		MA, AOL, PC
11	35463818	35477969	BovineHD2700010084	BovineHD2700010096	<i>ZMAT4</i>	MA, AOL, PC
6	35605105	35612873	BovineHD2700010149	BovineHD2700010155	<i>ZMAT4</i>	MA, AOL, PC
8	35759290	35780742	BovineHD2700010208	BovineHD2700010217		MA, AOL, PC
3	35918584	35921046	BovineHD2700010245	BovineHD2700010247	<i>SFRP1</i>	MA, AOL, PC
2	35923934	35928412	BovineHD2700010248	BovineHD2700010249	<i>SFRP1</i>	MA, AOL, PC
5	35933406	35944602	BovineHD2700010250	BovineHD2700010254	<i>SFRP1</i>	MA, AOL, PC
10	35959242	35979311	BovineHD2700010262	BovineHD2700010273		MA, AOL, PC
3	35982017	35984361	BovineHD2700010274	BovineHD2700010276		MA, AOL, PC
3	35982017	35984361	BovineHD2700010274	BovineHD2700010276		MA, AOL, PC
10	35985713	36001607	ARS-BFGL-NGS-9378	BovineHD2700010285		MA, AOL, PC
10	35985713	36001607	ARS-BFGL-NGS-9378	BovineHD2700010285		MA, AOL, PC
5	36007072	36016075	BovineHD2700013323	BovineHD2700010290		MA, AOL, PC
5	36007072	36016075	BovineHD2700013323	BovineHD2700010290		MA, AOL, PC
14	36035293	36087987	BovineHD2700010296	BovineHD2700010308		MA, AOL, PC
5	36146647	36158919	BovineHD2700010324	BovineHD2700010327	<i>GINS4</i>	MA, AOL, PC
7	36179183	36200086	BTA-62789-no-rs	BovineHD2700010337		MA, AOL, PC

4	36208029	36219500	BovineHD4100018368	BovineHD2700010343	<i>AGPA76</i>	MA, AOL, PC
2	36220692	36222207	BovineHD2700010344	BovineHD2700010345	<i>AGPA76</i>	MA, AOL, PC
19	36225899	36271313	BovineHD2700010346	BovineHD2700010364	<i>AGPA76, LOC784372, ANKI, MIR486</i>	MA, AOL, PC
19	36225899	36271313	BovineHD2700010346	BovineHD2700010364	<i>AGPA76, LOC784372, ANKI, MIR486</i>	MA, AOL, PC
7	36274982	36289617	BovineHD2700010365	BovineHD2700010371	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC
3	36304910	36308259	BovineHD2700010380	BovineHD2700010383	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC
3	36304910	36308259	BovineHD2700010380	BovineHD2700010383	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC
2	36311611	36330869	BovineHD2700013324	BovineHD2700010388	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC
3	36332275	36337263	BovineHD2700010389	BovineHD2700010392	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC, EGS
3	36332275	36337263	BovineHD2700010389	BovineHD2700010392	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC, EGS
2	36342691	36345584	ARS-BFGL-NGS-88722	BovineHD2700010397	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC, EGS
2	36342691	36345584	ARS-BFGL-NGS-88722	BovineHD2700010397	<i>ANKI</i>	MA, AOL, PC, EGS
2	36360221	36364149	BovineHD2700010402	BovineHD2700010403	<i>ANKI</i>	MA,EGS
6	36365013	36370570	BovineHD2700010404	ARS-BFGL-NGS-100828		MA,EGS
14	36373793	36419907	BovineHD2700010410	BovineHD2700010426		MA,EGS
6	36425988	36433735	BovineHD2700010428	ARS-BFGL-NGS-31584		MA,EGS
6	36425988	36433735	BovineHD2700010428	ARS-BFGL-NGS-31584		MA,EGS
3	36434349	36444126	BovineHD2700010433	BovineHD4100018372		MA,EGS
3	36522942	36541290	BovineHD2700010451	BovineHD2700010453	<i>MYST3</i>	MA,EGS
3	36522942	36541290	BovineHD2700010451	BovineHD2700010453	<i>MYST3</i>	MA,EGS

5	36565780	36585554	BovineHD2700010458	BovineHD2700010460	<i>MYST3</i>	MA,EGS
4	36767603	36780540	BovineHD2700010493	BovineHD2700010495		MA,EGS
6	36899610	36912995	BovineHD2700010534	BovineHD2700010539	<i>POLB, DKK4</i>	MA,EGS
6	36923154	36947937	BovineHD2700010540	BovineHD2700010546	<i>VDAC1P5, SLC20A2</i>	MA,EGS
2	36977789	36981514	BovineHD2700010561	BovineHD2700010563	<i>SLC20A2</i>	MA,EGS

¹-Número de SNPs no haplótipo; ²-Posição inicial do haplótipo em pb; ³-Posição final do haplótipo em pb; ⁴- Nome do primeiro SNP no haplótipo; ⁵- Nome do último SNP no haplótipo.

*Legenda: AOL= área de olho de lombo; MA= marmoreio; PC= peso de carcaça e EGS= espessura de gordura subcutânea

ANEXO 4

Resumo das análises de associação de SNP único e com área de olho de lombo (AOL) e identificação dos genes e QLTs nas regiões associadas.

Nome do SNP	BP*	P**	BONF***	Gene	QLT****
BovineHD2700010268	35972259	6,55E-04	0,000445		AOL, PC, MA
BovineHD2700010246	35920494	6,96E-04	0,0004728	<i>SPRF1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010388	36330869	9,29E-04	0,0006305	<i>ANK1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010285	36001607	1,29E-06	0,000876		AOL, PC, MA
ARS-BFGL-NGS-88722	36342691	1,29E-06	0,000876	<i>ANK1</i>	MA, EGS
ARS-BFGL-NGS-31584	36433735	1,34E-03	0,0009113		MA, EGS
BovineHD2700010430	36429186	1,43E-03	0,0009684		MA, EGS
BovineHD2700010272	35978334	1,95E-03	0,001321		AOL, PC, MA
BovineHD2700010270	35976369	1,95E-03	0,001321		AOL, PC, MA
BovineHD2700010274	35982017	2,09E-03	0,001422		AOL, PC, MA
BovineHD2700010481	36732572	2,19E-03	0,001488	<i>AP3M2</i>	MA, EGS
BovineHD2700010336	36196674	2,19E-03	0,00149		AOL, MA, PC
BovineHD2700010333	36180538	2,19E-03	0,00149		AOL, MA, PC
BovineHD2700010353	36250202	2,42E-03	0,001645	<i>LOC784372</i>	AOL, MA, PC
BovineHD4100018368	36208029	2,43E-03	0,001651		AOL, MA, PC
BovineHD2700009974	35232878	3,99E-03	0,002712		AOL, MA, PC
BovineHD2700010540	36923154	4,04E-03	0,002742		MA, EGS
BovineHD2700010343	36219500	4,87E-06	3,30E-03	<i>AGPA76</i>	AOL,PC, EGS
BovineHD2700010347	36228351	5,56E-03	0,003773	<i>AGPA76</i>	AOL,PC, EGS
BovineHD2700010407	36368826	5,71E-03	0,003876		MA, EGS
BovineHD2700010408	36369749	5,86E-03	0,003979		MA, EGS

ARS-BFGL-NGS-100828	36370570	5,86E-03	0,003979		MA, EGS
BovineHD2700010291	36017172	6,98E-03	0,004737		AOL, PC, MA
BovineHD2700010290	36016075	6,98E-03	0,004737		AOL, PC, MA
BovineHD2700010287	36010031	6,98E-03	0,004737		AOL, PC, MA
BovineHD2700010241	35911298	7,21E-03	0,004892	<i>SPRF1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010247	35921046	8,06E-06	5,47E-03	<i>SPRF1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010383	36308259	8,44E-03	0,005727	<i>ANK1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010289	36014627	9,80E-03	0,006657		AOL, PC, MA
BovineHD2700010275	35982756	1,08E-02	0,007345		AOL, PC, MA
BovineHD2700009959	35213215	1,13E-02	0,007691		AOL, PC, MA
BovineHD4100018367	36187226	1,15E-02	0,007796		AOL, PC, MA
ARS-BFGL-NGS-9378	35985713	1,29E-08	8,76E-03		AOL, PC, MA
BovineHD2700010276	35984361	1,41E-05	9,60E-03		AOL, PC, MA
BovineHD4100018356	35145344	1,66E-02	0,01129		AOL, PC, MA
BovineHD2700009941	35152341	1,66E-02	0,01129		AOL, PC, MA
BovineHD2700010426	36419907	1,87E-02	0,0127		MA, EGS
BovineHD2700010453	36541290	1,88E-02	0,01275	<i>MYST3</i>	MA, EGS
BovineHD2700010292	36018045	2,10E-05	1,43E-02		AOL, PC, MA
BovineHD2700010382	36307461	2,50E-02	0,01696	<i>ANK1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010375	36293590	2,58E-02	0,0175	<i>ANK1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010259	35953474	2,90E-02	0,01967		AOL, PC, MA
BovineHD2700010258	35952667	2,90E-02	0,01967		AOL, PC, MA
BovineHD2700010257	35951085	2,90E-02	0,01967		AOL, PC, MA
BovineHD2700010086	35465963	3,82E-02	0,02592	<i>ZMAT4</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010563	36981514	4,01E-02	0,02719	<i>SLC20A2</i>	MA, EGS
BovineHD2700010564	36982502	4,06E-02	0,02753	<i>SLC20A2</i>	MA, EGS

ARS-BFGL-NGS-111354	36392756	4,80E-02	0,03258		MA, EGS
BovineHD2700010252	35938070	5,42E-05	0,0368	<i>SFRP1</i>	AOL, PC, MA
BovineHD2700010286	36003793	5,99E-02	0,04064		AOL, PC, MA
BovineHD2700010479	36731130	6,82E-02	0,04632	<i>A3PM2</i>	MA, EGS
BovineHD2700010478	36730248	6,82E-02	0,04632	<i>A3PM2</i>	MA, EGS
BovineHD2700010477	36727938	6,82E-02	0,04632	<i>A3PM2</i>	MA, EGS
BovineHD2700009945	35170144	7,12E-02	0,04836		AOL, MA, PC

*Posição do SNP em pb; ** P-valor, ***P valor corrigidos por Bonferroni;

****Legenda: AOL= área de olho de lombo; MA= marmoreio; PC= peso de carcaça e EGS= espessura de gordura subcutânea.