



ENEPEX

ENCONTRO DE ENSINO,
PESQUISA E EXTENSÃO

8° ENEPE UFGD • 5° EPEX UEMS

ANÁLISE GENÔMICA EM FÊMEAS PRECOSES DA RAÇA NELORE

**André Vieira do Nascimento¹; Juliana dos Santos Fernandes²; Marcia Cristina Matos³;
José Fernando Garcia⁴; Alexéia Barufatti Grisolia⁵**

¹Mestrando em Biologia Geral/Bioprospecção, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - UFGD, Dourados-MS, Bolsista PIBIC-CNPq 2013-2014, E-mail: andrevn16@gmail.com

²Acadêmica do curso de Biotecnologia, Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - UFGD, Dourados-MS

³Docente no Centro Universitário da Grande Dourados - UNIGRAN, Dourados-MS

⁴Docente na Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba-SP

⁵Orientadora e docente na Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais - UFGD, Dourados-MS
E-mail correspondência: alexeiagrisolia@ufgd.edu.br

RESUMO

As raças zebuínas são extensivamente utilizadas nacionalmente, chegando a representar cerca de 80% do rebanho de corte. Aspectos reprodutivos interferem diretamente na lucratividade da pecuária de corte, sendo a Idade ao Primeiro Parto (IPP) uma característica importante na busca de indivíduos com eficiência reprodutiva maior. Com o objetivo de avaliar a utilização de uma ferramenta genômica para associação de polimorfismo de nucleotídeo de sítio único (SNP) distribuídos no genoma bovino com a característica reprodutiva de IPP em vacas Nelore, o estudo foi conduzido com 55 animais genotipados em painel de alta densidade para analisar mais de 777.000 marcadores. Os indivíduos foram separados em dois agrupamentos, denominados de Grupo de Prenhas (P) para novilhas com prenhez confirmada aos 18 meses, e Grupo de Não Prenhas (NP) para não gestantes aos 18 meses, com número amostral de 30 e 25, respectivamente. O procedimento de controle de qualidade dos genótipos e teste de associação foram realizados por meio de uso de *scripts* customizados utilizando a biblioteca GenABEL v.1.8-0 do pacote estatístico R v.3.1.0. Não houve associação dos marcadores com a característica em estudo, entretanto, o SNP rs110169757 localizado no cromossomo bovino 2 (BTA2) foi considerado o mais próximo a correlação com o fenótipo de IPP, sendo explorada a região genômica ao redor deste polimorfismo. Na região de 500 Kb para cada lado da posição do SNP foram encontrados 19 *loci* de características quantitativas (QTL)

anteriormente descritos na literatura, sendo três destes relacionados com fenótipos reprodutivos. Os resultados apresentados apontam que o uso da ferramenta genômica foi eficiente na avaliação e análise de milhares de SNP presentes no DNA de novilhas Nelore com fenótipo de idade ao primeiro parto, obtendo alta densidade de genótipos acurados. Sendo possível a verificação regiões de QTLs relacionados a características reprodutivas.

Palavras-chave: *Bos indicus*, Idade ao primeiro parto, SNP

INTRODUÇÃO

As raças zebuínas são extensivamente utilizadas nacionalmente, chegando a representar cerca de 80% do rebanho de corte, desta população 90% são animais da raça Nelore. Os principais fatores para esta preferência se deve às suas características adaptativas as condições climáticas do Brasil, maior capacidade de aproveitamento de alimento e resistência a parasitas (ACNB, 2014). Porém, para se consolidar no cenário do comércio mundial e atender ao mercado consumidor constantemente ascendente e cada vez mais exigente, é necessário o desenvolvimento de tecnologias que possibilitem melhorar o aproveitamento dos rebanhos, pois as áreas produtivas são limitadas. (ABIEC, 2014).

Os aspectos reprodutivos interferem diretamente na lucratividade do rebanho na pecuária de corte. Devido a esse fato, pesquisas relacionadas à área de biotecnologia animal que possibilitem investigar tecnologias que permitam identificar no rebanho indivíduos com maior eficiência reprodutiva são de grande interesse econômico (VAICIUNAS, 2008).

A puberdade é definida como o período transitório entra a fase pós-natal e a fase adulta, durante o qual a maturidade do sistema reprodutivo é atingida, capacitando uma fêmea para gerar descendentes (TERASAWA e FERNANDEZ, 2001). As fêmeas zebuínas são mais adaptadas ao clima tropical e resistentes a parasitas, entretanto apresentam um retardo para atingirem a puberdade, em média de 6 a 12 meses, quando comparadas às fêmeas taurinas, característica que traz prejuízos ao produtor (WILTBANK et al., 1969; DOBSON et al., 1986; PIRLO, 2000).

A idade ao primeiro parto (IPP) é um parâmetro que marca o ingresso da novilha no sistema produtivo de gado de corte, fenótipo facilmente coletável. A redução na IPP leva a maior eficiência produtiva, pois resulta em animais com melhor desempenho reprodutivo (PIRLO et al., 2000; VALLE et al., 2000; SASAKI et al., 2013)

Estudos relacionados à identificação de genes ligados a fenótipos de interesse econômico obtiveram grandes avanços com o desenvolvimento de painéis de SNP de alta densidade, de modo que, a genotipagem feita por esta ferramenta analisa dezenas de milhares simultaneamente (BOVINE HAPMAP CONSORTIUM, 2009; MATUKUMALLI et al., 2009).

Os painéis de alta densidade podem ser utilizados para estudo de associação genômica amplas ou GWAS (do inglês, *Genome Wide Association Study*) ou para seleção genômica ampla ou GWS (do inglês, *Genome Wide Selection*). A GWS pode proporcionar ao produtor a seleção precoce direta de animais com genótipo superior para produção, pois atua em genes que serão expressos na fase adulta, genes estes muitas vezes para uma característica quantitativa. O GWAS permite identificar polimorfismos que possam estar associados com característica fenotípica de interesse comercial (HIRSCHHORN e DALY, 2005; RESENDE et al., 2010)

Atualmente, características mensuráveis diretamente nas fêmeas tem ganhado atenção, pois estas influenciam o sistema pecuário de corte (SANTANA et al., 2012). Assim a redução da idade ao primeiro parto objetivando maior produtividade é uma das grandes preocupações de pesquisadores e produtores (NOGUEIRA, 2004). No entanto, a estimativa de herdabilidade para IPP são de baixas a moderadas, variando entre 0,09 a 0,19 (PEREIRA et al., 2001; PEREIRA et al., 2002; DIAS et al., 2004).

Em décadas anteriores, os marcadores microssatélite foram intensamente utilizados na prospecção de *loci* de características quantitativas, denominados QTLs (do inglês, *Quantitative Trait Locus*) em bovinos, resultando na identificação de diversos QTLs ao longo do genoma bovino. Atualmente existem 8,305 QTLs identificados para características de interesse econômico para gado de corte e leite (CATTLEQTLDB, 2014). Neste contexto, o GWAS tem demonstrado resultados satisfatórios na averiguação de bases genéticas dos processos reprodutivos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a utilização de uma ferramenta genômica para associação de polimorfismo de nucleotídeo de sítio único distribuídos no genoma bovino com a característica reprodutiva de IPP em vacas Nelore.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais e dados fenotípicos

O grupo amostral foi composto por 55 fêmeas da raça Nelore, nascidas entre os anos de 1996 e 2004. Esses animais foram selecionados dentre todo o rebanho comercial de fêmeas ativas da propriedade São Jorge do Maracay (Iguatemi – MS), tendo como critério de seleção a presença dos dados de Idade ao Primeiro Parto (IPP) e paternidade conhecida. A fazenda adota manejo alimentar exclusivamente a pasto.

No período de 1995 a 2004, foi estabelecida na propriedade uma estação de acasalamento de novilhas denominada “estação de desafio”, ocorrendo independente do peso e condição corporal do animal. As fêmeas avaliadas foram desafiadas aproximadamente aos 18 meses de idade e as “estações de desafio” aconteceram entre os meses de janeiro e fevereiro com duração de 45 dias. As novilhas foram expostas às mesmas condições de manejo e em monta natural com um grupo de touros jovens, na proporção de um reprodutor para 25 matrizes.

Os 55 indivíduos foram separados em dois agrupamentos, denominados de Grupo de Prenhas (P) para novilhas com prenhez confirmada aos 18 meses, e Grupo de Não Prenhas (NP) para não gestantes aos 18 meses, com número amostral de 30 e 25, respectivamente. Dessa forma, a característica analisada foi característica binária, onde os grupos P e NP assumiram os valores de 1 e 0, respectivamente.

A estatística descritiva para a característica de Idade ao Primeiro Parto dos grupos P e NP pode ser visualizada na Tabela 1.

Tabela 1. Estatística descritiva da idade ao primeiro parto (IPP) em meses para os grupos de prenhas (P) e não prenhas (NP) e o total.

Grupo	N	Média	Desvio-padrão	Mediana	Min.	Máx.
P	35	26.85	0.93	26.84	24.11	28.55
NP	20	33.27	0.69	33.61	31.90	33.94
Total	55	29.19	3.22	27.5	24.11	33.94

Colheita de sangue e extração de DNA

O DNA de cada animal foi extraído por meio da utilização de kit comercial (DNeasy Blood & Tissue Kit, QIAGEN, Espanha) a partir do sangue periférico. O material genético foi avaliado quanto à qualidade e concentração por meio de espectrofotometria de micro-volume (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific Inc., EUA).

Dados genotípicos

Os animais foram genotipados no painel de alta densidade BovineHD Genotyping BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA), que contém sondas para interrogar mais de 777.000 SNP com intervalo médio de 3.4 e mediana de 2.68 kb (kilobase, 1kb = 1,000 pares de bases) entre marcadores. O procedimento de genotipagem e análise de SNP foram realizados em laboratório comercial, seguindo o protocolo preconizado pelo fabricante (ILLUMINA, 2014).

O agrupamento e a determinação dos genótipos foram realizados no *software* GenomeStudio v2011.1 (Illumina Inc., EUA). Neste estudo os genótipos com sucesso foram determinados pelo “*GenCall score*” (GCScore) > 0.7, exportados como arquivo de texto e importados para o pacote estatístico R (versão 3.0.2), utilizando-se de arquivos do programa Plink. As análises de QC e teste de associação foram realizadas utilizando funções customizadas em R (versão 3.1.0) e biblioteca GenABEL (versão 1.8-0) (AULCHENKO et al., 2007; PURCELL et al., 2007; AULCHENKO et al., 2011). As coordenadas dos SNP no ensaio foram baseadas na versão de montagem do genoma *Bos taurus* UMD 3.1 (acesso GenBank DAAA000000000.2).

Antes das análises de associação os dados genômicos foram submetidos a um controle de qualidade (QC) inicial, onde os critérios de exclusão de marcadores foram: não mapeados, mapeados para a mesma coordenada genômica e não autossômicos, ou seja, os SNP presentes nos cromossomos X, Y e DNA mitocondrial. Em seguida foi realizada a análise de IBS (do inglês, *Identity By State*) para avaliação de amostras possivelmente duplicadas, onde é calculada a proporção de alelos compartilhados por estado entre os indivíduos, assim amostras com IBS > 95% foram removidas.

Com a intenção de excluir marcadores e amostras potencialmente problemáticos, foram removidos os SNP levando em consideração os seguintes critérios: 1) MAF (do inglês, *Minor Allele Frequency*), marcadores com frequência alélica menor ou igual a 2%; 2) HWE

(do inglês, *Hardy Weinberg Equilibrium*), SNP com valor $P < 10^{-5}$ para o Teste Exato de Fisher (ou seja, com desvios extremos do HWE, sugerindo potencial erro de genotipagem); 3) “*Call rate*” (CR_{SNP}), polimorfismo que não se encontra ao menos em 98% da população. Após a verificação dos SNP foi realizado os QC por indivíduo, “*Call rate*” (CR_{IND}), onde amostras com menos de 90% de genótipos determinados foram desconsideradas.

O procedimento de controle de qualidade dos genótipos foi realizado por meio de uso de *scripts* customizados e da biblioteca GenABEL (AULCHENKO et al., 2007) do pacote estatístico R.

Teste de associação

A função “*qtscore*” da biblioteca GenABEL foi utilizada no teste de escore para associação entre a característica e o polimorfismo genético. Resíduos foram estimados após o ajustamento para covariáveis (grupo de contemporâneos (GC) (ano e trimestre de nascimento) e paternidade). Neste caso, os efeitos foram aproximados aos *Odds Ratios* (ORs) esperados em um modelo de regressão logística.

O cálculo do fator de inflação λ foi estimado para verificar a confiabilidade dos resultados. Valores de λ acima de 1.1 sugerem uma inflação generalizada no modelo. Com propósito de controle suplementar, foi plotado um gráfico quantil-quantil (Q-Q) para verificar o ajuste dos valores de P para uma distribuição Qui-quadrado.

Os resultados foram apresentados na forma de “Manhattan plot” com o co-logaritmo dos valores de P , fazendo uso de Bonferroni, o qual é um método para correção de testes múltiplos, onde α é definido por $0,05/N$, sendo N o número de marcadores testados (BENJAMIN e HOCHBERG, 1995) e, com intuito de explorar SNP possivelmente associáveis, foi estabelecida a linha de significância ($-\log_{10}(P) = 5$).

Exploração dos SNP significativos

Para a verificação da região genômica para o SNP mais significativo, foi explorada uma janela de 500 Kb (kilobase) de cada lado do marcador usando a ferramenta *BioMart* (KINSELLA et al., 2011) do banco de dados Ensembl, com base no assembly UMD v3.1. O banco de dados *Cattle QTLdb* (HU et al., 2013) foi utilizado para examinar se o SNP mais significativo se encontrava dentro de regiões de QTLs de espécie bovina já catalogado na literatura e genes mais próximos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Controle de Qualidade

De um montante inicial de 786,798 SNP, 43,889 (5.5%) não eram marcadores autossômicos. Cinquenta e quatro marcadores autossômicos (0.01%) apresentaram as mesmas coordenadas genômicas e foram excluídos. A análise de IBS não detectou nenhuma amostra possivelmente duplicada. Um total de 203,561 (28.8%) SNP foram excluídos por apresentarem $MAF < 2\%$. O número de marcadores removidos por $CR_{SNP} < 98\%$ e teste exato de Fisher P -value para HWE $< 10^{-5}$ foi 44,418 (6.3%) e 772 (0.1%) respectivamente. O CR_{IND} por indivíduo não removeu nenhum animal. Ao fim do QC o grupo amostral foi de 55 animais e 464,005 marcadores.

O número amostral, espécie e painel de genotipagem são fatos considerados importantes na escolha do critério de “*Call rate*” a serem aplicados no estudo. Jiang et al. (2013) adotaram um CR_{IND} rigoroso (99.9%) com grupo amostral constituído de 96 animais da raça Holstein, que nesse caso, apresenta grande quantidade de marcadores polimórficos no painel (BovineHD Genotyping BeadChip), quando comparado à raça Nelore. Em outro estudo utilizando animais da raça Japanese Black, o CR_{IND} usado foi de 95%, um valor mais flexível considerando o número 1156 de indivíduos, entretanto o SNP-chip em questão apresentava 54,001 marcadores (BovineSNP50 BeadChip) (NISHIMURA et al., 2012). Assim o uso de CR_{IND} de 90%, se deve ao fato do presente estudo apresentar um grupo amostral de 55 animais e estes serem zebuínos.

Utsunomiya et al. (2013) em estudo com bovinos Nelore utilizando painel de alta densidade (777,961 marcadores) usando os mesmos parâmetros no QC obtiveram proporções de exclusão de SNP, não autossômicos e MAF similares ao presente trabalho, 5.5% e 30.4% respectivamente, sendo a MAF responsável pelo maior número de marcadores excluídos. Os parâmetros de CR_{SNP} (16.7%) e teste exato de Fisher P -value para HWE (1.8%) teve proporções distintas, possivelmente isto está relacionado com o número amostral maior (654 animais).

A Figura 1 mostra o número de SNP autossômicos antes e após o QC, onde houve redução de 37.5% da quantidade de marcadores. Esse resultado corrobora com o trabalho de Utsunomiya et al (2013), que utilizou o painel de genotipagem BovineHD Genotyping BeadChip (777,961 SNP) em Nelore e obteve uma exclusão de marcadores por volta de

40.9%. Entretanto, o mesmo painel aplicado em bovinos da raça Holstein foi possível obter melhor aproveitamento de SNP, com taxa de remoção por volta de 30.7% (SHIN et al., 2013), isto devido as sondas desta ferramenta serem construídas predominantemente com base no genoma de animais taurinos (452 indivíduos) quando comparado aos zebuínos (104), acarretando assim na existência de grande quantidade de polimorfismo monomórficos para zebuínos (ILLUMINA, 2012).

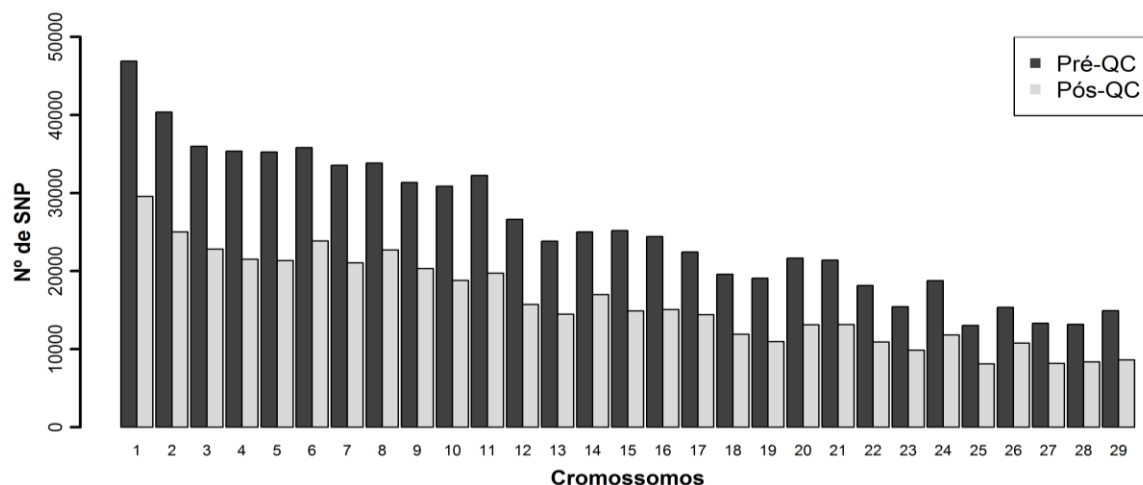


Figura 1. Representação do número de marcadores por cromossomo antes e depois da realização do controle de qualidade dos dados genotípicos.

As distribuições das MAFs dos marcadores pré e pós-controle de qualidade podem ser observadas na Figura 2, onde os marcadores remanescentes apresentam MAF superior a 2%.

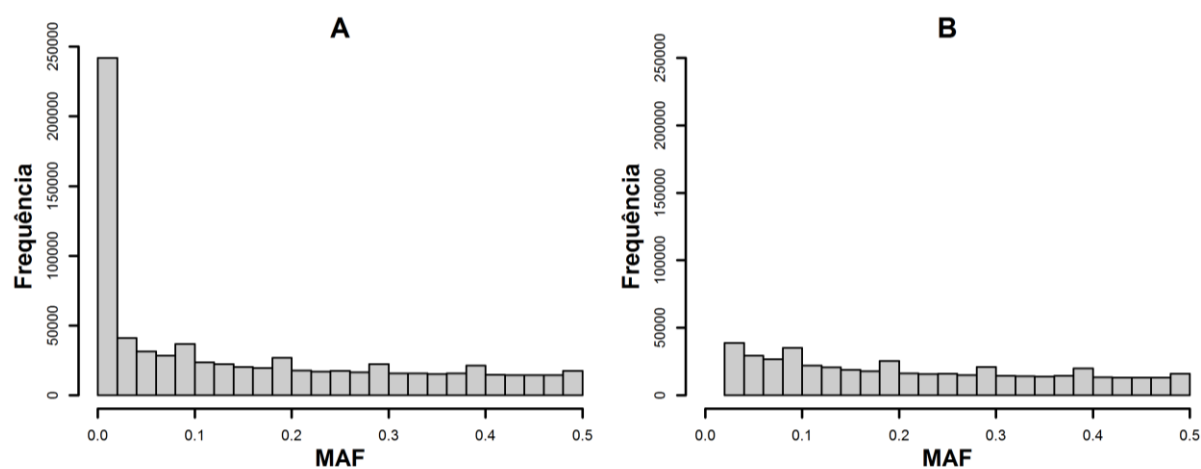


Figura 2. Distribuição da frequência do menor alelo (MAF) dos marcadores antes (A) e após (B) o controle de qualidade.

Em estudos com bovinos os valores usando para a MAF variam de 1% a 10% (NISHIMURA et al., 2012; SHIN et al., 2013; UTSUNOMIYA et al., 2014), de maneira que o critério de MAF é mais rigoroso quando este percentual for maior, o que acarreta em elevadas reduções no número de marcadores nas análises. Conforme Anderson et al. (2010), os valores de MAF em trabalhos com humanos costumam variar de 1% a 2%, indicando que o presente estudo está de acordo com pesquisas anteriores. Marcadores com MAF inferior a 1% são raros na população e não apresenta poder estatístico, de modo que a exclusão destes do grupo de dados é recomendada (TURNER et al., 2011).

A distribuição da heteroziguidade dos SNP apresentou médias de 22% e 31%, para antes e depois do controle de qualidade, respectivamente. A distribuição da heteroziguidade dos marcadores pode ser observada na Figura 3.

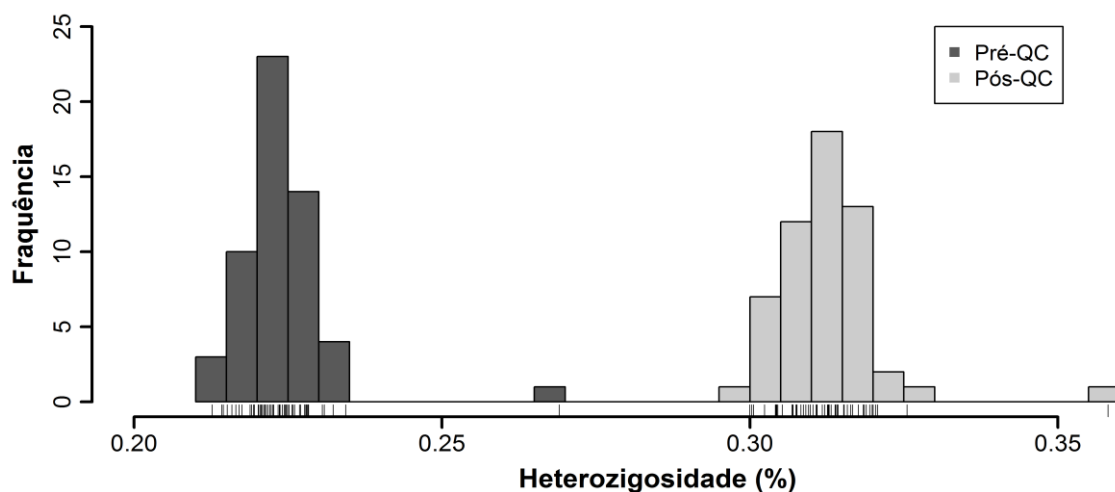


Figura 3. Comparativo da distribuição da heteroziguidade dos marcadores moleculares na população, anterior e posterior ao controle de qualidade (QC).

O aumento médio de 41% da distribuição da heteroziguidade após o controle de qualidade se explica devido ao grande número de marcadores homozigotos removidos no critério de MAF. A heteroziguidade é um fator de importância na obtenção da informação genética, pois na associação de polimorfismos com características fenotípicas ocorre a avaliação dos efeitos dos diferentes alelos, de modo que, a baixa frequência de um dos alelos não traz informação suficiente para inferir quaisquer correlações (BOTSTEIN et al., 1980).

Teste de associação

Sob a hipótese nula da inexistência de associação para qualquer *locus* SNP, assim espera-se que os pontos se distribuam sobre a linha de tendência central que relaciona os valores esperados e observados. A ocorrência de desvios nesta linha indicam *loci* que contrastam com a hipótese nula (associação significativa), sendo que um grande número é indicativo de inflação no teste estatístico devido à existência de algum viés nos dados (MATOS, 2012).

O gráfico quantil-quantil (Q-Q) (Figura 4) mostrou que o teste estatístico utilizado foi aceitável ($\lambda = 1.002578$). Mesmo com valor de λ ótimo se pode observar uma suave deflação na distribuição dos pontos após o centro do gráfico, possivelmente devido ao número de indivíduos reduzido.

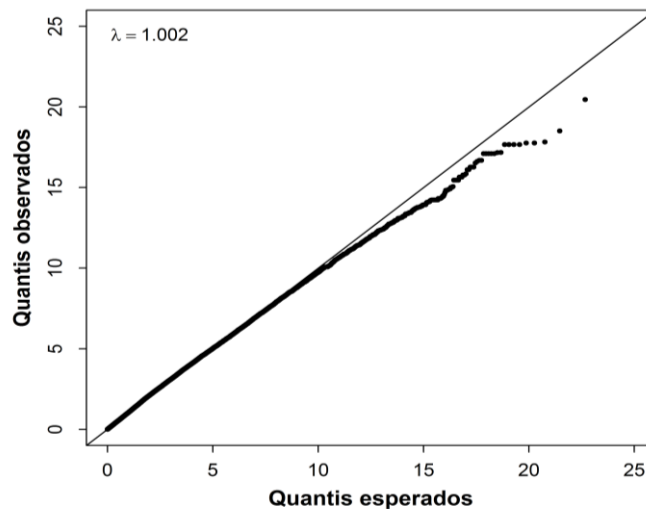


Figura 4. Gráfico quantil-quantil dos resultados do GWAS para IPP. Onde a linha preta representa a distribuição esperada e os pontos pretos à distribuição observada da estatística Qui-quadrado (χ^2).

A associação dos polimorfismos com a característica de IPP partiu do pressuposto de um modelo de herança aditiva, ou seja, que o valor fenotípico dependia da quantidade de réplicas do alelo menor. Desta forma, no GWAS realizado os SNP testados não conseguiram atingir o limiar de significância pela correção de Bonferroni. Entretanto, o SNP rs110169757 foi considerado o mais significativo e possivelmente correlacionado com o fenótipo de IPP, este se localiza no cromossomo autossômico bovino 2 (BTA2: 6151365) em região intergênica e se apresentou acima da linha de associação sugestiva (Figura 5).

Nos resultados do GWAS demonstrados na forma de Manhattan plot se pode observar a formação de picos difusos distribuídos nos diferentes cromossomos, remetendo que diversas regiões genômicas apresentaram algum tipo de relação com a característica em estudo. De fato, muitas das características reprodutivas têm padrão de herança poligênica, assim sendo, o fenótipo influenciado por múltiplos genes (MATOS, 2012).

Em estudo de associação genômica ampla, a interpretação dos resultados apresentam uma dificuldade fundamental conhecida como testes múltiplos, de modo que pesquisadores usam metodologias corretivas, por exemplo, o ajuste de Bonferroni, definindo, assim, um índice de significância (MOSKVINA e SCHIMIDT, 2008; FROMMLET et al., 2012). Este problema com múltiplos teste se intensificam, principalmente, quando a quantidade de marcadores aumenta e a população é reduzida (FINLAY et al., 2012). Neste contexto, é possível que neste estudo o método de correção tenha sido muito restritivo, assim para evitar que associações em potencial fossem eliminadas, assumimos um limiar de $P = 10^{-5}$ para investigação.

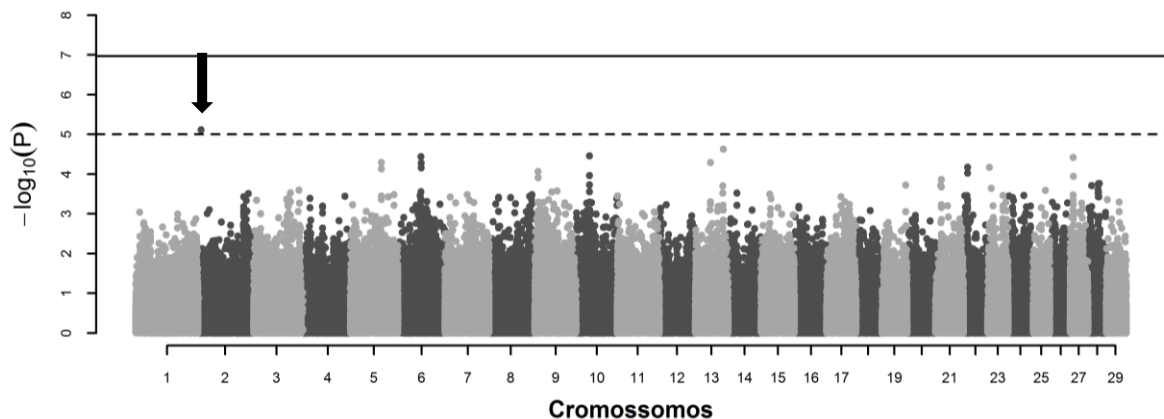


Figura 5. Manhattan plot dos resultados de associação genômica para idade ao primeiro parto, onde a linha tracejada é a linha de associação sugestiva ($\alpha = 10^{-5}$) e a linha contínua representa a correção ao ajustamento de Bonferroni ($\alpha = 1.07 \times 10^{-7}$).

Estudos do tipo GWAS na espécie humana costumam apresentar número de indivíduos acima de 10,000, contrastando com a realidade ocorrente nos trabalhos com espécies domésticas (SUN, 2012). Partindo deste fato, pode-se sugerir que o grupo amostral analisado deste trabalho foi um fator limitante para obtenção de associações fortemente significativas.

A região de 500 Kb para ambos os lados da localização do polimorfismo (rs110169757) com base no alinhamento UMD v3.1 utilizando a ferramenta *BioMart* do

Ensembl pode ser visualizada na Figura 6 e a lista com os 11 genes encontrados nesta mesma área na Tabela 2.

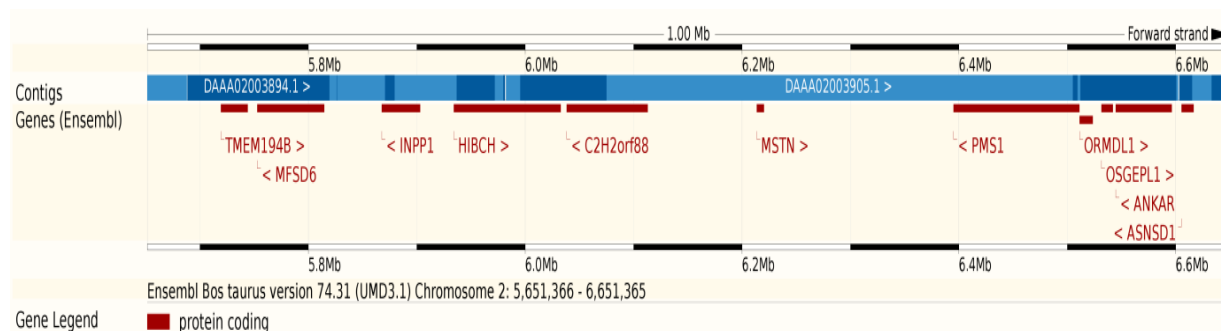


Figura 6. Imagem da região correspondente a 1 Mb em volta do SNP rs110169757. Em azul são representados os *contigs* do alinhamento UMD v3.1 e as barras vermelhas representam as regiões codificantes referentes aos genes.

Dentre os genes investigados houve evidências relacionando às características de desenvolvimento muscular, crescimento corporal, comportamental, reparação e manutenção do genoma nuclear (BARKER et al 1995; BERGER et al.,2012; JIMÉREZ et al., 2013; SINGH et al., 2014). Entretanto não foi encontrada correlação direta com fenótipo de idade ao primeiro parto.

Na análise do banco de QTLs em uma janela de 1 Mb ao redor do marcador mais sugestivo, localizou-se a presença de 19 QTLs (Tabela 3) relacionados com características de produção, carne e carcaça, leite e reprodução em diferentes raças, sendo três QTLs ligados a esta última. A região do BTA2 apontada neste estudo foi associada anteriormente com fenótipo reprodutivo, sendo o intervalo para o primeiro estro pós-parto relacionado à fertilidade da matriz e, fixação do úbere e *strenght*, correlacionados com as condições corporais de suporte a maternidade (DAWUDA et al, 1988; ASHWELL et al, 2005; SCHULMAN et al, 2008).

A compreensão da interação dos genes na influencia de um fenótipo é um enorme desafio, que muitas vezes é prejudicada por confundidores de origem ambiental sobre o fenótipo. Entretanto, as informações geradas neste estudo procurou estabelecer conexões funcionais do genótipo com o fenótipo de IPP, promovendo a investigação de processos biológicos que poderão contribuir em pesquisas posteriores destinadas à validação de genes candidatos e entendimento de mecanismos de interação gênica.

Tabela 2. Lista dos genes presentes em uma janela de 1 Mb ao redor do marcador rs110169757.

Gene	Ensembl ID	BTA 2 coordenada	Distância do SNP (kb)	Tamanho do gene (pb)	Descrição
C2H2orf88	ENSBTAG00000026994	6038403:6113008	38.3	580	<i>Bos taurus</i> small membrane A-kinase anchor protein
MSTN	ENSBTAG00000011808	6213566:6220196	62.2	2,768	<i>Bos taurus</i> myostatin
HIBCH	ENSBTAG00000007787	5934156:6032782	118.5	1,390	3-hydroxyisobutyryl-CoA hydrolase
PMS1	ENSBTAG00000018795	6395005:6511175	243.6	3,088	Postmeiotic segregation increased 1
INPP1	ENSBTAG00000007584	5867812:5903148	248.2	1,556	<i>Bos taurus</i> inositol polyphosphate-1-phosphatase
MFSD6	ENSBTAG00000007719	5752911:5814559	336.8	2,939	Major facilitator superfamily domain containing 6
ORMDL1	ENSBTAG00000012561	6511310:6523389	359.9	1,990	<i>Bos taurus</i> ORM1-like 1
OSGEPL1	ENSBTAG00000012557	6531525:6542021	380.1	1,394	<i>Bos taurus</i> O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1
ANKAR	ENSBTAG00000012554	6544589:6596238	383.2	4,302/4,329	Ankyrin and armadillo repeat containing
TMEM194B	ENSBTAG00000015678	5719428:5744015	407.3	1,634	Transmembrane protein 194B
ASNSD1	ENSBTAG00000000492	6605444:6616484	453.0	2,384	Asparagine synthetase domain containing 1

Tabela 3. QTLs do banco de dados *Cattle QTLdb* encontrados em uma janela de 1Mb nas proximidades do SNP rs110169757.

Característica	Grupo	BTA 2 coordenada	QTLdb ID	PubMed ID
<i>Strength</i>	Reprodução	5897389:10937591	1554	16230715
Fixação do úbere	Reprodução	5897389:7763197	1551	16230715
Intervalo para o primeiro estro pós-parto	Reprodução	6063867:6283723	5028	18298935
Produção de gordura no leite	Leite	5897389:32464114	1675	16167984
Percentual de proteína no leite	Leite	2134354:75456158	3531	14762091
Peso corporal (desmame)	Produção	6063867:6283723	15718	22303340
Largura da articulação do quadril	Produção	5897389:7763197	1555	16230715
Peso corporal (nascimento)	Produção	5897389:9662643	2751	9498354
Rendimento do produto no mercado	Produção	5897389:9662643	2752	9498354
Percentual de gordura	Carne e carcaça	6011260:6231116	6297	19422365
Teor de ácido linoleico conjugado	Carne e carcaça	5897389:9662643	4855	17894565
Área de olho de lombo	Carne e carcaça	5897389:9662643	2753	9498354
Grau de rendimento	Carne e carcaça	5897389:9662643	2754	9498354
Marmoreio	Carne e carcaça	5897389:9662643	2755	9498354
Espessura de gordura na 12 ^a costela	Carne e carcaça	5897389:9662643	2756	9498354
Percentual de gordura nos rins, pélvica e coração	Carne e carcaça	5897389:9662643	2757	9498354
Relação de ácido oleico/esteárico	Carne e carcaça	5897389:9662643	4862	17894565
Teor de ácidos graxos monoinsaturados	Carne e carcaça	5897389:9662643	4859	17894565
Área de olho de lombo	Carne e carcaça	2134354:9695621	4492	17596127

CONCLUSÃO

Os resultados apresentados apontam que o uso da ferramenta genômica foi eficiente na avaliação e análise de milhares de SNP presentes no DNA de novilhas Nelore com fenótipo de idade ao primeiro parto, obtendo alta densidade de genótipos acurados. Sendo possível a verificação regiões de QTLs relacionados a características reprodutivas. O tamanho amostral possivelmente foi um fator limitante para encontrar associação entre SNP e característica de IPP. Assim estudos aprofundados e com número amostral mais expressivo se fazem necessários.

AGRADECIMENTOS

À FUNDECT - Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul, ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico pelo apoio financeiro e bolsa de iniciação científica concedida e à UFGD pelo apoio logístico.

REFERÊNCIAS

- ABIEC. Associação Brasileira de Indústrias Exportadoras de Carne. São Paulo, SP, 2014. Disponível em: < <http://www.abiec.com.br> >. Acesso em: 25 Jan. 2014.
- ACNB. Associação de Criadores de Nelore do Brasil. São Paulo, SP, 2014. Disponível em: < <http://www.nelore.org.br/> >. Acesso em: 25 Jan. 2014.
- ANDERSON, C. A.; PETTERSSON, F. H.; CLARKE, G. M. et al. Data quality control in genetic case-control association studies. **Nat Protoc**, v. 5, n. 9, p. 1564-73, 2010.
- ASHWELL, M. S.; HEYEN, D. W.; WELLER, J. I. et al. Detection of quantitative trait loci influencing conformation traits and calving ease in Holstein-Friesian cattle. **J Dairy Sci**, v. 88, n. 11, p. 4111-9, 2005.
- AULCHENKO, Y. S. Abel Tutorial. p. 243, 2011.
- AULCHENKO, Y. S.; DE KONING, D. J.; HALEY, C. Genomewide rapid association using mixed model and regression: a fast and simple method for genomewide pedigree-based quantitative trait loci association analysis. **Genetics**, v. 177, n. 1, p. 577-85, 2007.
- BAKER, S. M.; BRONNER, C. E.; ZHANG, L. et al. Male mice defective in the DNA mismatch repair gene PMS2 exhibit abnormal chromosome synapsis in meiosis. **Cell**, v. 82, n. 2, p. 309-19, 1995.

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)**, p. 289-300, 1995.

BERGER, J. H.; CHARRON, M. J.; SILVER, D. L. Major facilitator superfamily domain-containing protein 2a (MFSD2A) has roles in body growth, motor function, and lipid metabolism. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e50629, 2012.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.

BOVINE HAPMAP, C.; GIBBS, R. A.; TAYLOR, J. F. et al. Genome-wide survey of SNP variation uncovers the genetic structure of cattle breeds. **Science**, v. 324, n. 5926, p. 528-32, 2009.

CATTLEQTLDB. Release 22. 28 Dec. 2013 2013. Disponível em: <<http://www.animalgenome.org/cgi-bin/QTLdb/BT/index>>. Acesso em: 14 Fev. 2014.

DAWUDA, P. M.; EDUVIE, L. O.; ESIEVO, K. A.; MOLOKWU, E. C. Interval between calving and first observable oestrus in post-partum Bunaji cows. **Br Vet J**, v. 144, n. 3, p. 258-61, 1988.

DIAS, L. T.; EL FARO, L.; ALBUQUERQUE, L. G. D. Estimativas de herdabilidade para idade ao primeiro parto de novilhas da raça Nelore. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 33, n. 1, p. 97-102, 2004.

DO VALLE, E. R.; ANDREOTTI, R.; THIAGO, L. R. L. D. S. **Técnicas de manejo reprodutivo em bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2000.

DOBSON, H.; KAMONPATANA, M. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. **J Reprod Fertil**, v. 77, n. 1, p. 1-36, 1986.

FINLAY, E. K.; BERRY, D. P.; WICKHAM, B. et al. A genome wide association scan of bovine tuberculosis susceptibility in Holstein-Friesian dairy cattle. **PLoS One**, v. 7, n. 2, p. e30545, 2012.

FROMMLET, F.; RUHALTINGER, F.; TWARÓG, P.; BOGDAN, M. Modified versions of Bayesian Information Criterion for genome-wide association studies. **Computational Statistics & Data Analysis**, v. 56, n. 5, p. 1038-1051, 2012.

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

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 Res**, v. 41, p. 871-9, 2013.

ILLUMINA. BovineHD Genotyping BeadChip. San Diego, CA, 2012. Disponível em: < www.illumina.com >. Acesso em: 26 Jan. 2014.

ILLUMINA. San Diego, CA, 2014. Disponível em: < <http://www.illumina.com/> >. Acesso em: 26 Jan. 2014.

JIANG, L.; JIANG, J.; YANG, J. et al. Genome-wide detection of copy number variations using high-density SNP genotyping platforms in Holsteins. **BMC Genomics**, v. 14, p. 131, 2013.

JIMÉNEZ, E.; ARIAS, B.; MITJANS, M. et al. Genetic variability at IMPA2, INPP1 and GSK3 β increases the risk of suicidal behavior in bipolar patients. **European Neuropsychopharmacology**, v. 23, n. 11, p. 1452-1462, 2013.

KINSELLA, R. J.; KAHARI, A.; HAIDER, S. et al. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. **Database (Oxford)**, v. 2011, p. 30, 2011.

MATOS, M. C. **Associação genômica ampla para características reprodutivas em bovinos da raça nelore**. 2012. 105 (Doutorado). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Joticabal.

MATUKUMALLI, L. K.; LAWLEY, C. T.; SCHNABEL, R. D. et al. Development and characterization of a high density SNP genotyping assay for cattle. **PloS One**, v. 4, n. 4, p. 5350, 2009.

MOSKVINA, V.; SCHMIDT, K. M. On multiple-testing correction in genome-wide association studies. **Genet Epidemiol**, v. 32, n. 6, p. 567-73, 2008.

NISHIMURA, S.; WATANABE, T.; MIZOSHITA, K. et al. Genome-wide association study identified three major QTL for carcass weight including the PLAG1-CHCHD7 QTN for stature in Japanese Black cattle. **BMC Genet**, v. 13, p. 40, 2012.

NOGUEIRA, G. P. Puberty in South American *Bos indicus* (Zebu) cattle. **Anim Reprod Sci**, v. 82-83, p. 361-72, Jul 2004.

PEREIRA, E.; ELER, J. P.; FERRAZ, J. B. S. Análise genética de características reprodutivas na raça Nelore. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 5, p. 703-708, 2002.

PEREIRA, E.; ELER, J.; COSTA, F.; FERRAZ, J. Análise genética da idade ao primeiro parto e do perímetro escrotal em bovinos da raça Nelore. **Arq. bras. med. vet. zootec**, v. 53, n. 1, p. 116-21, 2001.

PIRLO, G.; MIGLIOR, F.; SPERONI, M. Effect of age at first calving on production traits and on difference between milk yield returns and rearing costs in Italian Holsteins. **J Dairy Sci**, v. 83, n. 3, p. 603-8, 2000.

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

RESENDE, M. D. V. D.; AGUIAR, A. M.; ABAD, J. I. M. et al. Computação da seleção genômica ampla (GWS). 2010.

SANTANA, M.; ELER, J.; FERRAZ, J.; MATTOS, E. Genetic relationship between growth and reproductive traits in Nelore cattle. **animal**, v. 6, n. 04, p. 565-570, 2012.

SASAKI, S.; IBI, T.; IKEDA, S.; SUGIMOTO, Y. A genome-wide association study reveals a quantitative trait locus for age at first calving in delta/notch-like EGF repeat containing on chromosome 2 in Japanese Black cattle. **Anim Genet**, p. 1-3, 2013.

SCHULMAN, N. F.; SAHANA, G.; LUND, M. S. et al. Quantitative trait loci for fertility traits in Finnish Ayrshire cattle. **Genet Sel Evol**, v. 40, n. 2, p. 195-214, 2008.

SHIN, D.-H.; CHO, K.-H.; PARK, K.-D. et al. Accurate Estimation of Effective Population Size in the Korean Dairy Cattle Based on Linkage Disequilibrium Corrected by Genomic Relationship Matrix. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences (AJAS)**, v. 26, n. 12, p. 1672-1679, 2013.

SINGH, S. P.; KUMAR, R.; KUMARI, P. et al. Characterization of 5' upstream region and investigation of TTTTA deletion in 5' UTR of myostatin (MSTN) gene in Indian goat breeds. **Anim Biotechnol**, v. 25, n. 1, p. 55-68, 2014.

SUN, Y. V. Integration of biological networks and pathways with genetic association studies. **Hum Genet**, v. 131, n. 10, p. 1677-86, 2012.

TERASAWA, E.; FERNANDEZ, D. L. Neurobiological mechanisms of the onset of puberty in primates. **Endocr Rev**, v. 22, n. 1, p. 111-51, 2001.

TURNER, S.; ARMSTRONG, L. L.; BRADFORD, Y. et al. Quality control procedures for genome-wide association studies. **Curr Protoc Hum Genet**, v. Chapter 1, p. Unit1 19, 2011.

UTSUNOMIYA, Y. T.; CARMO, A. S.; NEVES, H. H. et al. Genome-wide mapping of Loci explaining variance in scrotal circumference in nellore cattle. **PLoS One**, v. 9, n. 2, p. e88561, 2014.

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

Vaiciunas, A.; Coutinho, L. L.; Meirelles, F. V. et al. Leptin and hypothalamic gene expression in early-and late-maturing *Bos indicus* Nellore heifers. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 657-664, 2008.

WILTBANK, J.; KASSON, C.; INGALLS, J. Puberty in crossbred and straightbred beef heifers on two levels of feed. **Journal of Animal Science**, v. 29, n. 4, p. 602-605, 1969.