



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

GENOTIPAGEM DE ALTA DENSIDADE PARA ASSOCIAÇÃO DE CARACTERÍSTICA REPRODUTIVA EM BOVINOS DE CORTE

**Juliana dos Santos Fernandes¹; André Vieira do Nascimento²; Márcia Cristina Matos³;
José Fernando Garcia⁴; Alexeia Barufatti Grisolia⁵**

UFGD/FCBA, Caixa Postal 533, 79.804-970 Dourados-MS, E-mail: julianafy@hotmail.com

¹Bolsista de Iniciação Científica. ²Mestrando do Programa de Pós-graduação em Biologia Geral/Bioprospecção - UFGD. ³Doutora em Medicina Veterinária - Universidade Estadual Paulista (UNESP) – Jaboticabal; ⁴Docente da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho; ⁵Docente da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - UFGD.

RESUMO

Os zebuínos representam cerca de 80% do rebanho bovino brasileiro de corte e desses, a raça Nelore está em maior proporção. Como estes animais são importantes economicamente, a reprodução em larga escala dos mesmos é desejável, e um fenótipo relacionado com a eficiência reprodutiva das fêmeas é o período gestacional (PG), que é caracterizado pelo número em dias da gestação do bezerro, sendo que, quanto menor o PG, menor o peso do bezerro e mais fácil é o parto, além do fato de que a matriz irá possuir maior tempo de recuperação até a próxima gestação. Dessa forma, o presente trabalho objetivou a utilização buscar associação entre o fenótipo PG e polimorfismos de nucleotídeo único (SNP, do inglês, *Single Nucleotide Polimorphism*) distribuídos ao longo do genoma, por meio do estudo de associação genômica ampla (GWAS, do inglês, *Genome-Wide Association Studies*). O grupo amostral foi constituído por 41 animais, genotipados em painel de alta densidade. O controle de qualidade dos dados e estudo de associação foram realizados através do programa estatístico R (versão 3.0.3), utilizando a biblioteca GenABEL (versão 1.8-0). O SNP rs110856919 foi considerado o mais significativo apresentando correlação com características produtivas e reprodutivas, entretanto não apresentou relação direta com o fenótipo estudado. Verificando a região genômica de 1Mb ao redor desse marcador, foram encontrados 16 QTLs (*Loci* de Características Quantitativas, do inglês *Quantitative Traits Loci*), já descritos na literatura, sendo 2 destes correlacionados com características reprodutivas, facilidade do parto e porcentagem de espermatozoide anormal, além de outros seis com relação com

produção de leite. O gene PRLR, receptor de prolactina, hormônio diretamente relacionado com a produção de leite também foi encontrado. Assim, a abordagem genômica utilizada foi eficiente na análise dos vários marcadores disseminados ao longo do genoma bovino, encontrando regiões com associadas com características de interesse comercial.

Palavras-chave: Bovinos Nelore, GWAS, período gestacional.

INTRODUÇÃO

O rebanho bovino de corte do Brasil é composto principalmente por animais da raça zebuína (*Bos taurus indicus*), cerca de 80%, e desta parcela, 90% corresponde ao gado Nelore. Alguns fatores como adaptação ao ambiente, resistência a parasitas e melhor aproveitamento de alimentos permitiram que estes animais se adaptassem melhor ao clima tropical brasileiro (ABIEC, 2014). Desse modo, a reprodução em larga escala desses animais é de grande interesse econômico, até porque a reprodução é um parâmetro com maior retorno econômico dentro do ponto de vista produtivo (MATOS, 2012).

Uma característica fenotípica relacionada com a reprodução em bovinos é período gestacional (PG) ou duração da gestação, que é o número em dias, desde a concepção até o nascimento do bezerro (ROCHA, 2005; MATOS, 2012). O PG está correlacionado com o peso da prole ao nascimento, facilitando o parto devido nascerem mais leves, além de possibilitar que a matriz tenha período de descanso maior até a próxima gestação (ROCHA, 2005; MOREIRA, 2011).

Dessa forma, é preciso utilizar tecnologias que permitam aprimorar os rebanhos, a fim de atender as necessidades do mercado, logo, ferramentas que possibilitem a identificação de indivíduos com maior eficiência reprodutiva, são de grande interesse econômico (VAICIUNAS, 2008).

Marcadores do tipo SNP (Polimorfismo de Nucleotídeo Único, do inglês, *Single Nucleotide Polimorphism*) são caracterizados por alterações pontuais nas bases nitrogenadas da molécula de DNA. Eles são muito frequentes em humanos e em animais, podendo haver milhões de SNP no genoma de um indivíduo, e suas bases moleculares garantem abundância e distribuição homogênea no genoma. Tecnologias baseadas nesse marcador permitiram a prospecção e genotipagem do mesmo, gerando aplicação direta nas cadeias produtivas da pecuária mundial. Deste modo, o desenvolvimento de painéis de SNP de alta densidade permitiu a genotipagem de dezenas de milhares até milhões de SNP por ensaio, possibilitando

a criação de ferramentas usadas em estudos de associação genótipo-fenótipo (CAETANO, 2009; MATOS, 2012).

Estudos de associação genômica ampla (GWAS, do inglês, *Genome-Wide Association Studies*), podem ser utilizados em bovinos na localização de regiões genômica que podem contribuir na identificação de variações genéticas naturais em qualquer característica fenotípica, ou seja, identificam polimorfismos relacionados com fenótipos de interesse comercial (MATUKUMALLI *et al.*, 2009).

As análises envolvendo GWAS são amplamente utilizadas em bovinos, pois permitem que sejam realizados mapeamentos de QTL (*Loc*i de Características Quantitativas, do inglês, *Quantitative Trait Loci*), que são regiões genômicas relacionadas com a expressão de determinadas características fenotípicas. Atualmente se identificou 11,543 QTLs em bovinos para características de interesse comercial (MATOS, 2012; TOLEDO *et al.*, 2008; CattleQTLdb, 2014).

Este trabalho objetivou verificar o potencial da utilização da abordagem genômica GWAS em análises de associação entre marcadores do tipo SNP com fenótipo de período gestacional.

MATERIAL E MÉTODOS

Grupo amostral e dados fenotípicos

O presente estudo foi constituído por 41 fêmeas bovinas da raça Nelore nascidas entre os anos 2005 e 2006, que foram selecionadas dentre um rebanho comercial de fêmeas ativas da propriedade São Jorge de Maracay (Iguatemi – MS), tendo como manejo alimentar exclusivamente o pasto.

Tabela 1: Estatística descritiva dos valores genéticos preditos (EBV) da característica Período Gestacional (PG).

EBV	Fêmeas	Média	Desvio-padrão	Mediana	Min.	Máx.
PG	41	0,859	2,187	0,82	-3,12	4,90

Análises laboratoriais

O material genético desses animais foi obtido através da coleta de 4,5 mL de sangue periférico por meio da punção da veia jugular, sendo coletados em tubos do tipo Vacuntainer

com EDTA potássico e armazenados à -20° C até o processamento. A extração do DNA foi realizada através do kit comercial de extração de sangue e tecido (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Espanha), e a avaliação da pureza e concentração foi determinada por meio de espectrofotometria de micro-volume (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA). A média da concentração das amostras foi de 50 ng/μL e da razão 260:280, foi de 1,8 (± 0,2).

Protocolo de genotipagem

Os animais foram genotipados pelo painel Bovine HD Genotyping BeadChip 777 K (Illumina Inc., San Diego, CA), capaz de identificar mais de 777.962 SNP. O DNA extraído foi desnaturado e neutralizado com NaOH, etapa que prepara os ácidos nucleicos para posterior amplificação. Logo após, as amostras amplificadas foram fragmentadas e o DNA foi precipitado por meio da adição de isopropanol. A ressuspensão do DNA foi realizada em tampão de hibridização. Em seguida, o painel de genotipagem foi preparado para hibridização e as amostras foram aplicadas no mesmo, sendo este levado à incubação *overnight* em forno imediatamente após a aplicação das amostras. Neste processo, os fragmentos de DNA das amostras se anelam aos *loci* específicos e ocorrerá hibridização. Transcorrida a incubação, o painel foi lavado, para a remoção do DNA não hibridizado e, dessa forma, o mesmo estava pronto para as etapas de coloração e extensão.

A partir dos alelos encontrados, houve colorações diferentes no painel de genotipagem, que foram lidas pelo aparelho *Illumina iScan*®, onde há a emissão de um laser para excitar as moléculas de fluoróforos, dessa forma, o scanner registra imagens de alta resolução da luz emitida pelos fluoróforos, fornecendo os resultados da hibridização.

Controle de qualidade

O controle de qualidade dos genótipos foi realizado através da utilização de scripts customizados e da biblioteca GenABEL (versão 1.8-0) (AULCHENKO *et al.*, 2007) do pacote estatístico R (versão 3.0.3), sendo dividido em duas categorias: exclusão de SNPs (marcadores) e exclusão de indivíduos (amostras).

O controle de qualidade por marcador foi realizado para os seguintes parâmetros: marcadores que apresentaram as mesmas coordenadas genômicas, marcadores que não foram mapeados, e marcadores não autossômicos (SNP presentes nos cromossomos X, Y e DNA mitocondrial).

Já o controle de qualidade por amostra incluiu os seguintes critérios:

- IBS (*Identity By State* – Identidade por Estado): indivíduos com mais de 95% de semelhança são descartados do conjunto de dados a ser analisado;
- *Call Rate* (CR_{IND}): amostras que não contenham pelo menos 90% de genótipos determinados pelo painel de genotipagem serão desconsideradas para análise.

Para excluir os marcadores e amostras potencialmente problemáticos os seguintes critérios foram considerados para remoção dos SNP:

- MAF (*Minor Allele Frequency* – Frequência do Menor Alelo): marcadores com frequência alélica menor ou igual a 2%;
- *Call Rate* (CR_{SNP}): exclusão de marcadores que não estejam presentes em pelo menos 98% da população;
- HWE (*Hardy Weinberg Equilibrium* – Equilíbrio de Hardy-Weiberg): marcadores com $p < 10^{-5}$ para o teste exato de Fisher, ou seja, com desvios extremos de HWE, sugerindo potencial erro de genotipagem.

Análise de associação genômica

A confiabilidade dos resultados foi averiguada por meio do cálculo do fator de inflação λ , definido como:

$$\lambda = \frac{\text{mediana}(T_1^2, T_2^2, T_3^2, \dots, T_M^2)}{0.456}, \quad \lambda \geq 1 \quad (\text{Equação 1})$$

onde T^2 é o valor estatístico observado no teste de associação para cada SNP (distribuição aproximada X^2). Valores de λ superior a 1,1 são indicativos de inflação generalizada do teste.

Como um controle complementar, os valores de P não ajustados foram inspecionados por meio de gráfico de quantil-quantil (Q-Q).

Os resultados foram apresentados na forma de “Manhattan plot” com o co-logaritmo dos valores de P , utilizando o método de Bonferroni para a correção dos testes múltiplos, sendo α definido por $0,05/N$, e N , o número de marcadores testados (BENJAMIN e HOCHBERG, 1995). Visando identificar SNP potencialmente associáveis, estabeleceu-se a linha de significância, $(-\log_{10}(P) = 5)$. Estas análises foram conduzidas na biblioteca GenABEL, utilizando o programa estatístico R (versão 3.0.3).

Busca por SNP significativos

A busca pelo SNP significativo foi realizada considerando uma janela de 500 Kb para cada lado do marcador, utilizando a ferramenta *BioMart* (KINSELLA *et al.*, 2011) do banco

de dados Ensembl, baseado no assembly UMD v3.1. O banco de dados *Cattle QTLdb* foi usado para avaliar se o SNP significativo estava dentro de regiões de *loci* de características quantitativas (QTL, do inglês, *Quantitative Trait Loci*) e de genes mais próximos de espécies bovinas já descritas na literatura (HU *et al.*, 2013).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de qualidade

De um montante de 786.798 SNP analisados, 43.889 (5,5%) foram removidos das análises por serem marcadores não autossômicos. Dos marcadores remanescentes (742.909), após o controle de qualidade realizado, este número foi reduzido para 446.477 SNP. Dentre os marcadores excluídos, 202.754 (28,78%), 66.831 (9,48%) e 325 (0,046%), foram removidos pelos critérios de MAF 2%, CR_{SNP} e Teste Exato de Fisher P -value para $HWE < 10^{-5}$, respectivamente. O controle de qualidade por amostras não removeu nenhum indivíduo (CR_{IND}) do grupo amostral.

O tamanho do grupo amostral, a espécie analisada e painel de genotipagem são parâmetros a serem considerados na escolha do “*Call rate*” por indivíduo (SILVA, 2013). JIANG *et al.* (2013) com um grupo amostral de 96 indivíduos da raça Holstein e utilizando o mesmo painel de genotipagem, aplicaram um CR_{SNP} de 99,9%, enquanto que, NISHIMURA *et al.* (2012), usaram um CR_{SNP} de 95%, visto que seu número amostral correspondeu a 1156 indivíduos da raça Japanese Black e o painel utilizado foi o BovineSNP50 BeadChip (Illumina). Logo o CR_{SNP} de 90% utilizado no presente estudo foi utilizado considerando o grupo amostral de 41 indivíduos de raça zebuína.

O critério de MAF 2% foi responsável pela maior redução no número de marcadores. NASCIMENTO (2014) utilizando também bovinos Nelore e painel de alta densidade (777.962 SNP) obteve resultados semelhantes quanto ao número de marcadores eliminados e porcentagem de MAF (28,8%).

A quantidade de marcadores antes e após o controle de qualidade está mostrada na Figura 1. Foi verificada redução de 60,1%, tendo assim um baixo aproveitamento de SNP. Isto é caracterizado o fato de que as sondas no painel de genotipagem foram construídas principalmente com base no genoma de animais taurinos – *Bos taurus taurus* (452 indivíduos) e somente 104 indivíduos zebuínos – *Bos taurus indicus*, sendo que desses, somente 31 indivíduos eram da raça Nelore (ILLUMINA, 2012).

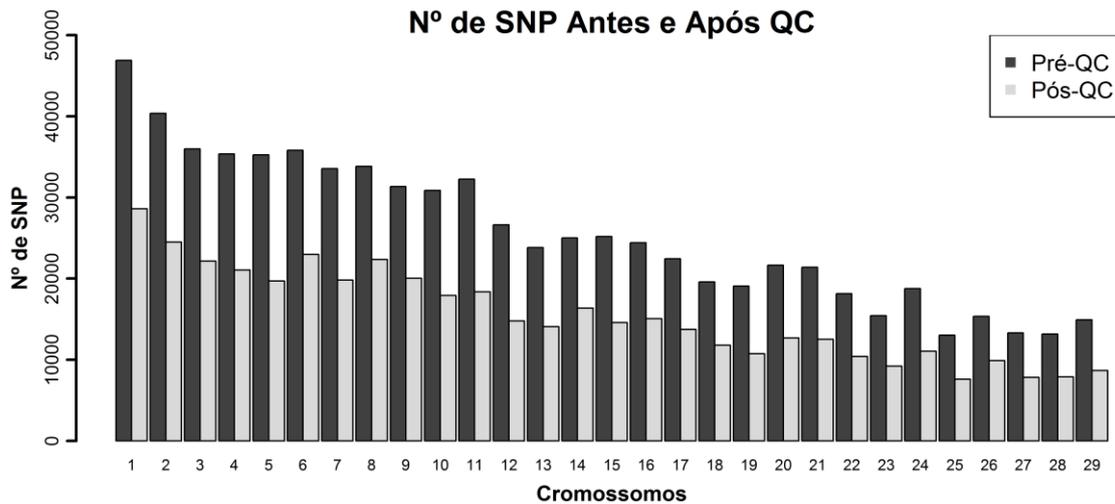


Figura 1: Quantidade de SNP antes e após o controle de qualidade dos dados genotípicos.

O critério de MAF torna-se mais rigoroso quanto maior for seu percentual nas análises, ocorrendo assim maiores reduções no número de marcadores. Dessa forma, é possível verificar na Figura 2 a abundância dos marcadores antes e depois do controle de qualidade, sendo que, após o QC restaram somente os marcadores com MAF maior que 2%.

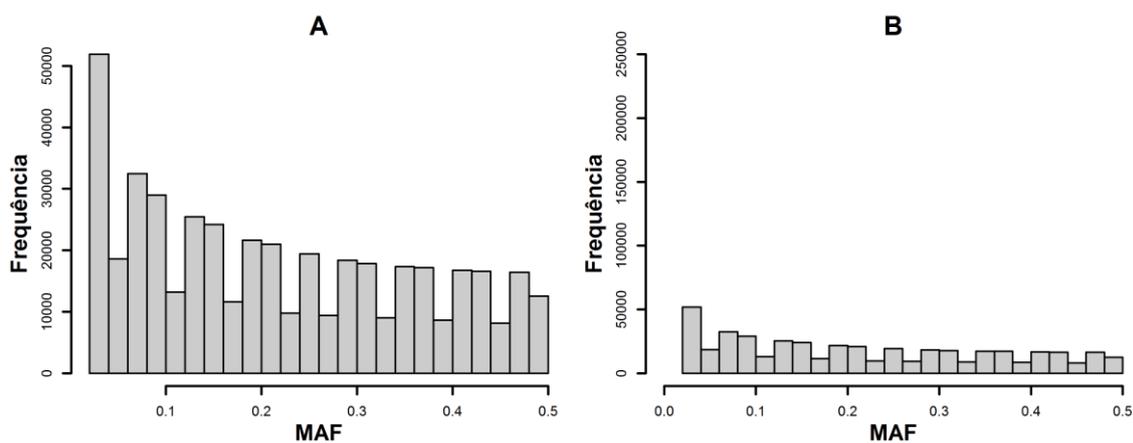


Figura 2: Representação da distribuição da frequência do menor alelo (MAF) dos marcadores antes e depois do controle de qualidade, A e B, respectivamente.

A média da heterozigosidade dos marcadores antes e depois do QC foi 22% e 31%, respectivamente. Esse aumento da heterozigosidade é devido ao número de marcadores homocigotos que foram removidos pelo critério de MAF.

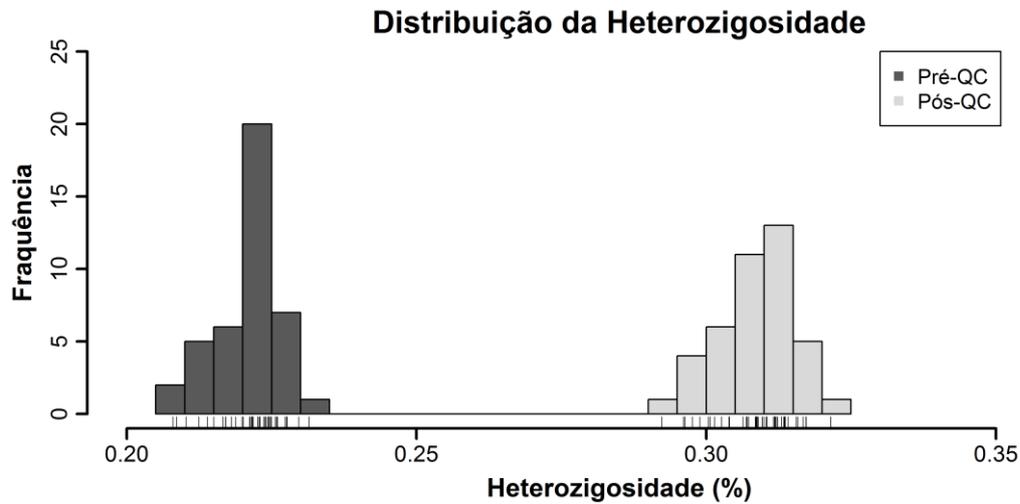


Figura 3: Distribuição da heterozigosidade dos marcadores SNP na população antes e depois do controle de qualidade.

Análise de associação genômica

Considerando nula a hipótese de não haver associação entre qualquer SNP, espera-se que haja distribuição dos pontos sobre a linha de tendência central, de modo a relacionar os valores esperados e observados. Contudo, quando há desvios dos pontos na linha de tendência significa que ocorreu uma discordância entre o *loci* de SNP e a hipótese nula, sendo este fator possivelmente relacionado com alguma inflação ocorrida durante o teste estatístico (MATOS, 2012).

De acordo com o gráfico Q-Q (Figura 4) o teste estatístico utilizado não foi aceitável, visto que houve inflação na distribuição dos pontos, pois o valor de λ ficou acima do recomendado.

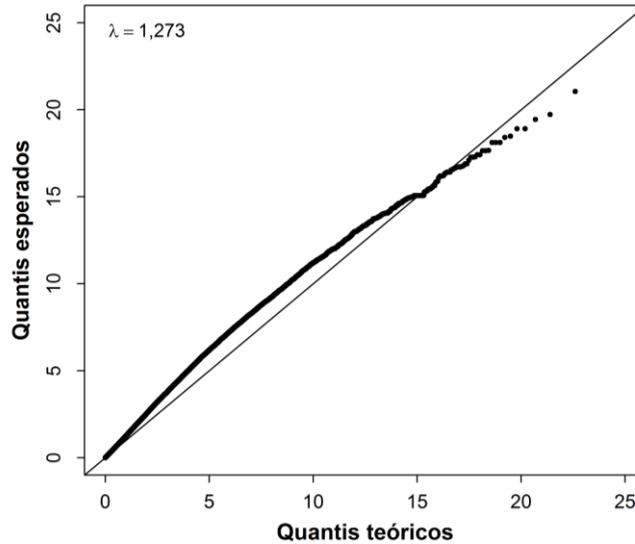


Figura 4: Gráfico quantil-quantil (Q-Q) dos resultados do GWAS para EBV (PG). A linha central na diagonal do gráfico representa a distribuição esperada e os pontos representam a distribuição observada estatisticamente pelo Qui-quadrado (χ^2).

A ideia básica por trás das análises de GWAS é a relação com possíveis associações, em populações, entre determinada característica fenotípica e marcadores moleculares utilizado em painéis de alta densidade para analisar tais associações (MATOS, 2012).

Um fator importante que limita a interpretação dos resultados em estudos de associação em larga escala são os testes múltiplos, que podem ser corrigidos através de métodos de ajustamento, como a correção de Bonferroni, que possui um limiar de significância de $0,05/n$ (n é igual ao número de SNP testados de forma independente) (BENJAMIN & HOCHBERG, 1995).

Assim, as análises de associação genômica no presente estudo, como mostrado na Figura 5, não atingiram o limiar de significância pela correção de Bonferroni. No entanto, o SNP rs110856919, localizado no cromossomo bovino 20 em região intragênica (no gene AGXT2), se apresentou acima da linha de associação sugestiva, sendo considerado o mais promissor para correlação com a característica de interesse. A linha de associação sugestiva é adotada a fim de evitar a eliminação de potenciais associações, quando o método de correção de Bonferroni é muito restritivo (NASCIMENTO, 2014).

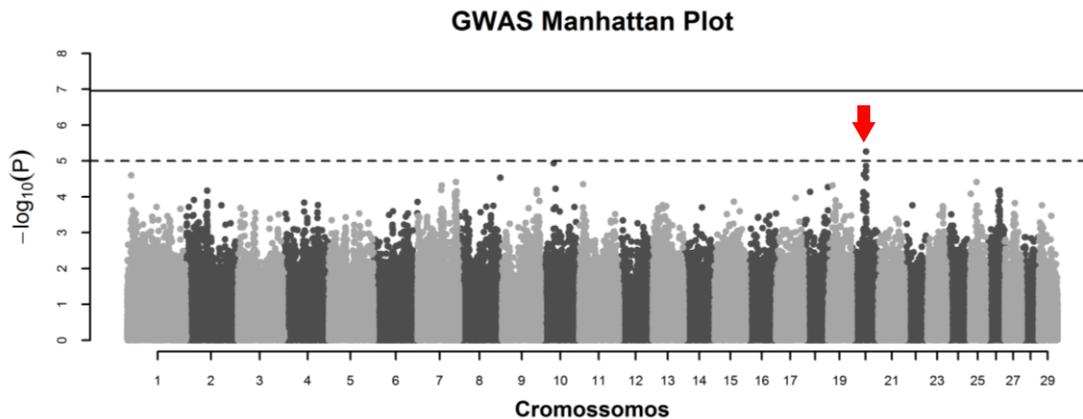


Figura 5: Manhattan plot para a associação genômica para o fenótipo período gestacional, sendo que a linha tracejada é a linha de associação sugestiva ($\alpha = 10^{-5}$) e a linha contínua representa a correção ao ajustamento de Bonferroni ($\alpha = 1.07 \times 10^{-7}$).

O resultado obtido sem uma associação fortemente significativa pode estar relacionado com o tamanho do número do grupo amostral, visto que estudos com humanos geralmente utilizam mais de dez mil indivíduos, contrariamente de estudos com espécies domésticas (SUN, 2012).

A região genômica em torno do SNP mais significativo (Figura 6), considerando 1 Mb em torno do mesmo (500 Kb para cada lado), realizada por meio da ferramenta *BioMart* do Ensembl, não encontrou genes relacionados com o período gestacional, o fenótipo de interesse, entretanto diversos genes relacionados com características reprodutivas e produtivas foram encontrados nessa região, como mostrado na Tabela 2.

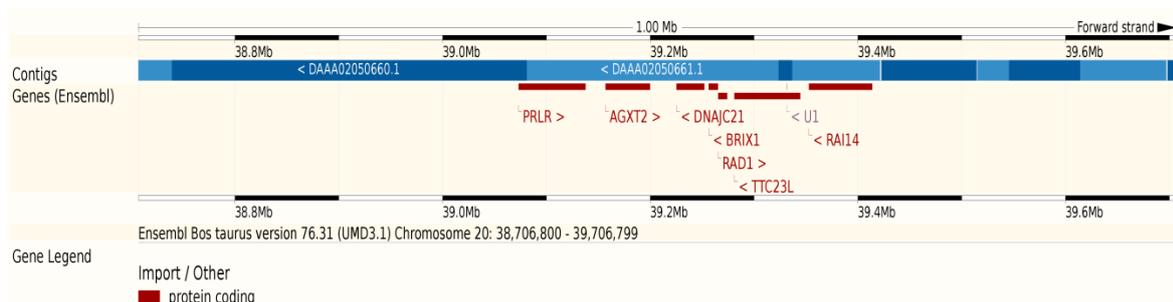


Figura 6: Região genômica correspondente a 1 Mb em torno do SNP rs110856919. Os contigs obtidos do alinhamento estão representados pela barra azul e as regiões codificadoras para os genes encontrados são as barras vermelhas.

Tabela 2: Lista dos genes encontrados na janela de 1 Mb ao redor do marcador mais significativo (rs110856919).

Gene	Ensembl ID	BTA 20 coordenada	Distância do SNP (kb)	Tamanho do gene (pb)	Descrição
PRLR	ENSBTAG000000025035	39073246:39137480	39298	2387	<i>Bos taurus</i> prolactin receptor (PRLR), transcript variant 2, mRNA
AGXT2	ENSBTAG000000007690	39156953:39199656	22878	1846	<i>Bos taurus</i> alanine – glyoxylate aminotransferase 2 (AGXT2), mRNA
DNAJC21	ENSBTAG000000015648	39225166-39252050	75272	2084	<i>Bos taurus</i> DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 21 (DNAJC21), mRNA
BRIX1	ENSBTAG000000019211	39256327-39265218	88440	1286	<i>Bos taurus</i> BRX1, biogenesis of ribosomes, homolog (<i>S. cerevisiae</i>) (BRIX1), Mrna
RAD1	ENSBTAG000000019209	39265413-39274082	97304	2985	RAD1 homolog (<i>S. pombe</i>)
TCC23L	ENSBTAG000000032933	39281008-39344413	167635	1383/1096*	Tetratricopeptide repeat domain 23-like
U1	ENSBTAG000000037206	39331273-39331423	154495	151	U1 spliceosomal RNA
RAI14	ENSBTAG000000007071	39352841-39413736	236958	3224	Retinoic acid induced 14

*duas isoformas para o gene TCC23L: TTC23L-201 e TTC23L-202, logo dois tamanhos de fragmentos.

Tabela 3: QTLs do banco de dados *Cattle QTLdb* encontrados em uma janela de 1Mb nas proximidades do SNP mais significativo (rs110856919).

Característica	Grupo	BTA 20 coordenada	QTLdb ID	PubMed ID
Profundidade do úbere	<i>Exterior</i>	35540553-48531778	4986	18832229
Rendimento de proteína do leite	Leite	2231819-71951703	10103	18298934
Porcentagem de proteína do leite	Leite	23772500-40410489	10213	7713441
Porcentagem de células somáticas	<i>Health</i>	2231819-71951703	10188	12487475
Peso corporal (nascimento)	Produção	32794807-48966457	11103	20477797
Porcentagem de proteína do leite	Leite	8954701-61961224	10448	15514072
Produção de leite	Leite	14202179-41700995	2749	9699270
Altura (em um ano)	Produção	32794807-48966457	11105	20477797
Nível de imunoglobina G	<i>Health</i>	9140681-51167021	5373	19016677
Facilidade do parto (direto)	Reprodução	33972063-69901195	10447	15514072
Porcentagem de gordura do leite	Leite	37896208-65402436	11108	20477797
Peso de carcaça	Carne e carcaça	37896208-48966457	11107	20477797
Altura (maduro)	Produção	37896208-48966457	11106	20477797
Porcentagem de espermatozoides anormais	Reprodução	31391177-72296736	9925	19630877
Rendimento de proteínas do leite	Leite	37896208-71472656	2722	12487480
Porcentagem de maciez da carne	Carne e carcaça	38769631-68633380	1341	14677852

Como mostrado na Tabela 4, foram encontrados 6 QTLs associados com produção de leite. Isso pode estar relacionado com a presença do gene PRLR que se encontra dentro da região genômica de 1Mb. Esse gene é o receptor da prolactina (PLR), hormônio que participa da regulação do desenvolvimento da glândula mamária, do início e da manutenção da lactação, e da produção de leite, além de influenciar na atividade dos genes das proteínas do leite (PEIXOTO *et al.*, 2009).

Outros dois QTLs relacionados com características reprodutivas também foram encontrados, sendo eles, a facilidade do parto e a porcentagem de espermatozoides anormais.

CONCLUSÃO

A utilização da ferramenta genômica, apresentou-se eficiente para analisar dos marcadores SNP ao longo do genoma bovino. No entanto, não foi encontrada associação dos marcadores com o fenótipo de interesse (período gestacional), porém foram encontradas regiões de QTL associadas com características de reprodução, como os QTLs facilidade de parto e espermatozoides anormais, bem como associações com características produtivas, principalmente com produção de leite. Ainda assim, o número de reduzido de indivíduos analisados foi limitante para buscar associações significativas com o fenótipo de interesse.

AGRADECIMENTOS

À UFGD pela bolsa concedida e à FUNDECT-MS, pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

ABIEC - Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne (2014) http://www.abiec.com.br/3_rebanho.asp. Acesso 05 Set. 2014.

AULCHENKO, Y.S., KONING, D.K., HALEY, C. Genome-wide rapid association using mixed and regression: a fast and simple method for genome-wide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. **Genetics** 177:577-585, 2007.

BENJAMINI, Y.; HOCHBERG, Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. **Journal of the Royal Statistical Society Series B (Methodological)**:289-300, 1995.

CAETANO, A. R. Marcadores SNP: conceito básico, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o futuro. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.38, p.64-71 (supl. Especial), 2009.

CattleQTLdb – **Cattle QTL Database** (2014) Release 24. <http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>. Acesso: 11 Set. 2014

DOBSON, H., KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **Journals of Reproduction and Fertility** 77 (1):1-36, 1986

HU, Z.L.; PARK, C.A.; WU, X.L.; REECY, J.M. Animal QTLdb: an improved database tool for livestock animal QTL/association data dissemination in the post-genome era. **Nucleic Acids Research** 41:871-879, 2013.

ILLUMINA - BovineHD Genotyping BeadChip (2012). <http://www.illumina.com>. Acesso 10 Set. 2014

JIANG, L.; JIANG, J.; YANG, J.; LIU, X.; WANG, J.; WANG, H.; DING, X.; LIU, J.; ZHANG, Q. Genome-wide detection of copy number variations using high-density SNP genotyping platforms in Holsteins. **BMC Genomics** 14:131, 2013.

KINSELLA, R.J.; KÄHÄRI, A.; HAIDER, S.; ZAMORA, J.; PROCTOR, G.; SPUDICH, G.; ALMEIDA-KING, J.; STAINES, D.; DERWENT, P.; KERHOUNOU, A.; KERSEY, P.; FLICEK, P. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. **Database: the Journal of Biological Databases and Curation** 2011:30, 2011.

MATOS, M. C. **Associação genômica ampla para características reprodutivas em bovinos da raça Nelore**. Universidade Estadual Paulista - UNESP, Joticabal, 2012.

MATUKUMALLI, L. K., LAWLEY, C.T., SCHNABEL, R. D., TAYLOR, J. F., ALLAN, M. F., HEATON, M.P., O'CONNELL, J., MOORE, S. S., SMITH, T. P.L., SONSTEGARD, T. S., VAN TASSELL, C. P. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PLoS One**, v.4, n.4, p.e5350, 2009.

MOREIRA, H.L. **Seleção para características reprodutivas em bovinos de corte da raça Nelore**. Instituto de Zootecnia - Nova Odessa, SP, 2011. 43p.

NASCIMENTO, A.V. **Estudo de associação genômica ampla para característica reprodutiva em fêmeas da raça Nelore**. Trabalho de conclusão de Curso – Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, 2013, 32 p.

NISHIMURA, S.; WATANABE, T.; MIZOSHITA, K.; TATSUDA, K.; FUJITA, T.; WATANABE, N.; SUGIMOTO, Y.; TAKASUGA, A. Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the PLAG1-CHCHD7 QTN for stature in Japanese Black cattle. **BMC Genetics** 13:40, 2012.

PEIXOTO, M.G.C.D.; VERNEQUE, R.D.; PENNA, V.M.; PEREIRA, M.C.; MACHADO, C.H.C.; LÔBO, R.B.; CARVALHO, M.R.S. **Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite: Resultados dos Testes de Progênie, do Arquivo Zootécnico Nacional e do Núcleo MOET**. 1ª ed. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2009.

ROCHA, J.C.M.C.; TONHATI, H.; ALENCAR, M.M.; LÔBO, R.B. Componentes de variância para o período de gestação em bovinos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.6, p.784-791, 2005.

SILVA, L.E. **Controle de qualidade de dados de SNP em bovinos da raça Nelore**. Trabalho de conclusão de Curso – Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD, 2013, 25p.

SUN, Y.V. Integration of biological networks and pathways with genetic association studies. **Human Genetics** 131 (10):1677-1686, 2012.

TOLEDO, E.R.; LEANDRO, R.A.; SOUZA JUNIOR, C.L.; DOUZA, A.P. Mapeamento de QTLs: uma abordagem bayesiana. **Rev. Bras. Biom.**, São Paulo, v.26, n.2, p.107-114, 2008

VAICIUNAS, A.; COUTINHO, L.L.; MEIRELLES, F.V.; PIRES, A.V.; SILVA, L.F.P. Leptin and hypothalamic gene expression in early-and late-maturing Bos indicus Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology** 31 (3):657-664, 2008.