

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E EVOLUÇÃO

**Identificação de regiões genômicas e genes candidatos posicionais e funcionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore**

**Priscila Silva Neubern de Oliveira**

**São Carlos**

**2014**

**Identificação de regiões genômicas e genes candidatos posicionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore**

**Priscila Silva Neubern de Oliveira**

Tese 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 Doutor em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

Orientação: **Dra Luciana Correia de Almeida Regitano**

Co-orientação: Dr. Maurício de Alvarenga Mudadu

Dr. Dante Pazzanese Lanna

**São Carlos**

**2014**

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

O48ir

Oliveira, Priscila Silva Neubern de.

Identificação de regiões genômicas e genes candidatos posicionais e funcionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore / Priscila Silva Neubern de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2014.

104 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2014.

1. Bovino - genética. 2. Zebu. 3. Polimorfismo. 4. Nucleotídeos. I. Título.

CDD: 575.1 (20<sup>a</sup>)

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

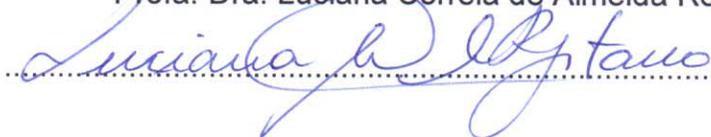
“Identificação de regiões genômicas e genes candidatos posicionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore”

Tese de Doutorado de

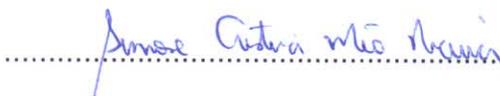
PRISCILA SILVA NEUBERN DE OLIVEIRA

Banca Examinadora

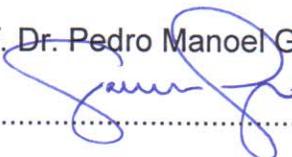
Profa. Dra. Luciana Correia de Almeida Regitano

  
.....

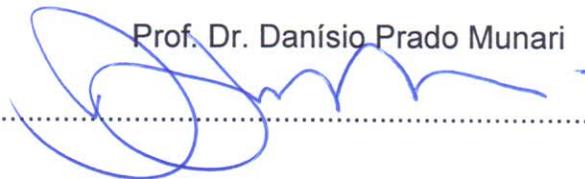
Profa. Dra. Simone Cristina Méo Niciura

  
.....

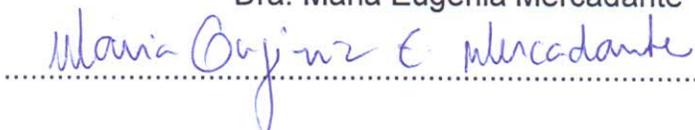
Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti

  
.....

Prof. Dr. Danísio Prado Munari

  
.....

Dra. Maria Eugênia Mercadante

  
.....

SÃO CARLOS – SP  
2014

**Dedico** este trabalho aos meus queridos pais, **César e Néa**  
por todo carinho, incentivo e amor.

**Ofereço** este trabalho às minhas irmãs, **Caroline e Gabriela**,  
à minha sobrinha **Valentina**,  
ao meu cunhado **Rafael**,  
e ao meu Amor, **Ricardo Pertile**.

*“Sem vocês nada disso teria sentido”*

*“... separa do rebanho todo animal negro entre os cordeiros e o que é malhado ou salpicado entre as cabras.” (Genesis, 30, 32, Bíblia de Jerusalém, Paulus, 2010).*

**“A mente que se abre a uma nova ideia jamais volta ao seu tamanho original”**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à DEUS, por me dar saúde e força de vontade para chegar até aqui. Obrigada DEUS, sinto sua presença sempre comigo!

Aos meus queridos pais, César e Néa, por sempre estarem ao meu lado sendo tão carinhosos, me dando coragem nos momentos mais difíceis, me amparando e, principalmente incentivando à mim e minhas irmãs para que nunca parássemos de estudar. Muito obrigada! Essa conquista é nossa, amo vocês!

Às minhas irmãs Caroline e Gabriela, à minha sobrinha Valentina e ao meu cunhado Rafael, agradeço imensamente os momentos de descontração, lazer e incentivo. Vocês fazem parte disso tudo, amo vocês!

Ao meu namorado e amor Ricardo Pertile, agradeço todo dia à DEUS por ter colocado você em minha vida, você é o maior presente que tive durante estes 4 anos de Doutorado, e ter uma vida juntos é um dos meu maiores incentivos! Te Amo!

Agradeço especialmente à minha orientadora Dra Luciana Correia de Almeida Regitano, primeiramente por me abrir as portas do laboratório sem nunca ter me conhecido, por acreditar e confiar em mim, sempre me apoiando, me tratando como profissional e amiga. Agradeço também pelos inúmeros ensinamentos e contribuições para realização deste trabalho. Muito obrigada por me deixar fazer parte do seu grupo de pesquisa! Espero que possamos trabalhar muitos anos ainda juntas!

Agradeço ao meu co-orientador Dr. Maurício Mudadu pelos ensinamentos, apoio e amizade durante esses 4 anos de Doutorado.

Agradeço ao meu outro co-orientador Dante Pazanesse Lanna, à Michele Lopes do Nascimento, à Amalia Chaves e Andréa Ribeiro pelo desenvolvimento do trabalho de campo e coleta de dados fenotípicos que permitiram a realização deste trabalho.

Agradeço aos membros da banca Dra Maria Eugênia Mercadante, Dr Danísio Prado Munari, Dra Simone Méo Niciura e Dr Pedro Manuel Galetti e pelas valiosas contribuições para a finalização deste trabalho.

Agradeço aos meus amigos do Laboratório de Biotecnologia; Marcela de Souza, Polyana Tizioto, Adriana Somavilla, Andressa Lima, Vítor Catoia, Alexandre Oliveira, Suelen Mello, Marina Ibelli, Wellison Diniz, Kamila Oliveira, Flávia Bressani, Gilbertinho, Wilson Malagó, Daniela Moré e especialmente, à Marcela de Souza e Polyana Tizioto por estarem comigo desde o início, me orientando e me incentivando, e pelos momentos de descontração. Agradeço também especialmente à Aline César, por sua amizade e confiança, e por ter me recebido durante o meu período de Estágio de Doutorado Sanduíche nos Estados Unidos.

Agradeço à Iowa State University (Ames, EUA) e principalmente ao Dr James Reecy por ter me recebido tão bem, por me orientar e me passar ensinamentos tanto profissionais como pessoais. Agradeço também a todos outros pesquisadores da Iowa State University por terem contribuído com esse trabalho. Trabalhar com vocês, sem dúvida, foi a realização de um sonho!

Agradeço ao CNPq e à Capes pela concessão da bolsa de estudos.

Agradeço à Universidade Federal de São Carlos, à todos os professores do Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução, e à Embrapa Pecuária Sudeste por terem me recebido e permitido a realização deste trabalho.

## Resumo

Esta tese foi dividida em três capítulos para melhor compreensão dos experimentos realizados. O primeiro capítulo refere-se a uma breve Revisão de Literatura, com os principais conceitos e justificativas para a realização deste trabalho. O segundo capítulo aborda a estratégia de genes candidatos posicionais e funcionais para características de eficiência alimentar na raça Nelore e o terceiro capítulo apresenta um estudo de associação genômica ampla para características de eficiência alimentar na mesma população. A eficiência alimentar é uma característica produtiva importante em sistemas de produção de bovinos de corte. O objetivo deste estudo foi identificar genes/QTLs associados com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore utilizando genótipos do Illumina *BovineHD BeadChip* (770K). As características analisadas foram: ganho de peso médio diário (GMD), consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), consumo alimentar residual (CAR), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TCR). A primeira estratégia abordada neste trabalho, a de genes candidatos, investigou a associação dos genes *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)*, *Kv channel interacting protein 4 (KCNIP4)*, e *Vascular endothelial growth factor C (VEGFC)*, com características produtivas nesta mesma população. Nossos resultados corroboram com resultados da literatura que indicam os genes *KCNIP4* e *VEGFC* como genes candidatos para eficiência alimentar; e este estudo é o primeiro a sugerir o gene *NEUROD1* como gene candidato para espessura de gordura subcutânea, peso médio e peso metabólico em bovinos da raça Nelore. No estudo de associação genômica, algumas regiões de QTL identificadas foram sobrepostas minimamente com regiões de QTL relatadas anteriormente para eficiência alimentar em bovinos *Bos taurus*, e abrigam genes com funções biológicas relacionadas com processos metabólicos, metabolismo lipídico e proteico, geração de energia e crescimento. A comparação com os resultados publicados indicam que diferentes QTL e genes podem estar envolvidos no controle da eficiência alimentar nesta população de bovinos da raça Nelore. A validação dos resultados obtidos neste trabalho em populações independentes pode contribuir para elucidação dos mecanismos envolvidos na variação do consumo alimentar e para programas de melhoramento específicos para a raça Nelore.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*, genes candidatos, polimorfismos de nucleotídeo único

## **Abstract**

This thesis has been divided into three chapters for better understanding of the experiments. The first chapter refers to a brief Literature Review, with the main concepts and justifications for this work. The second chapter discusses the strategy of positional and functional candidate genes for traits of feed efficiency in Nelore cattle, and the third chapter presents a genome-wide association study for feed efficiency traits in the same population. Feed efficiency is an important production trait in beef cattle production systems. The aim of this study was to identify genes/QTLs associated with feed efficiency traits in Nelore cattle genotypes using the Illumina BeadChip BovineHD (770K) of 593 Nelore steers. The traits analyzed were: average daily weight gain (ADG), dry matter intake (DMI), feed conversion (FC), feed efficiency (FE), residual feed intake (RFI), efficiency of maintenance (EM), efficiency gain (EG), partial efficiency of growth (PEG) and relative growth rate (RGR). The first strategy discussed in this work, using candidate genes, investigated the association of *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)*, *Kv channel interacting protein 4 (KCNIP4)*, and *Vascular endothelial growth factor C (VEGFC)* genes, with production traits in the same population. Our results are in accordance with literature that indicate *NEUROD1*, *KCNIP4* and *VEGFC* as candidate genes for feed efficiency; and this study is the first to suggest the *NEUROD1* gene as a candidate for gene backfat thickness, body weight and metabolic weight in Nelore cattle. In the genome-wide association study some QTL regions identified in this study minimally overlapped with QTL regions previously reported for feed efficiency in *Bos Taurus* cattle, and harbor genes with biological functions related to metabolic processes, lipid and protein metabolism, energy generation and growth. A comparison with published results indicates that different QTL and genes may be involved in the control of feed efficiency in this population of Nelore cattle. The validation of the results obtained in this work in independent populations may contribute to elucidation of the mechanisms involved in the variation of feed consumption and specific improvement in Nelore programs.

**Key words:** *Bos indicus*, candidate genes, single nucleotide polymorphisms

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1.</b> Descrição dos <i>primers</i> para sequenciamento do gene <i>NEURODI</i> sob temperatura de anelamento de 59°C.....	41
<b>Tabela 2.</b> Descrição dos <i>primers</i> utilizados para genotipagem do SNP1062 do gene <i>NEURODI</i> pela técnica Tetra-primer ARMS- PCR. ....	45
<b>Tabela 3.</b> Descrição dos SNPs prospectados para o gene <i>NEURODI</i> , p valor do Teste Exato de Fisher e MAF. ....	49
<b>Tabela 4.</b> Frequência alélica e genotípica do SNP1062G> C no gene <i>NEURODI</i> em novilhos da raça Nelore.....	51
<b>Tabela 5.</b> Resultados da análise de modelos mistos para a associação entre as características de produção e o SNP1062G> C do gene <i>NEURODI</i> em novilhos da raça Nelore.....	52
<b>Tabela 6.</b> Descrição dos SNPs do gene <i>KCNIP4</i> presentes no <i>Illumina BovineHD BeadChip</i> que foram associados com CAR em novilhos da raça Nelore. ....	55
<b>Tabela 7.</b> Descrição dos SNPs do gene <i>KCNIP4</i> presentes na formação dos haplótipos associados com CAR em novilhos da raça Nelore. ....	56
<b>Tabela 8.</b> Frequência genotípica para os haplótipos do gene <i>KCNIP4</i> associados com CAR em novilhos da raça Nelore. ....	57
<b>Tabela 9.</b> Estimacão dos efeitos aditivo e de dominância dos haplótipos do gene <i>KCNIP4</i> que apresentaram efeito significativo sobre CAR em novilhos da raça Nelore. ....	59
<b>Tabela 10.</b> Descrição dos SNPs do gene <i>VEGFC</i> associados com CAR em novilhos da raça Nelore. ....	63
<b>Tabela 11.</b> Descrição dos SNPs do gene <i>VEGFC</i> presentes na formao dos haplótipos .....	64
<b>Tabela 12.</b> Frequência genotípica para o haplótipos do gene <i>VEGFC</i> associados com CAR em novilhos da raça Nelore. ....	65
<b>Tabela 13.</b> Estimacão dos efeitos aditivo e de dominância dos haplótipo 2 do gene <i>VEGFC</i> que apresentou efeito significativo sobre CAR em novilhos da raça Nelore. ....	66
<b>Tabela 14.</b> Estatística descritiva para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore. ....	77

- Tabela 15.** Médias dos componentes de variância para ganho médio diário (GMD); consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), consumo alimentar residual (CAR), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TRC) em bovinos da raça Nelore. .... 77
- Tabela 16.** Regiões de QTL associadas com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore. .... 80

## Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> Animal da Raça Nelore .....	14
<b>Figura 2.</b> Representação esquemática do ARMS-PCR.....	45
<b>Figura 3.</b> SNP ( <i>BovineHD0200004223</i> ) do gene <i>NEUROD1</i> representado pela ferramenta <i>Genome Browser</i> (genoma bovino versão UMD 3.1). .....	48
<b>Figura 4.</b> Padrão de desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) entre os SNPs prospectados e o SNP representado no chip ( <i>BovineHD0200004223</i> ) ; SNP1: 599 C>G; SNP2: 1008 G>A; SNP3: 1062 G>C* ; SNP4:1224 T>G; SNP5: 1743 T>C; SNP6: 2232 G>T; e SNP7: 2254 C>T.....	50
<b>Figura 5.</b> Gel de agarose demonstrando os genótipos (CC, CG e GG) obtidos com a técnica ARMS-PCR. ....	51
<b>Figura 6.</b> SNPs do gene <i>KCNIP4</i> representados pela ferramenta <i>Genome Browser</i> (genoma bovino versão UMD 3.1). ....	54
<b>Figura 7.</b> SNPs do gene <i>VEGFC</i> representados pela ferramenta <i>Genome Browser</i> (genoma bovino versão UMD 3.1). ....	63
<b>Figura 8.</b> Manhattan plots das regiões de QTL associadas à Consumo de Matéria Seca (CMS) em bovinos da raça Nelore.....	82
<b>Figura 9.</b> Manhattan das regiões de QTL associadas à Ganho Médio Diário (GMD) em bovinos da raça Nelore.....	82
<b>Figura 10.</b> Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Conversão Alimentar (CA) em bovinos da raça Nelore.....	83
<b>Figura 11.</b> Manhattan plots das regiões de QTL associadas à Eficiência Alimentar (EA) em bovinos da raça Nelore.....	83
<b>Figura 12.</b> Manhattan plots das regiões de QTLs associada com Consumo Alimentar Residual (CAR) em bovinos da raça Nelore.....	84
<b>Figura 13.</b> Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência de Manutença (EM) em bovinos da raça Nelore.....	85
<b>Figura 14.</b> Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência Parcial de Crescimento (EPC) em bovinos da raça Nelore.....	85

- Figura 15.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência de Ganho (EG) em bovinos da raça Nelore..... 86
- Figura 16.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Taxa Relativa de Crescimento (TRC) em bovinos da raça Nelore. .... 86

## SUMÁRIO

<b>Capítulo 1.....</b>	<b>11</b>
<b>Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>11</b>
<b>1.1. Considerações iniciais.....</b>	<b>11</b>
<b>1.2. Revisão Bibliográfica.....</b>	<b>13</b>
1.2.2. Raça Nelore.....	13
1.2.3. Eficiência Alimentar.....	14
1.2.4 Marcadores moleculares e seleção assistida por marcadores.....	16
1.2.5. Estudos de Associação Ampla do Genoma e Seleção Genômica.....	17
1.2.6. QTL para características de eficiência alimentar em bovinos de corte.....	20
1.2.7. Genes Candidatos.....	21
1.2.7.1. Gene <i>NEUROD1</i> .....	25
1.2.7.2. Gene <i>KCNIP4</i> .....	25
1.2.7.3. Gene <i>VEGFC</i> .....	25
<b>1.3. Objetivos.....</b>	<b>26</b>
<b>1.4. Referências.....</b>	<b>26</b>
<b>Capítulo 2.....</b>	<b>37</b>
<b>Identificação de genes candidatos posicionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.....</b>	<b>37</b>
<b>2.1. Resumo:.....</b>	<b>37</b>
<b>2.2. Introdução.....</b>	<b>38</b>
<b>2.3. Material e Métodos.....</b>	<b>39</b>
2.3.1. Animais.....	39
2.3.2. Medidas Fenotípicas.....	39
2.3.2.1. Mensuração da eficiência alimentar, peso médio e peso metabólico.....	39
2.3.2.2. Mensuração das medidas da carcaça.....	39
2.3.3. Coleta de amostras e Extração de DNA.....	40
2.3.4. Seleção de animais com fenótipos extremos para CAR.....	40
2.3.5. Sequenciamento do gene candidato para eficiência alimentar <i>NEUROD1</i> pela metodologia de Sanger.....	41
2.3.5.1. Desenho de primers:.....	41
2.3.5.2. Amplificação e purificação.....	42
2.3.5.3. Reação de sequenciamento.....	42
2.3.6. Análise do Sequenciamento.....	43
2.3.7. Genotipagem do SNP 1062G> C do gene <i>NEUROD1</i> .....	44
2.3.9. Reconstrução da fase de ligação e blocos haplotípicos dos SNPs localizados nos genes <i>KCNIP4</i> e <i>VEGFC</i> .....	45
2.3.8. Análises estatísticas.....	46
<b>2.4. Resultados e Discussão.....</b>	<b>47</b>
2.4.1. Identificação de SNPs no gene candidato <i>NEUROD1</i> .....	47
2.4.1.1. Genotipagem e estudos dos efeitos das associações do SNP1062 G>C com as características CAR, EGS, AOL, PM e PMM.....	50
2.4.2. Análises de associação de haplótipos nos genes candidatos para eficiência alimentar <i>KCNIP4</i> e <i>VEGFC</i> .....	54
2.4.2.1. Gene candidato <i>KCNIP4</i> .....	54

2.4.2.2. Associação de haplótipos no gene candidato <i>KCNIP4</i> .....	55
2.4.2.3. Frequência haplotípica para o gene <i>KCNIP4</i> .....	56
2.4.3. Gene candidato <i>VEGFC</i> .....	62
2.4.3.1. Associação de haplótipos no gene candidato <i>VEGFC</i> .....	64
2.4.3.2. Frequência haplotípica para o gene <i>VEGFC</i> .....	64
<b>2.5 Conclusões</b> .....	67
<b>2.6 Referências</b> .....	68
<b>Capítulo 3</b> .....	71
<b>Identificação de regiões genômicas associadas com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup></b> .....	71
<b>3.1. Resumo</b> .....	71
<b>3.2. Introdução</b> .....	72
<b>3.3. Material e Métodos</b> .....	73
3.3.1. Animais e Dados Fenotípicos .....	73
3.3.2. Extração de DNA e Dados Genotípicos.....	74
3.3.3. Estatística Descritiva .....	74
3.3.4. Estudos de Associação Ampla do Genoma ( <i>Genome Wide Association Study</i> ).....	75
<b>3.4. Resultados e Discussão</b> .....	76
3.4.1. Dados fenotípicos.....	77
3.4.2. Estudos de Associação Ampla do Genoma .....	77
<b>3.5. Conclusões</b> .....	93
<b>3.6. Referências</b> .....	95
<b>Capítulo 4. Considerações Finais</b> .....	104

## Capítulo 1. Revisão Bibliográfica

### 1.1. Considerações iniciais

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE (2014), o Brasil apresenta o maior rebanho comercial de bovinos do mundo, contando com aproximadamente 208 milhões de cabeças. O Brasil obteve recorde de exportação de carne bovina em 2013 (ABIEC, 2014). O aquecimento deve-se principalmente à demanda de Hong Kong e Rússia, que continuam liderando o ranking de mercados importadores. Dessa forma, a pecuária de corte apresenta fundamental importância para a economia do país, contribuindo sobretudo para a balança comercial brasileira.

O rebanho brasileiro é constituído principalmente por raças zebuínas, sendo a raça Nelore a que apresenta maior expressão como produtora de carne, com índices de desempenho econômicos notáveis. A raça Nelore apresenta grandes vantagens quanto à rusticidade e adaptabilidade às condições brasileiras, com criação predominantemente à pasto. O confinamento para terminação, o semi-confinamento e a suplementação durante o período seco são estratégias adotadas pelos pecuaristas para aumento da eficiência e produtividade da bovinocultura de corte.

O aumento da produtividade do rebanho é um desafio. Neste contexto, a eficiência alimentar surge como aspecto produtivo de grande importância. A eficiência alimentar, tipicamente definida como conversão alimentar (CA; kg de consumo: kg de ganho), é considerada uma característica moderadamente herdável e em razão das dificuldades de mensuração do consumo alimentar (ARTHUR et al., 2001), existem poucas estimativas de parâmetros genéticos para essa característica no Brasil, principalmente para a raça Nelore.

Existem diversas características utilizadas para medir a eficiência alimentar em bovinos: conversão alimentar, eficiência de manutenção, eficiência parcial de crescimento, consumo alimentar residual, taxa relativa de crescimento, entre outras (ARCHER et al., 1999; ARTHUR, HERD, 2008), sendo a eficiência e a conversão alimentar os parâmetros mais utilizados. A taxa de ganho em peso e pesos em diferentes idades são características também utilizadas em programas de melhoramento de bovinos de corte (ALENCAR et al., 2004). Segundo Basarab et al. (2003), a seleção de animais mais eficientes, levará a reduções de área de pasto e de diversos índices de

impacto ambiental, como emissão de carbono e metano, além da melhor rentabilidade para o produtor, já que a alimentação representa o maior custo de todo sistema de produção. Segundo Elzo et al. (2012), mesmo pequenas mudanças genéticas em características de eficiência alimentar, terão grande impacto sobre a rentabilidade da produção de gado de corte.

Pesquisas identificaram QTL (Quantitative Trait Loci) nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 11, 12, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 24, 26, 28 e 29 para características de eficiência alimentar em bovinos *Bos taurus* ( NKRUMAH et al., 2007; BARENDSE et al., 2007; SHERMAN et al., 2008; KARISA et al., 2014). Genes candidatos funcionais para eficiência alimentar também têm sido identificados (BARENDSE et al., 2007; KARISA et al., 2014).

Pesquisas demonstram que a eficiência alimentar é uma característica complexa, caracterizada por complexas interações entre os constituintes celulares (DNA e RNA) e proteínas, influenciada por múltiplos processos biológicos (KARISA et al., 2014). A identificação de regiões genômicas e genes candidatos e seus polimorfismos pode contribuir para a explicação da variação genética e fenotípica desta característica e para o estabelecimento de critérios de seleção. Segundo Sherman et al. (2008), a identificação de QTLs fornece um ponto de partida para identificar genes que afetam o consumo de alimentos, contribuindo para o conhecimento dos processos biológicos envolvidos nessa variação e possivelmente sua utilização em seleção assistida por marcadores.

A seleção de animais com características favoráveis pode contribuir para a melhoria da cadeia produtiva, atendendo às exigências do consumidor por um produto de melhor qualidade e com maior eficiência na produção. No entanto, determinadas características, como as relacionadas à eficiência alimentar são de difícil e onerosa mensuração, dificultando assim o processo de seleção. A seleção assistida por marcadores (SAM) pode ser uma alternativa em programas de seleção e melhoramento zootécnico de bovinos de corte (DEKKERS, 2004). A SAM utiliza informação molecular obtida a partir dos marcadores em conjunto com os dados de produção fenotípicos e de pedigree para a seleção de animais geneticamente superiores, podendo aumentar a acurácia da seleção tradicional.

Análises do genoma bovino, incluindo mapeamento de QTL, sequenciamento do genoma e caracterização da variabilidade de marcadores moleculares do tipo SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) e, mais recentemente, o desenvolvimento de metodologias para a genotipagem em larga escala, podem contribuir para a seleção precoce de bovinos de corte. A genotipagem em larga escala permite a análise de milhares de marcadores simultaneamente (KIZILKAYA et al.,

2010; PETERS et al., 2012), com seus resultados sendo aplicados, por exemplo, na seleção genômica. A seleção genômica, segundo Resende et al. (2008) pode ser definida como a seleção simultânea para centenas ou milhares de marcadores, os quais cobrem o genoma densamente, de forma que genes que controlam um determinado caráter quantitativo estejam em desequilíbrio de ligação com pelo menos parte dos marcadores.

A maioria dos estudos de associações entre marcadores moleculares e características produtivas de bovinos de corte é realizada em bovinos *Bos taurus*, devido à sua importância na cadeia produtiva de carne em países europeus e da América do Norte. No entanto, a frequência dos alelos desses marcadores muda consideravelmente entre raças e populações (SERAO et al., 2013). Estudos com diferentes populações são necessários para se considerar adequadamente a magnitude das associações entre polimorfismos em genes candidatos e características produtivas, antes que essas informações possam ser usadas eficientemente pelos produtores (SCHENKEL et al. 2005).

São escassos os trabalhos que associam regiões genômicas à características de eficiência alimentar em animais *Bos indicus*. Trabalhos de seleção para eficiência alimentar poderão ser acompanhados de estudos genômicos, capazes de permitir que genes ligados à essas características sejam identificados. O desenvolvimento de um projeto de identificação de marcadores associados à variação de características produtivas importantes, especificamente para a raça Nelore, deverá contribuir para a efetiva contribuição da genética molecular no melhoramento dessa raça no Brasil.

## **1.2. Revisão Bibliográfica**

### *1.2.2. Raça Nelore*

Os rebanhos brasileiros apresentam uma predominância do gado zebuíno, em especial da raça Nelore. As raças zebuínas (*Bos indicus*), originárias da Ásia, representam cerca de 80% do rebanho nacional, isto se deve ao fato de que, quando comparados com as raças de origem européia (*Bos taurus*), apresentam maior tolerância ao calor, resistência a parasitas e fertilidade, o que reflete em maior produtividade.

Os primeiros exemplares da raça Nelore chegaram ao Brasil no final do século XVIII e rapidamente se tornaram a raça de gado predominante do rebanho brasileiro. Nelore é o nome de

um distrito da antiga Província de Madras, Estado de Andra, situada na costa oriental da Índia, onde foram embarcados os primeiros animais para o Brasil.

De acordo com Magnabosco et al. (1997), sete touros importados (Golias, Godhavari, Karvadi, Kurupathy, Mahali, Taji e Rastã) contribuíram significativamente para a formação do rebanho Nelore brasileiro, representando quase 20% dos genes presentes no rebanho atual, sendo então considerados a base genética da raça Nelore no Brasil. Estima-se que o número de touros importados não foi superior a 7.000. As linhagens dentro da raça Nelore podem ser divididas em importada e nacional. A linhagem importada é constituída por animais genearcas trazidos para o Brasil, que se destacaram pelas características fenotípicas que possuíam. As linhagens predominantes da raça Nelore são: Karvardi, Taj Mahal, Golias, Godhavari e Rastan (MAGNABOSCO et al., 1997). A Figura 1 representa o animal da raça Nelore.



**Figura 1. Animal da Raça Nelore**

### *1.2.3. Eficiência Alimentar*

Um das primeiras medidas de eficiência alimentar foi proposta por Kelnner (1909). A eficiência parcial de crescimento (EPC) é calculada pelo ganho de peso relativo ao consumo acima

da manutenção. Fitzhugh e Taylor (1971) sugeriram medir a eficiência como sendo ganho de peso referente ao tamanho instantâneo do corpo, denominado taxa relativa de crescimento (TRC). Além dessas medidas de eficiência, muitos autores têm sugerido e estudado alternativas para se medir a eficiência de utilização alimentos; como a eficiência bruta (ganho de peso/consumo de alimento), eficiência de manutenção (ganho de peso/consumo para manutenção), a eficiência do par vaca/bezerro e eficiência de produção (carne produzida/consumo de alimento) (ARCHER et al, 1999; NKRUMAH et al., 2004; SHENCKEL et al., 2004; ARTHUR; HERD, 2005).

Uma das principais limitações relacionadas à seleção para eficiência alimentar está ligada à coleta de dados fenotípicos, que segundo Herd et al. (2003) é de alto custo. No Brasil, as estimativas iniciais do impacto econômico da seleção para eficiência mostram que os benefícios são muito maiores do que os custos associados com a coleta de dados de consumo (LANNA et al, 2003). Segundo esses autores, sem uma metodologia sistemática de coleta de dados fenotípicos será impossível conduzir estudos eficientes para o genoma funcional de bovinos.

A seleção para eficiência alimentar tem sido deixada em segundo plano pelos programas de melhoramento genético de bovinos de corte devido à dificuldade de se obter o consumo individual de alimentos, e ao fato de ser considerada um parâmetro altamente correlacionado com ganho de peso à idade adulta (ARTHUR et al., 2001). Segundo Lanna et al. (2003), utilizar a conversão alimentar como parâmetro na seleção para eficiência alimentar pode levar ao aumento do tamanho adulto bovino, o que pode ser indesejável por comprometer a eficiência produtiva em condições limitantes. Como no Brasil, a maior parte dos animais é produzida sob o regime de pastagens, o tamanho adulto do animal passa a ser importante na determinação da eficiência biológica, uma vez que as exigências de manutenção (MARSHALL et al., 1996) e o consumo de alimentos dependem do tamanho do animal (McMORRIS e WILTON, 1986).

Outro parâmetro de eficiência, inicialmente sugerido por Koch (1963), que não levaria ao aumento do tamanho adulto dos animais é o consumo alimentar residual (CAR). O CAR é um índice que permite comparar a eficiência de utilização dos alimentos entre animais contemporâneos com diferentes pesos vivos. É medido como a diferença entre o consumo observado além ou aquém do necessário para atender às exigências de manutenção e crescimento, por uma equação de regressão múltipla em função do ganho médio diário (GMD) e peso vivo metabólico ( $PV^{0,75}$ ). O resíduo obtido da regressão, ou seja, o CAR, é a diferença entre o consumo real de alimentos e o predito pela equação. Assim, animais mais eficientes têm CAR negativo

(consumo observado menor do que o predito para o ganho observado), e os menos eficientes tem CAR positivo (consumo observado maior do que o predito).

A literatura aponta variação genética para CAR em animais em crescimento e manutenção (ARCHER et al., 2004; NKRUMAH et al., 2007). O CAR apresenta moderada a alta herdabilidade, com a maior parte das estimativas variando de 0,18 a 0,35 (NKRUMAH et al., 2007; BOLORMAA et al., 2013), sendo uma medida geneticamente independente do peso vivo e do nível de produção (ARTHUR et al., 2001). Os autores observaram que existe satisfatória variabilidade fenotípica para consumo alimentar ajustado para taxa de ganho e peso vivo, e indicam a utilização do CAR como critério de seleção.

A determinação da característica de eficiência a ser utilizada depende dos objetivos dos programas de seleção. Nota-se que a maioria das pesquisas utilizam o CAR como medida de eficiência alimentar (BARENDSE et al., 2007; NKRUMAH et al., 2007; SHERMAN et al., 2009; BOLORMAA et al., 2011; BOLORMAA et al., 2012) e conseqüentemente como critério de seleção, devido ao fato de ser uma medida geneticamente independente do ganho de peso e peso adulto (KOCH et al., 1953). No entanto, os estudos das outras medidas de eficiência também são importantes na elucidação dos mecanismos biológicos e na busca de genes candidatos que determinam com essas características.

#### *1.2.4 Marcadores moleculares e seleção assistida por marcadores*

Os marcadores moleculares equivalem a pontos de referência na observação do genótipo e são definidos como toda e qualquer variação herdável presente no DNA e que diferencia dois ou mais indivíduos (SALMAN et al., 2009). Atualmente os polimorfismos do tipo SNP têm sido os marcadores moleculares mais utilizados em estudos de associação com características produtivas importantes em bovinos de corte. Para serem consideradas polimorfismos, tais variações precisam estar representadas pelo menos em 1% dos gametas de uma população. Os marcadores moleculares possuem herança mendeliana e permitem a identificação da presença ou posição de um gene de interesse.

A origem dos SNPs é devido a variações individuais, oriundas de mutações de ponto, substituições, adições ou deleções de nucleotídeos (VIGNAL, 2002). Dentre as principais aplicações do uso dos marcadores moleculares do tipo SNP no melhoramento animal estão:

determinação da estrutura genética de diferentes populações, estimação do grau de diversidade e divergência genética entre e dentro de populações, identificação e localização de regiões no genoma sujeitas à seleção, estudos de associação e estimação do valor genético dos animais a partir de dados genômicos (seleção genômica). Estes marcadores podem estar associados a locos que determinam características de interesse, situação adequada para realizar a seleção assistida por marcadores (ALZATE-MARIN et al., 2005).

A seleção assistida por marcadores se utiliza de marcadores moleculares para identificação de indivíduos geneticamente superiores. Assim, a biologia molecular pode ser integrada aos métodos tradicionais de seleção por meio da aplicação da seleção assistida por marcadores, trazendo benefícios como a diminuição no intervalo de gerações, aumento da acurácia e incremento à resposta de seleção (DEKKERS et al., 2007).

Estudos demonstram que a incorporação de informação de marcadores moleculares na seleção de características de herdabilidade média a alta tem proporcionado melhores resultados, em termos econômicos, se comparados a características de baixa herdabilidade, sendo mais difícil e menos preciso detectar QTL relacionados à características de baixa herdabilidade (TOGASHI & LIN, 2010). A utilização da seleção assistida por marcadores vai depender da arquitetura genética da característica, isto é, quantos genes estão envolvidos em sua expressão, o efeito de cada um e a interação existente entre eles.

A detecção de marcadores em genes candidatos que influenciarão características produtivas e o mapeamento de QTLs são ferramentas que podem ser incorporadas na seleção assistida por marcadores. Avanços recentes na genética e biologia molecular têm dado novo rumo à seleção assistida por marcadores. A recente disponibilidade de mapas de marcadores de densidade elevada e os baixos custos de genotipagem de um grande número de marcadores utilizando metodologias de genotipagem de alto rendimento têm renovados os interesses na incorporação das informações de marcadores em programas de melhoramento genético de bovinos (DEKKERS et al., 2007).

#### *1.2.5. Estudos de Associação Ampla do Genoma e Seleção Genômica*

A abundância de SNPs no genoma bovino e sua facilidade de genotipagem tornam esses marcadores eficazes para os estudos de associação ampla do genoma (GEORGES, 2007; GIBBS et al, 2009, GODDARD e HAYES, 2009). Estes estudos foram aprimorados com construção de

chips de genotipagem de alta densidade (MATUKUMALLI et al., 2009), e o custo atual viável dessa tecnologia tem permitido a sua utilização generalizada (ELZO et al., 2012), principalmente em estudos de associação.

Os estudos de associação ampla do genoma (*Genome Association Study, GWAS*) são capazes de identificar QTL, demonstrando a utilidade desta abordagem para dissecar a genética de características poligênicas (McCARTHY et al., 2008). O primeiro estudo de *GWAS* foi conduzido em humanos com degeneração macular relacionada à idade, e foi publicado em 2005 (KLEIN et al., 2005). As primeiras pesquisas que utilizaram ampla genotipagem de SNPs com bovinos começaram a ser publicadas em 2007 (HAYES et al., 2007; KHATKAR et al., 2007; HAYES & GODDARD; 2008). Barendse et al. (2007) foram o primeiro grupo de pesquisa a reportar estudos de associação ampla do genoma em bovinos. Em animais de produção, os estudos de associação ampla do genoma possuem muitas aplicações como detecção de QTL, determinação de redes gênicas e seleção genômica (EGGEN et al., 2012; FORTES et al., 2012b; SNEELING et al., 2012).

A seleção genômica, refere-se ao uso de um grande número de marcadores genéticos, tais como SNPs, cobrindo o todo o genoma para predizer o valor genético dos indivíduos (GODDARD et al., 2011). Como proposto por Meuwissen et al. (2001), a seleção genômica utiliza as associações de um grande número de marcadores em todo o genoma com fenótipos, capitalizando o desequilíbrio de ligação (*Linkage Disequilibrium, LD*) entre marcadores e locos de características quantitativas. Este *LD* gera uma associação entre alguns marcadores e a característica (BOLORMAA et al., 2011).

A seleção genômica é uma forma de seleção assistida por marcadores, em que marcadores genéticos que cobrem todo o genoma são usados para que todos loci de características quantitativas estejam em desequilíbrio de ligação com, pelo menos, um marcador. Assim, potencialmente toda a variância genética é explicada pelos marcadores; e o número de efeitos por QTL a ser estimado é pequeno (GODDARD & HAYES, 2007). Dados de simulação mostraram que o valor genético poderia ser previsto com uma precisão de 0,85 se comparado ao uso de marcadores individuais (MEUWISSEN et al., 2001).

No entanto, se os marcadores associados a uma característica forem utilizados para a seleção genômica ou para o mapeamento de QTL, é necessário confirmar em populações independentes as associações que foram descobertas. Muitas vezes essas tentativas de confirmação não são bem sucedidas (PRYCE et al., 2010b). A não confirmação dessas associações pode ser

devido à 3 razões: 1) a descoberta original era um falso positivo, 2) a associação é específica para essa raça; ou o QTL não segrega em outra raça ou a fase ou LD se diferencia entre raças, ou 3) há falta de poder estatístico na população de descoberta ou na população de validação, ou em ambas populações (BOLORMAA et al., 2011).

A seleção genômica pode ser útil para características que são difíceis de medir, como características de consumo alimentar (BOLORMAA et al., 2011). As informações obtidas nos estudos de associação de polimorfismos com características produtivas podem ser posteriormente combinadas em programas de seleção para aumentar a precisão na escolha dos animais com melhor potencial genético (SPENCER, 2009; MAGEE et al., 2010). Informações de genotipagem utilizando chips de alta densidade de animais fenotipados para eficiência alimentar poderiam melhorar a nossa capacidade de identificar indivíduos mais eficientes.

Com o advento dos chips de genotipagem, vários estudos de associação envolvendo as mais diferentes características produtivas vêm sendo desenvolvidos em bovinos (BARENDSE et al., 2007; COLE et al., 2009; SNELLING et al., 2010; ROLF et al., 20011; BOLORMAA et al., 2011; PETERS et al., 2012; KIZILKAYA et al., 2013; PETERS et al., 2013; LU et al., 2013).

Barendse et al., (2007) identificaram SNPs e sistemas fisiológicos associados com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Angus, Brahman, Belmont Red, Hereford, Murray Grey, Santa Gertrudis e Shorthorn. Cole et al. (2009) realizaram estudos de associações com características produtivas em gado de leite. Snelling et al., (2010) realizaram estudos de associação para características de crescimento em animais *Bos taurus*.

Rolf et al. (2011) realizaram GWAS para características de CMS, CAR e GMD em novilhos da raça Angus. Bolormaa et al. (2011) investigaram associação de regiões genômicas para características de consumo e crescimento em 3 tipos de raças de bovinos de corte: *Bos indicus*, *Bos taurus*, e *B. indicus* × *B. Taurus*. Peters et al. (2011; 2013) avaliaram a associação de QTL com características de crescimento, carcaça e características reprodutivas em novilhas da raça Brangus. Kilzilkaya et al. (2013) avaliaram QTL associados à ceratoconjuntivite infecciosa bovina, uma doença altamente contagiosa, em bovinos da raça Angus. Lu et al. (2013) analisaram associações com características de eficiência alimentar e características de crescimento em uma população de bovinos mestiços.

Estudos de GWAS com bovinos da raça Nelore vêm surgindo mais recentemente (TIZIOTO et al., 2013; UTSUNOMIYA et al., 2013; CESAR et al., 2014, SANTANA et al., 2014). Tizioto

et al. (2013) e Cesar et al. (2014) identificaram regiões genômicas e genes associados com características de maciez de carne e gordura intramuscular em novilhos Nelore. Utsunomiya et al. (2013) identificaram QTLs e genes para característica de peso ao nascimento, e Santana et al. (2014) identificaram QTLs para características de eficiência alimentar, como consumo alimentar residual e consumo de matéria seca em touros jovens e novilhos da raça Nelore.

Estudos de associação específicos para a raça Nelore são necessários pois a magnitude do LD, e conseqüentemente a magnitude das associações podem variar entre raças. Diferenças entre o gado indiano e taurino ocorreram durante o processo histórico de domesticação e seleção, como conseqüência do tamanho efetivo das populações (TENESA et al., 2007). Esse histórico evolutivo das populações de bovinos de corte leva a diferenças no LD entre os alelos do SNP, e conseqüentemente nos loci que controlam essas características entre raças (SERAO et al., 2013).

A grande maioria dos estudos de associação com características de eficiência alimentar são realizados em animais *Bos taurus*, portanto a identificação de regiões genômicas e genes específicos para animais *Bos indicus* pode contribuir para a efetiva aplicação da genética molecular ao melhoramento genético desta raça no Brasil.

#### 1.2.6. QTL para características de eficiência alimentar em bovinos de corte

A identificação e o mapeamento de QTL para características de carcaça e crescimento em bovinos de corte tem sido relatados há alguns anos (DAVIS et al., 1998; STONE et al., 1999; CASAS et al., 2000). Davis et al. (1998) mapearam cinco QTL para peso ao nascimento em bovinos Charolais x Brahman nos cromossomos 5, 6, 14, 18, e 21. Stone et al. (1999) relataram evidências significativas de QTL nos cromossomos 1, 2, 5, 7, 11, 13, 14, 18 e 26 afetando o crescimento e características de carcaça em uma família de meios-irmãos Brahman. Um estudo realizado por Casas et al. (2000) sugeriu QTLs nos cromossomos 5, 6, 7, 13, 14, 17, 19, 22, 27, e 29 para a composição de carcaça e crescimento em *Bos taurus*.

A base genética relacionada à eficiência alimentar também tem sido estudada e vários QTL vêm sendo associados com consumo alimentar residual (BARENDSE et al., 2007; NKRUMAH et al., 2007a; SHERMAN et al., 2008a,b). Nkrumah et al. (2007) e Sherman et al. (2008a) observaram QTL para CAR nos cromossomos 1, 7, 12, 17, 18, 19, 21, 24 e 26; QTL para conversão alimentar nos cromossomos 7, 11, 17, 24 e 28 e 1 QTL para consumo de ração no cromossomo 18, para

animais *Bos taurus*. QTL para CAR têm sido descritos também nos cromossomos 2, 5, 10, 20 e 29 para *Bos taurus* (MOORE et al., 2006; SHERMAN et al., 2008).

Marques et al. (2009) identificaram QTL para CAR nos cromossomos 2, 6, 7, 10, 11, 13 e 16; para CA nos cromossomos 9, 12, 16, 17 e 21; para GMD nos cromossomos 9, 14, 15, 17 e para CMS nos cromossomos 2, 5, 6, 9, 10, 11, 20 e 23 em *Bos taurus*. Rolf et al. (2011) detectaram regiões de QTLs nos cromossomos 3, 5, 6, 11, 12, 14, 15, 17, 19, 21 e 24 associados com CMS, GMD e CAR em bovinos *Bos taurus*. Bolormaa et al. (2011) identificaram SNPs significativos para CAR nos cromossomos 3, 5, 7 e 8 em bovinos de corte. Serao et al. (2013) identificaram SNPs associados com CAR e eficiência de ganho em quase todos os cromossomos, exceto nos cromossomos 21 e 27 em bovinos *Bos taurus*. Os cromossomos mais significativos foram 6, 8, 12, 15 e 17.

Karisa et al. (2013) encontram SNPs associados com CAR nos cromossomos 1, 2, 4, 7, 15, 18, 20 e 29, indicando que a maioria dos SNPs significativos foram localizados nos cromossomos 1, 2 e 20, para animais *Bos taurus*. Em recente estudo com novilhos Nelore, Santana et al. (2014) identificaram QTLs para CAR e CMS nos cromossomos 4, 8, 14 e 21.

Regiões genômicas com QTL associados ao CAR têm sido relatadas em todos os cromossomos bovinos, exceto nos cromossomos 27 e X (SHERMAN et al., 2008, 2009, 2010) BOLORMAA et al, 2011). A identificação de regiões de QTL em praticamente todos os cromossomos do genoma bovino relacionados ao consumo alimentar residual, e conseqüentemente à eficiência de utilização de alimentos, demonstra o perfil poligênico desta característica.

Características de importância econômica são características quantitativas, influenciadas por vários genes em diferentes locus dentro do genoma, geralmente com efeito pequeno (Garrick et al. 2008). Segundo Moore et al. (2009), estudos mostraram que centenas de genes estão associados com CAR, o que não é surpreendente, dada a diversidade de processos fisiológicos envolvidos com esta característica.

### 1.2.7. Genes Candidatos

A maioria das características complexas é caracterizada por interações complexas entre componentes celulares, tais como o DNA, RNA e proteínas, sendo influenciadas simultaneamente por vários processos biológicos (BARABÁSI & OLTVAI, 2004).

Estudos de associação genômica podem identificar SNPs e outras variantes no DNA, os quais estão associados a uma característica; no entanto, não são capazes de identificar genes causais (KARISA et al., 2013). O conhecimento das funções e interações gênicas podem proporcionar grande conhecimento para os mecanismos que afetam características poligênicas, facilitando a aplicação da seleção genômica para características produtivas (SNELLING et al., 2012). Para se entender os processos biológicos relacionados à características de eficiência alimentar é necessário abordar os mecanismos pelos quais uma variante associada dá origem ao fenótipo e às diferenças observadas entre os indivíduos.

A abordagem de genes candidatos utiliza um conhecimento prévio, baseado nas funções gênicas para inferir o seu papel biológico na variação observada em uma característica. Genes candidatos posicionais são genes localizados em uma região cromossômica associada com a característica de interesse e/ou candidatos funcionais, são genes que estão envolvidos em uma via metabólica de interesse, codificando uma proteína relacionada com a característica fenotípica em estudo. O conhecimento sobre a função biológica de um gene pode ser indicativo do possível envolvimento do mesmo nas características fenotípicas que envolvem esses processos biológicos. No entanto, estudos de validação em diferentes populações são necessários antes de se indicar esses genes como potenciais genes candidatos (ELZO et al., 2012).

O gene *Insulin-like growth factor 1 (IGF-1)* também conhecido como somatomedina C, está mapeado no cromossomo 5 bovino. IGF1 é um hormônio que regula o crescimento celular e anabolismo e foi associado com a eficiência alimentar (BISHOP et al 1989;. VARA et al. 1998). Polimorfismos do gene *Growth hormone 1 (GH)* também foram associados à produção (HOJ et al., 1993, MOODY et al., 1996), quantidade de gordura do leite (YAO et al., 1996), peso ao nascimento (ROCHA et al., 1992) e à composição e qualidade da carne em bovinos *Bos taurus* (TAYLOR et al., 1998).

Zwierzczowski et al. (2001) identificaram associação entre o polimorfismo do gene da leptina e o consumo e a conversão alimentar. A leptina é um hormônio produzido pelo tecido adiposo e que tem ação sobre os mecanismos que regulam a ingestão, o metabolismo energético, a reprodução e até o sistema imune. Outros autores também detectaram polimorfismos no gene da leptina bovino (HAEGEMAN et al., 2000; LAGONIGRO et al., 2003; SALMAN, 2003) e os associaram ao consumo de ração (LAGONIGRO et al., 2003).

Barendse et al. (2007) identificaram vários genes com efeitos sobre o CAR em bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*. Dentre os genes identificados estão: *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)*, *Ubiquitin-conjugating enzyme E2F (UBE2F)*, *ATPase, Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> transporting, alpha 1 polypeptide (ATP1A1)*, *Fibroblast growth factor 2 (FGF2)* entre outros. Esses genes estão envolvidos em processos metabólicos relacionados à expressão da insulina, apoptose, turnover de proteína, canais de íons, crescimento e desenvolvimento.

Sherman et al. (2008b) analisaram vários genes com efeitos sobre características produtivas e eficiência alimentar em animais *Bos taurus*. Dentre os genes estão: *Neuropeptide Y (NPY)*, *Growth hormone receptor (GHR)*, *Ghrelin (GHRL)*, *Un-coupling proteins 2 and 3 (UCP2 e UCP3)*, *IGF2*, *Corticotrophin-releasing hormone (CRH)*, *Cocaine andamphetamine regulated transcript (CART)*, *Melano-cortin-4 receptor (MC4R)*, *Proopiomelanocortin (POMC)* e *GH*. O gene *NPY* atua como estimulador central do apetite, e é importante para o consumo de ração e controle do balanço de energia (WYNEE et al., 2005). O gene *GHR* está vinculado ao gene *GH*, resultando na ativação de sistemas hormonais envolvidos na promoção do crescimento (BREIER, 1988). O gene *GHRL* é um peptídeo também associado ao *GH* e age como estimulante do apetite (KOJIMA et al, 1999; WYNNE et al., 2005). O gene *IGF2* está envolvido com crescimento, metabolismo e regulação do peso metabólico (DeCHIARA et al., 1990), e possui um SNP associado com área de olho de lombo em bovinos de corte (SCHMUTZ e GOODALL, 2005). Os genes *UCP2* e *UCP3* foram relacionados com eficiência metabólica (ERLANSON-ALBERTSSON, 2003).

Em outro estudo semelhante, Sherman et al. (2010) encontraram SNPs nos genes *Fibronectin type III domain containing 3B (FNDC3B)*, *RUN and FYVE domain containing 3 (RUFY3)*, *Propionyl CoA carboxylase, alpha polypeptide (PCCA)*, *Cadherin 13, H-cadherin (CDH13)*, *Glucocorticoid receptor DNA binding factor 1 (GRLF1)*, *Protein kinase cGMP-dependent, type I (PRKG1)*, *G protein-coupled receptor 137 (GPR137)* associados com CAR. Estes genes estão envolvidos com metabolismo de lipídeos, glicoproteínas e apoptose.

Abo-ismail (2013) indentificaram os genes *Protease serine (PRSS2)* e *Cholecystokinin B receptor (CCKBR)* associados com eficiência alimentar envolvendo processos digestivos e metabólicos em animais cruzados. Karisa et al (2014) encontraram vários genes nos cromossomos 1, 2, 4 ,7, 15, 18, 20 e 29 associados com CAR em bovinos *Bos taurus*. Dentre os genes encontrados estão: *Pleckstrin homology domain containing, family A member 7 (PLEKHA7)*, *Poly*

*ADP-ribose polymerase family member 14 (PARP14)*, *SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily a-like 1 (SMARCA1)*, *Ubiquitin-like modifier activating enzyme 5 (UBA5)*, *Low density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5)*, *Calpastatin (CAST)*, *Insulin induced gene 1 (INSIG1)*, *GHR*, *Oncostatin M receptor (OSMR)* e *Leukemia inhibitory factor receptor alpha (LIFR)*. Estes genes estão envolvidos com a síntese de lipídeos e esteróides, metabolismo de proteínas e carboidratos, regulação da expressão gênica através da transcrição do DNA, estabilidade e degradação de proteínas.

Vários estudos sobre genes candidatos relacionados à eficiência alimentar têm sido desenvolvidos, no entanto, a maioria desses estudos é realizado com animais *Bos taurus* (MOORE et al., 2006; BARENDSE et al., 2007; NKRUMAH et al., 2007; SHERMAN et al., 2008b, KARISA et al., 2014). De acordo com Barendse et al (2007) os genes que afetam determinada característica poderão mudar entre diferentes espécies, e diferenças no desempenho e eficiência estão bem estabelecidos (NKRUMAH et al, 2007).

Em recente estudo com bovinos Nelore, Santana et al., (2014) identificaram alguns genes candidatos para eficiência alimentar em bovinos, dentre eles estão: *Stathmin-like 2 (STMN2)*, *Coiled-coil domain containing 171 (CCDC171)*, *PC4 and SFRS1 interacting protein 1 (PSIP1)*, *Small nuclear RNA activating comp 3 (SNAPC3)*, *Zinc finger protein 804B (ZNF8048)*, *Annexin A10 (ANXA10)*, *DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypep 60 (DDX60)*, *G protein-coupled receptor 132 (GPR132)*, *Cell division cycle associated 4 (CDCA4)*, *AHNAK nucleoprotein 2 (AHNAK2)* e *RNA polymerase III transcr init factor 90 (BRF1)*.

Segundo Sherman et al. (2008), genes que regulam o metabolismo e particionamento de energia têm potencial de influenciar características produtivas. A regulação fisiológica da ingestão, o crescimento, e partição de energia em animais está sob o controle de múltiplos genes, que podem ser importantes candidatos para desvendar a variação genética em características economicamente relevantes (SHERMAN et al., 2008).

Moore et al. (2009) observaram que nenhum gene principal que afeta o consumo alimentar residual foi encontrado, embora múltiplos marcadores tenham sido descritos. Ainda segundo esses autores, a interação dos genes que afetam o CAR com outras características ainda não foi totalmente compreendida, e o número de animais com estimativas confiáveis de CAR permanece pequeno. A identificação de genes candidatos para eficiência alimentar específicos para bovinos

da raça Nelore e seus polimorfismos pode contribuir para a explicação da variação genética desta característica e para o estabelecimento de critérios de seleção da raça.

#### 1.2.7.1. Gene *NEUROD1*

O gene *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)* está localizado no cromossomo 2 bovino, o qual apresenta QTLs para consumo alimentar residual (MARTINEZ et al., 2010), ganho de peso diário (LI et al., 2010), peso corporal (CASAS et al., 2003) e área de olho de lombo (ALLAIS et al., 2010).

Sua via metabólica indica participação no metabolismo de carboidratos e mais especificamente na regulação da expressão do gene da insulina (MALECKI et al., 1999). A insulina é responsável pela redução da glicemia, ao promover o ingresso de glicose nas células. É essencial ao consumo de consumo de carboidratos, na síntese de proteínas e armazenamento de lipídeos. Estudo conduzido por Malecki et al., (1999) em humanos, relacionou mutações no gene *NEUROD1* com o desenvolvimento de diabetes mellitus do tipo II.

#### 1.2.7.2. Gene *KCNIP4*

O Gene *Kv channel interacting protein 4 (KCNIP4)*, está presente no cromossomo 6 bovino, no qual existem relatos de QTLs para características de produção (CASAS et al., 2000; SHERMAN et al., 2009; McCLURE et al., 2010). Membro da família *KCNIP*, são proteínas de ligação de cálcio relacionadas a canais de potássio (PRUUNSILD et al., 2005). Os canais de potássio estão envolvidos na regulação da homeostase celular, tendo papel em diversas rotas metabólicas basais.

Pruunsild et al. (2005) analisaram a expressão de diferentes isoformas do gene *KCNIP* em ratos e humanos e observaram níveis de expressão do gene *KCNIP4* em tecidos do coração, cólon, rim, próstata e intestino. Barendse et al., (2007) citaram este gene como gene candidato para CAR em bovinos.

#### 1.2.7.3. Gene *VEGFC*

O gene *Vascular endothelial growth factor C (VEGFC)* está presente no cromossomo 27 bovino. Pertence à família do fator de crescimento VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), o qual é um potente fator angiogênico secretado por adipócitos. A adipogênese é um processo de diferenciação celular altamente regulado, em que os pré-adipócitos são transformados em células diferenciadas. Os adipócitos desempenham papel vital na homeostase energética e processam a maior reserva de energia como triglicerol nos animais (YAMADA, et al., 1997). A leptina é uma adipocitocina importante que desempenha papel crucial na regulação do apetite e do metabolismo (PELLEYMOUNTER et al., 1995).

### 1.3. Objetivos

- Identificar genes candidatos para eficiência alimentar em famílias de referência da raça Nelore;
- Prospectar e estimar efeitos de SNPs em genes candidatos associados à eficiência alimentar em famílias de referência da raça Nelore;
- Identificar regiões genômicas e genes candidatos localizados próximos aos SNPs associados com eficiência alimentar por meio de estudos de associação ampla do genoma.

### 1.4. Referências

ABIEC. Associação Brasileira das Indústrias Exportadoras de Carnes. **Pecuária Brasileira**. Disponível em: < [www.abiec.com.br](http://www.abiec.com.br)>. Acesso em: 24 de abril de 2014.

ABO-ISMAIL, M., KELLY, M. Identification of single nucleotide polymorphisms in genes involved in digestive and metabolic processes associated with feed efficiency and performance traits in beef. **J. Anim. Sci.**, v.91, n.6, p. 2512–2529, 2013.

ALENCAR, M.M. Perspectivas para o melhoramento genético de gado de corte no Brasil. In:

SIMPÓSIO PARA O MELHORAMENTO ANIMAL. REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 41., 2004, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande: SBZ, 2004, p. 358-367.

ALLAIS, S. et al. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds, 2010. **J. Anim. Sci.**, v. 88, n.2, p. 446-454, 2010.

ALZATE-MARIN, A.L. et al. Seleção Assistida por Marcadores Moleculares Visando ao Desenvolvimento de Plantas Resistentes a Doenças, com Ênfase em Feijoeiro e Soja. **Fitopatol. Bras.** v.30, n.4, p. 333-342, 2005.

ARCHER, J. A. et al. Genetic variation in feed efficiency and its component traits. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 1998. **Proceedings...** Armidale, v. 25. p. 81-84.

ARCHER, J. A. et al. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. **J. Agric. Res.**, v.50, 147-161, 1999.

ARCHER, J. A., HERD, R. M., ARTHUR, P. F. Feed efficiency in beef cattle. In: FEED EFFICIENCY WORKSHOP, 2001. Armidale, Austral **Proceedings...** 2001. p. 107.

ARCHER, J.A., BARWICK, S.A., GRASER, H.U. Economic evaluation of beef cattle breeding schemes incorporating performance testing of young bulls for feed intake. **Australian J. of Experimen. Agri.**, v. 44, p. 393-404, 2004.

ARTHUR, P. F. et al. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 2805-2811, 2001.

ARTHUR, P.F., HERD, R.M. Efficiency of feed utilization by livestock: implications and benefits of genetic improvement. **Canadian J. Anim. Sci.**, Ottawa, v. 85, p. 281-290, 2005.

ARTHUR, P.F., HERD, R. M. Residual feed intake in beef cattle. **Rev. Bras. de Zootecnia**, Viçosa, v.37, n. Espe. 37, p. 269- 279, 2008.

BARENDSE, W. et al. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v.176, p.1893-905, 2007.

BASARAB, J.A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Can. J. Anim. Sci.**, v.83, p.189-204, 2003.

BOLORMAA, S. et al. Detection of chromosome segments of zebu and taurin origin and their effect on beef production and growth. **J. Anim. Sci.**, v.89, p.2050–2060, 2011.

BOLORMAA, S. et al. Accuracy of prediction of genomic breeding values for residual feed intake, carcass and meat quality traits in *Bos taurus*, *Bos indicus* and composite beef cattle. **J. Anim. Sci.** v.91, n.7, p. 3088-104.

BREIER, B.H., GLUCKMAN, P.D., BASS, J.J. Influence of nutritional status and oestradiol-17 $\beta$  on plasma growth hormone, insulin-like growth factors-I and II and the response to exogenous growth hormone in young steers. **J. of Endocrin.** , v. 118, p. 243-50, 1988.

BRODY, S. **Bioenergetics and growth with special reference to the efficiency complex in domestic animals.** Baltimore: Reinhold Publishing Corporation, 1945.

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p. 2976-2983, 2003.

CESAR, A. S. et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nelore cattle. **BMC Genetics**, v.15, n.1, p.39, 2014.

CEZAR, I.M. et al. **Sistemas de Produção de Gado de Corte no Brasil: Uma Descrição com Ênfase no Regime Alimentar e no Abate.** Embrapa Gado de Corte (Campo Grande, MS), 2005. 40p.

CRC FOR BEEF GENETIC TECHNOLOGIES PROSPECTUS. **Cooperative Research Centre for Cattle and Beef Quality.** Armidale, Australia, 2004.16p.

DAVIS, G. P, DANISE, S. K. The Impact of Genetic Markers on Selection. **J. Anim. Sci.**, v. 76, p. 2331–2339, 1998.

DECHIARA, T. M., EFSTRATIADIS, A., ROBERTSON, E. J. A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. **Nature**, v.345, p. 78–80, 1990.

DEKKERS, J. C. M. Commercial application of markers and gene-assisted selection in livestock: strategies and lessons. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.313-328, 2004.

DEKKERS, J.C.M. Prediction of response to marker-assisted and genomic selection using selection index theory. **J. Anim. Breed. Genet**, 124, 331–341, 2007.

ELZO, M. A. et al. Genomic-polygenic evaluation of Angus-Brahman multibreed cattle for feed efficiency and postweaning growth using the Illumina 3K chip. **J. Anim. Sci.**, 90, 2488–2497, 2012.

ERLANSON-ALBERTSSON, C. The role of uncoupling proteins in the regulation of metabolism. **Acta Physiol.**, v.178, p. 405–412, 2003.

FERRIS, F. L. et al. Complement Factor H Polymorphism in Age-Related Macular Degeneration. **Science**, 308, 385–9, 2005.

FITZHUGH, H. A., TAYLOR, C. S. Genetic analysis of degree of maturity. **J. Anim. Sci.**, v.33, p.717–725, 1971.

FORTES, M. R. S. et al. Gene network analyses of first service conception in Brangus heifers: Use of genome and trait associations, hypo-thalamic-transcriptome information, and transcription factors. **J. Anim. Sci.**, v. 90, p. 2894–2906, 2012.

GEORGES, M. Mapping, fine mapping, and molecular dissection of quantitative trait loci in domestic animals. **Rev. Genomics Hum. Genetic**, v.8, p. 131–62, 2007.

GIBBS, R. A. et al. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science**, v. 324, p.528–532, 2009.

GODDARD, M.E., HAYES, B. J. Genomic selection. **J. Anim. Breed. Genet**, v.124, p. 323–330, 2007.

GODDARD, M. E., HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programs. **Nat. Rev. Genet.**, v. 10, p. 381–391, 2009.

HAEGEMAN, A., VAN ZEVEVEREN, A., PEELMAN, L.J. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. **Anim. Genetics**, v. 31, n.1, p.79, 2000.

HAYES, B.J. et al. Accuracy of marker assisted selection with single markers and marker haplotypes in cattle. **Genome. Res.** v. 89, n.4, p.215-20, 2007

HAYES B.J., GODDARD M.E. Technical note: prediction of breeding values using marker derived relationship matrices. **J. Anim. Sci.**, v. 86, p. 2089–92, 2008.

HAYES, B.J., et al. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genet. Sel. Evol**, v. 41, p. 51, 2009.

HERD, R.M., ARCHER, J.A., ARTHUR, P.F. Reducing the cost of beef production through genetic improvement in residual feed intake. Opportunity and challenges to application. **J. Anim. Sci.**, v.81, n.1, p. 9-17, 2003.

HOJ, S., FREDHOLM, M., LARSEN, N. J. Growth hormone gene polymorphism associated with selection or milk fat production in lines of cattle. **Anim. Genetics**, v.24, p. 91-96, 1993.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística- IBGE. Disponível em:<<http://www.ibge.gov.br/home/>>. Acesso em: 24 de abril de 2014.

JORDAN, B. et al.Genome complexity reduction for SNP genotyping analysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, v. 99, n.5, p. 2942-2947, 2002.

KARISA, B., MOORE, S., PLASTOW, G. Analysis of biological networks and biological pathways associated with residual feed intake in beef cattle. **Anim. Sci. J.**, v. 85, p. 374–387. 2014

KARISA, B. K. et al. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms associated with variation in residual feed intake in beef cattle. **J. Anim. Sci.** v.91, n.8, p.3502-13, 2013.

KHATKAR, M.S. et al. A primary assembly of a bovine haplotype block map based on a 15,036-single-nucleotide polymorphism panel genotyped in Holstein-Friesian cattle. **Genetics**, v.176, p. 763–72, 2007.

KELLNER, O. **The scientific feeding of animals**. McMillan, New York. 1909

KIZILKAYA, K., FERNANDO, R. L., GARRICK, D. J.. Genomic prediction of simulated multi breed and purebred performance using observed fifty thousand single nucleotide polymorphism genotypes. **J. Anim. Sci.**, v.88, p. 544–551, 2010.

KIZILKAYA K. et al. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. **BMC Genetics**, v.14, p.23, 2013.

KLEIN, R. J. et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. **Science**. v. 15, n.308 (5720), p.385-9, 2005.

KOJIMA, M. et al. Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. **Nature**, v. 402, p. 656–660, 1999.

KOCH, R.M. et al. Efficiency of feed use in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.22, p. 486-494, 1963.

LANNA, D. P. D., CALEGARE, L. R., BERNDT, A. Conversão alimentar – Eficiência econômica de vacas de corte puras e cruzadas. In: SIMPÓSIO DE PECUÁRIA DE CORTE, 3., 2003. Lavras. **Anais...** Lavras: Universidade Federal de Lavras, 2003, p. 87-110.

LAGONIGRO, R. et al. A new mutation in the coding region of the bovine leptin gene associated with feed intake. **Anim. Genetics**, v. 34, p. 371-374, 2003.

LI, F. et al. Novel SNPs of the bovine *GAD1/gad67* gene and their association with growth traits in three native Chinese cattle breeds. **Mol. Biol. Repo.**, v. 37, n.1, p.501-5, 2010.

MAGNABOSCO, C.U. et al., **Catálogo de linhagens do germoplasma zebuino: raça Nelore**. Brasília: Embrapa-Cenargen, 1997.

MARQUES, E., et al. Polymorphism in positional candidate genes on BTA 14 and 26 affect carcass quality in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 87, p.2475–2484, 2009.

MARSHAL, D.A., PARKER, W.R., DINKEL, C.A. Factors affecting efficiency to weaning in Angus, Charolais and reciprocal cross cows. **J. Anim. Sci.**, v. 43, p. 1176-1187, 1976.

MARTINEZ, A. et al. Effect of breed body size and the muscular hypertrophy gene in the production and carcass traits of concentrate-finished yearling bulls. **J. Anim. Sci.**, v.88, n.4, p.1229-39, 2010.

MATUKUMALLI, L. K. et al. Development and characterization of high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS One**, v.4, n.4, p.5350, 2009.

MERTENS, D. R. Predicting intake and digestibility using mathematical models of ruminal function. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v.64, n.6, p.1548-1558, 1987.

MCCARTHY M.I. et al. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. **Nature Review Genetics** v.9, 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, p.597–607, 2010.

McMORRIS, M.R., WILTON, J.W. Breeding system, cow weight and milk yield effects on various biological variables in beef production. **J. Anim. Sci.**, Savoy, v. 63, p. 1361-1372, 1986.

MERTENS, D. R. Creating a system for meeting the fiber requirements of dairy cows. **J. of Dairy Sci.**, Savoy, v.80, p.1463-1481, 1997.

MERTENS, D. R. Regulation of forage intake. In: FAHEY, J. F.G. C. (Ed.). **Forage quality evaluation and utilization**. Madison: American Society of Agronomy, 1994, p.450-493,

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

MOODY, D. E. et al. Characterization of DNA polymorphism in three populations of Hereford cattle and their associations with growth and maternal EPD in line I Herefords. **J. Anim. Sci.**, v. 74, p. 1784-1793, 1996.

MALECKI, M. T. et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. **Nature genetics**, v. 23, 1999.

MOORE, S. S., MUJIBI, F. D., SHERMAN, E. L. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 87, p. 41-47, 2009.

NKRUMAH, J. D. et al. Different measures of energetic efficiency and their relationships with growth, feed intake, ultrasound and carcass measurements in hybrid cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 82, p. 2451-2459, 2004.

NKRUMAH J. D. et al. Genetic and phenotypic relationships of feed intake and measures of efficiency with growth and carcass merit of beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 85, p. 2711-20, 2007.

PELLEYMOUNTER, M. A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v.269, p.546-9, 1995.

PETERS, S. O. et al. Bayesian quantitative loci inference from whole genome analyses of growth and yearling ultrasound measures of carcass traits in Brangus heifers. **J. Anim. Sci.**, v. 90, p.3398-3409, 2012.

PETERS, S., KIZILKAYA, K. Heritability and Bayesian genome-wide association study of first service conception and pregnancy in Brangus heifers. **J. Anim. Sci.**, v.91, p. 605-612, 2013.

PRUUNSILD, P., TIMMUSK, T. Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. **Genomics**, v.86, p. 581-9, 2005.

PRYCE, J. E. et al. Accuracy of genomic predictions of residual feed 14 intake and 250 day bodyweight in 15 growing heifers using 625,000 SNP markers. **J. Dairy Sci.**, v.95, p.2108 - 2119, 2012.

REGITANO, L. C. A., COUTINHO, L. L., **Biologia molecular aplicada à produção animal.** EMBRAPA-INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2001, 215p.

RICHARDSON, E.C, HERD, R.M. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. **Australian J. of Experimental Agric**, v. 44, p. 431-440, 2004.

RESENDE, M.D.V. et al. Seleção genômica ampla (GWS) e maximização da eficiência do melhoramento genético. **Pesq. Flores. Bras.**, Colombo, n.56, p.63-77, 2008.

ROCHA, J. L., BAKER, J. F., WOMACK, J. E. Statistical associations between restriction fragment length polymorphisms and quantitative traits in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.70, p.3360-3370, 1992.

ROLF, M. M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Anim. Genet.**, v.43, p. 367 -374, 2011.

SALMAN, A. K. D. **Polimorfismo e expressão gênica da lepina em bovinos superprecoces.**, 2003. 49p. Tese, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista..., Botucatu, 2003.

SANTANA, M.H.A., et al. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nellore cattle. **BMC Genetics**, v.15, p.21, 2014.

SAATCHI, M., WARD, J., GARRICK, D. J. Accuracies of direct genomic breeding values in Hereford beef cattle using national or international training populations.. **J. Anim. Sci.**, v.91, n.4, 1538-51, 2013.

SCHENKEL, F.S., MILLER, S.P., WILTON, J.W. Genetic parameters and breed differences for feed efficiency, growth, and body composition traits of young beef bulls. **Canadian J. Anim. Sci.**, Ottawa, v. 84, p. 177-185, 2004.

SCHENKEL, F. S. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.9, n. 83, p. 2009 - 2020, 2005.

SCHMUTZ, S., GOODALL, J. **Improving production characteristics of cattle.** European Patent Office WO2005007881. 2005.

SHERMAN, E L, et al. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 87, n. 1, p.37-45, 2009.

SHERMAN, E. L., NKRUMAH J.D, MOORE, S.S. Whole Genome SNP associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 88, n.1, p.16-22, 2010.

SHOLOTERRER, C. Opinion: The evolution of molecular markers – just a matter of fashion. **Nature**, v.5, p.63-69, 2004.

SNELLING, W. M. et al. How SNP chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement females. **J. Anim. Sci.**, v. 90, p.152-1165, 2012.

SPENCER, H. G. Effects of genomic imprinting on quantitative traits. **Genetics**, v. 136, p. 285-293, 2009.

STONE, R. T. et al. A primary screen of the bovine genome for QTL affecting carcass and growth traits. **J. Anim. Sci.**, v.77, p.1379–1384, 1999.

TAYLOR, J. F., COUTINHO, L. L., HERRING, K. L. Candidate gene analysis of GH1 for effects on growth and carcass composition of cattle. **Anim. Genetics**, v.29, p.194-201, 1998.

TENESA, A. et al. Estimation of linkage disequilibrium in a sample of the United Kingdom dairy cattle population using unphased genotypes. **J. Anim. Sci.** v.81, p.617–623, 2003.

TIZIOTO, P.C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiol. Genomics**, v.45, n. 21, p. 1012–20. 2013.

TOGASHI, K., LIN, C.Y. Theoretical efficiency of multiple-trait quantitative trait loci-assisted selection. **J. of Anim. Breeding and Genetics**, v. 127, n. 1, p. 53-63, 2010.

UTSUNOMIYA, Y. T. et al. Genome-wide association study for birth weight in Nelore cattle points to previously described orthologous genes affecting human and bovine height. **BMC Genetics**, v.14, p.52. 2013.

VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Gen. Sel. Evol.**, v. 34, p. 275-305, 2002.

WILCOX, G. Insulin and Insulin Resistance. **Clin. Biochem. Rev.**, v.26, n.2, p.19-39, 2005.

WYNNE, K. et al. Appetite control. **J. Endocrinol.**, v.184, p.291–318, 2005.

YAMADA, K. et al. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. **Diabetologia**, v. 40, n.6, p.706-710, 1997.

YAO, J. et al. Sequence varies in the bovine growth hormone characterized by single – strand conformation polymorphisms (SSCP) analysis and their association with milk production traits in Holsteins. **Anim. Genetics**, v. 144, p. 1809, 1996.

ZWIERZCHOWSKI, L. et al. An association of growth hormone  $\kappa$ -casein,  $\beta$ -lactoglobulin, leptin and *Pit-1* loci polymorphism with growth rate and carcass traits in beef cattle. **Anim. Sci Papers and Reports**, v. 19, p. 65-78, 2001.

## Capítulo 2. Identificação de genes candidatos posicionais para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore

### 2.1. Resumo:

Em bovinos de corte, diversos genes já foram descritos como relacionados à características produtivas. Este estudo objetivou estudar os genes candidatos funcionais e posicionais *Neurogenic differentiaton 1 (NEUROD1)*, *Kv channel interacting protein 4 (KCNIP4)*, *Vascular endothelial growth factor C (VEGFC)*, e investigar sua associação com características de produção em famílias de referência da raça Nelore. Foram utilizados, no total, 585 novilhos descendentes de 34 touros escolhidos para representar a variabilidade na raça Nelore. Para o gene *NEUROD1*, que apresentava somente 2 SNPs representados no *BovineHD Bead chip*, por meio de sequenciamento dos 14 animais extremos para consumo alimentar residual (CAR) foram prospectados 7 novos SNPs, dos quais 1 foi genotipado no restante da população. A investigação do efeito do marcador nas características CAR, espessura de gordura subcutânea (EGS), área de olho de lombo (AOL), peso médio (PM) e peso médio metabólico (PMM) foi realizada utilizando um modelo misto, pelo método da máxima verossimilhança restrita. O SNP1062, caracterizado pela mudança de uma citosina por guanina, não mostrou associação significativa com CAR e AOL nesta população de bovinos da raça Nelore. No entanto, observou-se um efeito aditivo sobre o PM ( $P \leq 0.05$ ) e PMM ( $P \leq 0.05$ ), com o efeito substituição alélica estimada de -5,59 kg e -0,93 kg<sup>0.75</sup>, respectivamente. Um efeito de dominância deste SNP para EGS também foi encontrado ( $P \leq 0.01$ ). Para os genes *KCNIP4* e o *VEGFC*, que apresentavam vários SNPs representados no *BovineHD Bead chip*, foram realizadas análises de associação de haplótipos. O gene *KCNIP4* apresentou 6 haplótipos associados ( $P \leq 0.05$ ) com CAR, e o gene *VEGFC* apresentou 1 haplótipo associado ( $P \leq 0.01$ ) com CAR. Nossos resultados corroboram resultados da literatura que indicam os genes *KCNIP4* e *VEGFC* como genes candidatos para eficiência alimentar; e este estudo é o primeiro a sugerir o gene *NEUROD1* como gene candidato para espessura de gordura subcutânea, peso médio e peso metabólico em bovinos da raça Nelore. A validação desses resultados em populações independentes pode contribuir para elucidação dos mecanismos envolvidos na variação do consumo alimentar e para programas de melhoramento específicos para a raça Nelore.

**Palavras-Chave:** *Bos indicus*; consumo alimentar; gene candidato

## 2.2. Introdução

O Brasil é um importante produtor e exportador de carne bovina no mundo. Entre as raças de bovinos de corte utilizadas, a raça Nelore tem se destacado devido aos seus notáveis níveis de produção e à sua capacidade de adaptação e resistência em ambientes tropicais. A eficiência alimentar é uma característica produtiva importante, no entanto, apesar da herdabilidade moderada não tem sido incluída em programas de melhoramento, provavelmente devido às dificuldades relacionadas à medição do consumo alimentar (ARTHUR et al., 2001). A seleção para animais mais eficientes pode contribuir para redução das áreas de pastagens e produção de poluentes, além de ser mais rentável para os produtores (BASARAB et al., 2003). Assim como a eficiência alimentar, a espessura de gordura subcutânea (EGS) e área de olho de lombo (AOL) são características de produção de medidas tardiamente na vida do animal, de modo que a investigação de marcadores moleculares associados à essas características podem ajudar na sua inclusão em programas de melhoramento .

Alguns genes candidatos têm sido elencados para associação com eficiência alimentar em bovinos, entre eles, estão três genes indicados no trabalho de Barendse et al. (2007): *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1; Gene ID: 539487)*, *Kv channel interacting protein 4 (KCNIP4; Gene ID: 80333)*, e *Vascular endothelial growth factor C (VEGFC; Gene ID: 282122)*. O gene *NEUROD1* está localizado no cromossomo 2 bovino em que há relatos de QTLs para consumo alimentar residual (MARTINEZ et al , 2010; SHERMAN et al , 2010), ganho de peso diário (LI et al., 2010), peso corporal (CASAS et al., 2003) e AOL (ALLAIS et al., 2010). A via metabólica em que este gene está envolvido está relacionada com o metabolismo de carboidratos, especificamente na regulação da expressão do gene da insulina (MALECKI et al., 1999). A insulina é responsável pela redução da glicose no sangue, ao passo que permite a entrada de glicose nas células . É essencial para o consumo de carboidratos, síntese de proteínas e armazenamento de lípidos. Trabalho realizado por Malecki et al. (1999) em humanos, mostrou que mutações no gene *NEUROD1* estavam relacionadas com o desenvolvimento da diabetes mellitus tipo II.

O gene *KCNIP4* está presente no cromossomo 6 bovino, no qual existem relatos de QTLs para consumo alimentar residual (SHERMAN et al., 2009), peso corporal (McCLURE et al., 2010) e área de olho de lombo (CASAS et al., 2000), estando relacionado com canais de potássio (PRUUNSILD et al., 2005). O gene *VEGFC* está presente no cromossomo 27 bovino, e pertence

à família do fator de crescimento VEGF (Vascular endothelial growth factor), o qual é um potente fator angiogênico secretado por adipócitos. Os adipócitos desempenham importante papel na homeostase energética (YAMADA et al., 2010).

Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar os genes *NEUROD1*, *KCNIP4* e *VEGFC* como candidatos para consumo alimentar residual e características produtivas (EGS, AOL, peso médio, PM; e peso médio metabólico; PMM) nesta população de novilhos da raça Nelore, por meio da identificação de novos polimorfismos e análises de associação.

## **2.3. Material e Métodos**

### *2.3.1. Animais*

Um total de 585 novilhos Nelore, com média de 382,5 kg e 641 dias de idade, descendentes de 34 touros foram utilizados neste estudo. Os touros utilizados como pais das progênies foram escolhidos para serem o menos aparentados entre si e representar as principais genealogias da raça com base nas informações dos principais catálogos de associações brasileiras, e também representar o preço médio de sêmen em uso por pecuaristas. Famílias de meios-irmãos foram produzidas por inseminação artificial de fêmeas da raça Nelore comerciais e de raça pura. O número de filhos por touro variou de 2 a 20. Os novilhos nasceram em cinco fazendas diferentes, onde foram criados até 21 meses de idade, antes da alocação em baias individuais ou coletivas, em confinamentos localizados em São Carlos, SP, ou Campo Grande, MS.

### *2.3.2. Medidas Fenotípicas*

#### *2.3.2.1. Mensuração da eficiência alimentar, peso médio e peso metabólico*

A metodologia de obtenção dos fenótipos consumo alimentar residual (CAR), peso médio (PM) e peso metabólico (PMM) foi anteriormente descrita no item 2.3.1 do Capítulo 2.

#### *2.3.2.2. Mensuração das medidas da carcaça*

Quando atingiram 5 mm de espessura de gordura subcutânea (medida obtida por ultrassonografia) os animais foram abatidos e foram feitas medidas de composição e qualidade da

carcaça e da carne. A produção e avaliação fenotípica dos animais foram realizadas no âmbito de um projeto em rede, Rede Bife de Qualidade, da Embrapa.

Os fenótipos para EGS (mm) e AOL (cm<sup>2</sup>) foram obtidos a partir de bifés de 2,5 cm de espessura coletados no momento do abate na seção transversal do músculo Longissimus dorsi dorsi entre a 11<sup>a</sup> e 13<sup>a</sup> costela. Estes bifés foram identificados, embalados a vácuo e, se necessário, congelados para posterior análise. Os fenótipos EGS e AOL foram medidos 24 horas post-mortem. A EGS foi medida com uma régua e a AOL foi medida com uma grade quadriculada.

### 2.3.3. Coleta de amostras e Extração de DNA

Foram coletadas amostras de 5 ml de sangue dos novilhos por punção da veia jugular, em tubos para coleta a vácuo contendo EDTA potássico (K3). As amostras foram mantidas refrigeradas até o início do processo de extração. As extrações de DNA foram realizadas a partir de leucócitos por meio do método *salting out*, de acordo com os protocolos descritos por Regitano (2001). As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop<sup>®</sup> para análise da concentração e da pureza do DNA. Após a quantificação, as amostras foram diluídas para se obter concentração final de 40 ng/μl e conservadas em freezer à -20C°. As amostras de DNA foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1% corado com Gel Red para inspeção visual da integridade do DNA, sob iluminação UV.

### 2.3.4. Seleção de animais com fenótipos extremos para CAR

Amostras de DNA de 14 novilhos da raça Nelore foram seqüenciadas, sendo 7 de cada extremidade da distribuição dos valores BLUP para CAR. A seleção dos animais extremos foi feita com base no valor BLUP (*Best Linear Unbiased Prediction*). A análise genética para cálculo do valor BLUP foi baseada no seguinte modelo matemático:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \boldsymbol{\varepsilon}$$

em que  $\mathbf{y}$  é o vetor da variável resposta;  $\boldsymbol{\beta}$  é o vetor dos efeitos fixos de grupo de contemporâneos composto por ano, tipo de baía e origem dos animais;  $\mathbf{a}$  é o vetor do efeito genético aditivo animal NID

( $0, \sigma_a^2$ );  $\varepsilon$  é o vetor de efeito residual inerentes a cada observação, NID ( $0, \sigma_e^2$ ). Após ordenação dos valores BLUP, animais classificados entre os 5% maiores e menores valores foram selecionados, considerando-se animais representantes de famílias de diferentes meios-irmãos.

### 2.3.5. Sequenciamento do gene candidato para eficiência alimentar *NEUROD1* pela metodologia de Sanger

#### 2.3.5.1. Desenho de primers:

Foram desenhados pares de *primers* para amplificação e sequenciamento do gene *NEUROD1* à partir da sequência depositada no banco de dados *Ensembl*. Os *primers* foram desenhados com auxílio do software *Primer 3 plus*, disponível on line (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). A qualidade dos *primers* foi verificada pelo software *Netprimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/index.html>). Foram escolhidos os melhores pares de *primers* desenhados, ou seja, os pares que apresentaram  $\Delta G$  maior que 0 (ideal para que não ocorram reações espontâneas), que não formaram *hairpin* (que não foram auto complementares), que apresentaram score maior que 90 na análise pelo *Netprimer*, e que o produto de amplificação tivesse aproximadamente 600pb. Os *primers* desenhados para amplificação do gene *NEUROD1* estão descritos na Tabela 1.

**Tabela 1.** Descrição dos *primers* para sequenciamento do gene *NEUROD1* sob temperatura de anelamento de °59C

Primers	Sequência 5' - 3'	Tamanho do amplicon em pb	Posição do gene
1F	CCC TCT CCC CTG TTG AAT GTA G	451	

1R	CGA CAG AGC CCA GAT GTA GTT T		Éxon
2F	CTG AGA CGC ATG AAA GCC AAC		
2R	GGA CGG TTC GTG TTT GAA AG	529	Éxon
3F	CTG GAA CCT TTC TTT GAG AGC C		
3R	TTC TAC CAA AGG CAG TAA CGA C	436	Éxon
4F	GGC AGC CCT TTG AGT ATT ACT G		
4R	GAG AAG AAA GAA GTG CTA AGG C	523	Éxon
5F	CTT GTT ACC TTT CCC ATG CTG A		
5R	TCA TGG GAT GCA AAG GAG TA	466	Éxon
6F	GTT GTT GTG TTG CCT TAG CAC TTC		
6R	CTT CAC AAA CCT CAC CCA ACC	902	Éxon

F: *forward*; R: *reverse*; pb: pares de base; TA: temperatura de anelamento

### 2.3.5.2. Amplificação e purificação

Após testes para estabelecer as concentrações dos reagentes e a temperatura de amplificação específica dos *primers*, foram estabelecidas as seguintes concentrações: tampão de reação 1X, 1,5 mM de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>), 0,2 mM de cada dNTP, 0,165 µM de cada *primer*, 0,65 unidades da enzima Taq DNA polimerase e 200 ng de DNA. Água miliQ autoclavada foi adicionada para completar o volume final de 15 µL.

A amplificação constou das seguintes etapas: 5 minutos a 95°C para a desnaturação inicial das fitas do DNA, seguidos de 35 ciclos de 45 segundos a 94°C, 45 segundos à temperatura de anelamento dos *primers* e 45 segundos a 72°C. Após os 35 ciclos, o produto da amplificação foi submetido à etapa de extensão final por 10 minutos a 72°C. As reações de PCR foram purificadas com o kit *ExoSAP*. Para purificação foram adicionados 2 µL de *ExoSAP* a 5 µL de produto da PCR, e a mistura foi colocada no termociclador durante 15 minutos a 37°C, seguidos de 15 minutos a 80°C, para inativação da enzima.

### 2.3.5.3. Reação de sequenciamento

As reações de sequenciamento foram realizadas segundo o protocolo adaptado por Regitano (2001), utilizando o *Kit ABI PRISM® Big Dye terminator v. 3.1 cycle sequencing* da

Applied Biosystem. Para a reação de sequenciamento adicionaram-se 6  $\mu\text{L}$  de água, 1  $\mu\text{L}$  de Big dye (que contém DNA polimerase, ddNTPs marcados e dNTPs), 1  $\mu\text{L}$  de tampão ( $\text{Mg}^{+2}$  e Tris-HCl), 4 pmol de *primer* e 1  $\mu\text{L}$  de produto de PCR. As condições para reação de sequenciamento constaram de: pré - incubação a 94 °C por 2 minutos e 25 ciclos a 96 °C por 20 segundos, a temperatura de anelamento do primer por 10 segundos e 60 °C por 4 segundos.

Os produtos de sequenciamento foram purificados para evitar que os reagentes não incorporados interferissem na leitura do seqüenciamento. Para isso, foram adicionados 40  $\mu\text{L}$  de isopropanol 65% à temperatura ambiente, homogeneizados e incubados no escuro por 15 minutos. Passado este tempo, centrifugou-se por 25 minutos a 16.000 g à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado por inversão. Foram adicionados 200  $\mu\text{L}$  de etanol 60%, centrifugou-se por 5 minutos a 16.000 g à temperatura ambiente e o sobrenadante foi descartado (a lavagem com etanol 60% foi repetida duas vezes). As reações ficaram no escuro para secar durante 1 hora e depois foram armazenadas em freezer (-20°C). A análise dos produtos de sequenciamento foi feita no sequenciador *ABI Prism 3100 Avant* (Applied Biosystems).

### 2.3.6. Análise do Sequenciamento

Os eletroferogramas gerados pelo seqüenciador foram submetidos à análise de qualidade por meio do programa *Phred* (EWING et al., 1998), que atribui um valor de qualidade a cada nucleotídeo identificado. Quanto maior o valor atribuído pelo programa *Phred*, menor a probabilidade de ter ocorrido erro na designação do nucleotídeo. Em seguida, as seqüências foram submetidas ao programa de montagem *Phrap* (PROSDOCIMI et al., 2002), que agrupa as seqüências organizando-as em *contigs*. A visualização das seqüências geradas foi realizada pelo programa *Consed* (GORDON et al., 1998) que permite a visualização dos SNPs (PROSDOCIMI et al., 2002). Os SNPs presentes em éxons foram identificados a partir de pesquisas em bancos de dados públicos, com base nos *frames* de leitura dos genes. Estes foram analisados quanto à alteração de aminoácidos utilizando o programa *Gene Runner* (disponível em: <http://www.generunner.net/>).

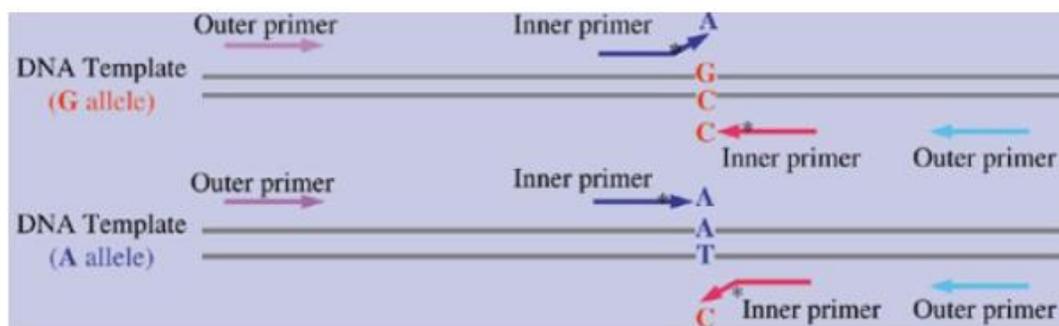
O programa Haploview (BARRETT et al., 2005) foi utilizado para determinar o desequilíbrio de ligação entre os SNPs prospectados. O Teste Exato de Fisher foi aplicado para

determinar se as frequências alélicas diferiam entre extremos para CAR, comparando os genótipos em cada extremo.

### 2.3.7. Genotipagem do SNP 1062G> C do gene *NEUROD1*

Para o gene *NEUROD1*, dos SNPs prospectados pelo seqüenciamento, um mostrou associação prévia com CAR pelo Teste Exato de Fisher. Este SNP foi genotipado em 585 novilhos da raça Nelore pela técnica Tetra primer ARMS (*Amplification Refractory Mutation Systems*) - PCR (YE et al., 2001).

Esta técnica é realizada por meio da utilização de quatro primers: dois primers internos alelo específicos (*inner primers*) e dois primers complementares à sequência que flanqueia o NP, os primers externos (*outer primers*). Como os dois *primers* internos possuem sequência complementar à alelos específicos do SNP, cada primer se anelará apenas à região genômica que contém o alelo correspondente. Esses primers alelo-específicos contêm um *mismatch* no antepenúltimo nucleotídeo da extremidade 3' para aumentar a especificidade alélica. Os primers externos se ligam as regiões flanqueadoras à distâncias distintas em relação ao SNP, de forma a amplificar regiões de diferentes tamanhos dependendo do alelo presente. A Figura 2 esquematiza a técnica ARMS-PCR.



**Figura 2.** Representação esquemática do ARMS-PCR.

Um único SNP foi usado como exemplo, uma substituição G/A. Dois amplicons alelo-específicos são gerados, usando 2 pares de *primers*, um par (indicado por setas em roxa e vermelha, respectivamente) gerando um amplicon que representa o alelo G, e outro par (indicado por setas azuis clara e escura, respectivamente) gerando um amplicon que representa o alelo A. A especificidade é garantida por um *mismatch* entre a extremidade 3' do *primer* (nucleotídeo específico de cada alelo do SNP) e por outro *mismatch* no antepenúltimo nucleotídeo da extremidade 3' do primer em relação ao DNA molde. O posicionamento dos 2 *primers* outer a diferentes distâncias do sítio polimórfico, faz com que os 2 amplicons alelo-específicos possuam tamanhos diferentes, tornando possível a discriminação alélica em um sistema de eletroforese (YE et al., 2001).

A Tabela 2 apresenta a descrição dos primers utilizados para genotipagem do SNP 1062G>C do gene *NEUROD1* por meio da Técnica Tetra-primer ARMS-PCR.

**Tabela 2.** Descrição dos *primers* utilizados para genotipagem do SNP1062 do gene *NEUROD1* pela técnica Tetra-primer ARMS-PCR.

Primers	Sequência	Tamanho do produto (pb)
<i>Forward inner</i> (alelo C)	GCCAAAACTACATCTGGGCTCTGACC	172
<i>Reverse inner</i> (alelo G)	GGCTTTTCCCTGAACGCAAGATTACC	235
<i>Forward outer</i> (5' – 3')	GGCCCCAAAAAGAAGAAGATGACGAA	354
<i>Reverse outer</i> (5' – 3')	GTCCTGGTTCTGCTCAGGCAGAAAAGT	354

### 2.3.9. Reconstrução da fase de ligação e blocos haplotípicos dos SNPs localizados nos genes *KCNIP4* e *VEGFC*.

Como os genes *KCNIP4* e *VEGFC* apresentavam vários SNPs representados no *BovineHD BeadChip*, esses genes não foram sequenciados, optando-se por trabalhar com a associação dos haplótipos construídos com os SNPs já genotipados pelo chip. A genotipagem dos animais no

*Illumina BovineHD BeadChip* e o controle de qualidade foram realizados conforme descritos do item 2.1.3.2. do Capítulo 2.

Os haplótipos foram construídos utilizando o software FastPhase (SCHEET e STEPHENS, 2006), que utiliza um algoritmo baseado em Cadeia de Markov oculta. Esse método, baseado em um modelo de cluster de haplótipos descrito por SCHEET E STEPHENS (2006), assume que, ao longo das regiões curtas de um cromossomo, os haplótipos tendem a se aglomerar em grupos. Os blocos haplotípicos foram construídos utilizando o programa Haploview (BARRETT et al., 2005). Foram consideradas somente combinações haplotípicas encontradas em pelo menos quatro animais.

### 2.3.8. Análises estatísticas

Para avaliar a influência dos marcadores sobre as características CAR, EGS, AOL, PM e PMM foi utilizado um modelo misto com efeitos fixos de grupo de contemporâneos e classes de genótipos do marcador; a idade do animal na data do abate foi incluída como covariável, além do efeito aleatório do touro (progenitor). Na análise de associação de haplótipos, os valores BLUP (descrito no ítem 3.3.4) foram considerados como variável resposta.

Para formação dos grupos de contemporâneos foram considerados os efeitos de local de nascimento, local de confinamento, ano e lote de abate. As análises foram realizadas pelo método da máxima verossimilhança restrita (REML) utilizando o programa SAS (SAS INSTITUTE INC., 2000), de acordo com o seguinte modelo matemático:

$$(1) Y_{ijkl} = \mu + CG_i + M_j + S_k + b_1(A_{ijkl}-a) + e_{ijkl}$$

$Y_{ijkl}$  = Observação no m-ésimo indivíduo, de idade A, filho do k-ésimo touro, do j-ésimo genótipo para o marcador, pertencente ao i-ésimo grupo de contemporâneos

$\mu$  = média geral;

$CG_i$  = efeito fixo do i-ésimo grupo de contemporâneos;

$M_j$  = efeito fixo do j-ésimo genótipo para o marcador;

$S_k$  = efeito aleatório associado ao touro  $N \sim (0, \sigma^2)$ ;

$b$  = coeficiente de regressão associado com a idade do animal;

$A_{ijkl}$  = idade do animal na data da mensuração,  $a$  é a idade média de medição;

$e_{ijkl}$  = erro aleatório associado a cada observação  $N \sim (0, \sigma_e^2)$ .

O procedimento PROC MIXED do SAS foi utilizado para testar o modelo aditivo-dominante.

## 2.4. Resultados e Discussão

### 2.4.1. Identificação de SNPs no gene candidato *NEUROD1*

O gene *Neurogenic differentiation 1 (NEUROD1)* é um gene candidato citado por Barendse et al. (2007), que identificou 141 regiões genéticas e diversos genes com efeitos sobre o CAR em estudo com novilhos da raça Angus, Brahman, Belmont Red, Hereford, Murray Grey, Santa Gertrudis e Shorthorn. Por possuir função metabólica relacionada à eficiência alimentar e por ser um gene com apenas 1 SNP representado no *BovineHD Bead chip* (Figura 3), este gene foi escolhido para posterior sequenciamento e prospecção de SNPs.

## Cattle UMD3.1 Database

Showing 2.372 kbp from Chr.2, positions 14,953,996 to 14,956,367

**Instructions**  
**Searching:** Search using a sequence name, gene name, locus, or other landmark. The wildcard character \* is allowed.  
**Navigation:** Click one of the rulers to center on a location, or click and drag to select a region. Use the Scroll/Zoom buttons to change magnification and position.

Examples: VSTM2A.

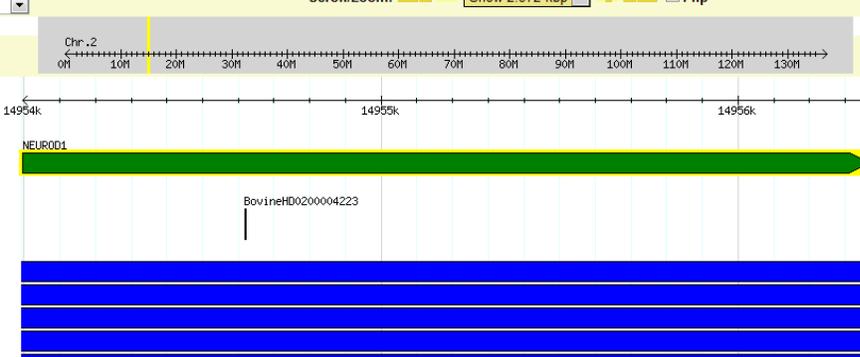
[Bookmark this](#) [Upload your own data](#) [Hide banner](#) [Share these tracks](#) [Link to Image](#) [High-res Image](#) [Help](#) [Reset](#)

**Search**  
 Landmark or Region:  
 NEUROD1

Data Source  
 Cattle UMD3.1 Database

Scroll/Zoom:       Flip

**Overview**



**Details**

14954k 14955k 14956k

Chr.2  
 0M 10M 20M 30M 40M 50M 60M 70M 80M 90M 100M 110M 120M 130M

NEUROD1

BovineHD0200004223

QTL

**Figura 3.** SNP (*BovineHD0200004223*) do gene *NEUROD1* representado pela ferramenta *Genome Browser* (genoma bovino versão UMD 3.1).

Por meio do sequenciamento de amostras de DNA de 14 animais extremos para CAR, foram prospectados 7 SNPs no gene *NEUROD1* (Tabela 3), que não se encontravam depositados em banco de dados. Todos os SNPs identificados foram depositados no banco de dados de SNPs do *NCBI* (*National Center for Biotechnology Information*).

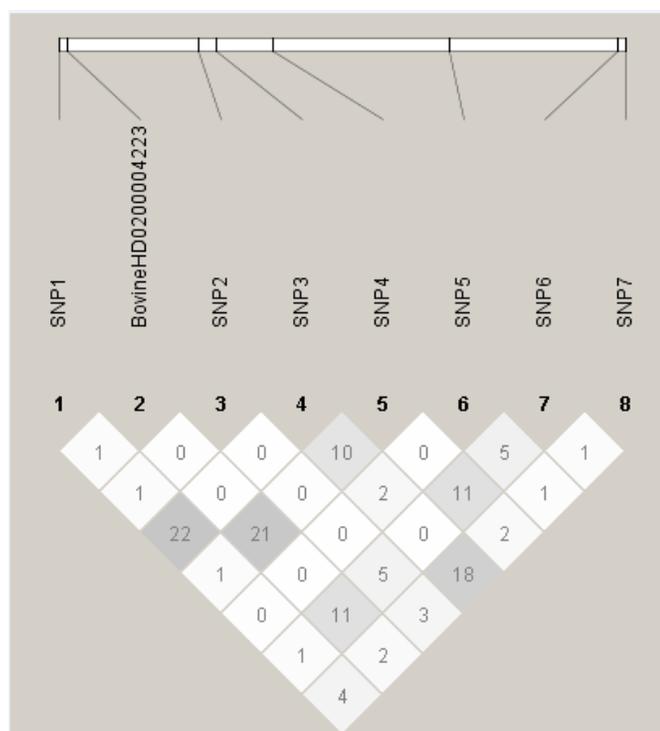
**Tabela 3.** Descrição dos SNPs prospectados para o gene *NEURODI*, p valor do Teste Exato de Fisher e MAF.**NEURODI**

SNP	Localização no gene	Região gênica <sup>1</sup>	Sequência <sup>2</sup>	p-valor <sup>3</sup>	MAFs <sup>4</sup>	NCBI_ss# SNP
599 C>G	599pb	5'UTR região	AAACCTAA(C/G)CATGACC	0.3147	0.153	902923723
1008 G>A	1008pb	codificadora região	ACGCAGAA(G/A)CTGTCCA	1.0000	0.143	902923724
1062 G>C	1062pb	codificadora região	GCTCTGTC(G/C)GAAATCT	0.0600*	0.417	902923725
1224 T>G	1224pb	codificadora	CACCTGCC(T/G)ACCGCCA	1.0000	0.369	902923726
1743 T>C	1743pb	3' UTR	AGGGCTGC(T/C)TTTGTA	1.0000	0.385	902923727
2232 G>T	2232pb	3'UTR	AATTATTTT(G/T)TATAAATT	0.3881	0.207	902923728
2254 C>T	2254pb	3'UTR	TGCACTGTTT(C/T)TTTTTA	0.5455	0.167	902923729

1,2: sequência referência depositada no Ensembl (ENSBTAG00000001755); 3: p valor do valor do Teste Exato de Fisher, \* p <0.10; 4: *Minor allele frequency* dos SNPs prospectados nos animais extremos para CAR.

Dos 7 SNPs encontrados no gene *NEURODI*, 3 estão presentes em regiões codificadoras mas que não modificam a sequência de aminoácidos da proteína. Além destes, foram encontrados 1 SNP na região 5'UTR e 3 SNPs na região 3'UTR. A frequência do alelo menos comum (*Minor Allele Frequency*) dos SNPs identificados nos animais extremos variou 0,14-0,41. As frequências alélicas geradas pelo Teste Exato de Fisher nos 14 animais extremos sequenciados indicou associação entre o SNP1062 G>C (P<0,10) e consumo alimentar residual (Tabela 7). O SNP1062 G>C é constituído por uma troca de uma Guanina por uma Citosina e não causa alteração de aminoácidos.

A análise de desequilíbrio de ligação entre os SNPs prospectados e o SNP representado no chip (*BovineHD0200004223*) do gene *NEURODI* apresentou uma região de LD com valor máximo de  $r^2=0,22$  (Figura 13). Pesquisas com o *BovineHD BeadChip* (770K) indicam valores de médio de LD para Nelore variando de  $r^2=0,34$ , à distância de 1 kb e MAF de 2% (ESPIGOLAN et al., 2013), à  $r^2=0,55$ , à distância de 1 kb e MAF de 5% (MOKRY et al, dados ainda não publicados). A Figura 4 representa a visualização do LD entre os SNPs pela estatística  $r^2$  (0- ausência de LD, 1-completo LD, %).

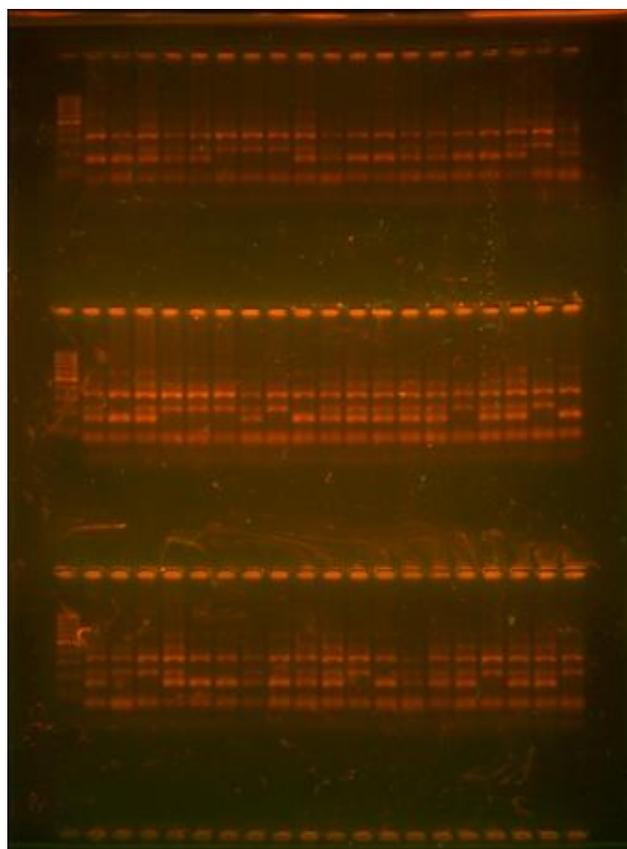


**Figura 4.** Padrão de desequilíbrio de ligação ( $r^2$ ) entre os SNPs prospectados e o SNP representado no chip (*BovineHD0200004223*); SNP1: 599 C>G; SNP2: 1008 G>A; SNP3: 1062 G>C\*; SNP4:1224 T>G; SNP5: 1743 T>C; SNP6: 2232 G>T; e SNP7: 2254 C>T.

Por ter apresentado associação com CAR pelo Teste Exato de Fischer nos animais seqüenciados extremos, o SNP1062 G>C foi genotipado em toda população de novilhos da raça Nelore deste estudo.

#### 2.4.1.1. Genotipagem e estudos dos efeitos das associações do SNP1062 G>C com as características CAR, EGS, AOL, PM e PMM.

A genotipagem do SNP1062 G>C foi realizada através da Técnica Tetra-primer ARMS-PCR. A representação dos resultados obtidos na genotipagem é apresentada na Figura 5.



**Figura 5.** Gel de agarose demonstrando os genótipos (CC, CG e GG) obtidos com a técnica ARMS-PCR.

A frequência alélica e genotípica do SNP1062 G>C nesta população de novilhos da raça Nelore é apresentada na Tabela 4.

**Tabela 4.** Frequência alélica e genotípica do SNP1062G> C no gene *NEUROD1* em novilhos da raça Nelore.

Gene	Frequência (%)				
	Alélica		Genotípica		
<i>NEUROD1</i>	C	G	CC	CG	GG
n=585	58	42	41,7	33,33	25,00

Não foi observada associação significativa ( $P = 0,7186$ ) do SNP 1062G>C e a característica CAR quando avaliada em toda a população. Contrastando esse resultado, Barendse et al. (2007) encontraram outro polimorfismo no gene *NEUROD1* associado com CAR numa população de bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus*. Isto pode ser devido ao fato de que este SNP genotipado na

população não seja uma mutação causal e não esteja em desequilíbrio de ligação com outras mutações causais. Mesmo considerando o fato dos polimorfismos avaliados não serem os mesmos, discrepâncias de frequências alélicas de mutações causais ou a extensão do desequilíbrio de ligação de marcadores pode resultar em efeitos diferentes de marcadores sendo detectados em diferentes raças (TIZIOTO et al., 2014). Resultados conflitantes para genes candidatos além de serem atribuídos à diferenças genéticas entre as populações de bovinos ou subespécies utilizadas em cada estudo, podem ser atribuídos à efeitos ambientais, de manejo e dieta aos quais cada população foi submetida (RINCKER et al., 2006).

A primeira abordagem adotada foi investigar os efeitos do SNP 1062G >C na característica consumo alimentar residual devido ao fato deste gene ser candidato para consumo alimentar residual citado na literatura (BARENDSE et al., 2007). No entanto, com base na função fisiológica e metabólica do gene *NEURODI*, e também com base em sua localização em região de QTLs previamente descritos para outras características de produção (CASAS et al., 2003; MARTINEZ et al., 2010; SHERMAN et al., 2010; LI et al., 2010; ALLAIS et al., 2010) foi avaliado o efeito do SNP 1062G >C em outras características produtivas. A Tabela 5 apresenta os resultados das análises de associação entre o SNP 1062G >C e EGS, PM e PMM nesta população de novilhos da raça Nelore.

**Tabela 5.** Resultados da análise de modelos mistos para a associação entre as características de produção e o SNP1062G> C do gene *NEURODI* em novilhos da raça Nelore.

SNP1062G>C					
			LS Means		
EGS (cm <sup>2</sup> )	396	Gen			
		CC	5.75±0.21	Ad.	ns
		CG	6.51±0.14		Dom.
		GG	5.91±0.51		
PM (kg)	396	CC	388.57±4.6	-11.50	ns
		CG	397.33±3.9		
		GG	400.07±4.5		
PMM (kg <sup>0.75</sup> )	396	CC	87.40±0.79	-1.92	ns
		CG	88.87±0.66		
		GG	89.32±0.77		

EGS = espessura de gordura subcutânea; PM= peso médio; PMM= peso médio metabólico; N = Número de observações; Gen. = Genótipo; LS Means ± SE = mínimos quadrados ajustadas pelo modelo ± erro padrão; Ad. = Efeito aditivo; Dom. = Efeito de Desvio de dominância; ns = não significativo ( $P \leq 0,05$ ).

Não foi encontrada associação significativa entre o SNP 1062G >C e AOL ( $P = 0,2007$ ), por este motivo os resultados não são apresentados na Tabela 9. No entanto, este SNP mostrou um efeito significativo sobre o desvio da dominância para EGS ( $P = 0,0009$ ); e um efeito aditivo significativo para PM ( $P = 0,0249$ ) e PMM ( $P = 0,0267$ ). O efeito de substituição alélica do SNP 1062G >C foi de  $-5,59$  kg e  $-0,93$  kg<sup>0.75</sup> para PM e PMM, respectivamente. A partir desses resultados, pode-se sugerir que o alelo C diminui a média de ganho médio diário e peso metabólico nesta população. Este polimorfismo representou 7,78 e 0,21 % da variância total aditiva, e 9,98 % e 0,27 % da variância genética total para PM e PMM, respectivamente. Desvios de dominância não foram significativos para estas características..

O gene *NEURODI* é um fator de transcrição que regula a expressão do gene da insulina através da ligação ao promotor do gene da insulina (MALECKI et al., 1999). A insulina é responsável pela redução da glicose sanguínea, ao promover o ingresso de glicose na células. A insulina age como um neuromodulador no sistema nervoso ((INGVARTSEN e ANDERSEN, 2000), ligando-se a receptores específicos do cérebro e controlando áreas importantes do cérebro relacionadas com consumo e metabolismo energético (INGVARTSEN e ANDERSEN, 2000). O papel da insulina na regulação da ingestão alimentar e do peso corporal em bovinos tem sido relatado (RICHARDSON e HERD et al, 2004; ROLF et al., 2011; KARISA et al., 2014).

Apesar de não alterar aminoácidos, o efeito do polimorfismo 1062G>C do gene *NEURODI* na espessura de gordura subcutânea observada neste estudo pode ser devido à função do gene *NEURODI* no metabolismo e armazenamento de lipídeos. A secreção de insulina em resposta a níveis elevados de glicose no sangue estimula a lipogênese (BROCKMAN et al., 1983). Além disso, o SNP1062C>G pode estar em desequilíbrio de ligação com outro SNP, ou outro gene que tenha função regulatória no metabolismo de lipídeos.

O gene *NEURODI* está mapeado no cromossomo bovino 2 (14951906..14956367), perto de QTLs descritos para consumo alimentar residual, ganho de peso diário, peso corporal e área de olho de lombo. Regiões de QTL no cromossomo 2 foram apontadas neste estudo (Capítulo 2) como associadas à eficiência alimentar (58 Mb), taxa relativa de crescimento (63 Mb), consumo de matéria seca (65 Mb), consumo alimentar residual (111 Mb) e eficiência de manutenção (124 Mb). Outros genes candidatos foram recentemente associados ao consumo alimentar residual no cromossomo 2 (KARISA et al., 2014). No entanto, não encontramos associação significativa entre o polimorfismo avaliado e a característica CAR, sugerindo que a seleção para EGS, PM e PMM,

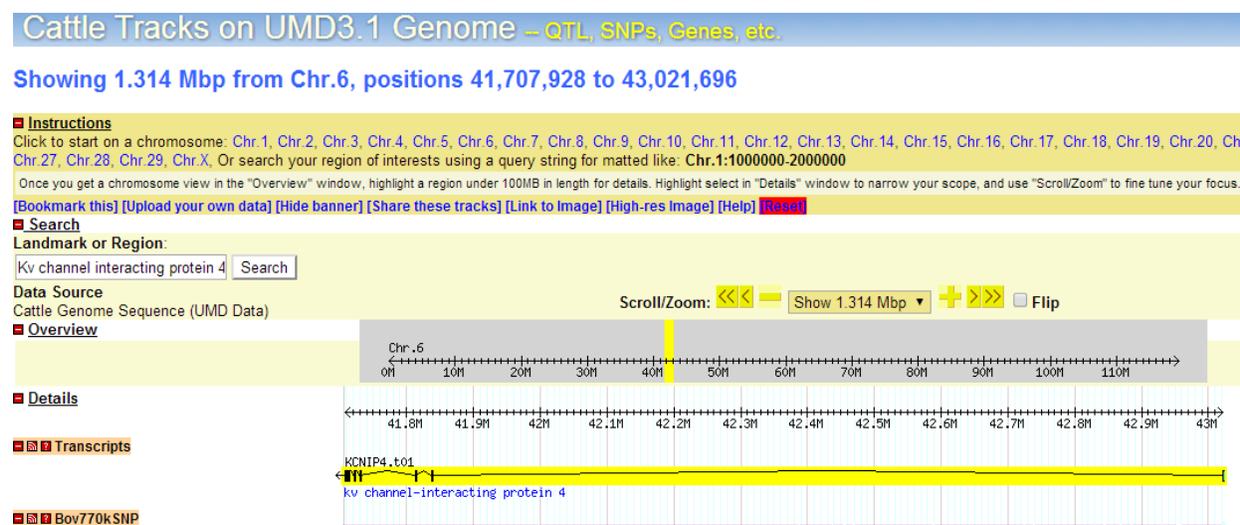
características em que esse marcador mostrou um efeito significativo nesta população, não levaria à efeitos sobre a seleção para o CAR.

Com base em nossos resultados, podemos sugerir o *NEUROD1* como um gene candidato para EGS e PM nesta população de bovinos da raça Nelore. No entanto, é necessária a validação deste marcador em populações independentes. Uma vez confirmada, a inclusão do SNP 1062G >C do gene *NEUROD1* em painéis de genotipagem pode contribuir para programas de melhoramento da raça Nelore, uma vez que este SNP não está representado nos chips de SNP disponíveis no mercado.

## 2.4.2. Análises de associação de haplótipos nos genes candidatos para eficiência alimentar *KCNIP4* e *VEGFC*

### 2.4.2.1. Gene candidato *KCNIP4*

O gene *KCNIP4* também foi citado no trabalho de Barendse et al. (2007) como gene candidato para consumo alimentar residual em bovinos. No entanto, como este gene apresentou muitos SNPs representados no *BovineHD Bead chip*, optou-se por realizar análises de associação de SNPs e haplótipos.



**Figura 6.** SNPs do gene *KCNIP4* representados pela ferramenta *Genome Browser* (genoma bovino versão UMD 3.1).

Na análise de associação de SNPs, o gene *KCNIP4* apresentou 13 SNPs do *Illumina BovineHD BeadChip* associados com CAR. Na Tabela 6 estão descritos os marcadores que foram associados com CAR nesta população de novilhos da raça Nelore.

**Tabela 6.** Descrição dos SNPs do gene *KCNIP4* presentes no *Illumina BovineHD BeadChip* que foram associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

<b>Gene <i>KCNIP4</i></b>					
SNPs	Região do Gene	Posição no cromossomo 6 (pb)	Variação	Frequência	P valor
BovineHD0600011279	íntron	41716558	T/C	0.4393	0,05325*
BovineHD0600011303	íntron	41798617	T/C	0.2642	0.0006002***
BovineHD0600011305	íntron	41800286	T/C	0.2644	0.0006002***
BovineHD0600011306	íntron	41801229	A/G	0.2646	0.0006002***
BovineHD0600011307	íntron	41803609	T/G	0.2638	0.0006002***
BovineHD0600011310	íntron	41806398	T/C	0.2629	0.0006002***
BovineHD0600011311	íntron	41808169	T/C	0.2627	0.0006002***
BovineHD0600011582	íntron	42548966	A/G	0.2736	0.0002693***
BovineHD0600011588	íntron	42574307	T/C	0.2627	0.0002763***
BovineHD0600011609	íntron	42633407	A/G	0.2539	0,058630*
BovineHD0600011610	íntron	42636872	A/G	0.2543	0,05863*
BovineHD0600011611	íntron	42641806	T/C	0.2555	0,055610*
BovineHD0600011629	íntron	42730349	A/G	0.2820	0.000986***

pb= pares de bases; Freq= Frequência do alelo mais frequente; \*P≤ 0,10; \*\*P≤ 0,05; \*\*\*P≤ 0,01

#### 2.4.2.2. Associação de haplótipos no gene candidato *KCNIP4*

Com a inferência de fase de ligação, foram formados 52 blocos de haplótipos no gene *KCNIP4*, dos quais 6 apresentaram associação significativa com CAR. A Tabela 7 apresenta os SNPs presentes na formação dos haplótipos do gene *KCNIP4* associados com CAR nesta população de novilhos da raça Nelore. Os haplótipos que apresentaram efeito significativo foram: 1, 31, 43, 45, 51 e 52.

**Tabela 7.** Descrição dos SNPs do gene *KCNIP4* presentes na formação dos haplótipos associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

Haplótipos	SNPs
1	Hapmap32713-BTC-036432 BovineHD0600011289 BovineHD0600011290 BovineHD0600011291 BovineHD0600011292
31	BovineHD0600011519 BovineHD0600011520 BovineHD0600011522 BovineHD0600011523
43	BovineHD0600011618 BovineHD0600011619 BovineHD0600011620 BovineHD0600011621
45	BovineHD0600011630 BovineHD0600011631
51	BovineHD0600034284 BovineHD0600011682 BovineHD0600011684 BovineHD0600011685 BovineHD0600011686 BovineHD0600011687
52	BovineHD0600011690 BovineHD0600011692

#### 2.4.2.3. Frequência haplotípica para o gene *KCNIP4*

Os SNPs localizados no gene *KCNIP4* foram primeiramente codificados como homozigotos 11 (alelo de referência) e 22 (alelo mutante) e heterozigotos 12 para podermos processar esses dados nos programas FastPhase e Haploview e construir os haplótipos. As frequências genóticas dos 6 haplótipos estão apresentadas na Tabela 8. Os genótipos dos haplótipos que apresentaram menos que 4 animais foram excluídos das análises.

**Tabela 8.** Frequência genotípica para os haplótipos do gene *KCNIP4* associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

Genótipos/ Haplótipo1	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
12 12	1	136	26.05
12 21	2	98	18.77
21 12	3	166	31.80
21 21	4	122	23.37

Genótipos/ Haplótipo31	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
1222 1222	1	110	21.07
1222 2112	2	47	9.00
1222 2121	3	59	11.30
1222 2122	4	12	2.30
2112 1222	5	16	3.07
2112 2112	6	13	2.49
2112 2121	7	25	4.79
2121 1222	8	77	14.75
2121 2112	9	17	3.26
2121 2121	10	35	6.70
2122 1222	11	40	7.66
2122 2112	12	22	4.21
2122 2121	13	41	7.85
2122 2122	14	8	1.53

Genótipos/ Haplótipo43	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
1121 1121	1	19	3.64
1121 1222	2	10	1.92
1121 2212	3	44	8.43
1121 2222	4	43	8.24
1222 2212	7	10	1.92
1222 2222	8	8	1.53
2212 1121	9	51	9.77
2212 1222	10	13	2.49
2212 2212	11	74	14.18
2212 2222	12	93	17.82
2222 1121	13	33	6.32
2222 1222	14	13	2.49
2222 2212	15	57	10.92

2222 2222	16	48	9.20
Genótipos/ Haplótipo45	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
11 11	1	167	31.99
11 12	2	106	20.31
11 22	3	32	6.13
12 11	4	88	16.86
12 12	5	84	16.09
12 22	6	20	3.83
22 11	7	12	2.30
22 12	8	7	1.34
22 22	9	6	1.15
Genótipos/ Haplótipo51	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
1112221 1112221	3	14	2.68
1112221 1211112	4	11	2.11
1112221 1211212	5	71	13.60
1112221 2121222	6	16	3.07
1211112 1112221	7	5	0.96
1211112 1211212	9	30	5.75
1211112 2121222	10	10	1.92
1211212 1112221	11	48	9.20
1211212 1211112	13	29	5.56
1211212 1211212	14	137	26.25
1211212 2121222	15	23	4.41
2121222 1112221	16	34	6.51
2121222 1211112	17	14	2.68
2121222 1211212	18	66	12.64
2121222 2121222	19	5	0.96
Genótipos/ Haplótipo52	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
12 21	1	32	6.13
12 22	2	34	6.51
21 21	3	97	18.58
21 22	4	105	20.11
22 21	6	115	22.03
22 22	7	135	25.86

Para os haplótipos associados com CAR foram estimados os efeitos aditivo e de dominância. (Tabela 9).

**Tabela 9.** Estimação dos efeitos aditivo e de dominância dos haplótipos do gene *KCNIP4* que apresentaram efeito significativo sobre CAR em novilhos da raça Nelore.

<b>Haplótipo1</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
CAR	585			0,0065**	0,0613	0,8837
		1	-0.06756±0.02			
		2	-0.02749±0.02			
		3	0.004953±0.017			
		4	0.03309±0.020			
<b>Haplótipo31</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom
CAR	585			0,0354*	0,4458	0,3421
		1	-0.00127±0.02			
		2	0.05041±0.033			
		3	0.02808±0.032			
		4	-0.09112±0.13			
		5	-0.1339±0.075			
		6	0.1331±0.065			
		7	0.007137±0.053			
		8	-0.01638±0.025			
		9	-0.1209±0.04			
		10	-0.0774±0.02			
		11	0.01689±0.03			
		12	0.01778±0.05			
		13	0.04919±0.04			
14	0.00581±0.09					
<b>Haplótipo43</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom
		1	0.005167±0.052	0.0201*	0,4209	0,0463*

CAR	585	2	-0.1185±0.074			
		3	0.05785±0.038			
		4	0.04885±0.033			
		7	-0.04942±0.090			
		8	0.1467±0.090			
		9	-0.06297±0.064			
		10	0.02945±0.029			
		11	-0.03690±0.052			
		12	0.02721±0.024			
		13	-0.06028±0.026			
		14	0.01913±0.035			
		15	-0.1556±0.057			
		16	-0.07245±0.037			
<b>Haplótipo45</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
CAR	585	1	-0.04401±0.017	0.0181*	0,8135	0,1646
		2	-0.00005 ± 0.021			
		3	-0.03541 ±0.031			
		4	0.03461 ± 0.024			
		5	0.03679 ±0.030			
		6	-0.03556±0.046			
		7	-0.06233 ±0.058			
		8	0.3532 ±0.13			
		9	-0.04942 ±0.092			
<b>Haplótipo51</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
CAR	585	3	-0.2682±0.12	0.0178*	0,2422	0,0472*
		4	-0.1774±0.12			
		5	-0.09877±0.06			
		6	0.08535±0.057			
		7	0.06606±0.027			
		9	0.003967±0.052			
		10	0.02246±0.12			
		11	-0.03930±0.038			
		13	0.005828±0.052			
		14	-0.02461±0.031			

		15	0.1002±0.091			
		16	0.007494±0.045			
		17	-0.06298±0.019			
		18	0.04777±0.038			
		19	0.03528±0.037			
<b>Haplótipo52</b>						
Característica	N	Combinações haplotípicas	Média ±DP	Efeito do Haplótipo ( P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
				0.0022**	0,4825	0,0423*
CAR	585	1	-0.04269±0.048			
		2	0.06553±0.034			
		3	-0.00517±0.021			
		4	-0.09928±0.024			
		5	0.003305±0.020			
		6	0.01057±0.0193			

\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ , CAR: consumo alimentar residual; N=número de animais; DP: desvio padrão; Efeito Ad: efeito aditivo; Desvio de Dom: desvio de dominância.

Os efeitos de substituição alélica para os haplótipos do gene *KCNIP4* não foram estimados porque não foi encontrado efeito aditivo significativo ( $P \leq 0.05$ ). Os resultados da análise de haplótipos corroboram as afirmações de Barendse et al., (2007), que indicaram o gene *KCNIP4* como gene candidato para eficiência alimentar. Seis haplótipos apresentaram associação significativa com CAR neste estudo, indicando que o gene *KCNIP4* afeta o consumo de alimentos, ou mesmo que a mutação causal está presente nessa região. Alternativamente, esses haplótipos podem estar em desequilíbrio de ligação com outras mutações causais nesse gene, ou em outros genes. Para os haplótipos 1, 31 e 45 apesar do efeito genotípico, não houve efeito aditivo ou de dominância significativo, indicando um possível interação epistática entre os *loci* dos haplótipos.

O gene *KCNIP4* é membro da família *KCNIP*, que são proteínas de ligação de cálcio relacionadas à canais de potássio (PRUUNSILD et al., 2005). Canais de potássio estão envolvidos na regulação da homeostase celular, tendo papel em diversas rotas metabólicas basais. Pruunsild et al., (2005) analisaram a expressão de diferentes isoformas do gene *KCNIP* em ratos e humanos e observaram níveis de expressão do gene *KCNIP4* em tecidos do coração, cólon, rim, próstata e intestino. Tizioto et al., (2013) associaram o gene *Potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member (KCNJ11)*, também relacionado à canais de potássio, à maciez da carne em

bovinos da raça Nelore. Camundongos transgênicos que possuíam o gene *KCNJ11* nocauteado reduziram o armazenamento de glicogênio, apresentando fenótipo magro, menor gordura corporal e fraqueza muscular (ALEKSEEV et al., 2010).

O gene *KCNIP4* está presente no cromossomo 6 (41707928..43021696), o qual apresenta regiões de QTLs para consumo alimentar residual (SHERMAN et al., 2009), peso corporal (McCLURE et al., 2010) e área de olho de lombo (CASAS et al., 2000). Regiões de QTL no cromossomo 6 foram associadas neste estudo (Capítulo 2) com consumo de matéria seca (3 Mb) e consumo alimentar residual (119 Mb).

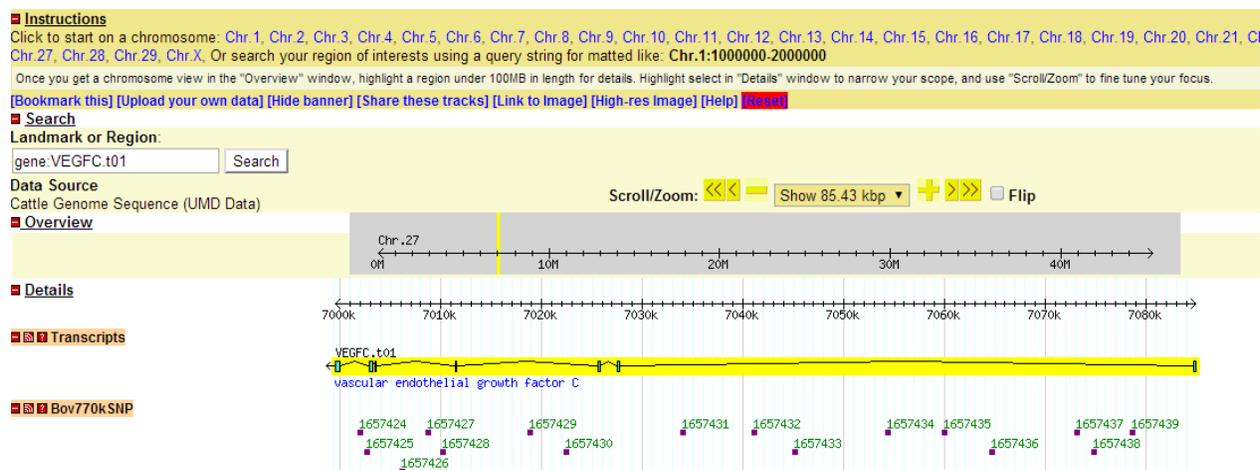
Como o gene *KCNIP4* está perto de regiões de QTLs para características produtivas, e com base em sua via metabólica e nos resultados obtidos neste estudo, podemos indicar o gene *KCNIP4* como gene candidato a influenciar o consumo alimentar residual nesta população, corroborando com as informações de Barendse et al. (2007), que já indicaram o gene *KCNIP4* como gene candidato para eficiência alimentar em bovinos. No entanto, estudos com outras populações da raça Nelore são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos na variação do consumo alimentar e confirmar os resultados aqui obtidos.

#### 2.4.3. Gene candidato *VEGFC*

O gene *Vascular endothelial growth factor C* (*VEGFC*) é outro gene candidato para consumo alimentar residual citado no trabalho de Barendse et al. (2007). Este gene também apresentou vários SNPs representados no *BovineHD Bead chip* (Figura 7), optando-se por realizar análises de associação de SNPs e haplótipos.

## Cattle Tracks on UMD3.1 Genome -- QTL, SNPs, Genes, etc.

Showing 85.43 kbp from Chr.27, positions 6,999,517 to 7,084,944



**Figura 7.** SNPs do gene *VEGFC* representados pela ferramenta *Genome Browser* (genoma bovino versão UMD 3.1).

Na análise de associação o gene *VEGFC* apresentou 3 SNPs associados com CAR. Na Tabela 10 estão descritos os marcadores associados com CAR nesta população de novilhos da raça Nelore.

**Tabela 10.** Descrição dos SNPs do gene *VEGFC* associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

Gene <i>VEGFC</i>					
SNPs	Região do Gene	Posição no cromossomo 27 (pb)	Variação	Frequência	P valor
BovineHD2700002221	5' UTR	6997399	A/G	0.2382	0.0004129***
BovineHD2700002222	ínton	7002026	A/C	0.4380	0.0008865***
BovineHD2700002246	3' UTR	7126690	T/C	0.2714	0.000194***

pb= pares de bases; Freq= Frequência do alelo mais frequente; \*P≤ 0,10; \*\*P≤ 0,05; \*\*\*P≤ 0,01

### 2.4.3.1. Associação de haplótipos no gene candidato *VEGFC*

Com a inferência de fase de ligação, foram formados 3 blocos de haplótipos dos quais 1 apresentou associação significativa com CAR nesta população. Na Tabela 11 são descritos os SNPs presentes formação dos haplótipos do gene *VEGFC* associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

**Tabela 11.** Descrição dos SNPs do gene *VEGFC* presentes na formação dos haplótipos

Haplótipos	SNPs
1	BovineHD2700002216
	BovineHD2700002217
	BovineHD2700002218
	BovineHD2700002220
2	BovineHD2700002221
	BovineHD2700002222
	BovineHD2700002223
3	BovineHD2700002225
	BovineHD2700002226
	BovineHD2700002227
	BovineHD2700002229
	BovineHD2700002230
	BovineHD2700002231
	BovineHD2700002232
	BovineHD2700002233
	BovineHD2700002235
	BovineHD2700002236
	BovineHD2700002237
	BovineHD2700002239
	BovineHD2700002241

### 2.4.3.2. Frequência haplotípica para o gene *VEGFC*

A Tabela 12 apresenta a frequência genotípica para todos os haplótipos do gene *VEGFC*.

**Tabela 12.** Frequência genotípica para o haplótipos do gene *VEGFC* associados com CAR em novilhos da raça Nelore.

<b>Haplótipo1</b>			
Genótipos/ Haplótipo1	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
1112 111	1	103	13.05
1112 122	2	24	3.04
1112 222	4	100	12.67
1221 111	5	71	9.00
1221 122	6	15	1.90
1221 222	8	75	9.51
2221 111	10	167	21.17
2221 122	12	49	6.21
2221 222	14	177	22.43
<b>Haplótipo2</b>			
Genótipos/ Haplótipo2	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
121 121	2	473	59.95
121 122	3	73	9.25
121 212	4	152	19.26
122 121	5	8	1.01
122 212	6	9	1.14
212 121	7	47	5.96
212 122	8	5	0.63
212 212	9	21	2.66
<b>Haplótipo3</b>			
Genótipos/ Haplótipo3	Nº do haplótipo	Nº de animais	Porcentagem
11112211111212 11112211111212	4	128	16.22
11112211111212 22221121212121	6	26	3.30
11112211111212 22221122212121	7	52	6.59
11112211111212 2222122212121	8	2	0.25
11112211111212 22222211221121	9	28	3.55
11112211111212 22222211221221	10	80	10.14
22221121212121 11112211111212	14	155	19.65
22221121212121 22221121212121	17	62	7.86
22221121212121 22221122212121	18	44	5.58
22221121212121 22222211221121	21	7	0.89
22221121212121 22222211221221	22	37	4.69
22221122212121 11112211111212	23	49	6.21
22221122212121 22221121212121	25	5	0.63
22221122212121 22221122212121	26	13	1.65

22221221212121 11112211111212	30	6	0.76
22222211221121 22221122212121	33	9	0.13
22222211221221 22221121212121	35	17	0.51
22222211221221 22221122212121	36	24	2.15
22222211221221 22222211221221	37	17	3.04

O haplótipo 2 apresentou associação significativa com CAR, para qual foi estimado o efeito aditivo e de dominância (Tabela 13).

**Tabela 13.** Estimação dos efeitos aditivo e de dominância dos haplótipo 2 do gene *VEGFC* que apresentou efeito significativo sobre CAR em novilhos da raça Nelore.

<b>Haplótipo2</b>						
Caractéristica	N	Nº Hapló tipo	Média ±DP	Efeito do Haplótipo (P valor)	Efeito Ad.	Desvio de Dom.
CAR	585			0.0037*	0.1453	0.0698
		2	0.01705±0.010			
		3	0.05506±0.027			
		4	-0.01283±0.017			
		5	0.1557±0.092			
		6	-0.1786±0.075			
		7	-0.03260±0.037			
		8	-0.04115±0.092			
		9	-0.1034±0.043			

\* $P \leq 0.05$ ; \*\* $P \leq 0.01$ , CAR: consumo alimentar residual; N=número de animais; DP: desvio padrão; Efeito Ad: efeito aditivo; Desvio de Dom: desvio de dominância.

Uma vez que não foi encontrado efeito aditivo significativo ( $P \leq 0.05$ ), o efeito de substituição alélica para o haplótipo 2 do gene *VEGFC* não foi estimado.

O gene *VEGFC* pertence à família do fator de crescimento VEGF (Vascular endothelial growth factor), o qual é um potente fator angiogênico secretado por adipócitos. YAMADA et al., (2010) relacionaram a expressão do fator de crescimento angiogênico (VEGF) ao tamanho de adipócitos em bovinos. A adipogênese é um processo de diferenciação celular altamente regulado,

em que os pré-adipócitos são transformados em células diferenciadas. Os adipócitos desempenham um papel vital na homeostase energética e processam a maior reserva de energia como triglicerol nos animais (YAMADA, et al., 2010). A leptina, por exemplo, é uma adipocitocina importante que desempenha um papel crucial na regulação do apetite e do metabolismo (PELLEYMONTER et al., 1995).

O gene *VEGFC* está presente no cromossomo 27 bovino (6999517..7084944), onde existem relatos de QTLs para peso corporal, peso de carcaça e espessura de gordura (McCLURE et al., 2010). Barendse et al., (2007) indicaram o gene *VEGFC* como candidato para eficiência alimentar, e com base em nossos resultados, também podemos sugerir o gene *VEGFC* como gene candidato para a característica consumo alimentar residual nesta população de bovinos da raça Nelore.

No entanto, no estudo de associação realizado neste trabalho (Capítulo 2) o cromossomo 27 não apresentou regiões de QTL associadas com as características de eficiência alimentar. As diferentes abordagens utilizadas nos 2 estudos pode ter influenciado os resultados. A abordagem de genes candidatos baseia-se no conhecimento a priori da função biológica de um gene e sua possível relação com a característica, e os estudos de associação com genes candidatos são baseados na associação entre a variação genética do gene e a característica avaliada. Em contraste, os estudos de associação ampla do genoma (*GWAS*) investigam todo o genoma, em busca de uma variação genética comum (GODDARD & HAYES, 2007).

Novos estudos com outras populações da raça Nelore são necessários para confirmar os resultados aqui obtidos e indicar esses genes como potenciais candidatos para eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.

## **2.5 Conclusões**

Os genes *NEUROD1*, *KCNIP4* e *VEGFC* foram indicados como genes candidatos para características produtivas nesta população de bovinos da raça Nelore. Os marcadores e haplótipos identificados contribuem para a variação fenotípica das características produtivas analisadas neste estudo, no entanto, é necessária a validação destes resultados em populações independentes, antes desses resultados serem implementados na seleção assistida por marcadores.

## 2.6 Referências

ALLAIS, S. et al. The two mutations, Q204X and nt821, of the myostatin gene affect carcass and meat quality in young heterozygous bulls of French beef breeds, 2010. **J. Anim. Sci.**, v. 88, n.2, p. 446-454, 2010.

ARTHUR, P. F. et al. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 2805-2811, 2001.

BARENDSE, W. et al. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v.176, p.1893–905, 2007.

BARRETT, J.C. et al. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v.21, n.2, p.263-265, 2005.

BASARAB, J.A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Can. J. Anim. Sci.**, v.83, p.189-204, 2003.

BOLORMAA, S. et al. Detection of chromosome segments of zebu and taurin origin and their effect on beef production and growth. **J. Anim. Sci.**, v.89, p.2050–2060, 2011.

BROCKMAN, R. P. Effects of insulin and glucose on the production and utilization of glucose in sheep. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.74, p.681, 1983.

CASAS, E. et al. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. **J. Anim. Sci.**, v. 78, p. 560–569, 2000.

CASAS, E. et al. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 81, p. 2976-2983, 2003.

ESPIGOLAN, R. et al. Study of whole genome linkage disequilibrium in Nellore cattle. **BMC Genomics**, v.14, p.305 2013.

EWING, B. et al. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Res.**, v.8, n.3, p.175-85, 1998.

GORDON, D., ABAJIAN, C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing. **Genome Res.**, v.8, n.3, p.195-202, 1998.

INGVARTSEN, K. L., ANDERSEN, J. B. Integration of metabolism and intake regulation: a review focusing on periparturient animals. **J. Dairy Sci.**, v.83, p.1573-1597, 2000.

KARISA, B., MOORE, S., PLASTOW, G. Analysis of biological networks and biological pathways associated with residual feed intake in beef cattle. **Anim. Sci. J.**, v. 85, p. 374–387. 2014

KARISA, B. K. et al. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms associated with variation in residual feed intake in beef cattle. **J. Anim. Sci.** v.91, n.8, p.3502-13, 2013.

LI, F. et al. Novel SNPs of the bovine GAD1/gad67 gene and their association with growth traits in three native Chinese cattle breeds. **Mol. Biol. Reports**, v. 37, n.1, p.501-5, 2010.

MALECKI, M. T. et al. Mutations in NEUROD1 are associated with the development of type 2 diabetes mellitus. **Nature genetics**, v. 23, n.3, p. 323-8 1999.

MARTINEZ, A. et al. Effect of breed body size and the muscular hypertrophy gene in the production and carcass traits of concentrate-finished yearling bulls. **J. Anim. Sci.**, v.88, n.4, p.1229-39, 2010.

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, p.597–607, 2010.

PELLEYMOUNTER, M.A. et al. Effects of the obese gene product on body weight regulation in ob/ob mice. **Science**, v.269, p.546-9, 1995.

PROSDOCIMI, F. Bioinformática: Manual do usuário. Ano 5. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n.29, 2002.

PRUUNSILD, P., TIMMUSK, T. Structure, alternative splicing, and expression of the human and mouse KCNIP gene family. **Genomics**, v.86, p.581–9, 2005.

REGITANO, L. C. A., COUTINHO, L. L., **Biologia molecular aplicada à produção animal**. EMBRAPA-INFORMAÇÃO TECNOLÓGICA, 2001, 215p.

RICHARDSON, E.C, HERD, R.M. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. 2. Synthesis of results following divergent selection. **Australian J. of Experimental Agric**, v. 44, p. 431-440, 2004.

ROLF, M. M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Anim. Genet.**, v.43, p. 367 -374, 2011.

RINCKER, C. B. et al. Relationship among GeneSTAR marbling marker, intramuscular fat deposition, and expected progeny differences in early weaned Simmental steers. **J. Anim. Sci.**, v.84, p.686–693, 2006.

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.

SHERMAN, E L. et al. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.87, n.1, 37-45, 2009.

SHERMAN, E. L., NKUMAH J.D, MOORE, S.S. Whole Genome SNP associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 88, n.1, p.16-22, 2010.

TIZIOTO, P.C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiol. Genomics**, v.45, n. 21, p. 1012–20. 2013.

YAMADA, K et al. Association between Ala54Thr substitution of the fatty acid-binding protein 2 gene with insulin resistance and intra-abdominal fat thickness in Japanese men. **Diabetologia**, v. 40, p.706-710, 1997.

YE, S., SAHAR, D., XIAYI, K. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. **Nucleic Acids Res.**, v.29, n.17,p.88, 2001.

## Capítulo 3. Identificação de regiões genômicas associadas com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore<sup>1</sup>

### 3.1. Resumo

A eficiência alimentar é determinada em conjunto pela produtividade e requerimentos alimentares, sendo que ambas são características economicamente relevantes em sistemas de produção de bovinos de corte. O objetivo deste estudo foi identificar genes/QTL associados com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore utilizando genótipos do *Illumina BovineHD BeadChip* (770K) de 593 novilhos da raça Nelore. As características analisadas foram: ganho de peso médio diário (GMD), consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), consumo alimentar residual (CAR), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TCR). A análise Bayesiana (Bayes B) foi implementada no software Gensel, com  $\pi = 0,9997$ . Regiões genômicas que corresponderam por mais de 1,0% da variância genética foram consideradas como regiões de QTL associadas com as características. Genes candidatos foram selecionados nas regiões que explicaram mais de 1% da variância genética, com base em suas funções no DAVID e Gene Ontology. Trinta e seis QTL (janela de 1 Mb SNP) foram identificados nos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 e 26 (UMD 3.1) para todas as características analisadas. Alguns destes QTL minimamente foram sobrepostos com QTL relatados anteriormente para eficiência alimentar em bovinos *Bos taurus*. As regiões de QTL descritas neste estudo abrigam genes com funções biológicas relacionadas com processos metabólicos, metabolismo lipídico e de proteína, geração de energia e crescimento. Entre os genes candidatos posicionais selecionados para eficiência alimentar estão: *HRH4*, *ALDH7A1*, *APOA2*, *LIN7C*, *CXADR*, *ADAM12* e *MAP7*. A comparação com os resultados publicados indicam que diferentes QTL e genes podem estar envolvidos no controle da eficiência alimentar nesta população da raça Nelore, em comparação com bovinos *Bos taurus*.

**Palavras-chave:** *Bos indicus*, consumo alimentar residual, gene candidato, polimorfismos de nucleotídeo único

<sup>1</sup> Artigo: "Identification of genomic regions associated with feed efficiency in Nelore cattle" publicado na revista BMC Genetics (De Oliveira et al., 2014)

### 3.2. Introdução

A eficiência alimentar tem grande influência sobre o custo unitário de produção de carne bovina. A seleção de animais eficientes não só pode melhorar a rentabilidade do produtor, como pode levar a reduções significativas nas áreas de pastagens, diminuir o custo de alimentação em confinamento, bem como, reduzir o impacto ambiental pela redução das emissões de carbono e de metano (BASARAB et al., 2003).

A eficiência alimentar é geralmente definida como conversão alimentar (CMS; consumo de matéria seca dividido por GMD, ganho médio diário), no entanto, outros índices também têm sido estudados, como consumo alimentar residual (CAR; KOCH, 1963), eficiência da manutenção (EM; ARCHER et al., 1999), eficiência parcial de crescimento (EPC; KELNER, 1909), eficiência de ganho (EG) e taxa de crescimento relativo (TRC; FITZHUGH et al., 1971). Apesar de sua herdabilidade moderada; 0,20-0,30 (ARTHUR et al., 2001; NKRUMAH et al., 2007; BOLORMAA et al., 2013), a eficiência alimentar não tem sido considerada em programas de melhoramento no Brasil, provavelmente devido às dificuldades associadas com a coleta de dados de consumo alimentar (ARTHUR et al., 2001).

O Brasil é um dos maiores produtores e exportadores de carne bovina do mundo, sendo a raça Nelore a raça predominante nos rebanhos brasileiros. Animais *Bos indicus* são conhecidos por sua capacidade de adaptação e resistência em ambientes tropicais. No entanto, existem apenas alguns (SANTANA et al., 2014) estudos genômicos relatados para as características de eficiência alimentar nesta raça.

Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) envolvem todas as regiões do genoma que estão significativamente associadas com o fenótipo, e podem ser usados para a detecção de QTL, determinação de redes gênicas ou seleção genômica (FORTES et al., 2011; SNELLING et al., 2012). A detecção de regiões genômicas e genes candidatos que influenciam a eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore deve contribuir para programas de melhoramento da raça.

O objetivo deste estudo foi identificar genes/QTL associados à eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore por meio de estudos de associação ampla do genoma utilizando o *BovineHD BeadChip* (770 k) e abordagens estatísticas Bayesianas.

### 3.3. Material e Métodos

#### 3.3.1. Animais e Dados Fenotípicos

Um total de 593 novilhos Nelore com média de 382,5 kg e 641 dias de idade, descendentes de 34 touros foram utilizados neste estudo. Os touros utilizados como pais das progênes foram escolhidos para representar as principais genealogias da raça com base nas informações dos catálogos das principais centrais de inseminação do país, e também representar o preço médio de sêmen em uso por pecuaristas. Famílias de meios-irmãos foram produzidas por inseminação artificial de fêmeas da raça Nelore comerciais e de raça pura. O número de filhos por touro variou de 2 a 20. Os bezerros nasceram em cinco fazendas diferentes, ao longo de 3 anos, onde foram criados até 21 meses de idade, antes da alocação em baias individuais ou coletivas, em confinamentos localizados em São Carlos, SP ou Campo Grande, MS.

Os animais foram alimentados *ad libitum* duas vezes ao dia, com sobras de 5% descartadas diariamente. As dietas continham 40% de matéria seca (MS), na forma de silagem de milho (ensaio 1) ou silagem de sorgo (ensaio 2), proteína bruta em 13,5 % (ensaio 1) , 15,4 % (ensaio 2), densidades de energia de metabolizável 2,8 (ensaio 1) ou 2,6 Mcal por kg de MS (ensaio 2), 60 % da matéria seca de concentrado, que continha milho moído, farelo de soja, caroço de algodão (ensaio 1), grão de soja (ensaio 2), casca de soja, calcário, mistura mineral, uréia e monensina sódica (Rumensin®). O período de adaptação foi de aproximadamente 28 dias e o consumo de matéria seca individual (CMS) foi medido por pelo menos 70 dias, sem jejum, a cada 14 dias.

O consumo de matéria seca individual (CMS, kg/d) foi obtido pela diferença entre a oferta e a recusa; o ganho médio diário (GMD, kg/d) foi estimado pela regressão linear do peso corporal (PC) em dias de confinamento, utilizando PROC REG (SAS, 2010). A conversão alimentar (CA, em kg/kg) foi calculada como a razão entre a CMS e GMD (kg/d), em que o inverso dessa razão foi representada pela eficiência alimentar (EA, em kg/kg). O consumo alimentar residual (CAR, kg/d) foi calculado como os resíduos da regressão de CMS sobre o peso vivo metabólico ( $PV^{0.75}$ ) e GMD (KOCH et al., 1963) utilizando-se modelo em que o grupo de contemporâneos (GC) foi definido como local de confinamento, ano, origem do animal e tipo de baia (individual ou coletiva) pelo MIXED (SAS, 2010). A eficiência parcial de crescimento (EPC, em kg/kg) que representa a eficiência energética para manutenção acima do GMD, foi calculada como a razão entre GMD à diferença entre média diária de CMS e CMS esperado para manutenção (CMS<sub>m</sub>), em que o CMS<sub>m</sub>

foi calculado utilizando as equações exigência de manutenção do NRC (1996), e equações de Zinn e Shen (1998) foram utilizadas para estimar a energia líquida da dieta para manutenção. A eficiência de ganho (EG, kg/Mcal) foi obtida dividindo GMD pelo consumo de energia metabolizável (Mcal/d). Para calcular a taxa de crescimento relativo (TCR, %/d), a equação utilizada foi:  $TRC = 100 * (\log PV_{final} - \log PV_{inicial}) / \text{dias de experimento}$  (FITZHUGH, 1971). O número total de animais (N) usado neste estudo de associação foi ligeiramente diferente entre as características devido à diferente disponibilidade dos dados.

### 3.3.2. Extração de DNA e Dados Genotípicos

O DNA genômico foi extraído de amostras de sangue (TIZIOTO et al., 2012). A genotipagem foi realizada no Departamento de Agricultura dos EUA - Laboratório de Genômica Funcional (ARS/USDA) por meio do *BovineHD BeadChip 770K* (Illumina, San Diego, CA). O software de análise Data Studio - Illumina foi utilizado para visualização dos dados e análises iniciais. Os genótipos foram registrados no formato alelo A/B Illumina e transformados no valor de 0, 1 ou 2, representando o número de alelos B presentes. Genótipos ausentes representaram menos do que 0,2% do total de observações e foram substituídos pelo número médio de alelos B para o locus. SNPs com *call rate*  $\geq 95\%$  e frequência do menor alelo (*MAF*)  $\geq 5\%$  foram utilizados nas análises. SNPs em cromossomos sexuais e não mapeados na versão *Bos taurus* UMD 3.1 foram excluídos. Um total de 449.363 SNPs foram utilizados neste estudo.

### 3.3.3. Estatística Descritiva

A estatística descritiva para CMS, GMD, CA, EA, CAR, EM, EG, EPC e TRC foram realizadas por meio do PROC SAS (SAS Inst. Inc., Cary, 2010). O PROC UNIVARIATE foi utilizado para testar e visualizar a normalidade dos dados, e o PROC MIXED usado para testar os efeitos significativos. O efeito fixo de grupo de contemporâneos (GC), que incluiu origem, tipo de baia, ano e local de confinamento; e o efeito da idade como covariável, foi utilizado no modelo de associação genômica.

### 3.3.4. Estudos de Associação Ampla do Genoma (*Genome Wide Association Study*)

Abordagens Bayesianas foram desenvolvidas para evitar falsos positivos e superestimação dos efeitos de QTL (ONTERU et al., 2011; PETERS et al., 2012; PETERS et al., 2013; GARRICK et al., 2013). A metodologia Bayes C (KIZILKAYA et al., 2010; HABIET et al., 2011) foi utilizada para estimar as variâncias genéticas e residuais, para uso a priori na análise Bayes B. Para a metodologia Bayes C, a variância genética e residual foi igual a 1 e  $\pi = 0.9997$ . O GWAS entre genótipos e fenótipos (GMD, CMS, CA, EA, CAR, EM, EG, EPC e TRC) foi realizado com a metodologia Bayes B, que analisa os dados de SNP simultaneamente e assume diferente variância genética para cada locus SNP (MEUWISSEN et al., 2001; SAATCHI et al., 2013; CESAR et al., 2014), com base no seguinte modelo:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\mathbf{b} + \sum_{j=1}^K \mathbf{a}_j \beta_j \delta_j + \mathbf{e}$$

Em que  $\mathbf{y}$  é um vetor de valores fenotípicos,  $\mathbf{X}$  é a matriz de incidência para os efeitos fixos,  $\mathbf{b}$  é um vetor de efeitos fixos que representam grupos contemporâneos,  $K$  é o número de loci SNP (449.363),  $\mathbf{a}_j$  é o vetor de coluna que representa a covariável SNP codificada pelo locus  $j$  como o número de alelos  $B$ ,  $\beta_j$  é o efeito da substituição aleatória para o locus  $j$ , que condicionada  $\sigma^2_{\beta}$  foi assumida normalmente distribuída  $N(0, \sigma^2_{\beta})$ , quando  $\delta_j = 1$  mas  $\beta_j = 0$  quando  $\delta_j = 0$ , com  $\delta_j$  sendo variável aleatória 0/1, indicando a ausência (com probabilidade  $\pi$ ) ou presença (com probabilidade  $1 - \pi$ ) do locus  $j$  no modelo, e  $\mathbf{e}$  é o vetor dos efeitos residuais aleatórios assumidos normalmente distribuído  $N(0, \sigma^2_e)$ . A variância  $\sigma^2_{\beta}$  (ou  $\sigma^2_e$ ) foi a priori assumida para seguir uma escala inversa qui-quadrado com  $\nu\beta = 4$  (ou  $\nu e = 10$ ) graus de liberdade e parâmetro de escala  $S^2_{\beta}$  (ou  $S^2_e$ ). O parâmetro de escala dos marcadores foi derivado como uma função da variância genética assumida conhecida da população, com base na frequência média de alelos do SNP e do número de SNP assumidos para ter efeitos diferentes de zero. O parâmetro  $\pi$  foi escolhido 0,9997 para estimar menos marcadores do que animais. As análises de GWAS foram realizadas por meio do software Gensel (FERNANDO e GARRICK, 2009), que utiliza métodos MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) para calcular estimativas posteriores médias dos efeitos do marcador e variâncias. As cadeias incluem 41.000 iterações, com primeiras 1.000 amostras utilizadas para

“burn-in” (SAATCHI et al., 2013). Os efeitos dos marcadores de cada 40 post “burn-in” iteração foram utilizados para caracterizar o mérito do genoma de cada animal para cada janela de 1 MB. Em modelos de regressão múltipla bayesianos com  $\pi = 0,9997$ , cerca de 100-150 marcadores SNP foram usados simultaneamente em cada iteração MCMC. Inferência de associações nesses modelos de regressão múltipla são baseados em janelas genômicas de 1 MB, em vez de marcadores únicos (ONTERU et al., 2011; GARRICK et al., 2013). As janelas genômicas foram construídas com base nas posições de pares de base dos cromossomos anotados em um arquivo de marcador de mapa com base na versão UMD-3.1 do genoma bovino (GARRICK et al., 2013).

Neste estudo, 2.527 janelas de SNP foram utilizadas em todos os 29 cromossomos. A proporção da variância genética explicada por cada janela em qualquer iteração particular foi obtida dividindo-se a variância dos valores genéticos para a janela pela variância do valor genético para todo o genoma naquela iteração. A variância genética das janelas foi calculada multiplicando-se o número de alelos que representam as co-variáveis SNP para cada SNP consecutivo na janela por suas respectivas médias posteriores de efeitos de substituição. As janelas SNP que explicaram > 1% da variância genética a partir da análise de Bayes B foram consideradas como QTL associados com as características (PETERS et al., 2012). Janelas de SNPs que explicaram de 0,5 a 1% da variância genética foram apresentadas como informação adicional no material suplementar. A versão UMD 3.1 do genoma bovino (<http://www.animalgenome.org/QTLdb>) e a base de dados de QTL bovino (<http://bovineqtl.tamu.edu/>) foram utilizados para pesquisar QTL anteriormente descritos na literatura. Genes candidatos posicionais e funcionais foram selecionados nas janelas de 1 Mb que explicaram > 1% da variância genética (PETERS et al., 2012) com base em função fisiológica e metabólica. O softwares DAVID (HUANG et al., 2009) e GO (ASHBURNER et al., 2000) foram utilizados para atribuir a classificação funcional dos genes. Nenhuma análise de *pathways* foi realizada. Genes com função biológica relacionada com as características e com base na literatura foram definidos como genes candidatos posicionais e funcionais.

### **3.4. Resultados e Discussão**

### 3.4.1. Dados fenotípicos

As médias observadas para todas as características avaliadas neste estudo (Tabela 14) estão de acordo com a literatura para animais *Bos taurus* e *Bos indicus* (NKRUMAH et al., 2004; CROWLEY et al., 2010; CORVINO et al., 2011; ELZO et al., 2012; BONILHA et al., 2013).

**Tabela 14.** Estatística descritiva para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.

Característica	N	Média	Desvio Padrão
GMD (Ganho Médio Diário; kg/d)	593	1,274	±0,34
CMS (Consumo de Matéria Seca; kg/d)	591	8,451	±1,28
CA (Conversão Alimentar; kg/kg)	516	7,147	±3,07
EA (Eficiência Alimentar, kg/kg)	516	0,155	±0,04
CAR (Consumo Alimentar Residual, kg/d)	591	0,001	±0,32
EM (Eficiência de Manutenção; kg/kg)	376	0,349	±0,13
EG (Eficiência de Ganho, kg/Mcal)	376	0,207	±0,10
EPC (Eficiência Parcial de Crescimento)	375	0,275	±0,05
TRC (Taxa Relativa de Crescimento; %/d)	593	0,165	±0,04

### 3.4.2. Estudos de Associação Ampla do Genoma

A Tabela 15 apresenta as variâncias genéticas, residuais, a herdabilidade genômica e a proporção da variância fenotípica explicada por marcadores utilizando Bayes B; que pressupõe que os efeitos dos SNP tem uma variação locus-específica e uma fração de marcadores ( $\pi$ ) sem efeito (MEUWISSEN et al., 2001; SAATCHI et al., 2013).

**Tabela 15.** Médias dos componentes de variância para ganho médio diário (GMD); consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), consumo alimentar residual (CAR), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TRC) em bovinos da raça Nelore.

	Proporção da variância
--	------------------------

Característica	Variância Genética	Variância Residual	Variância Total	fenotípica explicada por marcadores
GMD	0,06	0,08	0,15	0,42
CMS	0,52	1,22	1,75	0,29
CA	2,96	4,53	7,50	0,39
EA	0,13	0,009	0,23	0,47
CAR	0,14	0,27	0,41	0,33
EM	0,01	0,01	0,02	0,51
EG	0,0042	0,0034	0,0076	0,55
EPC	0,0027	0,0020	0,0048	0,57
TRC	0,0024	0,0005	0,00030	0,18

A proporção estimada da variação fenotípica explicada pelos marcadores ou “herdabilidade genômica” para todas as medidas de eficiência alimentar foi de moderada à alta, com exceção de TRC (Tabela 15). Herdabilidades moderadas para características de eficiência alimentar estão de acordo com estimativas publicadas a partir de análises tradicionais e genômicas (ARTHUR et al., 2001a; NKRUMAH et al., 2007; BOLORMAA et al, 2011; ELZO et al., 2012; BOLORMAA et al., 2013).

A variância genética explicada pelas janelas de SNPs para eficiência alimentar variou entre 0,5 e 9,07% (Tabela 16, Anexo 1). Estes resultados estão de acordo com resultados reportados para bovinos *Bos taurus* em que SNPs explicaram grandes quantidades da variação em características relacionadas à eficiência alimentar (ROLF et al., 2011). As maiores variâncias foram observadas nas regiões de QTL dos cromossomos 2, 9 e 12 (Tabela 16).

No total, 36 regiões genômicas (janelas de 1 Mb) que explicaram  $\geq 1$  % da variância genética foram identificadas (Tabela 16). Estas regiões estão distribuídas nos cromossomos 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 16, 18, 19, 20, 21, 22, 24, 25 e 26. Apenas algumas regiões de QTL coincidiram com regiões de QTL para eficiência alimentar previamente relatadas na literatura para outras raças bovinas (<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>). Este resultado pode indicar que diferentes QTL podem controlar a eficiência alimentar nesta população de bovinos Nelore em comparação com bovinos *Bos taurus* (BARENDSE et al., 2007; SHERMAN et al., 2008; ROLF et al., 2011; KARISA et al., 2013). A Tabela Suplementar (Anexo 1) apresenta as regiões genômicas que explicam mais de 0,5 % da variância genética para todas as características, e as figuras 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 e 16 apresentam os *Manhattan plots* com a

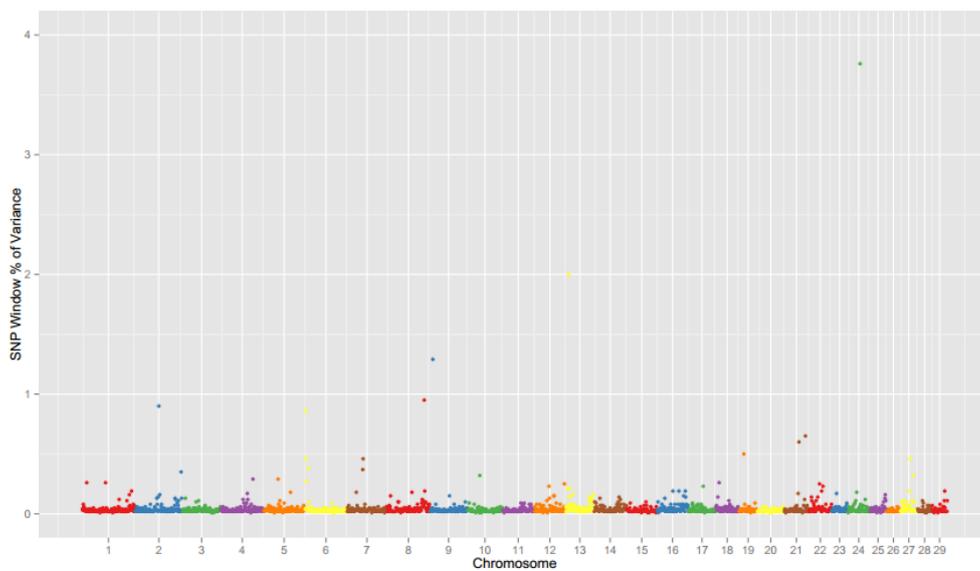
proporção da variância genética explicada pelas janelas nos 29 cromossomos para a CMS, GDM, CA, EA, CAR, EM, EPC, EG e TRC, respectivamente.

**Tabela 16.** Regiões de QTL associadas com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.

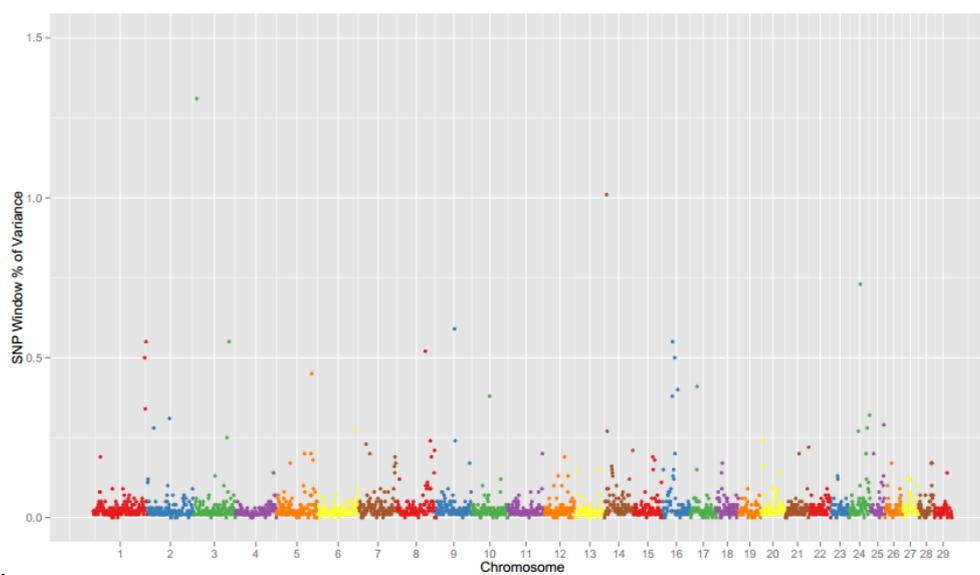
Característica	Janela de SNP (SNP final e inicial)	Número de SNPs na janela	% Variância explicada pela janela de SNPs	Cr.	Posição de Mapa (UMD 3.1 bovine assembly)	Genes Candidatos
CAR	rs132846819-rs136767848	217	1.50	8	43001055...43994362	
	rs109535395-rs134508640	50	1.42	18	14008775... 14999189	<i>DEPP1, TUBB3</i>
	rs109365529-rs132654030	186	1.12	11	93000777... 93986308	<i>PTGS1</i>
	rs136295413-rs41980878	260	1.12	21	35004352... 35999673	-
CMS	rs133031353-rs42739324	237	3.76	24	32007830...32998471	<i>HRH4, ZNF521</i>
	rs134105133-rs133615999	161	2.00	13	8009711...8998026	-
	rs133460769-rs109902312	255	1.29	9	8000493...8996276	-
CA	rs110424374-rs133308150	73	6.06	12	27042151...27967155	-
	rs41942246-rs134122046	191	5.99	20	36002437...36994188	<i>GDNF</i>
	rs42594525-rs109404921	182	1.52	15	58000208...58999275	<i>LIN7C</i>
	rs109105703 -rs136356118	189	1.40	18	15002281...15989210	-
EA	rs133645581-rs137479730	231	2.58	9	22019753...22993318	-
	rs134914044-rs42277860	203	2.30	1	21002744...21985704	-
	rs136028559-rs110570158	250	1.04	14	73002666...73999191	-
	rs109171156-rs42987702	255	1.03	2	58005318...58996319	-
GMD	rs133645581-rs137479730	231	4.94	9	22019753... 22993318	<i>IBTK</i>
	rs134217291- rs43586239	245	2.91	1	156005880...156999077	-
	rs134861070-rs133661192	176	2.33	16	31007509... 31998663	-
	rs109785180- rs42314597	181	1.62	7	28006905... 28999205	<i>MARCH3, ALDH7A1</i>
	rs110427506-rs109577271	215	1.31	3	8007708... 8998553	<i>APOA2, USP21, UFC1</i>

	rs135933205-rs136131764	270	1.01	14	6007610... 6998560	-
EM	rs110886051-rs136158385	132	2.23	9	85000924...85992426	-
	rs135793109-rs134017120	244	1.48	14	83000515...83999590	-
	rs132642498-rs42290512	195	1.28	20	42002534...42999156	-
	rs136695261-rs134921622	265	1.24	1	155006277...155998842	<i>DPH3</i>
	rs41681891-rs111007160	315	1.22	13	19000011...19998017	-
	rs134217291-rs43586239	245	1.11	1	156005880...156999077	-
EG	rs135733781-rs136250718	170	3.42	10	82000451...82991463	-
	rs41681891-rs111007160	315	2.01	13	19000011...19998017	-
	rs135553767-rs133216097	265	1.73	20	58002823...58996938	-
	rs132642498-rs42290512	195	1.39	20	42002534...42999156	-
	rs134907990-rs135714341	143	1.14	28	29001640...29996795	<i>CAMK2G</i>
EPC	rs135793109- rs134017120	244	2.25	14	83000515...83999590	-
	rs136639955- rs109263205	208	1.63	10	27001939...27998826	-
	rs41681891 -rs111007160	315	1.30	13	19000011...19998017	-
	rs42442541-rs42102604	324	1.29	26	46000238...46999583	<i>ADAM12,</i>
	rs137164093 -rs137788588	158	1.10	3	55053110...55996246	-
	rs43109937-rs135732317	102	1.08	1	18002981...18998146	<i>CXADR</i>
TRC	rs110498934...rs109401708	89	9.07	2	63002463... 63957289	-
	rs135507221...rs136312022	170	1.72	12	64002872... 64983441	-
	rs41576182... rs137330342	227	1.23	12	63000336... 63998631	-
	rs137740719 ...rs132674185	236	1	9	75004071... 75998811	<i>MAP7, PEX7</i>

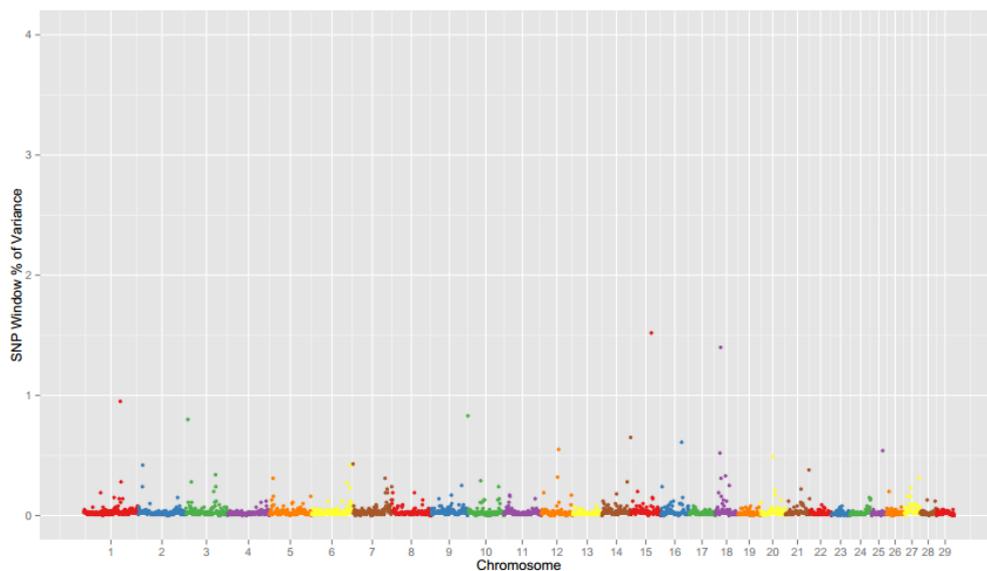
Consumo alimentar residual (CAR); conversão alimentar (CA), consumo de matéria seca (CMS), ganho médio diário (GMD), eficiência alimentar (EA), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TRC).



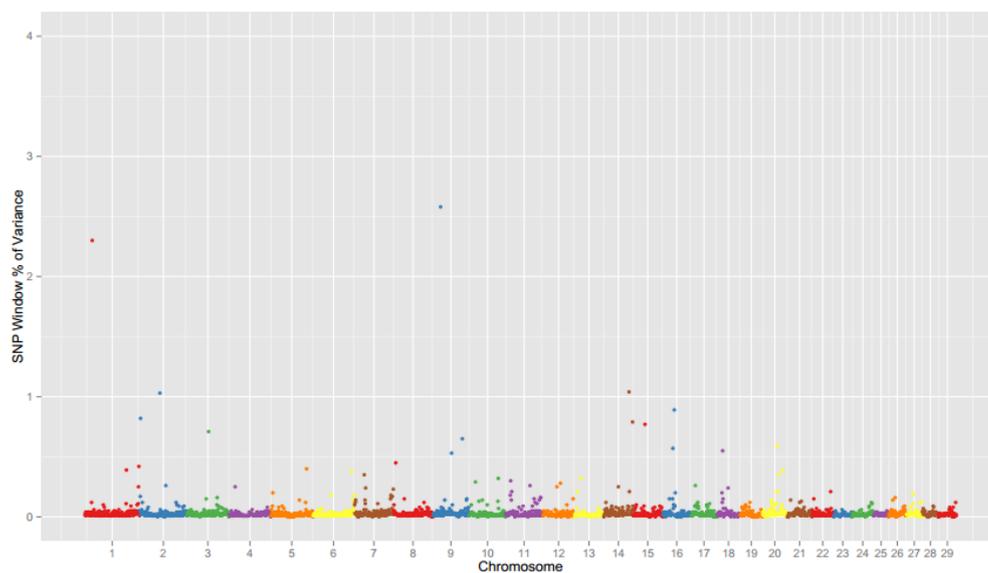
**Figura 8.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas à Consumo de Matéria Seca (CMS) em bovinos da raça Nelore.



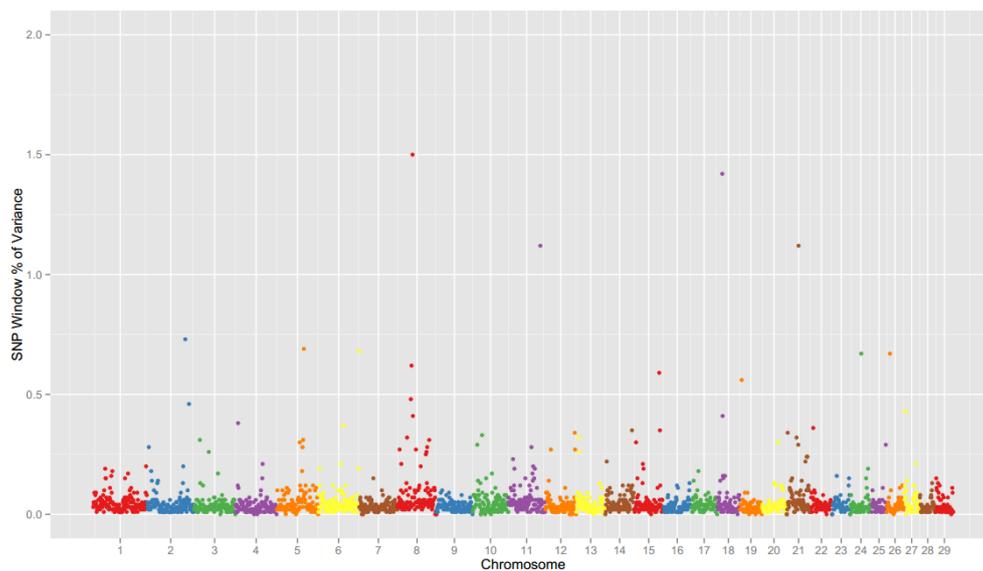
**Figura 9.** Manhattan das regiões de QTL associadas à Ganho Médio Diário (GMD) em bovinos da raça Nelore.



**Figura 10.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Conversão Alimentar (CA) em bovinos da raça Nelore.



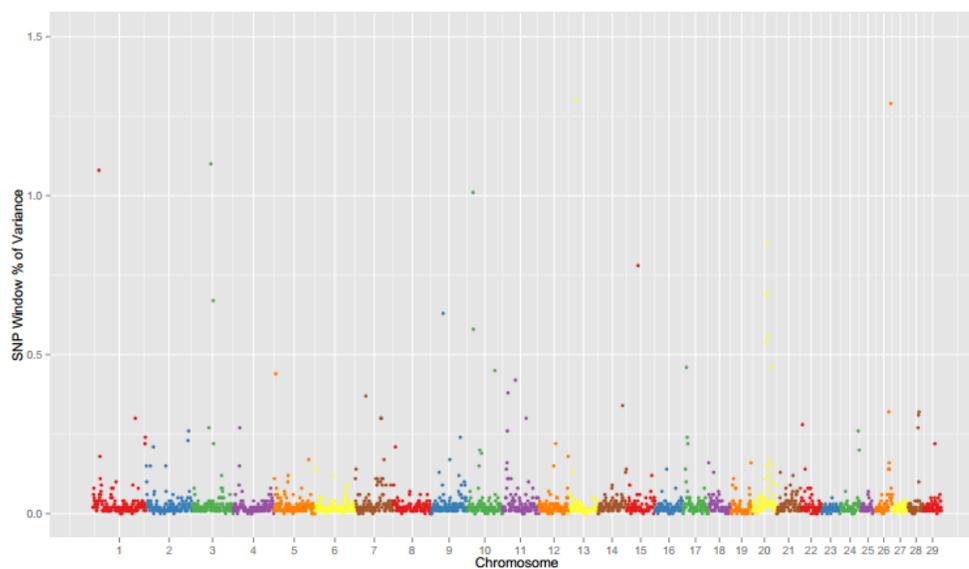
**Figura 11.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas à Eficiência Alimentar (EA) em bovinos da raça Nelore.



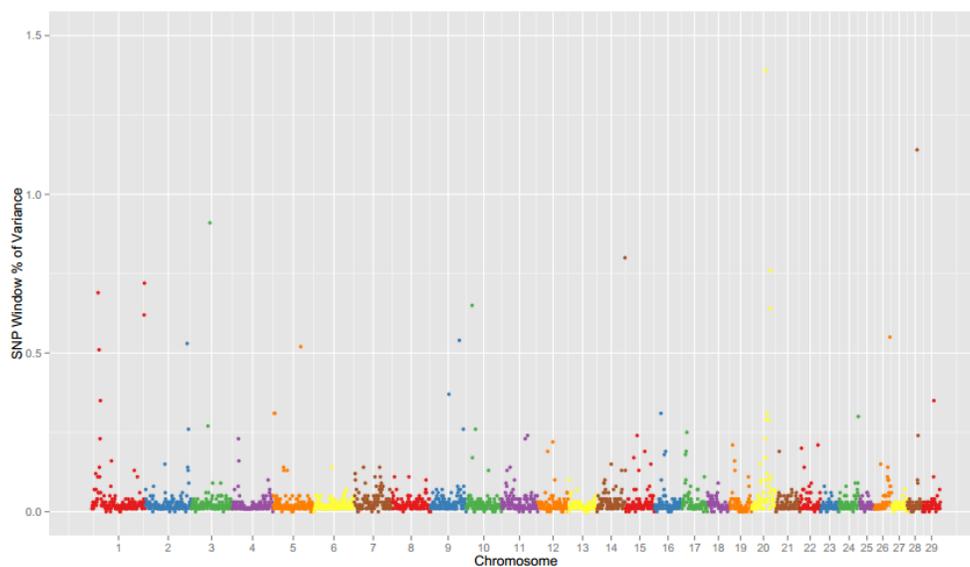
**Figura 12.** Manhattan plots das regiões de QTLs associada com Consumo Alimentar Residual (CAR) em bovinos da raça Nelore.



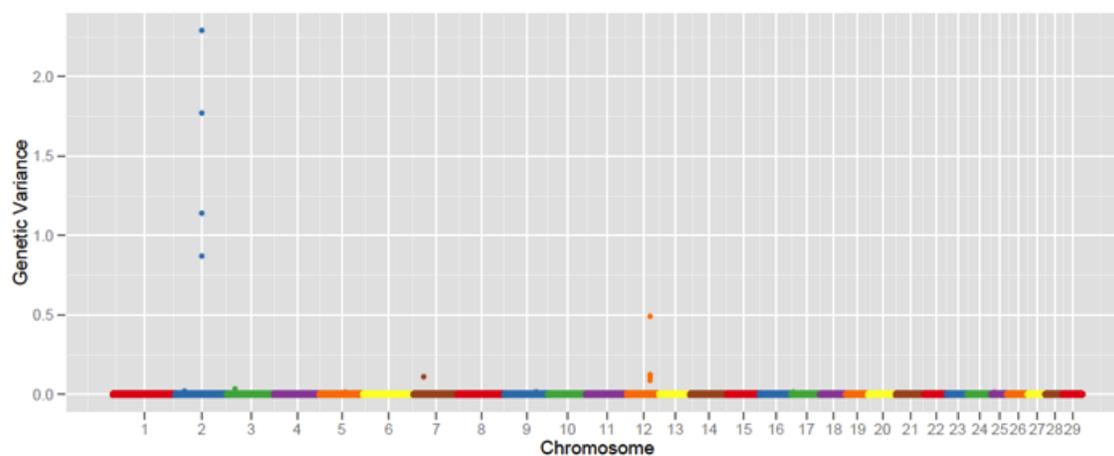
**Figura 13.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência de Manutenção (EM) em bovinos da raça Nelore.



**Figura 14.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência Parcial de Crescimento (EPC) em bovinos da raça Nelore.



**Figura 15.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Eficiência de Ganho (EG) em bovinos da raça Nelore.



**Figura 16.** Manhattan plots das regiões de QTL associadas com Taxa Relativa de Crescimento (TRC) em bovinos da raça Nelore.

Três regiões genômicas explicaram  $> 1\%$  da variância genética para a CMS (Tabela 16). A região do cromossomo 24 (32 Mb) também foi associada com CAR (Anexo 1). Dois genes candidatos posicionais e funcionais foram selecionados nesta região; *Histamine receptor H4* (*HRH4*) é o primeiro gene candidato, e está associado com a regulação do apetite e resposta imune

e inflamatórias (JONES et al., 2011). A histamina é produzida pela descarboxilação da histidina pela histidina descarboxilase, e exerce a sua ação ligando-se a receptores específicos de histamina (RANGACHARI et al., 1992). A histamina participa de uma variedade de processos fisiológicos, incluindo a inflamação e imunidade, secreção ácida gástrica, contração do músculo liso, crescimento e reparação de tecidos, alergias alimentares e regulação do apetite e metabolismo em seres humanos (JI et al., 2013). O segundo gene candidato é o gene *Zinc finger protein 521* (*ZNF521*), também encontrado como *zinc finger protein* (*ZNF804B*), caracterizado pela coordenação e estabilização dos íons zinco em vários processos de troca iônica. Este gene foi associado com CMS em bovinos da raça Nelore por Santana et al. (2014).

Seis regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética para GMD (Tabela 16). A região do cromossomo 9 (22 Mb) também foi associado com EA. No cromossomo 7 (28 Mb) dois genes com função biológica relacionada ao ganho de peso foram selecionados; *Membrane-associated ring finger* (*MARCH3*) e *Aldehyde dehydrogenase 7 family, member A1* (*ALDH7A1*). O gene *MARCH3* está relacionado à proteólise de acordo com os termos do Gene Ontology (GO: 0006508). A proteólise é a hidrólise de proteínas em polipeptídeos menores e/ou aminoácidos, por clivagem das suas ligações peptídicas (KEGG). Um estudo indicou que taxas de proteólise e síntese de proteínas são maiores em indivíduos obesos do que em indivíduos magros, enquanto outros estudos não têm confirmado essas informações (WELLE et al., 1992). O gene *ALDH7A1* faz parte de uma via metabólica relacionada a glicólise/gluconeogênese (KEGG). A glicólise é a sequência de reações que metaboliza uma molécula de glicose em duas moléculas de piruvato com a produção concomitante de ATP (BERG, 2002). Essas vias podem desempenhar papel fundamental na regulação do peso corporal (VISIONI et al., 2012). O gene *ALDH7A1* codifica a proteína antiquin que foi associada com o aumento do ganho de peso corporal e obesidade em ratos (JOO et al., 2001).

No cromossomo 3 (8 Mb) três genes candidatos foram identificados; *Apolipoprotein A-II* (*APOA2*), *Ubiquitin specific peptidase 21* (*USP21*), e *Ubiquitin-fold modifier conjugating enzyme 1* (*UFC1*). Ao gene *APOA2* foi atribuído termos biológicos de transporte de proteínas (GO: 0051223), metabolismo lipídico (GO: 0008610) e resposta ao estímulo de carboidratos (GO: 0009743). O gene *APOA2* produz a apolipoproteína A - II, que é um factor regulador chave do metabolismo de HDL, *High Density Lipoproteins* (KALOPISSIS et al., 2003). Polimorfismos neste gene foram associados com obesidade e o peso corporal em humanos (CORELLA et al.,

2011). Fontanesi et al. (2012) indicaram o gene *APOA2* como um gene candidato para espessura de gordura em suínos. Os genes *USP21* e *UFC1* estão relacionados à proteólise (GENE ONTOLOGY), e são membros da família de genes ubiquitina. O sistema ubiquitina regula praticamente todos os aspectos da função celular (ERSNT et al., 2013), desde regulação da expressão gênica a processos relacionados com degradação de retículo associada a proteínas, degradação lisossomal, degradação da proteína através do proteassoma, sinalização celular e a reparação do DNA (ASHBURNER et al., 2000). Estes processos são geralmente descritos como regulatórios pós-traducionais da expressão gênica e podem causar variação no fenótipo, influenciando os níveis de proteínas e a sua atividade na realização dos processos bioquímicos (KARISA et al., 2013). Karisa et al. (2013) identificaram a via metabólica do gene *UBC (ubiquitin C)* associada a CAR em bovinos *Bos taurus*.

Para CA, quatro regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética (Tabela 16). A região no cromossomo 18 (15 Mb) também foi associada com EA ( Anexo 1). Um gene candidato funcional foi selecionado na região genômica do cromossomo 15 (58 Mb): *Lin7 homolog c (LIN7C)*. À este gene foi atribuído termos associados ao transporte de proteínas (GO: 0008104). O gene *LIN7C* está relacionado com diabetes do tipo 2, principalmente por meio da modulação da adiposidade, e Maggie et al. (2013) analisaram variantes genéticas no gene *LIN7C* relacionada com a obesidade e diabetes do tipo 2 em humanos. O gene *Glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF)* está anotado no cromossomo 20 (36 Mb). A proteína codificada por este gene tem sido descrita como secretada a partir de células adiposas (FRADETTE et al., 2005). Os adipócitos secretam hormônios com papel importante na deposição de gordura e obesidade (RICHARD et al., 2011).

Quatro regiões genômicas explicaram > 1% da variância genotípica para EA (Tabela 16). Quatro regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética para CAR (Anexo 1). A região no cromossomo 18 (14 Mb) está entre duas regiões, onde cada uma explicou mais de 0,5% da variância genética para outras características de eficiência alimentar (CA e EA, Anexo 1). Dois genes candidatos posicionais relacionados à termos biológicos de proteólise (GO: 0006508; GO: 0006461) foram selecionados nesta região; *Dipeptidase 1 (DEPPI)* e *Tubulin beta 3 (TUBB3)*. De acordo com Richardson et al. (2002) a degradação de proteínas e o *turnover* de proteína contribuem para a variação no CAR, e genes envolvidos nesses processos são bons candidatos para características de eficiência alimentar (ABO-ISMAIL et al., 2013). A região associada no

cromossomo 11 (93 Mb) abriga o gene *Prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (PTGS1)*. O gene *PTGS1* está envolvido com processo metabólico de ácidos graxos (GO: 0006631) e biossíntese de lipídeos (GO: 0008610). *PTGS1* é uma enzima chave na biossíntese de prostaglandinas, que são produzidas em diferentes fases da vida dos adipócitos (HOSSAIN et al., 2011). A diferenciação de adipócitos e adipogênese é importante em termos de obesidade e relacionada à diabetes em mamíferos (RAHMAN et al., 2013).

Seis regiões genômicas 1 Mb explicaram > 1% da variância genética para EM (Tabela 16). Além de estar associada com eficiência de manutenção, duas regiões adjacentes no cromossomo 1 (155 e 156 Mb) foram também associadas com GMD (Anexo 1). Um gene que está associado ao desenvolvimento de ratos (LIU et al., 2006) foi selecionado nesta região; *S. cerevisiae, homolog (DPH3)*. O factor de alongação 2 em eucariotas (EEF-2) contém um único resíduo de histidina modificada pós-traducionalmente, designado *diphthamide* (LIU et al., 2006). *DPH3* é uma pequena proteína necessária para a biossíntese de *diphthamide*, e desempenha papel em complexos de proteínas eucarióticas envolvidas em vários processos biológicos (BAR et al., 2008). À este gene foi atribuído termos biológicos associados à regulação da secreção de proteínas (GO: 0050708) e transporte de proteínas (GO: 0051223).

Cinco regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética para EG (Tabela 16). Uma região do cromossomo 13 (19 Mb) e do cromossomo 20 (42 Mb) foram também associadas com EM. A região do cromossomo 28 (29 Mb) abriga um gene com função relacionada com o metabolismo do cálcio; *Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II gamma (CAMK2G)*. Estudos têm implicado o  $Ca^{2+}$  como regulador de várias funções celulares, incluindo a progressão do ciclo celular e a proliferação, fertilização e desenvolvimento inicial (SKELDING et al., 2011). O gene *CAMK2G* tem sido relacionado com a regulação de outros processos biológicos, tais como a diferenciação osteogênica e manutenção do tônus vascular (SKELDING et al., 2011). O gene *CAMK2G* está associado com termos biológicos como ciclo celular (GO: 0022402) e fosforilação de proteínas e aminoácidos (GO: 0006468).

Seis regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética para EPC (Tabela 16). Regiões no cromossomo 13 (19 Mb) e no cromossomo 14 (83 Mb) foram também associadas com EM. Um gene candidato funcional foi selecionado na janela no cromossomo 1 (18Mb); *Coxsackie virus and adenovirus receptor (CXADR)*. Ao gene *CXADR* foram atribuídos termos biológicos relacionados ao desenvolvimento de órgãos musculares (GO: 0007517), regulação do crescimento

de órgãos (GO: 0046620), desenvolvimento do tecido muscular (GO: 0060537) e regulação do crescimento e desenvolvimento (GO: 0048638). Variantes no gene *CXADR* foram associados com a pressão arterial e a obesidade em humanos (SHETTY et al., 2012). O gene *CXADR* desempenha papel na condução elétrica do coração, e tem sido associado com miocardite viral e cardiomiopatia dilatada subsequente, a qual está associada com a pressão sanguínea elevada (LISEWSKI et al., 2008). Um gene posicional foi selecionado no cromossomo 26 (46 Mb); *Adam metallopeptidase domain 12 (ADAM12)*. De acordo com Coles et al. (2014), *ADAM12* é um gene interessante em bovinos de corte devido ao seu envolvimento na regulação da remodelação da matriz extracelular, modulação de alterações morfológicas celulares e desenvolvimento de músculo e gordura (CAO et al., 2003; KAWAGUCHI et al., 2003). O gene *ADAM12* está envolvido na regulação da miogênese e adipogênese em bovinos de corte (COLES et al., 2014). Kim et al. (2012) identificaram o gene *ADAM12* também como regulador do TGF- $\beta$ 1 (*transforming growth factor*). O TGF- $\beta$ 1 induz a diferenciação de células estaminais humanas derivadas de tecido adiposo mesenquimais em células musculares.

Quatro regiões genômicas explicaram > 1 % da variância genética para TCR (Tabela 16). Dois genes com função relacionada com o crescimento do esqueleto foram escolhidos no cromossomo 9 (75 Mb); *Microtubule-associated protein 7 (MAP7)* e *Peroxisomal biogenesis factor 7 (PEX7)*. Ao gene *MAP7* foi atribuída a função biológica relacionada com o crescimento (GO: 0040007), crescimento de órgãos (GO: 0035265) e organização do citoesqueleto (GO: 0007010). O crescimento do músculo esquelético é um processo complexo (GOLL et al., 1989), uma vez que a taxa e a extensão do crescimento do músculo esquelético depende de três fatores: da síntese de proteínas do músculo; da degradação da proteína muscular; e do número e tamanho das células do músculo esquelético. As características metabólicas e funcionais dos músculos esqueléticos são resultado das características bioquímicas das miofibras e da matriz de tecido conjuntivo (MALTIN et al., 2011). A unidade básica de músculo esquelético em todos os metazoários são as miofibras multinucleadas, dentro do qual os núcleos individuais são regularmente posicionados. O gene *MAP7* é um regulador essencial do posicionamento mionuclear necessário para a função do músculo esquelético em mamíferos (METZGER et al., 2012). Ao gene *PEX7* também foi atribuído termos biológicos associados ao desenvolvimento do sistema esquelético (GO: 0001501) e desenvolvimento ósseo (GO: 0060348). Este gene foi relacionado ao esqueleto de ratos em desenvolvimento (BRAVERMAN et al., 2010).

As regiões de QTL descritas neste estudo abrigam genes com funções biológicas relacionadas à resposta imune e inflamatórias, metabolismo iônico e do cálcio, proteólise, metabolismo de lipídeos e ácidos graxos, glicólise, geração de energia, crescimento e desenvolvimento . Barendse et al. (2007) em um estudo que utilizou novilhos *Bos taurus* e *Bos indicus* relataram 141 regiões genéticas associadas com CAR . Os genes descritos tinham funções biológicas também relacionadas com o crescimento e desenvolvimento, resposta imune e inflamação, turnover de proteína, canais iônicos, metabolismo de ácidos graxos, e outros processos adicionais, como processos de transcrição e tradução, apoptose, transdução de sinal e sinalização da leptina. Rolf et al. (2011) em um estudo de associação genômica ampla para eficiência alimentar em bovinos Angus, também encontraram genes relacionados à processos metabólicos para o crescimento e eficiência de utilização de energia, tais como o crescimento e morte celular, distúrbios metabólicos e transdução de sinal. Em um estudo com novilhos da raça Nelore, Bonilha et al. (2013) relataram outros processos fisiológicos com papel importante na eficiência de utilização de alimentos, são eles: digestibilidade, padrão de alimentação, produção de calor, atividade física, estresse, composição do ganho e metabolismo ruminal. Santana et al. (2014), em recente estudo de associação para CAR e ingestão de matéria seca (IMS) em bovinos da raça Nelore, encontraram genes relacionados ao transporte iônico, processos de troca iônica e sinalização da leptina. Estes resultados indicam que diversos mecanismos fisiológicos estão por trás do controle do consumo alimentar em bovinos de corte. Embora nenhuma análise funcional tenha sido feita neste estudo para apoiar a implicação desses genes nos fenótipos, estes são os melhores candidatos com base na metodologia utilizada para indicar genes dentro das regiões QTL.

Algumas regiões genômicas foram sobrepostas entre as características analisadas neste estudo. Regiões do cromossomo 9 foram sobrepostas entre sete características diferentes; CMS, GMD, EA, EM, TRC, EG e EPC (Tabela 16, Anexo 1). Uma região do cromossomo 9 (22 Mb) foi sobreposta entre EA e GMD; outra região (85 Mb) foi sobreposta entre EA, EG e EM . Este cromossomo abriga QTL previamente descritos para peso corporal em bovinos Angus (McCLURE et al., 2010) e consumo alimentar residual em bovinos Angus e Charolês (SHERMAN et al., 2009).

Os cromossomos 1, 13, 14, 18 e 24 também apresentaram regiões que se sobrepuseram entre as características analisadas (Tabela 16, Anexo 1). Duas regiões no cromossomo 1 foram sobrepostas entre GMD, EM e EG (156 Mb); e entre EPC, EM e EG (180 Mb). O cromossomo 1

apresenta QTL anteriormente descritos para peso corporal e conversão alimentar em *Bos taurus* (McCLURE et al., 2010). Uma única região no cromossomo 13 (19 Mb) foi sobreposta entre EM, EG e EPC. O cromossomo 13 apresenta QTL anteriormente descritos para peso de carcaça e peso corporal (McCLURE et al., 2010). No cromossomo 14, uma região (83 Mb) foi sobreposta entre 5 características: EA, CA, EM, EG e EPC. O cromossomo 14 apresenta QTL descritos para peso corporal em bovinos da raça Brangus (PETERS et al., 2012) e para gordura subcutânea em bovinos da raça Canchim (VENERONI et al., 2010). Para o cromossomo 18, a região de 15 Mb foi sobreposta entre CA e EA. Este cromossomo apresenta QTL descritos para peso de carcaça em *Bos taurus* x *Bos indicus* (CASAS et al., 2003) e espessura de gordura (McCLURE et al., 2010). No cromossomo 24, a região de 32 Mb foi sobreposta entre duas características, CMS e CAR. O cromossomo 24 apresenta QTL anteriormente descritos para espessura de gordura (McCLURE et al., 2010). As regiões de QTLs sobrepostas nos cromossomos 1, 9, 13, 14, 18 e 24 parecem ser importantes regiões de QTL para as características de eficiência alimentar neste estudo, e demonstram o perfil epistático destas características.

As regiões genômicas que controlam o CMS e o CAR neste estudo são de alguma forma diferentes daquelas relatadas por Santana et al. (2014). Os autores encontraram os cromossomos 4, 8, 14 e 21 associados com CMS e CAR em bovinos da raça Nelore. Neste estudo, foram identificadas regiões nos cromossomos 9, 13 e 24, e nos cromossomos 8, 11, 18 e 21 para CMS e CAR, respectivamente. Somente o cromossomo 8 e o cromossomo 21 foram comuns em ambos os estudos. Estas diferenças podem ser parcialmente explicadas por diferenças no desenho experimental e na base genética das populações. Em relação ao desenho experimental, algumas das discrepâncias observadas poderiam ser o resultado de efeitos de ambiente/hormonais sobre genes ou QTLs, uma vez que em Santana et al. (2014) foram utilizados touros jovens e novilhos, enquanto que no presente trabalho foram utilizados apenas novilhos. Em relação à base genética, o não relacionamento entre os touros dos diferentes estudos, pode ter levado às diferenças observadas.

A eficiência alimentar é uma característica poligênica (BOLORMAA et al., 2013), caracterizada por complexas interações entre os constituintes celulares (DNA, RNA e proteínas), influenciados por múltiplos processos biológicos (KARISA et al., 2013). Nossos resultados indicam vários QTL e genes controlando características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore. Algumas regiões de QTL (cromossomos 3, 10, 11, 15, 20, 28) e alguns genes candidatos funcionais

identificados não foram relatados previamente em bancos de dados para eficiência alimentar em bovinos *Bos taurus*, o que indica que a eficiência alimentar seja controlada por algumas regiões específicas nesta população da raça Nelore. Discrepâncias de frequências alélicas dos SNPs ou a extensão do desequilíbrio de ligação entre marcadores para bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* pode resultar em efeitos diferentes de marcadores sendo detectados em diferentes raças (TIZIOTO et al., 2013). Mais estudos com outras populações da raça Nelore serão necessários para validar esses resultados.

De acordo com Barendse et al. (2007), os genes que afetam determinada característica irão mudar em diferentes espécies, e diferenças no desempenho e eficiência estão bem estabelecidas. Apesar de algumas diferenças entre genes e regiões genômicas encontrados neste estudo para *Bos indicus*, os processos fisiológicos e metabólicos (respostas imune e inflamatórias, metabolismo iônico e do cálcio, proteólise, glicólise, metabolismo de lipídeos e ácidos graxos, geração de energia, crescimento e desenvolvimento) relacionados com a eficiência alimentar parecem ser semelhantes entre as duas subespécies (BARENDSE et al., 2007; ROLF et al., 2013; KARISA et al., 2013; SANTANA et al., 2014).

Os estudos de regiões genômicas e genes candidatos associados com características produtivas importantes elucidam o caminho para a compreensão dos possíveis processos biológicos relacionados com essas características, e a maioria destes mecanismos fisiológicos ainda não estão bem definidos. Os estudos de associação ampla do genoma para características produtivas em bovinos da raça Nelore estão surgindo recentemente, e estes são importantes uma vez que existem poucas pesquisas e relatos de regiões e genes associados com características de eficiência alimentar nesta raça.

### **3.5. Conclusões**

Além de algumas regiões genômicas previamente relatadas associadas a eficiência alimentar em *Bos taurus*, o presente estudo de associação ampla do genoma identificou novas regiões genômicas, o que indica que a eficiência alimentar talvez seja controlada por algumas regiões específicas nessa população de bovinos da raça Nelore.

As regiões de QTL descritas neste estudo abrigam genes com funções biológicas relacionadas com processos metabólicos, metabolismo de lipídios e de proteínas, produção de energia e crescimento. Entre os genes candidatos posicionais selecionados para eficiência alimentar estão: *HRH4*, *ALDH7A1*, *APOA2*, *LIN7C*, *CXADR*, *ADAM12* e *MAP7*. Os genes presentes nessas regiões podem ser genes candidatos para características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.

### 3.6. Referências

ARCHER, J. A. et al. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: a review. **J. Agric. Res.**, v.50, 147–161, 1999.

ARTHUR, P. F. et al. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency, and other postweaning traits in Angus cattle. **J. Anim. Sci.**, v. 79, p. 2805-2811, 2001.

ASHBURNER, M. et al. Gene ontology: tool for the unification of biology. **Nat. Genet.**, v.25, n.25-29, 2000.

BÄR, C. et al. A versatile partner of eukaryotic protein complexes that is involved in multiple biological processes: Kti11/Dph3. **Molecular Microbiology**, v.69, n.5, 1221–33. 2008.

BARENDSE, W. et al. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics**, v.176, p.1893–905, 2007.

BASARAB, J.A. et al. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Can. J. Anim. Sci.**, v.83, p.189-204, 2003.

BERG, J. M., TYMOCZKO, J. L., STRYER, L. **Biochemistry**. 5<sup>th</sup>. Ed. New York: W H Freeman, 2002.

BOLORMAA, S. et al. Accuracy of prediction of genomic breeding values for residual feed intake, carcass and meat quality traits in *Bos taurus*, *Bos indicus* and composite beef cattle. **J. Anim. Sci.** v.91, n.7, p. 3088-104.

BONILHA, E. F.M. et al. Body chemical composition of Nelore bulls with different residual feed intakes. **J Anim Sci.**, v.91, n.7, p. 3457-64, 2013.

BRAVERMAN, N. et al. A Pex7 hypomorphic mouse model for plasmalogen deficiency affecting the lens and skeleton. **Molecular Genetics and Metabolism**, v.99, p.408–416, 2010.

CAO, Y. et al. Role of metalloprotease disintegrin *ADAM 12* in determination of quiescent reserve cells during myogenic differentiation in vitro. **Mol. Cell. Biol.**, v.23, p.6725–6738, 2003.

CESAR, A. S. et al. Genome-wide association study for intramuscular fat deposition and composition in Nellore cattle. **BMC Genetics**, v.15, n.1, p.39, 2014.

COLES, C., WADESON, J. A disintegrin and metalloprotease-12 is type I myofiber specific in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle. **J. of Anim. Sci.**, v.92, n.4, 1473–1483., 2014.

CORELLA, D. et al. Association between the APOA2 promoter polymorphism and body weight in Mediterranean and Asian populations: Replication of a gene-saturated fat interaction. **Int J Obes**, v.35, p.666–675, 2011.

CORVINO, T. L. S. et al. Residual feed intake and relationships with performance of Nelore cattle selected for post weaning weight. **Rev. Bras. Zootec**, v.40, p.929-937, 2011.

CROWLEY, J. J. et al. Genetic relationships between feed efficiency in growing males and beef cow performance. **J Anim Sci**, v.89, n.11, p.3372-3381, 2010.

ELZO, M. A. et al. Genomic-polygenic evaluation of Angus-Brahman multibreed cattle for feed efficiency and postweaning growth using the Illumina 3K chip. **J. Anim. Sci.**, v.90, p. 2488–2497, 2012.

ERNST, A. et al. A strategy for modulation of enzymes in the ubiquitin system. **Science**, v.339, n.6119, p. 590-5, 2013

FERNANDO, R., GARRICK, D.J. GENSEL – User manual for a portfolio of genomic selection related analyses, 2nd ed. for version 2.12. **Anim. Breeding and Genetics**, Iowa State University, Ames, IA, 2009

FITZHUGH, H.A., TAYLOR, C.S. Genetic analysis of degree of maturity. **J Anim Sci**, v.33, p. 717–725, 1971.

FONTANESI, L. et al. Identification and association analysis of several hundred single nucleotide poly morphisms within candidate genes for back fat thickness in Italian Large White pigs using a selective genotyping approach. **J Anim Sci**, v.90, p.2450-2464, 2012.

FORTES, M. R. S. et al. Gene network analyses of first service conception in Brangus heifers: Use of genome and trait associations, hypo-thalamic-transcriptome information, and transcription factors. **J. Anim. Sci.**, v.90, p. 2894–2906, 2012.

FRADETTE, J. et al. HSV vector-mediated transduction and *GDNF* secretion from adipose cells. **Gene Therapy**, v.12, p. 48–58, 2005.

GARRICK, D.J., FERNANDO, R. L. Implementing a QTL detection study using genomic prediction methodology. **Methods Mol Biol**, v.1019, p.275-298, 2013.

GOLL, D. E., KLEESE, W. C., SZPACENKO, A. Skeletal muscle proteases and protein turnover. **J. Cell Sci.**, v.116, p. 3893–3904, 1989.

HABIER, D. et al. Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. **BMC Bioinformatics**, v.12, p.186, 2011.

HOSSAIN, M.S. et al. Development of enzyme-linked immunosorbent assay for  $\Delta$ 12-PGJ2 and its application to the measurement of the endogenous product generated by cultured adipocytes during the maturation phase. **Prosta-glandins & Other Lipid Mediators**, v.94, p.73–80, 2011.

HUANG, D.W., SHERMAN, B.T., LEMPICKI, R.A. Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. **Nucleic Acids Res**, v.37, p.1–13, 2009.

JI, Y. et al. Lymphatic diamine oxidase secretion stimulated by fat absorption is linked with histamine release. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.**, v.304, n.8, p.732–40, 2013.

JONES, B.L., KEARNS, G.L. Histamine: new thoughts about a familia mediator. **Clin Pharmacol Ther**, v.89, p.189–197, 2011.

JOO, J. I. et al. Differential expression of adipose tissue proteins between obesity-susceptible and -resistant rats fed a high-fat diet. **Proteomics**, v.11, p.1–20, 2011.

KALOPISSIS, A.D., PASTIER, D., CHAMBAZ, J. Apolipoprotein A-II: Beyond genetic associations with lipid disorders and insulin resistance. **Curr. Opin. Lipidol.**, v.14, p.165–172, 2003.

KARISA, B., MOORE, S., PLASTOW, G. Analysis of biological networks and biological pathways associated with residual feed intake in beef cattle. **Anim. Sci. J.**, v. 85, p. 374–387. 2014

KARISA, B. K. et al. Candidate genes and single nucleotide polymorphisms associated with variation in residual feed intake in beef cattle. **J. Anim. Sci.** v.91, n.8, p.3502-13, 2013.

KAWAGUCHI, N. et al. *ADAM12* induces actin cytoskeleton and extracellular matrix reorganization during early adipocyte differentiation by regulating beta1 integrin function. **J. Cell Sci.**, v.116, p. 3893–3904, 2003.

KELLNER, O. **The scientific feeding of animals.** McMillan, New York. 1909

KIM, Y. M. et al. Proteomic Identification of *ADAM12* as a Regulator for TGF- $\beta$ 1-Induced Differentiation of Human Mesenchymal Stem Cells to Smooth Muscle Cells. **PLoS ONE**, v.7, n.7, p.40820, 2012.

KIZILKAYA, K., R. L. FERNANDO, D. J. GARRICK. Genomic prediction of simulated multibreed and purebred performance using observed fifty thousand single nucleotide polymorphism genotypes. **J. Anim. Sci.**, v.88, p.544–551, 2010.

KIZILKAYA K., et al. Genome-wide association study of infectious bovine keratoconjunctivitis in Angus cattle. **BMC Genetics**, v.14, n.23, 2013.

KOCH, R. M. et al. Efficiency of feed use in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.22, p.486-494, 1963.

LIU, S. et al. Dph3, a small protein required for diphthamide biosynthesis, is essential in mouse development. **Mol Cell Biol.**, v.26, n.10, p.3835-41, 2006.

LISEWSKI, U. et al. The tight junction protein CAR regulates cardiac conduction and cell-cell communication. **J Exp Med.**, v.205, n.10, p.2369–79, 2008.

MAGGIE, C. Y. N. G. et al. Implication of genetic variants near *NEGR1*, *SEC16B*, *TMEM18*, *ETV5/DGKG*, *GNPDA2*, *LIN7C/BDNF*, *MTCH2*, *BCDIN3D/FAIM2*, *SH2B1*, *FTO*, *MC4R*, and *KCTD15* with Obesity and Type 2 Diabetes in 7705 Chinese. **Clin Endocrinol Metab**, v.95, n.5, p.2418–2425, 2010.

MALTIN, C., DELDAY, M., SINCLAIR, K. Impact of manipulations of myogenesis in utero on the performance of adult skeletal muscle. **Reproduction**, v.122, p. 359–374, 2001.

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, p.597–607, 2010.

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

METZGER, T., GACHE, V., XU, M. MAP and kinesin-dependent nuclear positioning is required for skeletal muscle function. **Nature**, v.484, n.7392, p.120–4., 2012.

NKRUMAH, J. D. et al. Different measures of energetic efficiency and their relationships with growth, feed intake, ultrasound and carcass measurements in hybrid cattle. **J. Anim. Sci.**, v.82, p.2451–2459, 2004.

NKRUMAH J.D. et al. Genetic and phenotypic relationships of feed intake and measures of efficiency with growth and carcass merit of beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.85, p. 2711–20, 2007.

ONTERU, S.K. et al. Whole-genome association analyses for lifetime reproductive traits in pig. **J. Anim. Sci**, v.89, p.988–995, 2011.

PETERS, S., KIZILKAYA, K. 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.3398–3409, 2012.

PETERS, S., KIZILKAYA, K. Heritability and Bayesian genome-wide association study of first service conception and pregnancy in Brangus heifers. **J. Anim. Sci.**, v.91, p. 605–612, 2013.

RAHMAN, M. S. et al. Cultured Preadipocytes Undergoing Stable Transfection with Cyclooxygenase-1 in the Antisense Direction Accelerate Adipogenesis during the Maturation Phase of Adipocytes. **Appl Biochem Biotechnol**, v.171, n.1, p.128-44, 2013.

RANGACHARI, P. K. Histamine: mercurial messenger in the gut. **Am J PhysiolGastrointest Liver Physiol**, v.262, p. G1–G13, 1992.

RICHARD, A. J., STEPHENS, J. M. Emerging roles of JAK-STAT signaling pathways in adipocytes. **Trends Endocrinol. Metab**, v.22, p.325–332, 2011.

RICHARDSON, E. C., HERD, R.M. Biological basis for variation in residual feed intake in beef cattle. Synthesis of results following divergent selection. **Aust. J. Exp. Agric.**, v.44, p.431–440, 2002.

ROLF, M. M. et al. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Anim. Genet.**, v.43, p. 367 -374, 2011.

SAATCHI, M., WARD, J., GARRICK, D. J. Accuracies of direct genomic breeding values in Hereford beef cattle using national or international training populations.. **J. Anim. Sci.**, v.91, n.4, 1538-51, 2013.

SANTANA, M.H.A., et al. Genome-wide association analysis of feed intake and residual feed intake in Nellore cattle. **BMC Genetics**, v.15, p.21, 2014.

SAS INSTITUTE. **SAS/STAT**: guide of personal computers, version 9.2, Cary, 2009.v.1.

SHERMAN, E L. et al. Fine mapping quantitative trait loci for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **J. Anim. Sci.**, v.87, n.1, p. 37-45, 2009.

SHETTY, P. B. et al. Variants in CXADR and F2RL1 are associated with blood pressure and obesity in African-Americans in regions identified through admixture mapping. **J Hypertens**, v.30, n.10, p.1970-6, 2012.

SNELLING, W. M. et al. How SNP chips will advance our knowledge of factors controlling puberty and aid in selecting replacement females. **J. Anim. Sci.**, v.90, p.1152-1165, 2012.

SKELDING, K. A., ROSTAS, J. A. P., VERRILLS, N. M. Controlling the cell cycle: The role of calcium/calmodulin-stimulated protein kinases I and II. **Cell Cycle**, v.10, n.4, 631–639. 2011.

TIZIOTO, P.C. et al. Genome scan for meat quality traits in Nelore beef cattle. **Physiol. Genomics**, v.45, n. 21, p. 1012–20. 2013.

VENERONI, G. B. et al. Prospecting candidate SNPs for backfat in Canchim beef cattle. **Genetics and Molecular Research** , v.9, n.4, 1997–2003., 2010.

VISINONI, S., KHALID, N.F., JOANNIDES, C.N. The role of liver fructose-1,6-bisphosphatase in regulating appetite and adiposity. **Diabetes**, v.61, p.1122–1132, 2012.

WELLE, S. et al. Increased protein turnover in obese women. **Metabolism.**, v.41, n.9, p.1028-34. 1992.

ZINN, A., SHEN, Y. A. An evaluation of ruminal degradable intake protein and metabolizable amino acid requirements of feedlot calves. **J Anim Sci.**, v.76, p.1280-1289, 1998.

**Anexo 1. Regiões de QTL associadas com características de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore.**

Característica	Janela de SNP (SNP final e inicial)	Número de SNPs na janela	% da variância explicada pela janela de SNPs	Cr	Posição no mapa (UMD 3.1 bovine assembly)
CAR	rs135744174-rs109110129	160	0.73	2	111003171...111998250
	rs134109723-rs137285753	132	0.69	5	79005067...79995258
	rs43497129-rs136390112	148	0.68	6	119004594...119454666
	rs137741468-rs109288157	192	0.67	26	10009703...10995721
	rs133031353-rs42739324	237	0.67	24	32007830...32998471
	rs110088745 -rs43549651	233	0.62	8	40010769...40994687
	rs135695322-rs136588271	283	0.59	15	73014830...73997794
	rs135460402-rs109526284	232	0.56	19	5011545...5989303
CMS	rs137694547- rs43071594	189	0.95	8	97002787...97997099
	rs109193786- rs109735608	215	0.90	2	65003697...65984693
	rs43447821 - rs110661345	254	0.86	6	3001917...3994395
	rs135072686-rs136404079	284	0.65	21	61003991...61993075
	rs42576050-rs41980496	203	0.60	21	44046471...44996964
	rs133145159 -rs136867776	159	0.50	19	12000176...12997525
CA	rs136132267-rs132707578	187	0.95	1	106001306...106994610
	rs135559142-rs110828671	132	0.83	10	18238...993197
	rs43328164-rs134696015	295	0.80	3	6009105...6999643
	rs135793109-rs134017120	244	0.65	14	83000515...83999590
	rs43311488-rs135786810	295	0.61	16	60001696...60997190
	rs136127571-rs41872478	173	0.55	12	50022587...50999539
	rs42945830-rs137456474	243	0.54	25	32000075...32992384
	rs136086133-rs136846608	107	0.52	18	13004282...13994812
EA	rs109801168 -rs121919078	141	0.89	16	33002827...33992046
	rs133364656 -rs134251358	137	0.82	2	2020914...2997466
	rs135793109 -rs134017120	244	0.79	14	83000515...83999590
	rs41642281 - rs136649912	241	0.77	15	34004680...34998425
	rs110438768 -rs132904937	196	0.71	3	62004226...62995709
	rs110886051 -rs136158385	132	0.65	9	85000924...85992426
	rs132642498 - rs42290512	195	0.59	20	42002534...42999156
	rs110312247 -rs135563562	223	0.57	16	29001388...29987410
	rs109105703 -rs136356118	189	0.55	18	15002281...15989210
	rs133801254 -rs134385432	138	0.53	19	54001734...54973309
GMD	rs110787372- rs134954387	206	0.73	24	33001958...33982585
	rs133801254- rs134385432	138	0.59	9	54001734...54973309
	rs110312247- rs135563562	223	0.55	16	29001388...29987410
	rs136695261- rs134921622	265	0.55	1	155006277...155998842

	rs137497028- rs110943619	157	0.55	3	103003289...103998628
	rs110681959- rs134417726	181	0.52	8	82000756...82997174
	rs41803460- rs110671046	243	0.50	16	35003481...35998905
	rs133082754- rs42902510	149	0.50	1	151000965...151999589
EM	rs135553767-rs133216097	265	0.98	20	58002823...58996938
	rs133644625 -rs137494465	181	0.78	12	44013402...44986882
	rs42066681-rs133291391	240	0.61	5	4010093...4995711
	rs43109937-rs135732317	202	0.59	1	18002981...18998146
	rs109372510-rs134352492	222	0.56	7	77004653...77998425
	rs134352492-rs133053098	172	0.53	2	124023198...124997614
EG	rs137164093-rs137788588	158	0.91	3	55053110...55996246
	rs135793109-rs134017120	244	0.8	14	83000515...83999590
	rs137822645-rs137079462	178	0.76	20	56004883...56999854
	rs134217291-rs43586239	245	0.72	1	156005880...156999077
	rs43109937 -rs135732317	202	0.69	1	18002981...18998146
	rs110532506-rs133928131	154	0.65	10	17011165...17997362
	rs134963634-rs42390829	207	0.64	20	55010178...55999450
	rs136695261 -rs134921622	265	0.62	1	155006277...155998842
	rs42442541-rs42102604	324	0.55	26	46000238...46999583
	rs110886051-rs136158385	132	0.54	9	85000924...85992426
	rs110048374-rs133053098	172	0.53	2	124023198...124997614
	rs137541109-rs110015555	219	0.52	5	82023942...82994350
	rs134914044-rs42277860	203	0.51	1	21002744...21985704
EPC	rs110532506-rs133928131	154	1.01	10	17011165...17997362
	rs42290518- rs137428126	158	0.85	20	43000253...43994737
	rs41642281-rs136649912	241	0.78	15	34004680...34998425
	rs134918768-rs42901236	154	0.69	20	44004196...44991729
	rs132642498-rs42290512	195	0.69	20	42002534...42999156
	rs110438768-rs132904937	196	0.67	3	62004226...62995709
	rs43590097-rs43593862	208	0.63	9	34003997...34999679
	rs110686871-rs109738686	126	0.58	10	18003127...18983183
	rs135591942-rs136061761	139	0.56	20	46003628...46999429
	rs43041698-rs109491336	275	0.54	20	40001507...40996382
TRC	rs42008483- rs133648313	127	0.83	22	46005889... 46999402
	rs110944108- rs133368945	170	0.69	3	17007477... 17998304
	rs109785180- rs42314597	181	0.66	7	28006905... 28999205
	rs110244417- rs42198814	139	0.5	25	30000273... 30993420

Ganho médio diário (GMD); consumo de matéria seca (CMS), conversão alimentar (CA), eficiência alimentar (EA), consumo alimentar residual (CAR), eficiência da manutenção (EM), eficiência de ganho (EG), eficiência parcial de crescimento (EPC) e taxa de crescimento relativo (TRC).

#### **Capítulo 4. Considerações Finais**

Os estudos de regiões genômicas e genes candidatos associados com características produtivas têm papel importante na compreensão dos possíveis processos biológicos relacionados à essas características. Diversos estudos têm identificado genes associados com características de produção, no entanto, os mecanismos fisiológicos associados à essas características ainda não são bem esclarecidos.

Uma vez que os genes e/ou segmentos genômicos que controlam as características de eficiência alimentar forem identificados, poderá ser possível determinar os mecanismos biológicos e a base genética subjacente à estas características. Assim, novos estudos com outras populações da raça Nelore serão necessários para validação dos resultados encontrados, a fim de implementar a seleção para esta característica nos programas de melhoramento genético da raça Nelore no Brasil.

Como a alimentação é um dos principais componentes de custos de produção, e a raça Nelore é a raça de maior importância econômica no Brasil, a capacidade de identificar e selecionar os animais mais eficientes deve ter impacto econômico considerável. O desenvolvimento de critérios moleculares para melhorar a eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore deve também contribuir para a redução do impacto ambiental da produção de carne nos trópicos.