UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA
DE ALIMENTOS

MIGUEL HENRIQUE DE ALMEIDA SANTANA

**Estudo genético e genômico da ingestão e eficiência alimentar em bovinos
da raça Nelore (*Bos indicus*)**

Pirassununga

2013

MIGUEL HENRIQUE DE ALMEIDA SANTANA

**Estudo genético e genômico da ingestão e eficiência alimentar em bovinos
da raça Nelore (*Bos indicus*)**

Tese apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo como parte
dos requisitos para obtenção do título de
doutor em Zootecnia.

Área de Concentração: Qualidade e
Produtividade Animal

Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman
Ferraz

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos
da Universidade de São Paulo

S232e Santana, Miguel Henrique de Almeida
 Estudo genético e genômico da ingestão e eficiência
 alimentar em bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) /
 Miguel Henrique de Almeida Santana. -- Pirassununga,
 2013.
 89 f.
 Tese (Doutorado) -- Faculdade de Zootecnia e
 Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.
 Departamento de Medicina Veterinária.
 Área de Concentração: Qualidade e Produtividade
 Animal.
 Orientador: Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz.

 1. Consumo alimentar residual 2. Ingestão 3. Ganho
 de peso 4. GWAS 5. SNPs. I. Título.

Aos meus amados pais, Ana D’Arc e José Humberto, eu agradeço pelo amor, exemplo, caráter, incentivo e compreensão incondicionais em todos os momentos da minha vida;

À minha querida irmã Amanda, vó “Tota”, vó Petuel (in memorian) e nosso exemplo de vida madrinha Caetana pelo suporte, orações e torcida em todos os caminhos trilhados;

À minha companheira, amada e amiga Patrícia, meu muito obrigado pelo amor, carinho, lealdade e dedicação sempre.

Dedico

Agradecimentos

Agradeço ao meu orientador, amigo e exemplo de profissional Prof. Dr. José Bento Sterman Ferraz pela oportunidade, orientação, amizade e por acreditar em mim e no meu trabalho;

Ao Dr. Rodrigo da Costa Gomes, Dr. Marina de Nadai Bonin e Prof. Dr. Heidge Fukumasu pela amizade, companheirismo, auxílio, incentivo e orientação em toda essa trajetória;

Aos professores Dr. Paulo Rossi Junior, Dr. Paulo Roberto Leme, Dr. Rodrigo de Almeida e Dr. Saulo da Luz e Silva pela orientação e incentivo desde o início da minha vida acadêmica;

Aos meus queridos entes e suas respectivas famílias: Tio Darinho (*in memorian*); Tio Miguel e Bozóz; Tia Dalila; Tio Gil; Tia Denise; Tia Sandra; Tio Carlos; Tia Zezé (*in memorian*); Tio Roberto; Tio Fernando e Tio Humberto;

Agradeço aos amigos que são como família: Matheus, Tarcísio e Shirlei; Caio e Otávio e família; João Campo e família; Edson, Chen, Diego, Luis, Nelson, Fabrizzio e Tiago Ramos;

Aos coautores e, acima disso, amigos Yuri Utsonomiya, Haroldo Neves, Diego Cucco, Gerson Oliveira, Pâmela Alexandre e Elisângela Mattos meus sinceros agradecimentos;

Ao Prof. Dr. José Fernando Garcia e sua equipe (Ludmilla, Adam, Gustavo Santiago, Solomon, Pier, Adriana e Rodrigo Alonso), por toda ajuda em nosso trabalho e pelos ensinamentos;

Ao Prof. Dr. Luiz Lehmann Coutinho e Ricardo Augusto Brassaloti pela ajuda e parceria nas genotipagens e na interpretação dos resultados das mesmas;

Aos professores Dr. Joanir Pereira Eler, Dr. Flávio Vieira Meirelles, Dr. Ricardo de Francisco Strefezzi, Dr. André Furugen Andrade, Dr. Luciano Andrade Silva, Dr. Arlindo Saran Netto, Dr. Luis Felipe Prada e Silva, Dra. Trícia Maria Oliveira, Dr. Adriano Carregaro, Dra. Rachel

Bueno, Dr. Francisco Palma Rennó, Dr. Fernando Sebastian Baldi Rey e Dr. Julio César de Carvalho Balieiro por todos os anos de convivência e amizade durante meu doutorado;

Ao Sr. Josoel, Dona Letícia, Geraldo, Maneco e restante da família que me adotou tão bem em seus lares;

Aos amigos da USP: Pedro Ratto, Tiago de Bem, Ismael, Kazu, Paulinho, Amoracyr, Tiago Stella, Pedro (Tripa), Ricardinho, Joãozinho, Johnny, Paulo Fantinato, Pedro Ribeiro, Camila, Gil Ozawa, Juliana Martinez, Lais, Yonara, Nara, Leandro Lunardini, Mirtão, Fabiana Martini, Simone, Paula Rummy, Viviane Lima, Gabrielle, Arina, Alejandro e Mateus Maldonado;

À família GMAB: Adalfredo, Chico, Fernanda, Fernando Manicardi, Isabela, Jane, Mário, Minos, Mirele, Priscila, Roulber, Sancho, e Victor;

Aos meus técnicos e amigos Ricardo Bientinez, Fabiano Ribeiro e Roberley Leonaldo por toda a convivência, ensinamentos e por colaborar imensamente na minha formação pessoal;

Ao Eduardo Penteado Cardoso da Fazenda Mundo Novo e ao Luciano Borges e Thiago Garcia Lopes da Fazenda Rancho da Matinha pelo pioneirismo, e por acreditarem e contribuírem imensamente nesse trabalho;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela bolsa de doutorado e auxílio financeiro desse projeto de pesquisa e à CAPES pela bolsa de doutorado;

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo que deram todo o suporte para a realização deste estudo e por ser minha segunda casa nesse período.

“Na vida, o que aprendemos mesmo é a sempre fazer maiores perguntas”

João Guimarães Rosa

“Aprender é a única de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende”

Leonardo Da Vinci

“O limite do homem é o limite dos seus sonhos”

John F Kennedy

RESUMO

SANTANA, M.H.A. **Estudo genético e genômico da ingestão e eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*)**. 2013. 89 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar os parâmetros genéticos e correlações das medidas de ingestão e eficiência alimentar com desempenho e características de carcaça, além de realizar o estudo de associação de amplo genoma (GWAS) para ingestão de matéria seca (IMS), consumo alimentar residual (CAR) e ganho de peso (GMD) em bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Foram utilizados dados de 1.058 animais com fenótipo para IMS, taxa de conversão alimentar (CA), CAR, ganho de peso residual (GPR), consumo e ganho residuais (CGR), ganho de peso diário (GMD) e características de carcaça. Os parâmetros genéticos da IMS, CA, CAR, GPR e CGR e suas correlações com GMD e características de carcaça foram estimados utilizando abordagem bayesiana. Quatro marcadores do tipo *SNP* (*Single Nucleotide Polymorphism*), localizados em genes relacionados ao controle de apetite (*NPY* e *PDE3B*) e transporte iônico (*TRPM3* e *ITPR1*), foram associados com o desempenho, ingestão e medidas de eficiência alimentar. Adicionalmente, os animais foram genotipados em dois *chips* distintos (Illumina Bovine HD e Illumina BovineSNP50) e as informações genótípicas foram combinadas por meio de estudo de imputação. As centenas de milhares de *SNPs* foram utilizadas para o GWAS da IMS, CAR e GMD pelo teste de associação *GRAMMAR-Gamma*. A herdabilidade da IMS, CAR e CGR foi de 0,40, 0,38 e 0,54, respectivamente. Não foram encontradas associações nos *SNPs* localizados nos genes *TRPM3*, *NPY* e *ITPR1*, no entanto, o *SNP* no gene *PDE3B* foi associado significativamente ($P \leq 0,05$) com IMS, CAR e CGR. Os *SNPs* mais associados com a IMS e CAR, no GWAS, estão localizados nos cromossomos 4, 8, 14 e 21 em regiões genômicas relacionadas com transporte iônico e regulação da ingestão. O GWAS para o GMD apontou os cromossomos 3, 6 e 10 como os que continham os marcadores com maior associação. A ingestão e eficiência alimentar são passíveis de seleção genética, principalmente o CGR. O gene *PDE3B* deve ser melhor estudado pois, aparenta ter relação com esses fenótipos. Por fim, esse trabalho apontou regiões genômicas, por meio de associação de amplo genoma, relacionadas com a IMS, CAR e GMD, acredita-se ser o primeiro estudo desse tipo para esses fenótipos em animais da raça Nelore.

Palavras-chave: consumo alimentar residual, ingestão, ganho de peso, GWAS, *SNPs*

ABSTRACT

SANTANA, M.H.A. **Genetic and genomic study of intake and feed efficiency in Nellore (*Bos indicus*) cattle.** 2013. 89 p. Thesis (Ph.D.) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

The aim of this study was to evaluate the genetic parameters and correlations of intake and feed efficiency with performance and carcass traits, and perform the genome-wide association study (GWAS) for dry matter intake (DMI), residual feed intake (RFI) and average daily gain (ADG) in Nelore cattle (*Bos indicus*). Data from 1,058 animals phenotyped for DMI, feed conversion ratio (FCR), RFI, residual body weight gain (RG), residual intake and body weight gain (RIG), average daily gain (ADG) and carcass traits were used. Genetic parameters of DMI, FCR, RFI, RG and RIG and their correlations with ADG and carcass traits were estimated using Bayesian approach. Four SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), located in genes related to appetite control (NPY and PDE3B) and ion transport (TRPM3 and ITPR1), were associated with performance, intake and feed efficiency traits. Additionally, the animals were genotyped in two different chips (Illumina Bovine HD and Illumina BovineSNP50) and genotypic information were combined by imputation. The hundreds of thousands of SNPs were used for GWAS of DMI, RFI and ADG by *GRAMMAR-Gamma* association test. The heritability of DMI, RFI and RIG was 0.40, 0.38 and 0.54, respectively. No associations were found in SNPs in genes TRPM3, NPY and ITPR1, however, the SNP in PDE3B gene was significantly associated ($P \leq 0.05$) with DMI, RFI and RIG. The SNPs most associated with DMI and RFI, in GWAS, are located on chromosomes 4, 8, 14 and 21 in genomic regions associated with ion transport and appetite regulation. The GWAS pointed chromosomes 3, 6 and 10 as those containing more associated markers for ADG. Feed intake and feed efficiency are amenable to genetic selection, especially the RIG. The PDE3B gene should be further studied thus appears to be related to these phenotypes. Finally, this work shows genomic regions by genome-wide association, related to DMI, RFI and ADG, believed to be the first study of its kind for these phenotypes in Nellore cattle.

Keywords: feed intake, GWAS, residual feed intake, SNPs, weight gain

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	I
LISTA DE TABELAS.....	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	III
1. INTRODUÇÃO	1
2. HIPÓTESES	4
3. OBJETIVOS GERAIS	5
3.1 Objetivos Específicos	5
CAPÍTULO I	6
.....	6
1. Introdução	7
2. Material e Métodos	9
2.1 Animais e instalações	9
2.2 Dieta experimental e manejo	9
2.3 Coleta de dados	9
2.4 Análises estatísticas	11
3. Resultados e Discussão.....	12
3.1 Estatística descritiva e componentes de variância.....	12
3.2 Herdabilidade	13
3.3 Correlações genéticas e fenotípicas.....	15
4. Conclusão	18
5. Referências bibliográficas	19
CAPÍTULO II.....	22
Polimorfismos de nucleotídeo único em genes ligados ao transporte iônico e regulação de apetite e suas associações com ganho de peso, eficiência alimentar e ingestão de bovinos da raça Nelore	22
1. Introdução	23
2. Material e Métodos	24

2.1 Animais, instalações e manejo	24
2.2 Extração de DNA e genotipagem	25
2.3 Análise estatística	25
3. Resultados e Discussão	27
4. Conclusão	30
5. Referências bibliográficas	31
CAPÍTULO III	32
Estudo de associação de amplo genoma da ingestão alimentar e consumo alimentar residual em bovinos Nelore	32
1. Introdução	33
2. Material e Métodos	36
2.1 Obtenção dos fenótipos	36
2.2 Extração de DNA, controle de qualidade das amostras e dos <i>SNPs</i>	37
2.3 Imputação de genótipos	38
2.4 Subestrutura populacional	38
2.5 Análise de associação	39
2.6 Exploração da região ao redor dos <i>SNPs</i> significativos	40
3. Resultados e Discussão	41
3.1 Fenótipos e controle de qualidade	41
3.2 Imputação e subestrutura populacional	42
3.3 GWAS e regiões genômicas próximas dos <i>SNPs</i> associados	44
4. Conclusão	51
5. Referências bibliográficas	52
CAPÍTULO IV	56
Estudo de associação de amplo genoma para ganho de peso diário em confinamento de bovinos Nelore	56
1. Introdução	57
2. Material e Métodos	59
2.1 Coleta de fenótipos e extração de DNA	59
2.2 Genotipagem, garantia de qualidade e imputação	59
2.3 Genótipos informativos e subestrutura populacional	60

2.4 Análise de associação.....	61
2.5 Regiões genômicas em torno dos <i>SNPs</i> significantes	62
3. Resultados e Discussão.....	63
3.1 Fenótipos, garantia de qualidade e imputação.....	63
3.2 Genótipos informativos e subestrutura populacional	63
3.3 Análise de associação e regiões genômicas próximas aos <i>SNPs</i>	64
4. Conclusão	69
5. Referências Bibliográficas.....	70
4. CONCLUSÕES GERAIS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Análise de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (50k).....	42
Figura 2 - Análise de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (HD).....	43
Figura 3 - Análise de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (HDimp).....	43
Figura 4 - <i>Manhattan plots</i> dos $-\text{Log}_{10}(P)$ para IMS em bovinos da raça Nelore.	44
Figura 5 - <i>Manhattan plots</i> dos $-\text{Log}_{10}(P)$ para IMS em bovinos da raça Nelore	45
Figura 6 - Gráfico quantil-quantil dos testes estatísticos usados para a análise de associação	64
Figura 7 – <i>Manhattan plot</i> dos $-\log_{10}(P)$ do teste de associação de amplo genoma para ganho de peso diário em bovinos Nelore.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Médias, desvios-padrões e componentes de variância genética aditiva (σ^2_a) e residual (σ^2_e) para desempenho, eficiência alimentar e características de carcaça de bovinos Nelore.....	12
Tabela 2 - Estatística descritiva e intervalo de HPD (<i>highest posterior density</i>) das herdabilidade das medidas relacionadas com crescimento, ingestão, eficiência alimentar e características de carcaça.....	14
Tabela 3 - Correlações genéticas (acima da diagonal) e fenotípicas (abaixo da diagonal) de medidas de desempenho, eficiência alimentar e características de carcaça de bovinos Nelore.....	15
Tabela 4 - Resumo das informações dos <i>SNPs</i>	25
Tabela 5 - Frequência alélica e genotípica de <i>SNPs</i> ligados a controle de apetite e transporte iônico.....	27
Tabela 6 - Associação e efeito de substituição alélica de <i>SNPs</i> ligados ao controle de apetite na ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar.....	27
Tabela 7 – Associação e efeito de substituição alélica de <i>SNPs</i> ligados ao transporte iônico na ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar.....	28
Tabela 8 - Controle de qualidade para remoção de <i>SNPs</i>	41
Tabela 9 - Descrição dos <i>SNPs</i> mais significativos para IMS e CAR.....	45
Tabela 10 - Genes e <i>QTLs</i> próximos aos <i>SNPs</i> associados com CAR e IMS.....	48
Tabela 11 - Estatísticas e descrição dos dez <i>SNPs</i> mais significativos.....	65
Tabela 12 - Genes próximos ao <i>SNP</i> (rs42518459) mais significativo.....	65
Tabela 13 - <i>QTLs</i> a 1Mb de distância do <i>SNP</i> mais significativo (rs42518459) no cromossomo 3.....	67
Tabela 14 - <i>QTLs</i> próximos às regiões dos <i>SNPs</i> mais significativos descritos previamente para GMD.....	68

LISTA DE ABREVIATURAS

λ – fator de inflação/deflação
50k – painel de genotipagem de média densidade (54.609 *SNPs*)
A - adenina
AMPc – adenosina monofosfato cíclico
AOL_g – ganho de área de músculo *Longissimus*
C - citosina
CA – taxa de conversão alimentar
CAR – consumo alimentar residual
CGR – consumo e ganho residuais
CR – *call rate*
CHr - cromossomo
CS – condição sexual
DNA - ácido desoxirribonucleico
EDTA – ácido etilenodiamino
EGS_g – ganho em espessura de gordura subcutânea no músculo *Longissimus*
EGP_g – ganho em espessura de gordura subcutânea no músculo *Biceps femoris*
EPM – erro padrão da média
G - guanina
GC – grupo de contemporâneos
GPR – ganho de peso residual
GMD – ganho médio diário
GRAMMAR – *genome-wide rapid association using mixed model and regression*
GWAS – *genome-wide association study*
HD – painel de genotipagem de alta densidade (777.962 *SNPs*)
HDimp – conjunto de dados combinados, por imputação, dos painéis HD e 50k
HPD – *highest posterior density*
HWE - Equilíbrio de Hardy-Weinberg
IBS - alelos idênticos por estado
IMS – ingestão de matéria seca
ITPR1 – receptor do inositol trifosfato tipo 1
LRT – teste de razão de verossimilhança
MAF – frequência alélica mínima
MS – matéria seca
NPY – neuropeptídeo Y

PCoA – análise de coordenadas principais

PDE3B – fosfodiesterase do tipo 3

PVM – peso vivo médio

QC – controle de qualidade

QTL – *quantitative trait loci*

SNP – *single nucleotide polymorphism*

T – timina

TRPM3 – receptor transitório potencial 3

VAR – variância fenotípica explicada

1. INTRODUÇÃO

O Brasil ocupa lugar de destaque na pecuária de corte bovina, com um rebanho estimado de 185 milhões de cabeças, formado majoritariamente por animais zebuínos, principalmente da raça Nelore. O consumo de carne bovina *per capita* é de aproximadamente 35 kg/hab/ano e a produção de cerca de 8 milhões de toneladas de equivalente carcaça sendo que, desse montante, 20% é destinada à exportação e o país é responsável por quase 25% do mercado mundial de carnes de acordo com o anuário da pecuária. No entanto, a maior parcela dessa exportação é direcionada a mercados menos exigentes quanto a aspectos qualitativos. A pouca consistência e padronização dessa produção leva, principalmente, ao menor preço pago por essa *commoditie*.

Esse cenário pode ser modificado em diversas frentes, contudo, é inegável que o aumento da produtividade é o principal norte a ser galgado. Esse aumento passa pela melhora do ambiente de criação (nutrição, reprodução, bem estar animal e sanidade) e no melhoramento genético (fertilidade, características de carcaça, desempenho, ingestão e eficiência alimentar).

A forma mais comum de mensurar a produtividade é pela relação da área ocupada pela produção. Nesse contexto, é possível relacionar duas medidas de produção com o intuito de criar uma medida que pode ser vista como produtividade. A relação da ingestão de alimentos (recurso empregado) pelo ganho de peso (produção) resultou em diversas medidas de eficiência alimentar (produtividade). Essas relações almejam melhorias no sistema produtivo tanto pela redução dos custos com alimentação, responsável por grande parte dos custos totais, como também pela maior velocidade de crescimento do tecido muscular e adiposo dos bovinos.

Diversos fatores encaminharam a bovinocultura a adotar com mais afinco a mensuração da produção (desempenho) em si e, por consequência, os recursos empregados em obter essa produção (ingestão alimentar) acabaram ficando em segundo plano nas avaliações. Certamente, um dos grandes desmotivadores, até então, do uso da ingestão e, por corolário, a eficiência alimentar, é a dificuldade de mensurá-la em bovinos de corte, principalmente em sistemas na qual o confinamento não faz parte em nenhuma fase do ciclo de produção. Outro fator que elucida esse direcionamento para as medidas de produção é que se admitia que a eficiência alimentar era estreitamente relacionada com o ganho de peso.

Nas últimas décadas, foi crescente a relevância dada à mensuração da ingestão alimentar, avaliada em bovinos pela ingestão de matéria seca. Dezenas de índices foram propostos para avaliar a eficiência alimentar, com destaque para a taxa de conversão alimentar e o consumo

alimentar residual. Um grande fomentador dos estudos desses fenótipos foi o avanço tecnológico empregado nas pesquisas e na indústria. Essa ascensão permitiu que medidas laboriosas de serem avaliadas pudessem ser alvo de futuras seleções genéticas. Esse fato ocorreu pelo desenvolvimento, concomitante, das ferramentas computacionais e da genética molecular.

Em outra esfera, o melhoramento genético classicamente utiliza os fenótipos e as informações dos seus ascendentes e colaterais para prever o mérito genético de determinado animal. Essa abordagem tem sido utilizada há décadas com muito sucesso para a seleção genética nas diversas espécies. Contudo, na bovinocultura, ainda é um desafio estimar o valor genético de animais jovens, com uma acurácia alta, devido ao baixo ou inexistente número de descendentes, principalmente de medidas que apresentam herdabilidade baixa. A estimativa dos componentes de variância e parâmetros genéticos para medidas de ingestão e eficiência alimentar de animais *Bos indicus* é escassa, principalmente animais da raça Nelore. O efeito dessa carência é o parco conhecimento referente às correlações genéticas desses fenótipos com outros de interesse, tais como, desempenho, características de carcaça e reprodutivas.

Por outro lado, a evolução das tecnologias voltadas para a genética molecular tem sido acentuada nas últimas décadas. Esse fato permitiu a melhor compreensão de regiões ao longo do genoma que influenciam determinadas características, principalmente de genes considerados candidatos. Os estudos nessa área são abundantes, principalmente voltados para doenças genéticas em humanos. Na produção animal essa abordagem foi utilizada com sucesso na certificação de paternidade, na identificação de doenças genéticas e para descrever medidas influenciadas por poucos genes e com alta herdabilidade por meio de marcadores do tipo polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP – Single Nucleotide Polymorphism*).

A partir de 2009, com o lançamento do genoma bovino de referência, surgiram produtos comerciais que realizam a prospecção automatizada de milhares de *SNPs* ao longo de todo o genoma dessa espécie. Com isso, o custo por marcador avaliado reduziu imensamente e aumentou sua aplicabilidade na bovinocultura. Esse aumento exponencial de informações geradas por esses *chips* direcionou a elaboração de metodologias capazes de explorar de forma eficaz esses dados. A abordagem que reúne essa gama de elementos, para relacionar milhares de loci genômicos polimórficos com características complexas, é o estudo de associação de amplo genoma (*GWAS – Genome-wide Association Study*).

O *GWAS* foi utilizado, inicialmente, na pesquisa epidemiológica da genética humana com a finalidade de identificar regiões ao longo do genoma que estavam relacionadas com

determinadas características e, posteriormente, buscar suas funções biológicas e vias metabólicas. Posteriormente, essa metodologia se expandiu para a bovinocultura e demais cadeias de produção animal. Todavia, ainda são escassos os trabalhos voltados para a caracterização genética e genômica das medidas de eficiência alimentar e ingestão em bovinos, principalmente em animais *Bos indicus*. O presente estudo tem como foco caracterizar a genética da ingestão, eficiência alimentar e ganho de peso de bovinos Nelore. Dessa forma, será demonstrado as possíveis respostas à uma seleção genética e também as correlações genéticas dessas medidas com outros fenótipos importantes. Adicionalmente será caracterizada a genômica da ingestão de matéria seca, consumo alimentar residual e ganho de peso diário pelo GWAS. Para esses três fenótipos serão apontadas as regiões com maior influência sobre eles e será abordado, de um ponto de vista fisiológico, as possíveis razões pelo o qual essas regiões são importantes para essas variáveis.

2. HIPÓTESES

- Existe variabilidade genética nas medidas de eficiência alimentar e ingestão de bovinos Nelore e estes fenótipos estão correlacionados geneticamente com medidas de desempenho e características de carcaça.
- Marcadores moleculares localizados em genes de interesse para ingestão e eficiência alimentar são associados com essas medidas.
- O estudo de associação de amplo genoma, aliado com a busca por genes, é capaz discernir os loci ao longo dos cromossomos autossômicos relacionados com a ingestão alimentar (IMS), consumo alimentar residual (CAR) e ganho de peso diário (GMD) em bovinos da raça Nelore.

3. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar os parâmetros genéticos da ingestão, eficiência alimentar e ganho de peso, bem como, detectar marcadores moleculares do tipo *SNP* associados e regiões cromossômicas relacionadas com esses fenótipos.

3.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estimar os componentes de (co)variância e herdabilidade de medidas de eficiência alimentar e ingestão. Calcular as correlações genéticas e fenotípicas dessas medidas com desempenho e características de carcaça.
2. Verificar a associação e os efeitos de substituição alélica de *SNPs* localizados em genes relacionados com controle de apetite e transporte iônico com medidas de desempenho, ingestão e eficiência alimentar.
3. Identificar os *SNPs* associados com IMS e CAR em estudos de associação de amplo genoma com animais genotipados em painéis de média e alta densidade. Realizar o *GWAS* com um conjunto de dados combinados dos dois diferentes painéis, por meio de imputação, para essas duas variáveis e para o GMD. Explorar as regiões, que cercam os marcadores identificados, buscando por genes e *QTLs* com funções fisiológicas potencialmente relacionadas com as variáveis fenotípicas.

CAPÍTULO I

PARÂMETROS GENÉTICOS DA EFICIÊNCIA ALIMENTAR E INGESTÃO E SUAS ASSOCIAÇÕES COM CRESCIMENTO E CARACTERÍSTICAS DE CARÇA EM BOVINOS NELORE

RESUMO

O objetivo do estudo foi estimar os parâmetros genéticos para eficiência alimentar e ingestão de matéria seca e verificar suas correlações com o crescimento e características de carcaça de bovinos Nelore. Utilizou-se um conjunto de dados de 1.058 animais machos medidos para características de ingestão, crescimento, eficiência alimentar e características de carcaça, e foi utilizado uma matriz de parentesco de 3.521 animais. A estimativa das correlações fenotípicas foram realizadas no PROC CORR do software SAS 9.3. Os parâmetros genéticos foram estimados pelo software GIBBS2F90, utilizando abordagem bayesiana. As estimativas de herdabilidade para a ingestão de matéria seca (IMS), consumo alimentar residual (CAR) e consumo e ganho residuais (CGR) foram de 0,40, 0,38 e 0,54, respectivamente. A correlação genética do CAR e CGR com o ganho de espessura de gordura subcutânea no *Longissimus* foi de 0,22 e 0,07. As características analisadas apresentaram variabilidade genética e herdabilidade suficiente para permitir sua inclusão nos programas de melhoramento genético animal de bovinos Nelore. O CGR apresentou maior herdabilidade e correlações genéticas mais favoráveis com outras medidas de ingestão, desempenho e carcaça.

Palavras-chave: bovinos de corte, componentes de variância, consumo alimentar residual, consumo e ganho residuais, herdabilidade

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se dado importância cada vez maior para a ingestão e eficiência alimentar em bovinos. As interações da ingestão de alimentos com a produção têm sido estudadas há bastante tempo na pecuária e, ao longo dos anos, geraram dezenas de medidas de eficiência alimentar. Esse fato ocorreu devido à necessidade de diminuir os custos de produção e aumentar a produtividade da bovinocultura de corte. Paralelamente, o interesse por essas medidas também englobam a preocupação com o impacto ambiental pela redução da emissão de gases de efeito estufa e dos dejetos sólidos (NKRUMAH et al., 2006; HEGARTY et al., 2007).

As principais variáveis utilizadas para estimar a eficiência alimentar em bovinos de corte são a taxa de conversão alimentar, a eficiência alimentar bruta, a taxa de Kleiber (KLEIBER, 1936), a eficiência parcial de crescimento, a taxa de crescimento relativo (FITZHUGH JR.; TAYLOR, 1971), o consumo alimentar residual (KOCH et al., 1963) e, a recentemente proposta, consumo e ganho residuais (BERRY; CROWLEY, 2012).

As estimativas de parâmetros genéticos e correlações genéticas da eficiência alimentar já foram largamente estudadas em animais taurinos (*Bos taurus*) e compostos, e o consumo alimentar residual já é utilizado em alguns programas de melhoramento genético de taurinos. As correlações genéticas do consumo alimentar residual (CAR) com medidas de carcaça avaliada por ultrassonografia, principalmente a deposição de gordura subcutânea, foi objeto de alguns trabalhos (ARTHUR; ARCHER; JOHNSTON, 2001; RICHARDSON et al., 2001).

As estimativas dos componentes de variância, dos parâmetros genéticos e das correlações genéticas de eficiência alimentar são escassas em animais zebuínos (*Bos indicus*). Em um dos poucos estudos, Barwick et al. (2009) estimaram esses parâmetros para eficiência alimentar com animais da raça Brahman. Em bovinos Nelore são mais raros ainda os estudos com estimativas desses parâmetros que são importantes nessa raça por representar a maioria da população de bovinos no Brasil, um dos maiores produtores mundiais de carne bovina. Adicionalmente, o conhecimento desses parâmetros e dessas correlações são fundamentais para futuros estudos de seleção genética baseada em eficiência e ingestão alimentar.

Os objetivos desse estudo foram estimar os parâmetros genéticos, os componentes de (co)variância e herdabilidade para ingestão de matéria seca e de medidas de eficiência alimentar em bovinos da raça Nelore. Complementarmente, correlacionar geneticamente e

fenotipicamente as medidas de eficiência e ingestão alimentar com medidas de desempenho e de carcaça nessa raça.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS E INSTALAÇÕES

As análises foram realizadas pelo Grupo de Melhoramento Animal e Biotecnologia da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (FZEA/USP) e é uma compilação de treze diferentes experimentos conduzidos no Brasil, sendo que destes, sete foram no Estado de São Paulo, três em Minas Gerais, dois em Goiás e um no Paraná.

Foram utilizadas informações de 1.058 animais machos da raça Nelore (*Bos indicus*), sendo que, destes, 147 eram castrados e 891 inteiros nascidos entre 2005 e 2011, filhos de 176 touros e 779 vacas, formando uma matriz de parentesco de 3.521 animais.

Os animais foram mantidos em sistema de confinamento, em três diferentes tipos de instalações: baias individuais (n=430 animais), Calan Gates (n=212 animais) e GrowSafe (n=396 animais), com média de 517 ± 169 dias de idade e 366 ± 59 kg de peso vivo no início. Os experimentos foram conduzido nos anos de 2007 a 2012.

2.2. DIETA EXPERIMENTAL E MANEJO

Antes do início dos testes, todos os animais passaram por um período de adaptação às instalações e à dieta, por um período não inferior a 21 dias. Nos experimentos foram realizadas coletas dos volumosos, concentrados e das sobras para avaliações periódicas da composição bromatológica dos mesmos, principalmente da matéria seca que é fundamental para avaliação da ingestão e eficiência alimentar. O alimento era fornecido duas vezes ao dia, na forma de ração total misturada.

2.3. COLETA DE DADOS

Os períodos de coleta de dados variaram de 70 a 90 dias, dependendo do experimento. Todos os animais foram pesados sem jejum alimentar e hídrico durante esse período, e assim obtido o peso vivo médio (PVM). O ganho de peso médio diário (GMD) foi calculado com base nessas pesagens periódicas, representado como o coeficiente angular da regressão linear dos pesos em relação aos dias em teste.

Adicionalmente, nesse período de avaliação, a ingestão de matéria seca (IMS) para cada animal foi mensurada diariamente por meio da subtração entre a quantidade de alimento fornecido e as sobras alimentares. A partir desses dados de IMS, foram calculadas as medidas de eficiência alimentar: taxa de conversão alimentar (CA), consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e consumo e ganho residuais (CGR).

A CA foi calculada pela razão da IMS pelo GMD, enquanto que o CAR e o GPR representam os resíduos (ε_1 e ε_2) das equações de regressão que estimaram a ingestão de matéria seca (IMS) e o ganho de peso diário (GMD), respectivamente. Os grupos de contemporâneos (GC) foram formados considerando o teste que cada animal foi avaliado. A condição sexual (CS) dos animais (inteiro ou castrado) foi incluída como covariável nos modelos estatísticos. Os modelos para estimação desta características foram:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 CS + \beta_4 GC + \varepsilon_1$$

$$GMD = \beta_0 + \beta_1 IMS + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 CS + \beta_4 GC + \varepsilon_2$$

Onde: os parâmetros (β) foram estimados a partir do procedimento PROC MIXED do software SAS 9.3. O CGR foi calculado pela fórmula abaixo:

$$CGR = (-1 * CAR) + GPR$$

Adicionalmente, os bovinos foram submetidos, no início e final de cada período experimental, à avaliação de carcaça por meio de ultrassonografia (Aloka SSD500 com um transdutor de 3,5MHz) por um técnico certificado da *Ultrasound Guidelines Council*, seguindo a metodologia descrita no guia da *Beef Improvement Federation* (BIF, 1996).

As medidas avaliadas foram: área do olho do lombo (AOL), espessura de gordura subcutânea sobre o lombo (EGS) e também espessura de gordura sobre a picanha (EGP). A AOL e a EGS foram mensuradas entre a região da 12^a e 13^a costelas, transversalmente ao músculo *Longissimus*. A EGP foi mensurada na intersecção dos músculos *Gluteus medius* e *Biceps femoris*, localizados entre o íleo e o ísquio. Os valores iniciais foram subtraídos dos finais para cálculo dos ganhos das medidas (AOL_g, EGS_g e EGP_g) durante o experimento.

2.4. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Informações que estavam fora da amplitude de ± 3 desvios padrão, assim como animais sem registro de pai e/ou mãe não foram consideradas nas análises genéticas. Os modelos estatísticos propostos para todas as características consideraram o efeito fixo de GC, as idades no início do experimento como covariável e o efeito aleatório genético aditivo de cada animal. A forma matricial geral dos modelos pode ser representada:

$$y = X\beta + Z\alpha + \varepsilon$$

onde: y é o vetor da variável dependente (variável fenotípica); β é o vetor dos efeitos fixos de grupo de contemporâneos e covariáveis; α é o vetor do efeito aleatório genético aditivo direto; ε é vetor efeitos residuais; X e Z são as matrizes de incidência relacionando β e α , com a variável dependente y . As correlações fenotípicas foram calculadas pelo procedimento PROC CORR do pacote estatístico SAS 9.3.

A predição dos parâmetros genéticos foram realizados usando o software GIBBS2F90 (MISZTAL et al., 2002), utilizando a metodologia bayesiana sob a abordagem do modelo animal em análise unicaracterística para estimativa da herdabilidade e bicaracterística para obtenção das correlações genéticas entre as medidas. As análises consistiram em uma cadeia de 500.000 ciclos, com um período de descarte amostral (*burn-in*) de 50.000 ciclos com amostras tomadas a cada 100 ciclos. A convergência foi verificada por inspeção gráfica (*trace-plots*).

Para calcular as estatísticas descritivas e o HPD (*highest posterior density*) foi usado o pacote BOA (*The Bayesian Output Analysis*) (SMITH, 2005) do ambiente R v2.15.2. A região do HPD mostra o intervalo que inclui 95% das amostras e esta foi considerada a medida de confiabilidade da análise.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. ESTATÍSTICA DESCRITIVA E COMPONENTES DE VARIÂNCIA

A estatística descritiva e os valores preditos para os componentes de variância genético aditivo e residual das características estudadas encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Médias, desvios-padrões e componentes de variância genética aditiva (σ^2_a) e residual (σ^2_e) para desempenho, eficiência alimentar e características de carcaça de bovinos Nelore.

Característica	Média	N	Desvio-Padrão	σ^2_a *	σ^2_e *
GMD (kg/dia)	1,29	1032	0,45	0,03(0,001)	0,05(0,001)
IMS (kg de MS/dia)	8,76	1040	1,96	0,29(0,002)	0,42(0,001)
CA	6,65	1032	2,05	0,22(0,001)	0,48(0,001)
CAR (kg de MS/dia)	0,00	1032	0,89	0,20(0,001)	0,33(0,000)
GPR (kg/dia)	0,00	1032	0,26	0,02(0,000)	0,03(0,000)
CGR	0,00	1032	1,07	0,47(0,003)	0,38(0,002)
AOL _g (cm ²)	11,31	758	5,87	7,20(0,045)	12,77(0,039)
EGS _g (mm)	2,09	756	1,40	0,33(0,002)	1,21(0,002)
EGP _g (mm)	2,85	755	2,06	1,02(0,006)	1,57(0,005)

GMD – Ganho médio diário, IMS – Ingestão de matéria seca, CA – Conversão alimentar, CAR – Consumo alimentar residual, GPR – Ganho de peso Residual, CGR – Consumo e ganho residuais, AOL – Área de olho de lombo, EGS – Deposição de gordura sobre o lombo, EGP – Deposição de gordura sobre a garupa

*Entre parênteses = erropadrão da média

Recentemente, foram estimadas as variações fenotípicas (desvio-padrão) para CAR em bovinos da raça Nelore, semelhante ou superior aos estudos realizados em animais taurinos. Os valores variam de 0,41 a 1,05 kg de MS/dia (ALMEIDA, LANNA, LEME, 2004; SOBRINHO et al., 2011; GOMES et al., 2012) para zebuínos e de 0,66 a 1,47 para taurinos (ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; BASARAB et al., 2003; SCHENKEL; MILLER; WILTON, 2004; DURUNNA et al., 2011). Porém, em animais zebuínos, os estudos geralmente abrangiam populações pequenas (menos de 100 animais). Em trabalho de Berry e Crowley (2012), os autores avaliaram 2605 animais taurinos, sendo o desvio-padrão foi semelhante ao presente estudo para CAR (0,87), menor para GPR (0,02) e menor para o CGR (0,88).

A variância genética aditiva para IMS e CAR verificada em bovinos taurinos variou de 0,18 a 0,60 e 0,10 a 0,25 (ARTHUR; ARCHER; JOHNSTON, 2001; ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; HOQUE et al., 2006), respectivamente, a encontrada nesse estudo. A variância genética aditiva para a característica de ganho em espessura de gordura sobre o *Biceps femoris* (EGP_g) foi superior ao ganho em espessura de gordura subcutânea sobre o *Longissimus* (EGS_g), sugerindo maior variabilidade em EGP_g . Esse fato que pode ser explicado também por se tratar de animais jovens e zebuínos na qual a deposição de gordura sobre a intersecção dos músculos *Gluteus medius* e *Biceps femoris* é mais precoce e maior quando comparado a mesma deposição sobre o *Longissimus* (YOKOO, 2005).

As características de desempenho, eficiência alimentar e ganho, relacionados com carcaça, apresentam variabilidade genética e podem ser trabalhadas dentro dos programas de melhoramento genético animal.

3.2. HERDABILIDADE

A herdabilidade estimada para todas as medidas foi de magnitude média, exceto para CGR (Tabela 2). Essas estimativas estão de acordo com outros estudos que avaliaram ganho de peso e CA, os valores variam entre 0,16 a 0,59 e 0,14 a 0,46, respectivamente (FAN; BAILEY; SHANNON, 1995; ARTHUR; ARCHER; JOHNSTON, 2001; NKRUMAH et al., 2007; DURUNNA et al., 2011).

Tabela 2 – Estatística descritiva e intervalo de HPD (*highest posterior density*) das herdabilidade das medidas relacionadas com crescimento, ingestão, eficiência alimentar e características de carcaça

Característica	Média	Mediana	Moda	Desvio Padrão	95% HPD
GMD (kg/dia)	0,351	0,345	0,343	0,153	0,022–0,613
IMS (kg de MS/dia)	0,401	0,387	0,324	0,166	0,107–0,726
CA	0,313	0,305	0,160	0,110	0,115–0,542
CAR (kg de MS/dia)	0,375	0,358	0,211	0,162	0,081–0,684
GPR (kg/dia)	0,406	0,405	0,362	0,147	0,129–0,690
CGR	0,544	0,540	0,499	0,173	0,207–0,880
AOL _g (cm ²)	0,357	0,345	0,250	0,143	0,087–0,630
EGS _g (mm)	0,215	0,204	0,115	0,082	0,073–0,380
EGP _g (mm)	0,387	0,382	0,500	0,158	0,102–0,720

GMD – Ganho médio diário, IMS – Ingestão de matéria seca, CA – Conversão alimentar, CAR – Consumo alimentar residual, GPR – Ganho de peso Residual, CGR – Consumo e ganho residuais, AOL – Área de olho de lombo, EGS – Deposição de gordura sobre o lombo, EGP – Deposição de gordura sobre a garupa

A herdabilidade da IMS em estudos realizados em animais taurinos oscilou de 0,15 a 0,74 (DURUNNA et al., 2011; SHOJO et al., 2005, respectivamente). Porém, de forma geral o valor da estimativa de herdabilidade do presente estudo com animais da raça Nelore está próxima aos encontrados na maioria dos trabalhos com taurinos, na qual essas estimativas foram de 0,39 a 0,54 (ARTHUR; ARCHER; JOHNSTON, 2001; ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; SCHENKEL; MILLER; WILTON, 2004; NKRUMAH et al., 2007; ROLFE et al., 2011). Esse parâmetro foi próximo também de um estudo realizado em animais da raça Brahman, na qual essa estimativa foi de 0,49 (BARWICK et al., 2009).

Para o CAR, a herdabilidade encontrada no presente estudo está de acordo com a literatura, com valores que variaram de 0,08 a 0,62, com a maioria dos estudos com valores próximos a 0,45 em animais taurinos (KOCH et al., 1963; JENSEN et al., 1992; ARCHER et al., 1997; ARTHUR; ARCHER; JOHNSTON, 2001; ARTHUR; RENAND; KRAUSS, 2001; HOQUE et al., 2006; ROLFE et al., 2011; BERRY; CROWLEY, 2012). Em zebuínos essa estimativa foi de 0,24 (BARWICK et al., 2009) e em animais compostos de 0,21 a 0,36 (NKRUMAH et al., 2007; DURUNNA et al., 2011).

Em poucos trabalhos pôde ser observado os parâmetros genéticos do GPR e do CGR, possivelmente pelo fato do CGR ter sido proposto recentemente, já o GPR pode ter sido

delegado a um segundo plano devido à pouca preocupação em utilizar outras medidas que tem o desempenho como enfoque, a não ser o próprio ganho de peso diário. Crowley et al. (2011) estimaram herdabilidade de 0,28 para GPR e Koch et al. (1963) de 0,64 para a mesma variável, ambos trabalhos realizados em animais taurinos. Berry e Crowley (2012) demonstraram herdabilidade de 0,36 quando propuseram a variável CGR, valor inferior ao verificado no presente estudo. O valor para AOL_g foi próximo ao relatado por Caetano et al. (2013) em bovinos Nelore que reportaram uma estimativa de 0,34. Os mesmos autores mostraram herdabilidade estimada para EGS_g de 0,23 e para EGP_g de 0,31.

A estimativa de herdabilidade para o CAR e o CGR teve valor moderado e alto, respectivamente. Essas estimativas indicam que essas medidas passíveis de serem usadas como critério de seleção direta visando ganho genético em bovinos de corte. A resposta a seleção poderia ser rápida para o CGR devido maior valor de herdabilidade se comparado com o CAR.

Outro fator que pode ser favorável ao uso do CGR no lugar do CAR é que o CAR não distingue os animais com maior ou ingestão de matéria seca. Como o CAR é um desvio sobre a média e calculado a partir do valor observado pelo estimado, animais de alta ingestão podem ter valores de CAR semelhantes que os animais de baixa ingestão caso a diferença dos valores observados dos estimados sejam próximas.

3.3. CORRELAÇÕES GENÉTICAS E FENOTÍPICAS

As correlações genéticas e fenotípicas da ingestão, eficiência alimentar, crescimento e características de carcaça estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Correlações genéticas (acima da diagonal) e fenotípicas (abaixo da diagonal) de medidas de desempenho, eficiência alimentar e características de carcaça de bovinos Nelore

Variáveis	GMD	IMS	CA	CAR	GPR	CGR	AOL _g	EGS _g	EGP _g
GMD		0,44	-0,57	0,06	0,61	0,15	0,10	-0,04	-0,02
IMS	0,63		0,14	0,67	0,01	-0,48	-0,02	0,07	0,05
CA	-0,46	0,08		0,26	-0,38	-0,30	-0,07	0,09	0,06
CAR	0,03	0,48	0,33		-0,18	-0,81	-0,04	0,22	0,14
GPR	0,46	-0,03	-0,51	-0,53		0,83	-0,03	-0,10	-0,01
CGR	0,04	-0,38	-0,32	-0,90	0,70		0,05	0,07	0,06
AOL _g	0,35	0,06	-0,30	-0,26	0,11	0,17		0,10	-0,01
EGS _g	0,10	0,21	0,08	0,22	-0,01	-0,18	-0,41		0,39
EGP _g	0,15	0,29	0,08	0,29	-0,02	-0,25	-0,44	0,58	

GMD – Ganho médio diário, IMS – Ingestão de matéria seca, CA – Conversão alimentar, CAR – Consumo alimentar residual, GPR – Ganho de peso Residual, CGR – Consumo e ganho residuais, AOL – Área de olho de lombo, EGS – Deposição de gordura sobre o lombo, EGP – Deposição de gordura sobre a garupa

A ingestão de matéria seca pode ser uma característica a ser cogitada para uma seleção genética, visto que essa tem herdabilidade moderada. No entanto, possui correlação genética desfavorável com o ganho de peso. A redução na ingestão alimentar, por si só, levaria por resposta correlacionada, em teoria, a redução do ganho de peso de 44%.

A conversão alimentar apresenta correlações favoráveis com outras medidas de eficiência alimentar. Porém, apesar dessas correlações, a herdabilidade dessa variável é a menor entre as medidas de eficiência. Além disso, sua correlação genética com a ingestão de matéria seca é baixa, portanto, a escolha da CA como medida de eficiência alimentar em uma seleção genética não terá qualquer efeito na redução da alimentação, que representa o maior custo variável da produção de bovinos de corte. Em compensação, teoricamente, poderia reduzir os custos em termos de menor tempo que os animais precisariam ficar confinados, visto sua forte correlação com o ganho de peso.

A correlação genética entre o CGR e o GMD foi superior ao observado com o CAR. Esse fato pode ser decisivo na escolha do CGR ao invés do CAR em um índice de seleção genética. As correlações genéticas do CGR com a deposição de gordura subcutânea (EGS_g e EGP_g) são baixas, diferentemente dos antagonismos genéticos apresentados entre o CAR e essas medidas. A seleção para CGR, em teoria, levaria a um aumento no ganho de peso e

redução na ingestão alimentar sem afetar negativamente a deposição muscular e adiposa na carcaça de bovinos zebuínos.

As correlações genéticas das medidas de deposição de gordura subcutânea na carcaça com o CAR são moderadas e indicam existir relação dessa medida de eficiência com a deposição de gordura corporal. Esse fato corrobora outros autores (NKRUMAH et al., 2007; CROWLEY et al., 2011) que também encontraram valores próximos de correlação genotípica (0,35 e 0,39, respectivamente) para a deposição de gordura subcutânea sobre o *Longissimus* em animais taurinos.

É importante considerar que essas medidas de eficiência nunca serão avaliadas como uma única característica, visto que a seleção se baseia sempre no equilíbrio entre diversas medidas importantes para o sistema de produção como um todo. Portanto, a escolha de uma ou de outra medida virá acompanhada, dentro de um programa de melhoramento genético, de outras características como as reprodutivas, de desempenho e de características de carcaça. No entanto, a seleção baseada na ingestão e eficiência alimentar deverá ser cuidadosamente delineada, isso porque a medida a ser escolhida poderá ter impactos negativos em outras medidas importantes.

A deposição de gordura corporal rege o conceito de terminação, dessa forma, deve-se optar por animais que sejam eficientes na deposição da mesma, com rápido crescimento corporal e que melhor aproveitem o alimento para esses dois itens. A reserva corporal é importante não somente para o sistema de confinamento mas, principalmente, para o sistema de produção de bezerros, pois as matrizes precisam dessa reserva concomitantemente para manutenção corporal, para a gestação, amamentação e, no caso de novilhas primíparas, para crescimento corporal.

4. CONCLUSÃO

Foi demonstrado no presente estudo que as medidas de eficiência alimentar, ingestão e desempenho possuem variabilidade genética aditiva e herdabilidade para ser utilizadas na seleção genética.

O consumo e ganho residuais teria resposta mais acelerada em uma seleção genética que as demais medidas de eficiência alimentar. Adicionalmente, essa medida apresentou as correlações genéticas mais favoráveis, pois uma seleção para essa medida levaria a um aumento no desempenho e redução na ingestão alimentar, sem qualquer efeito negativo na deposição muscular e adiposa na carcaça de bovinos da raça Nelore.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, R.; LANNA, D.P.D.; LEME, P.R. Consumo alimentar residual: um novo parâmetro para avaliar a eficiência alimentar de bovinos de corte. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, **Anais...** 41, 03-14, 2004.
- ARCHER, J.A.; ARTHUR, P.F.; HERD, R.M.; PARNELL, P.F.; PITCHFORD, W.S. Optimum postweaning test for measurement of growth rate, feed intake, and feed efficiency in British breed cattle. **Journal of Animal Science** 75, 2024-2032, 1997.
- ARTHUR, P.F.; ARCHER, J.A.; JOHNSTON, D.J. Genetic and phenotypic variance and covariance components for feed intake, feed efficiency and other postweaning traits in Angus cattle. **Journal of Animal Science** 79, 2805-2811, 2001.
- ARTHUR, P.F.; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic parameters for growth and feed efficiency in weaner vs yearling Charolais bulls. **Australian Journal of Agricultural Research** 52, 471-476, 2001.
- BARWICK, S.A.; WOLCOTT, M.L.; JOHNSTON, D.J.; BURROW, H.M.; SULLIVAN, M.T. Genetics of steer daily and residual feed intake in two tropical beef genotypes, and relationships among intake, body composition, growth and other post-weaning measures. **Animal Production Science** 49, 351-366, 2009.
- BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; AALHUS, J.L.; OKINE, E.K.; SNELLING, W.M.; LYLE, K.L. Residual feed intake and body composition in young growing cattle. **Canadian Journal of Animal Science** 83, 189-204, 2003.
- BERRY, D.P.; CROWLEY J.J. Residual intake and body weight gain: A new measure of efficiency in growing cattle. **Journal of Animal Science** 90, 109-115, 2012.
- BEEF IMPROVEMENT FEDERATION. **BIF Guidelines for Uniform Beef Improvement Programs**, 7th ed. Beef Improvement Federation (BIF), Kansas State Univ., Colby, KS, 1996.
- CAETANO, S.L.; SAVEGNAGO, R.P.; BOLIGON, A.A.; RAMOS, S.B.; CHUD, T.C.S.; LÔBO, R.B.; MUNARI, D.P. Estimates of genetic parameters for carcass, growth and reproductive traits in Nellore cattle. **Livestock Science** 155, 1-7, 2013.
- CROWLEY, J.J.; EVANS, R.D.; MC HUGH, N.; KENNY, D.A.; MCGEE, M.; CREWS JR.; D.H.; BERRY, D. Genetic relationship between feed efficiency in growing males and beef cow performance. **Journal of Animal Science** 89, 3372-3381, 2011.
- DURUNNA, O.N.; MUJIBI, F.D.N.; GOONEWARDENE, L.; OKINE, E.K.; BASARAB, J.A.; WANG, Z.; MOORE, S.S. Feed efficiency differences and reranking in beef steers fed grower and finisher diets. **Journal of Animal Science** 89: 158-167, 2011.
- FAN, L.Q.; BAILEY, D.R.C.; SHANNON, N.H. Genetic Parameter Estimation of Postweaning Gain, Feed Intake, and Feed Efficiency for Hereford and Angus Bulls Fed Two Different Diets. **Journal of Animal Science** 73, 365-372, 1995.
- FITZHUGH, H.A.; TAYLOR JR., C.S. Genetic analysis of degree of maturity. **Journal of Animal Science** 33, 717-725, 1971.
- GOMES, R.C.; SAINZ, R.D.; SILVA, S.L.; CÉSAR, M.C.; BONIN, M.N.; LEME, P.R. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy

requirements, meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. **Livestock Science** 150, 265-273, 2012.

HEGARTY, R.S., GOOPY, J.P., HERD, R.M., MCCORKELL, B. Cattle selected for lower residual feed intake have reduced daily methane production. **Journal of Animal Science** 85, 1479–1486, 2007.

HOQUE, M.A.; ARTHUR, P.F.; HIRAMOTO, K.; OIKAWA, T. Genetic relationship between different measures of feed efficiency and its component traits in Japanese Black (Wagyu) bulls. **Livestock Science** 99, 111-118, 2006.

JENSEN, J.; MAO, I.L.; ANDERSEN, B.B.; MADSEN, P. Phenotypic and genetic relationships between residual energy intake and growth, feed intake, and carcass traits of young bulls. **Journal of Animal Science** 70, 386-395, 1992.

KLEIBER, M. Problems involved in breeding for efficiency of food production. Pages 247–258 in **Proceedings**. American Society of Animal Production, 1936.

KOCH, R.M.; SWIGER, L.A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K.E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science** 22, 486-494, 1963.

MISZTAL, I.; TSURUTA, S.; STRABEL, T.; AUVRAY, B.; DRUET, T.; LEE, D.H. BLUPF90 and related programs (BGF90). **Proceedings** of 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, vol. 28, p. 07, 2002.

NKRUMAH, J.D.; OKINE, E.K.; MATHISON, G.W.; SCHMID, K.; LI, C.; BASARAB, J.A.; PRICE, M.A.; WANG, Z.; MOORE, S.S. Relationships of feedlot feed efficiency, performance and feeding behaviour with metabolic rate, methane production, and energy partitioning in beef cattle. **Journal of Animal Science** 84, 145–153, 2006.

NKRUMAH, J.D.; BASARAB, J.A.; WANG, Z.; LI, C.; PRICE, M.A.; OKINE, E.K.; CREWS, D.H.; MOORE, S.S. Genetic and phenotypic relationships of feed intake and measures of efficiency with growth and carcass merit of beef cattle. **Journal of Animal Science** 85, 2711-2720, 2007.

RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ODDY, V.H.; THOMPSON, J.M.; ARCHER, J.A.; ARTHUR P.F. Body composition and implications for heat production of Angus steers progeny of parents selected for and against residual feed intake. **Australian Journal of Agricultural Research** 41, 1065-1072, 2001.

ROLFE K.M.; SNELLING W.M.; NIELSEN M.K.; FREETLY H.C.; FERRELL C.L.; JENKINS T.G. Genetic and phenotypic parameter estimates for feed intake and other traits in growing beef cattle and opportunities for selection. **Journal of Animal Science** 89, 3452-3459, 2011.

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. **Can. Journal of Animal Science** 84, 177-185, 2004.

SHOJO, M.; YOUNG, J.; ANADA, K.; OYAMA, K.; MUKAI, F. Estimation of genetic parameters for growth and feed utilization traits in Japanese Black cattle. **Animal Science Journal** 76, 115-119, 2005.

SMITH, B.J. Bayesian Output Analysis Program (BOA), version 1.1.5. <http://www.public-health.uiowa.edu/boa>. 2005

SOBRINHO, T.L.; BRANCO, R.H.; BONILHA, S.F.M.; CASTILHOS, A.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Residual feed intake and relationships with performance of Nellore cattle selected for post weaning weight. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40, 929-937, 2011.

YOKOO, M.J. Estimativas de efeitos genéticos e ambientais para características de carcaça medidas pelo ultra-som em bovinos da raça Nelore. 2005. 89f. **Dissertação** (Mestrado) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

CAPÍTULO II

POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO EM GENES LIGADOS AO TRANSPORTE IÔNICO E REGULAÇÃO DE APETITE E SUAS ASSOCIAÇÕES COM GANHO DE PESO, EFICIÊNCIA ALIMENTAR E INGESTÃO DE BOVINOS DA RAÇA NELORE

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar as associações e efeitos de substituição alélica de polimorfismo de nucleotídeo único (*SNP*) em genes ligados ao controle do apetite (*NPY* e *PDE3B*) e transporte de íons (*ITPR1* e *TRPM3*) no ganho médio diário (GMD), na taxa de conversão alimentar (CA), no consumo alimentar residual (CAR), no ganho de peso residual (GPR), no consumo e ganho residuais (CGR) e na ingestão de matéria seca (IMS) de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). Duzentos e cinquenta e um animais foram alimentados em confinamento e tiveram sua IMS, peso corporal e GMD avaliados. Esses dados foram utilizados para calcular CA, CAR, GPR e CGR. Associações destas variáveis com quatro *SNPs* (um em cada gene citado acima) foram testados e os efeitos de substituição alélica foram estimadas utilizando PROC MIXED do SAS 9.3. Não foi encontrada associação de *SNPs* nos genes *TRPM3* e *NPY*, mas houve uma associação significativa ($P \leq 0,05$) e efeito de substituição de alelos em um *SNP* no gene *PDE3B* com IMS, CAR e CGR. O *SNPs* avaliados são polimórficos em bovinos da raça Nelore e o gene *PDE3B* deve ser melhor estudado, pois parece ter um efeito sobre o consumo e eficiência alimentar.

Palavras-chave: bovinos de corte, consumo alimentar residual, consumo e ganho residuais, desempenho, *SNPs*

1. INTRODUÇÃO

Os avanços das últimas décadas na genética e biologia molecular possibilitaram estudos de polimorfismos de nucleotídeos únicos (*SNPs*) em genes relacionados com características de interesse econômico. O controle fisiológico e genético de diversas medidas de interesse da produção animal podem ser, em parte, explicados pelas variações no genoma dos bovinos. Nos últimos anos, diversos estudos têm abordado como destaque a ingestão e eficiência alimentar em bovinos de corte.

Os principais mecanismos fisiológicos que influenciam a eficiência alimentar estão relacionados às exigências de manutenção e transporte de íons (RICHARDSON et al., 2004). Diversos fatores metabólicos podem contribuir na eficiência alimentar e sua regulação fisiológica é controlada por muitas centenas de genes (BARENDSE et al., 2007, SHERMAN et al., 2009). O neuropeptídeo Y (*NPY*) é um composto do eixo hipófise-hipotálamo que participa nos processos que controlam o apetite dos animais regulando a ingestão alimentar (CAMPFIELD; SMITH; BURN, 1996). A enzima *PDE3B* está relacionada com a secreção de insulina e leptina, que têm efeito sobre a ingestão (CONG et al., 2007). O *ITPR1* medeia a liberação de cálcio a partir do retículo endoplasmático, processo fundamental no transporte iônico (HUANG et al., 2012). O *TRPM3* é importante na sinalização de cálcio celular e homeostase. A proteína codificada por este gene medeia a entrada do cálcio, e essa entrada é potenciado pela redução do cálcio armazenado (CLAPHAN et al., 2005).

O presente trabalho tem por objetivo avaliar os efeitos de substituição alélica e associação de marcadores moleculares do tipo *SNP* em genes relacionados com controle de apetite (*NPY* e *PDE3B*) e transporte iônico (*ITPR1* e *TRPM3*) sobre medidas de eficiência alimentar, ingestão e desempenho em bovinos da raça Nelore.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS, INSTALAÇÕES E MANEJO

O estudo foi realizado com 251 animais machos da raça Nelore sendo 103 novilhos castrados e 148 tourinhos avaliados em cinco testes diferentes ocorridos de 2007 a 2011. Os testes foram realizados na Universidade Federal do Paraná (2009, n=46) e na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo (2007 a 2011, n=205). Os animais foram avaliados por não menos que 70 dias em confinamento dotado de baias individuais (155) e em Calan Gates (96) e tinham em média 21 ± 2 meses de idade e 380 ± 19 kg de peso no início do teste. A cada 21 dias os animais foram pesados para obtenção dos pesos (peso vivo médio, PVM) e cálculo do ganho de peso diário (GMD) por meio de regressão linear dos pesos vivos pelos dias de pesagem.

Durante o período de teste, os animais tiveram sua ingestão de matéria seca (IMS) medida diariamente obtida da subtração da quantidade fornecida pelas sobras alimentares, ambos ajustados para matéria seca da dieta. Os dados de IMS, PVM e GMD foram utilizados para calcular as medidas de eficiência alimentar. As medidas de eficiência utilizadas foram a conversão alimentar (CA), o consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e o consumo e ganho residuais (CGR).

A conversão alimentar foi calculada como a razão direta da IMS pelo GMD, o CGR foi a soma do CAR (multiplicado por -1) e do GPR. O CAR e o GPR são obtidos a partir do resíduo (ϵ) da equação de regressão que leva em consideração a estimativa da ingestão (IMS) e do ganho de peso (GMD) como variável dependente, respectivamente conforme modelos abaixo:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 CS + \beta_4 GC + \epsilon_1$$

$$GMD = \beta_0 + \beta_1 IMS + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 CS + \beta_4 GC + \epsilon_2$$

Onde: CS é a condição sexual (inteiro ou castrado) e GC é o grupo de contemporâneos.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA E GENOTIPAGEM

Os animais tiveram seu sangue colhido por punção jugular em tubos a vácuo contendo K2 EDTA como anticoagulante e utilizado para extração de DNA genômico por precipitação de NaCl, como descrito por Olerup e Zetterquist (1992). A caracterização e determinação dos genótipos para os polimorfismos foram realizadas por meio de PCR em tempo real utilizando o equipamento ABI Prism® 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems®, Foster City, CA, EUA). O sistema utilizado foi o de detecção TaqMan™ por meio de leitura de fluorescência das sondas.

Nesse trabalho foram analisados 4 *SNPs* em diferentes genes que foram escolhidos de uma base internacional de dados genômicos (NCBI, *National Center for Biotechnology Information*) a partir de trabalho realizado por Barendse et al. (2007), na qual foram eleitos os *SNPs* nos genes *NPY* (rs110418893) e *PDE3B* (rs29009964) relacionados ao apetite e os genes *ITPR1* (rs29020542) e *TRPM3* (rs29024915) ligados ao transporte de íons e com associação com a eficiência alimentar em animais taurinos (Tabela 4).

Tabela 4 – Resumo das informações dos *SNPs*

Gene	Cromossomo	Posição (bp)	Localização	<i>SNP</i> id	Substituição
<i>PDE3B</i>	15	38501690	Intron	rs29009964	T/A
<i>NPY</i>	4	72071212	Intron	rs110418893	A/G
<i>ITPR1</i>	22	21783249	Intron	rs29020542	C/T
<i>TRPM3</i>	8	47313175	Intron	rs29024915	C/T

2.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises de associação foram feitas utilizando do procedimento MIXED, do pacote estatístico SAS 9.3, considerando um modelo misto linear conforme o modelo abaixo:

$$Y_{ijk} = \mu + GC_i + CS_j + \alpha_1 IDADE + \alpha_2 GENÓTIPOS + R_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

Onde: Y_{ijk} = valor fenotípico da variável; μ = média geral da característica; GC_i = efeito fixo de grupo de contemporâneos (sendo considerado como GC os animais do mesmo teste); CS_j = efeito fixo de condição sexual (novilhos e tourinhos); α_1 = coeficiente de regressão da

covariável de idade; α_2 = coeficiente de regressão associado ao número de alelos; R_{ik} = efeito aleatório de reprodutor; ε_{ijk} = erro aleatório do resíduo. No cálculo dos efeitos de substituição alélica os mesmos modelos foram usados porém o genótipo foi usado como efeito fixo contínuo com base nos alelos favoráveis (0, 1 e 2) presentes no genótipo. O efeito de dominância foi estimado como o desvio dos heterozigotos da média dos dois homozigotos (FALCONER; MACKAY, 1996). A probabilidade do equilíbrio de Hardy-Weinberg associado com a frequência dos genótipos observados foi testada por qui-quadrado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As frequências alélicas e genotípicas para cada um dos 4 *SNPs* são mostradas na Tabela 5 abaixo.

Tabela 5 – Frequência alélica e genotípica de *SNPs* ligados a controle de apetite e transporte iônico

Gene/ <i>SNP</i>	EHW ¹	Frequência Alélica		Frequência Genotípica		
<i>PDE3B</i>	0,79	T – 90%	A – 10%	TT – 83%	TA – 15%	AA – 2%
<i>NPY</i>	0,01	A – 2,5%	G – 97,5%	AA – 2%	AG – 1%	GG – 97%
<i>ITPR1</i>	0,98	C – 69%	T – 31%	CC – 47%	CT – 44%	TT – 9%
<i>TRPM3</i>	0,02	C – 21%	T – 79%	CC – 8%	CT – 26%	TT – 66%

¹Probabilidade do teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg

Na Tabela 6 e 7 são mostrados os *SNPs* ligados a modulação de apetite e transporte iônico, respectivamente, juntamente com a associação dos *SNPs* com a ingestão de matéria seca (IMS), ganho médio diário (GMD), conversão alimentar (CA), o consumo alimentar residual (CAR), ganho de peso residual (GPR) e o consumo e ganho residuais (CGR), o efeito de substituição alélica dos mesmos e a frequência genotípica dos *SNPs*.

Tabela 6 – Associação e efeito de substituição alélica de *SNPs* ligados ao controle de apetite na ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar

Variável	Genótipo (Associação)			P ¹	Ef. Sub. T > A	P ²	Domin.	P ³
<i>PDE3B</i>	TT (208)	TA (37)	AA (6)					
IMS	9,72	9,13	10,07	0,04	0,43	0,03	0,77	0,14
GMD	1,57	1,55	1,70	0,76	0,00	0,97	0,08	0,46
CA	6,57	6,25	6,43	0,28	0,26	0,14	0,25	0,56
CAR	0,08	-0,33	0,27	0,11	0,33	0,05	0,33	0,42
GPR	-0,02	0,06	0,16	0,48	-0,05	0,22	0,01	0,90
CGR	-0,09	0,39	-0,11	0,13	-0,38	0,05	-0,31	0,52
<i>NPY</i>	AA (6)	AG (2)	GG (243)		A > G			
IMS	9,43	8,07	9,61	0,49	-0,25	0,56	1,45	0,30
GMD	1,65	1,47	1,55	0,85	0,03	0,71	0,13	0,66
CA	6,20	6,22	6,52	0,90	-0,18	0,66	0,14	0,90
CAR	-1,34	0,16	0,03	0,47	-0,32	0,37	0,93	0,41
GPR	0,41	0,19	-0,01	0,73	0,07	0,43	-0,04	0,88
CGR	1,76	0,03	-0,05	0,49	0,39	0,35	-0,98	0,46

¹Probabilidade do teste de associação

²Probabilidade do teste de efeito de substituição alélica

³Probabilidade do teste do efeito de dominância

Tabela 7 – Associação e efeito de substituição alélica de *SNPs* ligados ao transporte iônico na ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar

Variável	Genótipo (Associação)			P ¹	Ef. Sub.	P ²	Domin.	P ³
<i>ITPR1</i>	CC (117)	CT (110)	TT (24)		C > T			
IMS	9,53	9,62	10,13	0,22	0,21	0,15	0,21	0,34
GMD	1,54	1,57	1,65	0,31	0,04	0,15	0,03	0,59
CA	6,59	6,51	6,49	0,86	-0,07	0,60	0,03	0,87
CAR	-0,13	0,05	0,00	0,39	0,14	0,23	0,12	0,51
GPR	-0,03	-0,04	0,12	0,83	0,02	0,56	0,01	0,94
CGR	0,11	-0,08	0,12	0,58	-0,12	0,38	-0,11	0,59
<i>TRPM3</i>	CC (20)	CT (65)	TT (166)		C > T			
IMS	9,85	9,57	9,72	0,65	0,01	0,92	0,22	0,36
GMD	1,55	1,57	1,56	0,95	0,00	0,90	-0,01	0,77
CA	6,56	6,42	6,65	0,40	0,11	0,34	0,19	0,35
CAR	0,26	-0,01	-0,01	0,44	-0,01	0,90	0,24	0,20
GPR	-0,03	0,03	-0,02	0,72	0,00	0,99	-0,04	0,42
CGR	-0,29	0,04	-0,01	0,46	0,02	0,90	-0,28	0,21

¹Valor de P do teste de associação

²Valor de P do teste de efeito de substituição alélica

³Probabilidade do teste do efeito de dominância

Os quatro *SNPs* avaliados foram polimórficos em bovinos da raça Nelore. Isso nem sempre acontece quando *SNPs* encontrados em animais taurinos (*Bos taurus*) depositados em conjuntos de dados genômicos são estudados em animais zebuínos (*Bos indicus*), na qual podem apresentar somente uma forma genotípica (GOMES et al., 2013). Os *SNPs* dos animais avaliados nesse estudo possuíam todos os alelos, mesmo que para os *SNPs* dos genes da regulação de apetite pelo menos um dos genótipos tinha uma frequência genotípica muito baixa.

Os testes de associação e de efeito de substituição alélica não demonstraram efeito dos *SNPs* em genes responsáveis pelo transporte iônico em qualquer uma das características fenotípicas. O *SNP* localizado no gene *NPY* também não apresentou associação ou efeito de substituição alélica significativos ($P > 0,05$) para nenhuma das variáveis, contrariando estudos de animais taurinos para esse mesmo *SNP* que encontraram associação com ingestão e eficiência alimentar (BARENDSE et al., 2007, SHERMAN et al., 2008).

Já para o *SNP* localizado no gene *PDE3B*, foram observados associação e efeito de substituição alélica significativos ($P \leq 0,05$) para a ingestão de matéria seca, além de efeito de

substituição alélica foi significativo ($P \leq 0,05$). O *SNP* do gene *PDE3B* foi significativo em animais taurinos para o consumo alimentar residual (BARENDSE et al., 2007).

O gene que codifica a enzima fosfodiesterase do tipo 3 (*PDE3B*) está localizado no cromossomo 15 dos bovinos e essa enzima pode ser rapidamente ativada pela insulina, além de degradar a adenosina monofosfato cíclico (AMPc) reduzindo a lipólise das células adiposas (BARENDSE et al., 2007). Adicionalmente, o *PDE3B* medeia os efeitos da insulina sobre a secreção de leptina, serotonina e adiponectina que estão relacionados também com o controle de ingestão (CONG et al., 2007). Essa relação pode explicar esse efeito do *SNP* no gene *PDE3B* na ingestão de matéria seca.

4. CONCLUSÃO

A avaliação de *SNPs* que estão relacionados com a ingestão, ganho de peso e eficiência alimentar deve ser realizada em maior escala tanto em número de *SNPs* avaliados, como em bovinos testados. Os marcadores moleculares do tipo *SNP* em genes ligados ao controle de apetite e transporte iônico são polimórficos em bovinos Nelore.

Não foi observada associação dos *SNPs* com as medidas de eficiência alimentar avaliadas, com exceção do *PDE3B*. O entendimento desses processos fisiológicos podem fornecer informações de genes que podem ter relação com essas importantes características em bovinos da raça Nelore, como a influência do gene *PDE3B* na ingestão e eficiência alimentar.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARENDSE, W.; REVERTER, A.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B.E.; BARRIS, W.; THOMAS, M.B. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics** 176, 1893–1905, 2007.
- CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Hormone and Metabolic Research** 28, 619–32, 1996.
- CLAPHAM, D.E.; JULIUS, D.; MONTELL, C.; SCHULTZ, G. International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacology Revision* 57, 427–450, 2005.
- CONG, L.; CHEN, K.; LI, J.; GAO, P.; LI, Q.; MI, S.; WU, X.; ZHAO, A.Z. Regulation of adiponectin and leptin secretion and expression by insulin through a PI3K-*PDE3B* dependent mechanism in rat primary adipocytes. **Biochemical Journal** 403, 519–525, 2007.
- FALCONER, D.S.; MACKAY, T.F.C. **Introduction to Quantitative Genetics**. 4th ed. Longman Scientific and Technical, New York. 1996.
- GOMES, R.C.; SILVA, S.L.; CARVALHO, M.E.; REZENDE, F.M.; PINTO, L.F.B.; SANTANA, M.H.A.; STELLA, T.R.; MEIRELLES, F.V.; ROSSI JUNIOR, P.; LEME, P.R.; FERRAZ, J.B.S. Protein synthesis and degradation gene *SNPs* related to feed intake, feed efficiency, growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research** 12, 2923–2936, 2013.
- HUANG, L.; CHARDON, J.W.; CARTER, M.T.; FRIEND, K.L.; DUDDING, T.E.; SCHWARTZENTRUBER, J.; BOYCOTT, K.M. Missense mutations in *ITPR1* cause autosomal dominant congenital nonprogressive spinocerebellar ataxia. **Orphanet journal of rare diseases** 7(1), 67, 2012.
- OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCRSSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens** 39, 225–235, 1992.
- RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ARCHER, J.A.; ARTHUR, P.F. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Agricultural Research** 44, 441–452, 2004.
- SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J.D.; MURDOCH, B.M.; LI, C.; WANG, Z.; FU, A.; MOORE, S.S. Polymorphisms and haplotypes in the bovine neuropeptide Y, growth hormone receptor, ghrelin, insulin-like growth factor 2, and uncoupling proteins 2 and 3 genes and their associations with measures of growth, performance, feed efficiency, and carcass merit in beef cattle. **Journal of Animal Science** 86, 1–16, 2008.
- SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J.D.; BARTUSIAK, C.; MURDOCH, B.M.; MOORE, S.S. Fine mapping quantitative trait loci *QTL* for feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science** 87, 37–45, 2009.

CAPÍTULO III

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE AMPLO GENOMA DA INGESTÃO ALIMENTAR E CONSUMO ALIMENTAR RESIDUAL EM BOVINOS NELORE

RESUMO

A ingestão de alimentos desempenha um papel econômico fundamental em bovinos de corte, e está relacionada com a eficiência alimentar, ganho de peso e características de carcaça. No entanto, os fenótipos obtidos para consumo de matéria seca e eficiência alimentar são escassos quando comparados com outras medidas, tais como ganho de peso e características de carcaça. O uso de informações genômicas pode melhorar o poder de inferência de estudos dessas medidas, identificando regiões genômicas que afetam esses fenótipos. Este trabalho realizou o estudo de associação ampla do genoma (*GWAS*) para ingestão de matéria seca (IMS) e consumo alimentar residual (CAR) de 720 bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*). No geral, o teste de associação não mostrou uma região genômica com alta evidência, relacionada às duas variáveis, como esperado, pois estas têm regulação fisiológica controlada por centenas de genes. Três *SNPs* ultrapassaram o limite para o teste múltiplo de Bonferroni para IMS e dois *SNPs* para CAR. Estes marcadores estão localizados nos cromossomos 4, 8, 14 e 21 em regiões próximas a genes que regulam o apetite e transporte de íons. Este estudo mostrou o *GWAS* de IMS e CAR para identificar regiões genômicas associadas a esses fenótipos em bovinos da raça Nelore. Alguns genes e *QTLs* descritos anteriormente, em outras raças (*Bos taurus*), que influenciam essas medidas são confirmados neste estudo.

Palavras chave: *Bos indicus*, bovinos de corte, genômica, *GWAS*, eficiência alimentar, zebu

1. INTRODUÇÃO

A ingestão alimentar desempenha um importante papel econômico e pode representar os maiores custos na produção de bovinos de corte, em todo o sistema de produção de bovinos (ANDERSON et al., 2005). O consumo de alimentos, em animais ruminantes é avaliado pela ingestão de matéria seca (IMS), que está relacionada com o ganho de peso, características de carcaça e eficiência alimentar (NKRUMAH et al., 2007). Portanto, é uma variável relevante para todo o sistema de produção de carne e, possivelmente, uma medida a ser incluída nos programas de melhoramento genético que ainda não a utilizam.

Apesar do melhoramento genético se direcionar, primeiramente, para as características de crescimento e reprodução, outras variáveis devem ser levadas em consideração, isso porque a melhora nas taxas de ganho de peso pode levar a um concomitante aumento no tamanho adulto do rebanho e principalmente na elevação dos custos de manutenção dos animais (ARCHER et al., 1999). Por essa razão, os objetivos da seleção genética devem ser devidamente delineados pensando no equilíbrio entre as medidas de crescimento e outras características essenciais, como reprodutivas (PHOCAS et al., 1998), de qualidade de carne e de eficiência alimentar (ARCHER et al., 1999).

Nas últimas décadas, muitos esforços foram feitos para melhor balancear essa relação do ganho de peso com a ingestão nos bovinos de corte, porém, algumas medidas acabaram revelando-se menos efetivas em reduzir a resposta correlacionada negativa do aumento do tamanho corporal adulto, como a eficiência alimentar bruta (KENNEDY; VAN DER WERF; MEUWISSEN; 1993; ARCHER et al., 1999). Neste cenário, uma medida que foi proposta na década de 60 (KOCH et al., 1963), qual seja, o consumo alimentar residual (CAR), acabou ganhando mais espaço por ser independente fenotipicamente do crescimento e do tamanho corporal e voltada para a redução da ingestão (KOCH et al., 1963; KENNEDY; VAN DER WERF; MEUWISSEN; 1993; ARCHER et al., 1999; HERD; BISHOP, 2000; ARTHUR et al., 2001). Essa independência fenotípica se deve ao fato do CAR ser calculado como a diferença entre a ingestão observada e a ingestão estimada, por uma equação de regressão da IMS sobre o ganho médio diário (GMD) e o peso vivo médio (PVM).

Tanto a ingestão de matéria seca quanto o consumo alimentar residual em bovinos apresentam suficiente variabilidade e herdabilidade para responderem à seleção (HERD; BISHOP, 2000; ARTHUR et al., 2001; NKRUMAH et al., 2007). Entretanto, ainda não existe um consenso sobre como essas medidas devem ser consideradas nos índices de seleção

genética. Neste contexto, existem duas limitações principais: as dificuldades inerentes à obtenção de fenótipos para estas características e a forma de utilizar esta informação no processo de seleção (ROLF et al., 2011). Na raça Nelore (*Bos indicus*) estas dificuldades são ainda maiores, em virtude do pequeno número de animais com fenótipo disponível para IMS e CAR, e o escasso conhecimento sobre os parâmetros genéticos dessas medidas no Nelore. No entanto, sabe-se que a variabilidade fenotípica de CAR na raça Nelore é semelhante à observada em animais taurinos (*Bos taurus*) e compostos, com o desvio-padrão variando entre 0,31 e 0,69 kg de MS/dia (SOBRINHO, 2011; GOMES et al., 2012; SANTANA et al., 2012), fato que abre a possibilidade de se aplicar a seleção genética voltada para essas variáveis.

Uma possível estratégia para contornar o problema do número de animais avaliados para IMS e CAR seria a utilização da informação genômica. Estudos de associação de amplo genoma (GWAS) permitiram identificar subconjuntos de marcadores que explicam uma proporção importante da variação dessas características (BARENDSE et al., 2007; MOORE; MUJIBI; SHERMAN; 2009; ROLF et al., 2011). O uso da informação de tais marcadores possibilitaria conduzir seleção para eficiência alimentar a partir de um número muito menor de dados fenotípicos do que seria necessário para viabilizar um esquema de seleção tradicional.

Em diversos estudos constatou-se a viabilidade de utilizar a informação de polimorfismos de nucleotídeo único (*SNP*), no intuito de identificar regiões do genoma que afetam fenótipos de interesse, visando melhorar os sistemas de seleção para características de desempenho, reprodução e carcaça em bovinos de corte (COLE et al., 2009; SNELLING et al., 2010; BOLORMAA et al., 2011). Adicionalmente, os estudos de marcadores moleculares em bovinos foram potencializados com o lançamento do genoma de referência bovino (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2009) e com a melhora na tecnologia dos produtos de genotipagens, que realizam a prospecção veloz e automatizada de centenas de milhares de *SNPs*, possibilitando os GWAS.

O desenvolvimento de painéis comerciais de *SNPs* de alta densidade abriram uma gama de oportunidades de estudos dessa natureza (BOLORMAA et al., 2011). Além disso, a imputação de genótipos provou ser uma ferramenta eficaz para aumentar o poder dos GWAS, pelo aumento do número de animais genotipados e pode vir a ser uma estratégia valiosa para reduzir ainda mais o custo de genotipagem (VANRADEN et al., 2011).

Contudo, a grande maioria dos GWAS foram realizados em animais taurinos, assim como os primeiros *chips* de milhares de *SNPs* foram desenvolvidos baseados nesse tipo de animal, e isso faz com que diversos *SNPs*, descritos como sendo polimórficos em taurinos, não

sejam informativos em animais zebuínos (*Bos indicus*), principalmente da raça Nelore (GOMES et al., 2013; UTSONOMIYA et al., 2013). Somente nos últimos anos, os GWAS foram executados em animais zebuínos a partir do desenvolvimento de novos produtos de genotipagem otimizados também levando esse tipo de animal. Os objetivos desse estudo foram: identificar *SNPs* associados com a IMS e CAR em bovinos da raça Nelore, utilizando painéis de média (Illumina BovineSNP50 v2 BeadChip) ou alta densidade (Illumina BovineHD) e um painel combinando a informação de animais genotipados em média e alta densidade por meio de imputação; e ainda, explorar as regiões ao redor dos marcadores identificados buscando possíveis genes com funções conhecidas próximos a esses *SNPs*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. OBTENÇÃO DOS FENÓTIPOS

O estudo foi realizado a partir de uma compilação de 11 experimentos de ingestão e eficiência alimentar, conduzidos no Brasil de 2007 a 2012. Um experimento ocorreu na região Sul (SANTANA et al., 2012), oito no Sudeste (GOMES et al., 2012; 2013) e dois no Centro-Oeste. Nesses testes foram obtidos os fenótipos de 720 tourinhos e novilhos, com 550 ± 115 dias de idade e 380 ± 51 kg de peso vivo iniciais. Três diferentes instalações para medição das variáveis fenotípicas foram utilizadas, sistemas automatizados de baias coletivas (Calan gates e GrowSafe) e sistema de baias individuais. A duração foi de no mínimo 70 dias, sendo que a ingestão alimentar foi mensurada diariamente e posteriormente ajustadas para matéria seca (IMS).

Durante os testes, obteve-se o peso vivo médio (PVM) de cada animal por pesagens periódicas sem jejum alimentar, e o ganho de peso diário (GMD) foi calculado como o coeficiente angular da regressão linear dos pesos em relação aos dias em teste. O consumo alimentar residual (CAR) foi considerado o resíduo da equação de regressão da IMS sobre o GMD e o PVM (KOCH et al., 1963), porém, por se tratar de diferentes testes, formaram-se grupos de contemporâneos (GC) de tal modo que, animais do mesmo teste foram considerados como um GC. Dentro de três desses GC haviam tourinhos e novilhos castrados, portanto a condição sexual (CS) também foi incluída como covariável no modelo estatístico. O cálculo do CAR foi feito pelo procedimento PROC REG do pacote estatístico SAS 9.3 e a equação geral foi a seguinte:

$$IMS = \beta_0 + \beta_1 GMD + \beta_2 PVM^{0,75} + \beta_3 CS + \beta_4 GC + \varepsilon_1$$

O CAR e a IMS foram testados quanto à normalidade dos dados (Shapiro-Wilk) e à homocedasticidade dos resíduos do modelo (Breusch-Pagan). Também realizou-se o controle de dados *outliers* (IMS, GMD, PVM e CAR), no qual os registros fora da amplitude de média ± 3 desvios padrão foram considerados como possíveis erros de mensuração e acabaram sendo excluídos da análise.

2.2. EXTRAÇÃO DE DNA, CONTROLE DE QUALIDADE DAS AMOSTRAS E DOS *SNPs*

O sangue foi colhido de todos os animais avaliados por punção da jugular em tubos com K2 EDTA como anticoagulante. As amostras foram armazenadas a 4°C pós colheita e, posteriormente, utilizadas para extração do DNA, por precipitação de NaCl (OLERUP; ZETTERQUIST, 1992). Após a extração, a qualidade foi avaliada pela determinação da razão A260/280 em biofotômetro, sendo que as amostras só eram aceitas quando se enquadravam nos valores de 1,8 a 2,0, concomitantemente, esse DNA foi quantificado e as amostras diluídas até a concentração de no mínimo 50 ng/μl e no máximo 150 ng/μl para posterior genotipagem.

As genotipagens foram feitas em dois tipos de *chips*, o Illumina BovineHD BeadChip® contendo 777.962 *SNPs* (MATUKUMALLI et al., 2011) e o Illumina BovineSNP50 v2 BeadChip® com 54.609 *SNPs* (MATUKUMALLI et al., 2009), ambos no ensaio padrão *Infinium Assay II* para a plataforma HiScanSQ® (Illumina Inc., San Diego, CA). No total, 720 animais tiveram seus genótipo conhecidos, sendo 336 tourinhos e novilhos no BovineSNP50 (*dataset* 50k) e 384 tourinhos no BovineHD (*dataset* HD). Como o BovineSNP50 está contido no painel BovineHD, as amostras do HD também foram incluídas no *dataset* 50k para aumentar o tamanho amostral. Verificou-se a existência de amostras duplicadas pelo cálculo da proporção de alelos idênticos por estado (*IBS*) de todos os pares de indivíduos possíveis. Para o cálculo de *IBS*, consideraram-se genótipos para 5.000 e 20.000 marcadores tomados aleatoriamente no caso do BovineSNP50 e BovineHD, respectivamente, e qualquer par de amostras com *IBS* ≥ 95% foi excluído.

Para o GWAS, os *SNPs* foram submetidos a um controle de qualidade no qual, somente os *SNPs* com coordenada genômica conhecida e contidos nos cromossomos autossômicos foram considerados, isso porque os cromossomos sexuais e mitocondrial possuem forma de segregação diferente dos autossômicos. Amostras com *Call rate* (CR) inferior a 90% foram retiradas do estudo. Os marcadores foram removidos caso apresentassem frequência alélica mínima ($MAF \leq 2\%$), *Call rate* ≤ 95% e valor de P do teste exato de Fisher para Equilíbrio de Hardy-Weinberg ($HWE \leq 1 \times 10^{-5}$). Esse controle de qualidade foi realizado no software R v2.15.2 utilizando scripts desenvolvidos para este fim (UTSONOMIYA et al., 2013) e o pacote GenABEL v1.7-6 (AULCHENKO et al., 2007).

2.3. IMPUTAÇÃO DE GENÓTIPOS

No intuito de aumentar o tamanho amostral, uma análise de imputação foi realizada para combinar as informações disponíveis dos animais genotipados com o BovineSNP50 e as disponíveis nos genotipados no BovineHD. As informações do HD foram utilizadas em um estudo preliminar para verificar a eficiência da imputação do painel de 50k para o HD. Novamente, foi efetuado um controle de qualidade dos *SNPs* na qual foram excluídos: *SNPs* localizados em cromossomos não autossômicos, $CR \leq 97\%$, $HWE \leq 1 \times 10^{-6}$ e CR de amostra $\leq 90\%$.

Em seguida, uma amostra aleatória de 290 animais (genotipados em painel de alta densidade) foi considerada como população referência para a análise de imputação, enquanto os restantes animais desse painel foram incluídos num conjunto de validação. Exceto para os marcadores em comum entre os dois microarranjos, os animais genotipados no BovineHD de validação tiveram os seus genótipos mascarados e imputados, o que permitiu simular a imputação de 50k ao HD. Essas análises foram executadas no programa FImpute 2.2 (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL; 2012), utilizando-se os genótipos HD em conjunto com as informações de pedigree. A eficiência de imputação foi avaliada por meio da proporção de genótipos imputados corretamente. Posteriormente a esse controle de qualidade, a imputação foi realizada da mesma forma para todos os animais do 50k, na qual todos animais genotipados em HD que passaram nos critérios do controle de qualidade (362) foram considerados como população referência. O *dataset* final dos animais (HDimp) ficou com 672 animais e 290,620 *SNPs*, que foram imputados com precisão superior a 95%.

2.4. SUBESTRUTURA POPULACIONAL

Os *datasets* dos animais HD e 50k continham registros fenotípicos obtidos em 5 e 11 diferentes experimentos, respectivamente. Dentro de cada experimento os animais eram muito semelhante entre si, porém, entre os experimentos, os animais eram de linhagens distintas e submetidos a diferentes critérios de seleção genética. Portanto, a estratificação genética foi verificada por meio da análise de coordenadas principais (PCoA). Inicialmente, realizaram-se os cálculos dos coeficientes de parentescos genômicos entre todos os indivíduos fundamentado em *SNPs* aleatórios (AMIM et al., 2007), sendo 10.000 para o 50k e 100.000 para o HD e HDimp. O parentesco genômico foi transformado em quadrado das distâncias Euclidianas e

sujeitas a decomposição espectral via escalonamento multidimensional clássico (MARDIA, 1978).

2.5. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO

O teste de associação genômica teve como referência uma metodologia em dois passos baseada no método de componentes de variâncias chamada *GRAMMAR-Gamma* (SVISHCHEVA et al., 2012). Essa metodologia é computacionalmente eficiente, que corrige as análises de associação para confundidores devido a subestrutura populacional e parentesco e é uma aproximação não viesada do teste de razão de verossimilhança (*LRT*), que é considerado padrão ouro na literatura para *GWAS* (AULCHENKO; DE KONING; HALEY; 2007; SVISHCHEVA et al., 2012).

O primeiro passo para a análise de associação foi a utilização da matriz de variância/covariância para corrigir parentesco e subestrutura populacional e o cálculo do fator *GRAMMAR-Gamma*. Para garantir confiabilidade das estimativas, foi calculado o fator de inflação/deflação (λ) para correção do controle genômico (DEVLIN; ROEDER; WASSERMAN; 1999). O segundo passo consistiu em: associar o fenótipo com os genótipos sem a matriz de variância/covariância e ajustar as estimativas dos efeitos dos *SNPs* para o fator *GRAMMAR-Gamma* (SVISHCHEVA et al., 2012).

O modelo utilizado foi o poligênico (THOMPSON; SHAW, 1990) e o teste de associação variou dependendo do fenótipo utilizado e da população genotipada: animais genotipados em 50k e HDimput o modelo poligênico para CAR incluiu a idade e a CS como covariáveis e para os genotipados em HD somente a idade foi incluída no modelo. No caso da IMS, a CS foi incluída nos 50k e HDimput juntamente com o PVM como covariáveis e os animais genotipados em HD somente o PVM foi adicionado. Os resultados foram apresentados na forma de *Manhattan Plots* no qual foram plotados os valores de $-\text{Log}_{10}(P)$, corrigidos para λ e o limiar de Bonferroni ($\alpha = 0,05/N^{\circ} \text{SNPs}$) sendo considerado como significância. Todos os procedimentos descritos nesse item foram realizados no R v2.15.2, utilizando o pacote GenABEL v1.7-6 (AULCHENKO et al., 2007).

2.6. EXPLORAÇÃO DA REGIÃO AO REDOR DOS *SNPs* SIGNIFICATIVOS

Os *SNPs* que superaram o limiar do ajuste de Bonferroni foram descritos e os seus efeitos de substituição alélica calculados, a proporção da variância fenotípica explicada por tais *SNPs* também foi estimada pela fórmula abaixo:

$$VAR(\%) = \frac{2pq\beta^2}{S^2} * 100$$

Onde: p e q são as frequências dos alelos, β^2 é o quadrado do efeito de substituição alélica e S^2 é a variância total do fenótipo.

Adicionalmente, eles foram explorados quanto a sua localização genômica (genes ao redor e possíveis *QTLs* já mapeados para IMS e CAR). A exploração da região buscou genes com funções conhecidas que se encontrassem a no máximo 100 kb de distância desses *SNPs* no *Ensembl genes 73* (KINSELLA et al., 2011) utilizando a montagem UMD v3.1 (ZIMIN et al., 2009). A busca de *QTLs* foi examinada no *cattle QTLdb database* (HU et al., 2013) e os *QTLs* já descritos tanto para IMS quanto para CAR a 50 Mb foram verificados e relacionados com os fenótipos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. FENÓTIPOS E CONTROLE DE QUALIDADE

Para os 3 *datasets* das duas variáveis fenotípicas, não foram encontradas evidências para desvio de normalidade e homocedascidade dos resíduos dos modelos, pelo teste de Shapiro-Wilk e Breusch-Pagan ($P > 0,05$), respectivamente. No entanto, pelo controle de *outliers* foram retiradas 4 amostras do *dataset* HD e 50k para IMS e 2 amostras dos mesmos para CAR.

Com relação aos critérios para exclusão das amostras e dos *SNPs*, os resultados desse controle de qualidade, do 50k e HD, estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Controle de qualidade para remoção de *SNPs*

Critério	HD (<i>SNPs</i>)	HD (%)	50k (<i>SNPs</i>)	50k (%)
Localização*	42.669	5,5%	1.723	3,2%
Call rate	104.602	13,4%	9.253	16,9%
<i>MAF</i>	173.564	22,3%	13.728	25,1%
<i>HWE</i>	20.529	2,6%	16.74	3,1%
Total de <i>SNPs</i> excluídos	341.374	43,9%	26.378	48,3%

*No critério de localização genômica foram excluídos *SNPs* sem coordenada genômica conhecida e os localizados em cromossomos não autossômicos.

Os limiares dos critérios para exclusão de *SNPs* ainda são questionáveis. A acurácia desejada de cada critério depende fortemente do conjunto de dados e informações que se espera de cada tipo de *GWAS*. O critério que mais elimina *SNPs* e, possivelmente, seja o mais controverso, é a frequência alélica mínima (*MAF*). No geral, observa-se uma tendência a utilizar 5% de *MAF* para estudos de *GWAS* (SNELLING et al., 2010; ROLF et al., 2011; BOLORMAA et al., 2011; MUJIBI et al., 2011; SNELLING et al., 2011; PRYCE et al., 2012), no entanto, no presente estudo foi adotado 2% de *MAF*, mesmo com cerca de 25% dos *SNPs* sendo eliminados por esse critério, outros estudos também adotaram o mesmo patamar (WANG et al., 2005; ANDERSON et al., 2010; UTSONOMIYA et al., 2013).

Os *datasets* finais, após os critérios de controle de qualidade, ficaram com: 672 amostras no 50k com 28.231 *SNPs* e 365 amostras no HD com 436.588 *SNPs*.

3.2. IMPUTAÇÃO E SUBESTRUTURA POPULACIONAL

O número de *SNPs* imputados com mais de 95% de acurácia foi de 290.620 e o número de amostras restantes foi de 672 para o *dataset* HDimp. A mediana da acurácia da imputação foi de 97,2% com média de 94,6%. Somente os genótipos imputados com mais de 95% de precisão foram utilizados no *GWAS*. Os benefícios da utilização da imputação foram observados nesse estudo pois, no *dataset* HDimp foram encontrados regiões que se associavam significativamente com os fenótipos, fato não observado no *dataset* HD mesmo com ambos tendo o limiar de Bonferroni muito próximos. Mesmo que o número de *SNPs* do *dataset* de animais imputados seja bem inferior ao *dataset* HD (290.620 vs 436.588), essa ferramenta possibilitou um estudo de associação mais robusto pelo aumento considerável no número de amostras (672 vs 365).

Na análise de coordenadas principais (*PCoA*), o método *GRAMMAR-Gamma* corrigiu implicitamente as estimativas para os efeitos de subestrutura populacional, por considerar o modelo poligênico no primeiro passo desse método. Os gráficos do estudo de *PCoA* são demonstrados nas Figuras 1, 2 e 3, onde cada cor representa um grupo de contemporâneos.

Figura 1 – Análises de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (50k)

Figura 2 – Análises de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (HD)

Figura 3 – Análises de coordenadas principais baseada no coeficiente de parentesco genômico (HDimp)

3.3. GWAS E REGIÕES GENÔMICAS PRÓXIMAS DOS *SNPs* ASSOCIADOS

O fator de deflação/inflação (λ), calculado para todas as análises de associação, foi inferior a 1.1, portanto, considerado aceitável e podendo ser utilizado na abordagem da correção do controle genômico. Os valores de P dos *SNPs*, ao longo dos cromossomos, são mostrados na forma de *Manhattan Plots* para IMS na Figura 4 e para o CAR, na Figura 5 com o limiar representado pela linha de significância de Bonferroni.

Figura 4 - *Manhattan plots* dos $-\text{Log}_{10}(P)$ para IMS em bovinos da raça Nelore.

(1) *dataset* 50k, (2) *dataset* HD, (3) *dataset* HDimp

Figura 5 - *Manhattan plots* dos $-\text{Log}_{10}(P)$ para CAR em bovinos da raça Nelore.

(1) *dataset* 50k, (2) *dataset* HD, (3) *dataset* HDimp

Os *SNPs* significativos para Bonferroni, em cada uma das análises de IMS e CAR, estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 – Descrição dos *SNPs* mais significativos para IMS e CAR

Variável/Dataset	SNP	CHr	BP (Mb) ¹	MAF	Ef. Sub. ²	VAR(%) ³	P
IMS/50k	rs109784719	14	44,9	0,13	-1,83	9,59	$2,28 \times 10^{-06}$
IMS/50k	rs29024524	8	28,7	0,10	1,60	7,64	$2,22 \times 10^{-06}$
IMS/HDimp	rs134003539	4	73,5	0,38	0,36	1,78	$6,53 \times 10^{-08}$
CAR/50k	rs41660853	8	4,5	0,12	0,48	4,65	$8,13 \times 10^{-07}$
CAR/HDimp	rs135777172	21	71,0	0,09	0,89	11,1	$5,37 \times 10^{-08}$

¹BP = posição no cromossomo em milhões de pares de bases

²Ef. Sub = efeito de substituição alélica (MS/dia)

³Var = proporção da variância fenotípica explicada

Os GWAS de milhares de *SNPs*, ao longo dos 29 cromossomos autossômicos, não mostraram regiões altamente evidentes na IMS e no CAR de tourinhos e novilhos da raça Nelore, como suposto para essas variáveis que têm sua regulação fisiológica controlada por muitos genes. Esse fato foi relatado em outros trabalhos que também avaliaram a ingestão de

matéria seca e o consumo alimentar residual em diversas raças bovinas (BOLORMAA et al., 2011; ROLF et al., 2011) e CAR em suínos (ONTERU et al., 2013).

Os benefícios do uso da imputação foram observados nesse estudo pois, no *dataset* HDimp, foram encontradas regiões significativamente associadas com os fenótipos, que não foram detectadas no *dataset* HD, mesmo com o limiar de Bonferroni sendo pouco superior no HD ($1,14 \times 10^{-7}$ vs $1,72 \times 10^{-7}$). No entanto, o número de *SNPs* do HDimp é bem inferior ao HD (290.620 vs 436.588), a análise de imputação permitiu um estudo de associação mais robusto por aumentar consideravelmente o número de amostras analisadas (672 vs 365).

A comparação dos marcadores associados nos diferentes testes, dentro de uma mesma variável, demonstrou evidências de que regiões associadas demonstradas em um, nem sempre ocorriam no outro. Alguns marcadores presentes em uma análise não necessariamente estarão presentes na outra, principalmente devido ao tamanho amostral ser discrepante dos animais genotipados em HD. No contraste dos gráficos das duas variáveis, mesmo ambas tendo alta correlação genética e fenotípica entre si (ARTHUR et al., 2001; NKRUMAH et al., 2007; SANTANA et al., 2012), nem sempre as mesmas regiões apresentaram forte associação com estas características, isso pode ser parte da explicação da diferença entre os mecanismos fisiológicos que regulam o CAR, pois estes não são exatamente os mesmos que regulam a IMS. Por outro lado, regiões com efeito importante sobre as duas características sugerem a existência de efeitos pleiotrópicos sobre essas variáveis (SHERMAN et al., 2008; SHERMAN; NKRUMAH; MOORE; 2010).

Três *SNPs* superaram o limiar do teste múltiplo de Bonferroni para a IMS e dois *SNPs* também o fizeram para CAR. Diversos marcadores já foram reportados como sendo associados com essas duas variáveis na literatura (BARENDSE et al., 2007; SHERMAN et al., 2008; MOORE; MUJIBI; SHERMAN; 2009; SHERMAN; NKRUMAH; MOORE; 2010; ROLF et al., 2011; SNELLING et al., 2011; MUJIBI et al., 2011; PRYCE et al., 2012; ONTERU et al., 2013), porém, as metodologias utilizadas para esse fim são diversas, além de populações avaliadas extremamente distintas, o que pode acarretar que as associações realizadas em uma determinada raça e população podem não ser aplicáveis em outras (HAYES et al., 2009). Esses *SNPs* podem explicar parte da variância fenotípica, de tal modo que poucos marcadores chegam a explicar mais de 30% da variação no CAR (SHERMAN et al., 2008; ROLF et al., 2011; ONTERU et al., 2013).

Doravante, esse cálculo é realizado levando em consideração as frequências alélicas, o efeito de substituição dos alelos e a variância fenotípica da característica, e essa predição pode

ser superestimada dependendo desses fatores, principalmente quando se assume independência entre os marcadores considerados neste cálculo. Os efeitos de substituição alélica dos *SNPs* foram variados entre os painéis, sendo que esse efeito na IMS foi maior para os marcadores do painel 50k, e para o CAR no *dataset* HDimp. Essa diferença foi observada diretamente na proporção da variância explicada pelo *SNPs*, associados dos respectivos *datasets*.

A exploração da região ao redor dos 5 *SNPs*, que foram associados com a IMS e com o CAR, está demonstrada na Tabela 10 onde é possível observar todos os genes com funções conhecidas, que estão ao redor (100 kb) desses *SNPs*. Diversos outros genes estão a distâncias menores que essa, no entanto não foram incluídos por ainda possuírem função desconhecida de acordo com *Ensembl genes 73 UMD v3.1*. Adicionalmente, a distância dos *QTLs* mapeados para as duas variáveis fenotípicas mais próximos desses *SNPs* foram mostrados na mesma tabela.

Tabela 10 – Genes e *QTLs* próximos aos *SNPs* associados com CAR e IMS

<i>SNP</i> (Variável)	Gene	Gene ID ^a	Dist gene (kb) ^b	Sentido	Dist <i>QTL</i> (Mb) ^c	<i>QTL</i> ID ^d	Nome completo gene (Descrição)
rs109784719 (IMS)	<i>STMN2</i>	534991	27,4	+	44,1	4365	<i>Stathmin-like 2</i>
rs29024524 (IMS)	<i>CCDC171</i>	538331	0	-	12,1	4425	<i>Coiled-coil domain containing 171</i>
	<i>PSIP1</i>	282011	48,3	+			<i>PC4 and SFRS1 interacting protein 1</i>
	<i>SNAPC3</i>	511366	89,3	-			<i>Small nuclear RNA activating comp 3</i>
rs134003539 (IMS)	<i>ZNF804B</i>	100295505	0	+	4,5	10584	<i>Zinc finger protein 804B</i>
rs41660853 (CAR)	<i>ANXA10</i>	505322	0	+	7,1	4353	<i>Annexin A10</i>
	<i>DDX60</i>	787280	0	-	7,9	5274	<i>DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypep</i>
rs135777172 (CAR)	<i>GPR132</i>	539146	14,8	+	2,2	4462	<i>G protein-coupled receptor 132</i>
	<i>CDCA4</i>	527837	40,7	-			<i>Cell division cycle associated 4</i>
	<i>AHNAK2</i>	527701	84,9	-			<i>AHNAK nucleoprotein 2</i>
	<i>BRF1</i>	618161	93,3	-			<i>RNA polymerase III transcr init factor 90</i>

^aIdentificação do gene de acordo com a base de dados Ensembl genes 73

^bDistância em Mb do *SNP* para o gene citado na segunda coluna da própria tabela

^cDistância em Mb do *SNP* para o *QTL* mais próximo descrito na variável associada com o *SNP*

^dNúmero de identificação da região genômica com influência em medidas quantitativas (*QTL*) de acordo com o cattle *QTLdb* database

A respeito da localização dos *SNPs* relacionados com a IMS, o *SNP* rs109784719 (cromossomo 14) está a 27,4 kb do único gene próximo (*STMN2*), no entanto está na região do *QTL* 4365 descrito previamente para IMS (SHERMAN; NKRUMAH; MOORE; 2010). Em outros dois trabalhos foram encontrados *SNPs* associados com IMS no cromossomo 14 (ROLF et al., 2011; PRYCE et al., 2012), ambos em uma região próxima a genes como *PLAG1*, *RDHE2* e *CHCHD7*, que conhecidamente influenciam na estatura de várias espécies (PRYCE et al., 2012; UTSONOMIYA et al., 2013).

O *SNP* rs29024524, localizado no cromossomo 8, está no gene *CCDC171* e próximo a outros genes, além disso se encontra junto ao *QTL* 4425, que é uma parte do genoma com influência tanto para IMS quanto para CAR (BARENDSE et al., 2007). Outros dois *QTLs* (4353 e 5274) envolvidos com o CAR estão próximos a esse *SNP* e com o rs41660853, associado com o CAR. O rs41660853 se localiza próximo ao gene *CLCN3*, ligado a processos de transporte iônico e já reportado anteriormente como influente na eficiência alimentar (BARENDSE et al., 2007), corroborando um trabalho anterior que descreveu as diferenças metabólicas do CAR (RICHARDSON et al., 2004). Outros três estudos de associação genômica também indicaram a importância dessa região nessas variáveis (SHERMAN; NKRUMAH; MOORE; 2010; BOLORMAA et al., 2011; MUJIBI et al., 2011), com *SNPs* significativos para CAR e IMS, com destaque para dois deles, um por localizar *SNPs* nos genes ligados ao transporte iônico (MUJIBI et al., 2011) e outro trabalho em que 3 dos 9 *SNPs* principais estavam localizados no cromossomo 8 (BOLORMAA et al., 2011).

O sistema de transporte iônico pode responder por mais de 10% de todo o gasto energético de ruminantes (MCBRIDE; KELLY, 1990), portanto, animais com menores despesas energéticas para manter esse sistema podem, concomitantemente, direcionar melhor a energia consumida para outros processos, e isso pode influenciar a eficiência alimentar. O *SNP* rs135777172 também se encontra numa região de *QTL* (4462), já descrito para CAR, na parte final do cromossomo 21, onde existe uma abundância de genes que codificam diversos tipos de proteínas (KINSELLA et al., 2011).

Por fim, o *SNP* rs134003539 está em um locus já descrito como importante, tanto para a IMS quanto para o CAR (NKRUMAH et al., 2004; BARENDSE et al., 2007; BANOS et al., 2008; SHERMAN; NKRUMAH; MOORE; 2010; BOLORMAA et al., 2011; MUJIBI et al., 2011), a 4 Mb de distância do *QTL* (10584). Outros dois genes amplamente estudados em ambas variáveis fenotípicas também estão próximos, o gene que codifica o neuropeptídeo Y (*NPY*, Gene ID 504216) posicionado a 1,4 Mb de distância e o gene que codifica o hormônio leptina (*LEP*, Gene

ID 280836), a 19 Mb do *SNP* e inserido nesse *QTL*. Esses neuropeptídios e hormônios que controlam o apetite, o gasto energético e o metabolismo da gordura e glicose possuem uma relação entre si, essa relação parece ser mediada pela leptina. Esses compostos podem aumentar o apetite como o neuropeptídio Y, grelina, orexinas e noradrenalinas, ou mesmo podem ter efeito redutor no apetite como a própria leptina e serotonina (CAMPFIELD; SMITH; BURN, 1996). Além disso, esse *SNP* está no gene *ZNF804B* que é uma forma de proteína “*zinc finger*”, caracterizada pela coordenação e estabilização de um ou mais íons de zinco em diversos processos de trocas iônicas (KLUG; RODES, 1987).

De forma geral, os *GWAS* se apresentam como ferramenta interessante no sentido de identificar regiões genômicas que podem influenciar esses fenótipos. Outra possível vantagem desses estudos seria a criação de painéis menos densos voltado para uma raça de interesse contendo os *SNPs* direcionados a determinada característica. Isso poderia reduzir os custos empregados em uma possível seleção genética com o suporte de dados genômicos, melhorando as acurácias das estimativas de valor genético de animais jovens.

A identificação das regiões associadas com a IMS e com o CAR podem elucidar loci que influenciam essas variáveis e apontar possíveis mecanismos fisiológicos importantes. No presente estudo, algumas regiões promissoras foram identificadas, com efeito importante sobre IMS e CAR. Contudo, deve-se salientar que o nível de significância rigoroso adotado e o número animais genotipados podem ter contribuído para redução do poder de detecção do presente estudo, de modo que importantes regiões podem não ter sido identificadas, o que sugere a necessidade de futuros estudos que sejam delineados de modo a contornar tais limitações.

4. CONCLUSÃO

O presente trabalho mostrou os resultados do estudo de associação de amplo genoma em painéis de média e alta densidade, para identificar regiões genômicas associadas com a ingestão e eficiência alimentar. Acredita-se ser o primeiro estudo realizado em animais da raça Nelore para ingestão de matéria seca e consumo alimentar residual. Os resultados sugerem que CAR e IMS são, em parte, influenciadas por loci próximos de regiões previamente descritas e esses resultados obtidos em animais zebuínos são embasados pela literatura de outras raças.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFIAS

- ANDERSSON, C.A.; PETTERSON F.M.; CLARKE G.M.; CARDON, L.R.; MORRIS, A.P.; ZONDERVAN, K.T. Data quality control in genetic case-control association studies. **Nature Protocols** 5(9), 1564-1573, 2010.
- ANDERSON, R.V.; RASBY, R.J.; KLOPFENSTEIN, T.J.; CLARK, R.T. An evaluation of production and economic efficiency of two beef systems from calving to slaughter. **Journal of Animal Science** 83, 694–704, 2005.
- ARCHER, J.A.; RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ARTHUR, P.F. Potential for selection to improve efficiency of feed use in beef cattle: A review. **Australian Journal of Agricultural Research** 50, 147–161, 1999.
- ARTHUR, P.F.; RENAND, G.; KRAUSS, D. Genetic and phenotypic relationships among different measures of growth and feed efficiency in young Charolais bulls. **Livestock Production Science** 68, 131–139, 2001.
- AULCHENKO, Y.S.; RIPKE, S.; ISAACS, A.; VAN DUIJN, C.M. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. **Bioinformatics** 23(10), 1294–1296, 2007.
- 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** 177, 577–585, 2007.
- BANOS, G.; WOOLLIAMS, J.A.; WOODWARD, B.W.; FORBES, A.B.; COFFEY, M.P. Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. **Journal of Dairy Science** 91, 3190–3200, 2008.
- BARENDSE, W.; REVERTER, A.; BUNCH, R.J.; HARRISON, B.E.; BARRIS, W.; THOMAS, M.B. A validated whole-genome association study of efficient food conversion in cattle. **Genetics** 176, 1893–905, 2007.
- BOLORMAA, S.; HAYES, B.J.; SAVIN, K.; HAWKEN, R.; BARENDSE, W.; ARTHUR, P.F.; JOHNSTON, D.J.; HERD, R.M.; GODDARD, M.E. Genomewide association studies for feedlot and growth traits in cattle. **Journal of Animal Science** 89, 1684-1697, 2011
- BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. **Science** 324, 522–528, 2009.
- CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Hormone and Metabolic Research** 28, 619-32, 1996.
- COLE, J.B.; VAN RADEN, P.M.; O'CONNELL, J.R.; VAN TASSELL, C.P.; WIGGANS, G.R.; SONSTEGARD, T.S.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; WIGGANS, G.R. Distribution and location of genetic effects for dairy traits. **Journal of Dairy Science** 92, 2931–2946, 2009.
- DEVLIN, B.; ROEDER, K.; WASSERMAN, L. Genomic control for association studies: a semiparametric test to detect excess-haplotype sharing. **Biostatistics** 55, 997–1004, 1999.
- GOMES, R.C.; SAINZ, R.D.; SILVA, S.L.; CÉSAR, M.C.; BONIN, M.N.; LEME, P.R. Feedlot performance, feed efficiency reranking, carcass traits, body composition, energy requirements,

meat quality and calpain system activity in Nellore steers with low and high residual feed intake. **Livestock Science** 150, 265-273, 2012.

GOMES, R.C.; SILVA, S.L.; CARVALHO, M.E.; REZENDE, F.M.; PINTO, L.F.B.; SANTANA, M.H.A.; STELLA, T.R.; MEIRELLES, F.V.; ROSSI JUNIOR, P.; LEME, P.R.; FERRAZ, J.B.S. Protein synthesis and degradation gene *SNPs* related to feed intake, feed efficiency, growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research** 12, 2923-2936, 2013.

HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; CHAMBERLAIN, A.C.; VERBYLA, K.; GODDARD, M.E. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution** 41, 51, 2009.

HERD, R.M.; BISHOP, S.C. Genetic variation in residual feed intake and its association with other production traits in British Hereford cattle. **Livestock Production Science** 63, 111–119, 2000.

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.

KENNEDY, B.W.; VAN DER WERF, J.H.J.; MEUWISSEN, T.H.E. Genetic and statistical properties of residual feed intake. **Journal of Animal Science** 71, 3239–3250, 1993.

KINSELLA, R.J.; KÄHÄRI, A.; HAIDER, S.; ZAMORA, J.; PROCTOR, G.; SPUDICH, G.; ALMEIDA-KING, J.; STAINES, D.; DERWENT, P.; KERHORNOU, A.; KERSEY, P.; FLICEK, P. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. **Database (Oxford)** Bar030, 2011.

KLUG, A.; RHODES, D. ‘Zinc fingers’: a novel protein motif for nucleic acid recognition. **Trends in Biochemical Sciences** 12, 464–467, 1987.

KOCH, R.M.; SWIGER, L.A.; CHAMBERS, D.; GREGORY, K.E. Efficiency of feed use in beef cattle. **Journal of Animal Science** 22, 486–494, 1963.

MARDIA, K.V. Some properties of classical multi-dimensional scaling. **Communications in Statistics - Theory and Methods** A7(13), 1233–1241, 1978

MATUKUMALLI, L.K.; SCHROEDER, S.; DENISE, S.K.; SONSTEGARD, T.S.; LAWLEY, C.T.; GEORGES, M.; COPPIETERS, W.; GIETZEN, K.; MEDRANO, J.F.; RINCON, G.; LINCE, D.; EGGEN, A.; GLASER, L.; CAM, G.; VAN TASSEL, C.P. Analyzing LD blocks and CNV segments in cattle: Novel genomic features identified using the BovineHD BeadChip. 2011, **Pub. No. 370-002, Illumina Inc.**, 2011.

MATUKUMALLI, L.K.; LAWLEY, C.T.; SCHNABEL, R.D.; TAYLOR, J.F.; ALLAN, M.F.; HEATON, M.P.; O’CONNEL, J.; MOORE, S.S.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; VAN TASSEL, C.P. Development and characterization of a high density *SNP* genotyping assay for cattle. **PLoS ONE** 4, e5350, 2009.

MCBRIDE, B.W.; KELLY, J.M. Energy cost of absorption and metabolism in the ruminant gastrointestinal tract and liver: A review. **Journal of Animal Science** 68, 2997-3006, 1990.

MOORE, S.S.; MUJIBI, F.D.; SHERMAN, E.L. Molecular basis for residual feed intake in beef cattle. **Journal of Animal Science** 87(E Suppl.), 41–47, 2009.

MUJIBI, F.D.N.; NKRUMAH, J.D.; DURUNNA, O.N.; GRANT J.R.; MAH, J.; WANG, Z.; BASARAB, J.; PLASTOW, G.; CREWS JR, D.H.; MOORE, S.S. Associations of marker panel

scores with feed intake and efficiency traits in beef cattle using preselected single nucleotide polymorphisms. **Journal of Animal Science** 89, 3362–3371, 2011.

NKRUMAH, J.D.; LI, C.; BASARAB, J.; GUERCIO, S.; MENG, Y.; MURDOCH, B.; HANSEN, C.; MOORE, S.S. Association of a single nucleotide polymorphism in the bovine leptin gene with feed intake, feed efficiency, growth, feeding behaviour, carcass quality and body composition. **Canadian Journal of Animal Science** 84, 211–219, 2004.

NKRUMAH, J.D.; BASARAB, J.A.; WANG, Z.; LI, C.; PRICE, M.A.; OKINE, E.K.; CREWS, D.H.; MOORE, S.S. Genetic and phenotypic relationships of feed intake and measures of efficiency with growth and carcass merit of in beef cattle. **Journal of Animal Science** 85, 2711–2720, 2007.

OLERUP, O.; ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCRSSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. **Tissue Antigens** 39, 225–235, 1992.

ONTERU, S.K.; GORBACH, D.M.; YOUNG, J.M.; GARRICK, D.J.; DEKKERS, J.C.; ROTHSCILD, M.F. Whole Genome Association Studies of Residual Feed Intake and Related Traits in the Pig. **PloS One** 8(6), e61756, 2013.

PHOCAS, F.; BLOCH, C.; CHAPELLE, P.; BÉCHEREL, F.; RENAND, G.; MÉNISSIER, F. Developing a breeding objective for a French purebred beef cattle selection programme. **Livestock Production Science** 57, 49–65, 1998.

PRYCE, J.E.; ARIAS, J.; BOWMAN, P.J.; DAVIS, S.R.; MACDONALD, K.A.; WAGHORN, G.C.; WALES, W.J.; WILLIAMS, Y.J.; SPELMAN, R.J.; HAYES, B.J. Accuracy of genomic predictions of residual feed 14 intake and 250 day bodyweight in 15 growing heifers using 625,000 *SNP* markers. **Journal of Dairy Science** 95, 2108–2119, 2012.

RICHARDSON, E.C.; HERD, R.M.; ARCHER, J.A.; ARTHUR, P.F. Metabolic differences in Angus steers divergently selected for residual feed intake. **Australian Journal of Agricultural Research** 44, 441–452, 2004.

ROLF, M.M.; TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; MCKAY, S.D.; MCCLURE, M.C.; NORTHULT, S.L.; KERLEY, M.S.; WEABER, R.L. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Animal Genetics** 43, 367–374, 2011.

SANTANA, M.H.A.; ROSSI JR P.; ALMEIDA, R.; CUCCO, D.C. Feed efficiency and its correlations with carcass traits measured by ultrasound in Nellore bulls. **Livestock Science** 145, 252–257, 2012.

SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J.; SCHENKEL, F. Efficient combined family and population imputation in large data sets. **Open Ind Session**, 30, 2012.

SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J.D.; MURDOCH, B.M.; MOORE, S.S. Identification of polymorphisms influencing feed intake and efficiency in beef cattle. **Animal Genetics** 39, 225–231, 2008.

SHERMAN, E.L.; NKRUMAH, J.D.; MOORE, S.S. Whole genome single nucleotide polymorphism associations with feed intake and feed efficiency in beef cattle. **Journal of Animal Science**, 88, 16–22, 2010.

SNELLING, W.M.; ALLAN, M.F.; KEELE, J.W.; KUEHN, L.A.; MCDANELD, T.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; THALLMAN, R.M.; BENNETT, G.L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science**, 88, 837–848, 2010.

SNELLING, W.M.; ALLAN, M.F.; KEELE, J.W.; KEUHN, L.A.; THALLMAN, R.M.; BENNETT, G.L.; FERRELL, C.L.; JENKINS, T.G.; FREETLY, H.C.; NIELSEN, M.K.; ROLFE, K.M. Partial-genome evaluation of postweaning feed intake and efficiency of crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science** 89, 1731-1741, 2011.

SOBRINHO, T.L.; BRANCO, R.H.; BONILHA, S.F.M.; CASTILHOS, A.M.; FIGUEIREDO, L.A.; RAZOOK, A.G.; MERCADANTE, M.E.Z. Residual feed intake and relationships with performance of Nellore cattle selected for post weaning weight. **Revista Brasileira de Zootecnia** 40, 929-937, 2011.

SVISHCHEVA, G.R.; AXENOVICH, T.I.; BELONOGOVA, N.M.; VAN DUIJN, C.M.; AULCHENKO, Y.S. Rapid variance components-based method for whole-genome association analysis. **Nature Genetics** 44, 1166–1170, 2012.

THOMPSON, E.A.; SHAW, R.G. Pedigree analysis for quantitative traits: variance components without matrix inversion. *Biometrics* 46, 399-413, 1990.

UTSUNOMIYA, Y.T.; CARMO, A.S.; CARVALHEIRO, R.; NEVES, H.H.R.; MATOS, M.C.; ZAVAREZ, L.B.; O'BRIEN, A.M.P.; SÖLKNER, J.; MCEWAN, J.C.; COLE, J.B.; VAN TASSEL, C.P.; SCHENKEL, F.S.; SILVA, M.V.G.B.; PORTO NETO, L.R.; SONSTEGARD, T.S.; GARCIA, J.F. Genome-wide association study for birth weight in Nellore cattle points to previously described orthologous genes affecting human and bovine height. **BMC Genetics** 14, 52-64, 2013.

VANRADEN, P.M.; O'CONNELL, J.R.; WIGGANS, G.R.; WEIGEL, K.A. Genomic evaluations with many more genotypes. **Genetics Selection Evolution** 43 10, 2011.

WANG, W.Y.S.; BARRATT, B.J.; CLAYTON, D.G.; TODD, J.A. Genome wide association studies: theoretical and practical concerns. **Nature Reviews Genetics** 6, 109–118, 2005.

ZIMIN A.V., DELCHER A.L., FLOREA L., KELLEY D.R., SCHATZ M.C., PUIU D., HANRAHAN F., PERTEA G., VAN TASSEL C.V., SONSTEGARD T.S., MARÇAIS G., ROBERTS M., SUBRAMANIAN P., YPRKE J. A., SALZBERG, S.L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology** 10, R42, 2009.

CAPÍTULO IV

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO DE AMPLO GENOMA PARA GANHO DE PESO DIÁRIO EM CONFINAMENTO DE BOVINOS NELORE

RESUMO

O presente trabalho apresenta o estudo de associação de amplo genoma (*GWAS*) para ganho de peso médio diário (GMD) em bovinos da raça Nelore. Foram utilizados 720 bovinos machos, com fenótipos para GMD em confinamento, e 290.620 polimorfismos de base única (*SNPs*), oriundos de um conjunto de dados combinando informações do Illumina BovineHD (777.962 *SNPs*) e do Illumina BovineSNP50 (54.609) por imputação. Os *SNPs* foram submetidos a um controle de qualidade e o teste de associação utilizado foi o *GRAMMAR-Gamma*. A região genômica com maior quantidade de *SNPs* associados está situada no cromossomo 3. O *SNP* mais significativo (rs42518459, BTA3:85849977, $P = 9,49 \times 10^{-8}$) explicou 5,62% da variância fenotípica e tem o efeito de substituição alélica de -0,269 kg/dia. Próxima a essa região, estão localizados os genes como PDE4B, LEPR, CYP2J2 e FGGY e a região é sobreposta por 12 *QTLs* descritos para diversas medidas de produção. Outras regiões nos cromossomos 6 e 10, merecem destaque também. Esse estudo mostrou regiões com maior efeito sobre o GMD de animais *Bos indicus* confinados, estes resultados podem ser úteis para aumentar a eficiência da seleção para essa medida e a compreensão dos processos fisiológicos envolvidos na regulação do ganho de peso.

Palavras chave: *Bos indicus*, crescimento, genômica, *GWAS*, zebu

1. INTRODUÇÃO

A velocidade de crescimento tem sido discutida a muitos anos e, possivelmente, seja uma das medidas mais avaliadas em sistemas de produção de carne. Nesse sentido, o ganho de peso diário (GMD) se apresenta como um importante critério de seleção em programas de melhoramento genético de bovinos de corte. O GMD tende a ser maior em regime de terminação em confinamento, principalmente pela dieta com mais alimento do tipo concentrado (OWENS et al., 1995).

A terminação de novilhos em sistemas de confinamento é uma solução promissora para atender à questão de boas práticas na agropecuária uma vez que não requer áreas tão extensas como outros sistemas de terminação em pastagens. Por essa razão e por preocupações com o impacto ambiental (emissão de metano), a bovinocultura propende a aumentar o número de animais confinados, com o intuito de reduzir a idade de abate, principalmente em países que o sistema predominante de terminação de bovinos é o extensivo.

Caracterizar o ganho de peso quanto a sua fisiologia e, principalmente, quanto a regiões cromossômicas responsáveis pelas variações nessa medida, foi objeto de alguns estudos (CASAS et al., 2003; GUTIERREZ-GIL et al., 2009). Porém, esse tipo de abordagem foi potencializada pelo lançamento do genoma de referência do bovino (BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM, 2009), que possibilitou o desenvolvimento de uma gama de produtos comerciais contendo de centenas a milhões de marcadores moleculares do tipo polimorfismo de base única (*SNPs*). A avaliação dessa vasta quantidade de marcadores, ao mesmo tempo, foi plausível pelos estudos de associação de amplo genoma (*GWAS*) que, inicialmente se estabeleceram pelas pesquisas de caso-controle em humanos e posteriormente em medidas quantitativas em animais (GODDARD; HAYES, 2009).

O uso de dados genômicos para caracterizar loci que explicam proporções substanciais da variância fenotípica do GMD podem contribuir no entendimento mais preciso nas predições em medidas de crescimento. Além disso, descobrir as bases moleculares das diferenças no GMD podem auxiliar na compreensão sobre os mecanismos que controlam a relação entre o ganho de peso e outras características importantes na pecuária, como ingestão alimentar e composição corporal.

Os estudos de associação genômica têm crescido em bovinos de corte para ganho de peso (SNELLING et al., 2010; PAUSCH et al., 2011; LU et al., 2013). No entanto, são raros os estudos de associação em bovinos *Bos indicus* (BOLORMAA et al., 2011; FORTES et al., 2013;

UTSONOMIYA et al., 2013). Os objetivos desse trabalho foram: 1) identificar os *SNPs* associados com o ganho de peso diário em confinamento de bovinos Nelore (*B. indicus*) e 2) explorar os genes e *QTLs* próximos a esses *SNPs* para avaliar o seu potencial papel na determinação das diferenças no GMD.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. COLETA DE FENÓTIPOS E EXTRAÇÃO DE DNA

O trabalho foi realizado com 720 bovinos da raça Nelore, novilhos e tourinhos, com 550 ± 115 dias de idade e 380 ± 51 kg de peso vivo no início do confinamento. Os animais são provenientes de onze diferentes experimentos voltados para ganho de peso e eficiência alimentar realizados no Brasil em três regiões distintas: sul (SANTANA et al., 2012), sudeste (GOMES et al., 2013) e centro oeste.

Esses experimentos foram realizados em três diferentes instalações e tiveram duração de pelo menos 70 dias com pesagem periódicas por, no mínimo, a cada 21 dias. As pesagens ocorreram sem jejum alimentar ou hídrico, e o ganho de peso médio diário (GMD) foi estimado como o coeficiente angular da regressão linear dos pesos sobre os dias de teste.

Os dados obtidos foram submetidos a controle de outliers, com dados fora de ± 3 desvio-padrão sendo excluídos da análise. Posteriormente, os dados fenotípicos foram testados quanto a sua normalidade (Shapiro-Wilk) e homocedasticidade dos resíduos (Breusch-Pagan) no ambiente R v2.15.2. Cada um dos experimentos foi considerado como sendo um grupo de contemporâneos para as análises posteriores. Essa designação foi baseada no fato que os animais provenientes do mesmo teste tinham o pesos e idades muito semelhantes, além de serem submetidos ao mesmo regime alimentar durante o seu respectivo teste.

Em uma das pesagens realizadas, foi colhido sangue de cada um dos bovinos, em tubos a vácuo. O DNA genômico foi extraído e sua qualidade e quantidade testadas em biofotômetro (NanoDrop N2000). As amostras que não se enquadravam em 1,8 a 2,0 para a relação A260/280 e que não apresentavam concentração entre 50 ng/ μ L e 150 ng/ μ L, não foram utilizadas para genotipagens até estarem de acordo com esses níveis.

2.2. Genotipagem, garantia de qualidade e imputação

Os animais foram genotipados em dois painéis diferentes de *SNPs*, 384 touros no Illumina BovineHD (HD) e 336 touros e novilhos no Illumina BovineSNP50 v2 (50k), pelo protocolo *Infinium Assay II* na plataforma HiScan® (Illumina Inc., San Diego, CA). As leituras e determinação dos genótipos foram determinadas pelo programa GenomeStudio®. Adicionalmente,

foi analisada a quantidade de amostras duplicadas por possíveis erros de amostragem. Essa verificação foi calculada pela proporção de alelos idênticos por estado (*IBS*), na qual, uma amostra aleatória de 10% dos *SNPs* de cada painel foi checada por pares de amostras e, o par que apresentasse mais que 95% de *IBS* foi deletado.

Com o intuito de combinar as informações dos genótipos dos dois painéis, em um conjunto de dados único, e assim, aumentar o tamanho amostral, foi realizado um estudo de imputação dos genótipos. Inicialmente, as informações do HD foram empregadas em um ensaio prévio para testar a acurácia desse estudo. Somente os *SNPs* localizados em cromossomos autossômicos e com posição genômica conhecida foram considerados na análise.

Resumidamente, foram amostrados aleatoriamente 290 animais genotipados no HD, que foram considerados população de referência. Os 94 animais restantes foram utilizados como população de validação. Para avaliar o desempenho da imputação do 50k para o HD, foi extraído o conjunto de marcadores do 50k, que estão contidos no painel HD, e estes foram mascarados na população de validação, com base na população de referência. Foi utilizado o programa FImpute v2.2 (SARGOLZAEI; CHESNAIS; SCHENKEL; 2012) para prever os genótipos mascarados. A acurácia da imputação foi avaliada pela proporção de genótipos corretamente imputados.

Posteriormente, a imputação foi efetuada para os 336 bovinos genotipados no 50k, em que todos os animais do HD foram considerados como população de referência. Somente os marcadores genotipados com mais 95% de precisão foram considerados para as análises posteriores.

2.3. Genótipos informativos e subestrutura populacional

Após a imputação foi realizado o controle de qualidade (QC) dos *SNPs* e das amostras. O QC das amostras foi realizado pelo *Call rate* (CR), na qual somente amostras com CR acima de 90% foram consideradas aceitáveis. Com relação aos *SNPs*, além do CR (>95%), a frequência alélica mínima (*MAF*) superior a 2% e *SNPs* com valor de P no teste exato de Fisher para Equilíbrio de Hardy-Weinberg (*HWE*) superior a 1×10^{-5} foram mantidos para o GWAS.

Uma das possíveis fontes de erro no GWAS é a estrutura da população a ser avaliada. Em bovinos de corte, a presença de famílias de meio irmãos é comum, e aliada a isso, o presente estudo engloba populações de diferentes testes, que foram provenientes de programas de melhoramento genético com critérios de seleção distintos. Portanto, a estratificação genética foi analisada, utilizando análise de coordenadas principais (*PCoA*), para verificar essas possíveis subestruturas

populacionais. Para tanto, 50.000 *SNPs* aleatórios foram utilizados para calcular os coeficientes de parentesco genômico entre os animais. Esses coeficientes foram transformados em quadrados das distâncias Euclidianas e submetidas a decomposição espectral por escalonamento multidimensional clássico, cada experimento foi considerado como uma população distinta (AMIN; VAN DUIJN; AULCHENKO; 2007). Todos os procedimentos do QC e da subestrutura populacional ocorreram no ambiente R pelo pacote GenABEL v1.7-6 (AULCHENKO et al., 2007).

2.4. Análise de associação

Para contabilizar os efeitos de parentesco e subestrutura populacional na análise de associação, foi utilizado um teste em dois passos que é uma extensão do método *GRAMMAR* (*Genome-wide Rapid Association using Mixed Model and Regression*) (AULCHENKO; DE KONING; HALEY; 2007), chamado *GRAMMAR-Gamma* (SVISHCHEVA et al., 2012). Uma razão para o uso deste método é sua capacidade de produzir testes estatísticos não viesados que se aproximam do teste de razão de verossimilhança, padrão ouro em *GWAS*, porém com maior eficiência computacional (SVISHCHEVA et al., 2012).

No primeiro passo, um modelo de componentes de variância é ajustado para os dados e o fator *Gamma* é calculado a partir da estimativa de herdabilidade e da matriz de variância/covariância. Neste passo foi incluído o peso vivo médio, o grupo de contemporâneos e o sexo como efeitos fixos. No segundo passo, as equações de quadrados mínimos da correção *Gamma* são usadas para uma obtenção não viesada do efeito de substituição alélica, variância e teste estatístico para cada marcador. A hipótese nula é que se assume que as estatísticas seguem assintoticamente a distribuição χ^2 com um grau de liberdade. A validade desta hipótese foi verificada através da qualidade do ajuste dos quantis observados pela distribuição teórica via cálculo do fator de inflação/deflação (λ). Valores abaixo de 1.1 são considerados aceitáveis e os testes estatísticos foram divididos por λ para ajustar a inflação remanescente.

O limiar de Bonferroni foi adotado para determinar a significância dos *SNPs* (0,05/números de *SNPs*). A proporção da variância fenotípica explicada por esses *SNPs* serão estimadas por meio da fórmula a seguir:

$$VAR(\%) = \frac{2pq\beta^2}{S^2} * 100$$

Onde: p e q são as frequências dos alelos, β é o efeito de substituição alélica estimado e S^2 é a variância total do fenótipo. Todas as análises descritas acima foram realizadas no pacote GenABEL (AULCHENKO et al., 2007) do ambiente R.

2.5. Regiões genômicas em torno dos *SNPs* significantes

As regiões a 1Mb em torno dos *SNPs* significativos foram investigadas para determinar se elas mapearam algum locus previamente descrito em características quantitativas (*QTL*) depositado no banco de dados *QTLdb cattle* (HU et al., 2013). As coordenadas genômicas da montagem UMD v3.1 (ZIMIN et al., 2009) foram obtidas a partir do banco de dados *Ensembl genes 73* (KINSELLA et al., 2011) para anotação dos genes próximos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. FENÓTIPO, GARANTIA DE QUALIDADE E IMPUTAÇÃO

Os dados fenotípicos de ganho de peso diário em confinamento apresentaram distribuição normal e homocedasticidade de acordo como o teste de Shapiro-Wilk e Breusch-Pagan ($P > 0,05$), respectivamente, e cinco animais foram excluídos da análise por estarem fora do limiar de ± 3 desvio-padrão e serem considerados como *outliers*. A média, mínimo e máximo foram de $1,49 \pm 0,42$, 0,79 e 2,41, respectivamente. De acordo com esses resultados, a variável dependente não viola as premissas das análises de associação que foram utilizadas no presente estudo.

Nenhum par de amostras foi excluído pelo critério de identidade por estado (*IBS*), portanto não houve nenhuma amostra duplicada no conjunto de dados. No entanto, vinte amostras foram removidas do conjunto de dados por apresentarem CR menor que 90%.

A partir do estudo de imputação, 354.147 *SNPs* em 692 animais, com 95% dos genótipos imputados corretamente no estudo preliminar, formaram o conjunto de dados o teste de associação.

3.2. GENÓTIPOS INFORMATIVOS E SUBESTRUTURA POPULACIONAL

No controle de qualidade, um total de 63.266 marcadores com *MAF* menor que 2% e 261 *SNPs* com *HWE* menor que 1×10^{-5} foram removidos. Nenhum *SNP* foi excluído por CR menor que 95%, possivelmente pelo fato de que os *SNPs* com baixo CR não foram incluídos no estudo de imputação. O conjunto de dados final continha 672 indivíduos e 290.620 *SNP* para o *GWAS*.

O escalonamento multidimensional dos quadrados das distâncias euclidianas, o qual foi calculado pela análise de coordenadas principais (*PCoA*), corrigiu implicitamente os efeitos das subestruturas populacionais no primeiro passo do *GRAMMAR-Gamma*. Os dois auto vetores do *PCoA* que mais explicaram a variabilidade genotípica do GMD, somados, descreveram 6,31% dessa variação.

3.3. ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO E REGIÕES GENÔMICAS PRÓXIMAS AOS *SNPs*

O desvio dos testes estatísticos observados dos teóricos, mostrado no gráfico quantil-quantil (Figura 6), foi dentro do patamar aceitável e os valores foram ajustados para λ pelo controle genômico.

Figura 6 Gráfico quantil-quantil dos testes estatísticos usados para a análise de associação.

Os valores de P ajustados para λ apresentados na Figura 7.

Figura 7 *Manhattan plot* dos $-\log_{10}(P)$ do teste de associação de amplo genoma para ganho de peso diário em bovinos Nelore. A linha horizontal representa o limiar de Bonferroni ($\alpha=1,72 \times 10^{-7}$).

O *SNP* com menor valor de *P* está localizado na posição 85849977 do cromossomo 3 (rs42518459, $P = 9,49 \times 10^{-8}$) e apresentou um efeito de substituição alélica (β) de -0,27 kg/dia. O alelo favorável desse *SNP* é a citosina (C) que, quando é substituída por uma timina (T), causa esse efeito negativo no GMD. O percentual da variância fenotípica explicada por esse *SNP* é de 5,62% e a frequência do alelo C é de 86%, contra 14% de alelos T. Os dez *SNPs* com menor valor de *P* no teste de associação são mostrados na Tabela 11. Ao redor desse *SNP*, quatro genes principais foram identificados e estão apresentados na Tabela 12. Outros genes estão nessa região genômica, com destaque para *PDE4B*, *LEPR*, *LEPROT*, *UBE2U*, *PGM1*, *ITGB3BP*, *ALG6*, *ANGPTL3*, *PRKAA2* e *PPAP2B*.

Tabela 11 – Estatísticas e descrição dos dez *SNPs* mais significativos

<i>SNP</i>	CHr	Posição(bp)	<i>MAF</i>	β^1	<i>EPM</i>	<i>VAR</i> (%) ²	<i>P</i>
rs42518459	3	85849977	0,136	-0,269	0,049	5,622	$9,49 \times 10^{-8}$
rs42518463	3	85854233	0,137	-0,269	0,048	5,656	$9,49 \times 10^{-8}$
rs137011979	10	79814549	0,053	-0,435	0,079	6,279	$1,21 \times 10^{-7}$
rs109982289	3	85883091	0,124	-0,285	0,052	3,496	$1,28 \times 10^{-7}$
rs42516428	3	85940753	0,152	-0,273	0,050	5,718	$1,93 \times 10^{-7}$
rs42517631	3	85945421	0,132	-0,257	0,050	1,515	$6,79 \times 10^{-7}$
rs135472159	10	80095314	0,215	-0,374	0,077	2,078	$2,56 \times 10^{-6}$
rs110899667	6	63160626	0,180	-0,316	0,065	3,136	$2,63 \times 10^{-6}$
rs136057886	10	79793695	0,113	-0,366	0,076	4,628	$3,13 \times 10^{-6}$
rs133639017	3	85972521	0,155	-0,220	0,047	2,489	$4,63 \times 10^{-6}$

¹Efeito de substituição alélica estimado

²Percentual da variância fenotípica explicada

Tabela 12 – Genes próximos ao *SNP* (rs42518459) mais significativo

Gene	Gene ID	Distância (kb)	Descrição
<i>C3H1orf87</i>	504762	410,3	<i>Chromosome 3 open reading frame</i>
<i>NFIA</i>	615371	682,1	<i>Nuclear factor I/A</i>
<i>CYP2J2</i>	510406	759,6	<i>Cytochrome P450, polypeptide 2</i>
<i>FGGY</i>	534011	938,0	<i>FGGY carbohydrate kinase domain</i>

Os *SNPs* supracitados, juntos, podem explicar uma grande parte da variação do GMD em confinamento de bovinos Nelore. No entanto, seis desses *SNPs* estão na mesma região do cromossomo 3 (85-86Mb) e três no cromossomo 10 (79-80Mb) portanto, o desequilíbrio de ligação entre eles deve ser alto e os seus efeitos devem ser contabilizados como um só. A variância explicada no GMD, levando em conta somente o *SNP* com menor valor P nos cromossomos 3, 6 e 10 é de 15%, somados.

Seis dos dez *SNPs* com maior associação com o GMD localizam-se no cromossomo 3, onde muitos *QTLs* e genes descritos estão em torno dessa região que modula diversos fenótipos, com destaque para as medidas reprodutivas, de produção de leite, características de carcaça, pesos vivo e ganho de peso (JIANG et al., 2010; MAI et al., 2010; MCCLURE et al., 2010; SAHANA; GULDBRANDTSEN; LUND; 2011; NALAILA et al., 2012; ROLF et al., 2012). A montagem *Ensembl genes 73 UMD v3.1* mostrou diversos genes, citados acima, próximos aos *SNPs* associados, nesse cromossomo, que podem estar relacionados com o fenótipo de interesse. Outros estudos também constataram relações de *SNPs* no cromossomo 3, na mesma região apontada no presente estudo, com o GMD (BOLORMAA et al., 2011; LU et al., 2013).

Dos quatro genes próximos à essa região, o *CYP2J2* (*Cytochrome P450, polypeptide 2*) e o *FGGY* (*FGGY carbohydrate kinase family*) são ligados a processos que podem afetar o ganho de peso dos bovinos. Primeiramente, o *CYP2J2* está relacionado, entre outros, com a síntese de hormônios esteroides, que são determinantes para o desenvolvimento muscular dos animais (WILLIAMS et al., 2000). O *FGGY* é uma enzima do tipo carboidrato quinase que é capaz de usar substratos de diferentes açúcares (trioses a heptoses) para regular processos como o balanço energético metabólico dos animais (ZHANG et al., 2011).

Outros genes próximos merecem destaque são o *PDE4B* e o *LEPR*. O *PDE4B* codifica a enzima fosfodiesterase do tipo 4 que hidrolisa a adenosina monofosfato cíclico (AMPC), a qual está relacionada com processos de modulação energética no organismo, e está ligada com o controle da lipólise, regulando a composição corporal (BOLGER; RODGERS; RIGGS; 1994).

O receptor da leptina (*LEPR*) regula os níveis desse hormônio o qual influencia a ingestão alimentar, a composição corporal e o peso vivo dos animais. Seu papel é fundamental nos processos de controle do apetite dos bovinos, e é o composto chave de todo os hormônios e neuropeptídios do eixo hipófise-hipotálamo que estão relacionados com a ingestão alimentar (CAMPFIELD; SMITH; BURN, 1996). O cromossomo 10 também mostrou uma região a ser explorada em futuros estudos, essa região contém muitos genes que codificam diversos compostos que podem estar relacionados com o desempenho dos bovinos em confinamento.

Alguns estudos de associação de amplo genoma foram conduzidos para apontar regiões e genes de interesse do ganho de peso em bovinos taurinos (GUTIÉRREZ-GIL et al., 2009; SNELLING et al., 2010; BOLORMAA et al., 2011; PAUSCH et al., 2011; LU et al., 2013). No entanto, os locais destacados nos trabalhos podem variar para um mesmo fenótipo, isso porque as metodologias de análise, raças e populações avaliadas em um estudo, não necessariamente terão os mesmos resultados das empregadas em outro (HAYES et al., 2009). Outras regiões puderam ser apontadas como promissoras para estudos futuros sobre o ganho de peso em confinamento e, como era esperado, é uma medida controlada por diversos genes e variações ao longo de todo genoma.

Adicionalmente, doze *QTLs*, descritos para outras variáveis em bovinos, contém a região genômica do cromossomo 3 que os *SNPs* mais associados com o GMD estão. Esses *QTLs* estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – *QTLs* a 1Mb de distância do *SNP* mais significativo (rs42518459) no cromossomo 3

Variável	Início (pb)	Final (pb)	<i>QTLdb</i> ID ^a
Mastite clínica	83410809	88751595	16061
Tamanho do bezerro	83410809	96063748	16062
Peso de carcaça	88443339	110778079	10699
Mastite clínica	83410809	112411605	2489
Peso ao nascimento	83410809	88443339	10697
Tamanho do bezerro	83410809	107548315	15171
Índice de parição	83410809	107548315	15172
Facilidade de parto	83410809	107548315	15173
Morte fetal	83410809	107548315	15174
Produção de leite	83410809	88443339	14889
Produção de proteína no leite	83410809	88443339	14920
Gordura subcutânea na 12 ^a costela	83410809	88443339	20264

^a*QTL* descrito para outro fenótipo, que se encontra o *SNP* mais associado para ganho de peso diário

Apesar dessa região se mostrar com maior relação com o GMD, vale destacar que, dos dez *SNPs* com maior valor de P no GWAS, outros quatro *SNPs* não estão localizados no cromossomo 3. Três desses *SNPs* estão localizados no cromossomo 10, em uma região próxima a diversos genes, dentre eles estão *GPHN*, *MPP5*, *TMEM229B*, *PLEKHH1*, *PIGH*, *ARG2*, *RDH12* e

RAD51B, todos a menos de 1 Mb dos três *SNPs*. Os *QTLs* descritos para GMD mais próximos a esses dez *SNPs* estão descritos na Tabela 13.

Tabela 14 – *QTLs* próximos às dez regiões dos *SNPs* mais significativos descritos previamente para GMD

<i>QTLdb</i> ID	CHr	Localização (Mb) ¹	Dist <i>SNP</i> (Mb)	Referência
20926	3	110,8:109,3	24,9	Rolf et al. (2012)
20943	10	72,5:75,9	3,9	Rolf et al. (2012)
4415	6	58,5:67,7	0	Nkrumah et al. (2007)

¹Localização do pico do *QTL*

Esses resultados suportam os *QTLs* encontrados no *QTLdb* que estão contidos nessa região de interesse, pois, além relacionados com o GMD, esses genes podem influenciar variáveis dos *QTLs* supracitados, como tamanho do bezerro, peso de carcaça, produção de leite, produção de proteína no leite e deposição de gordura subcutânea na 12^a costela (músculo *Longissimus*). Para esse tipo de fenótipo, outro fator que interfere na menor detecção de associações dos *SNPs* é a herdabilidade. As variações genéticas aditivas e os efeitos dos *SNPs* tendem a ser menores quando comparados com fenótipos controlados por poucos genes e com herdabilidade mais alta (SNELLING et al., 2010).

Adicionalmente, o poder de detecção dessas associações, em *GWAS*, acabam sendo dependentes do número de indivíduos avaliados (GODDARD; HAYES, 2009; SNELLING et al., 2010), que no presente estudo foi de 672 animais. Aliado a isso, o critério conservativo de significância da correção de Bonferroni aumenta a confiabilidade das análises, pela redução da taxa de falsas descobertas, contudo, somente poucos *SNPs* superaram esse limiar de significância.

4. CONCLUSÃO

O presente estudo apontou alguns *SNPs* e regiões genômicas associadas com o ganho de peso diário de bovinos Nelore em confinamento. A variação fenotípica explicada pelo conjunto de *SNPs* avaliados é considerável e as regiões genômicas com influência sobre o GMD podem ser usadas na busca por processos fisiológicos que afetam esse fenótipo, principalmente os cromossomos 3, 6 e 10.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AMIN, N.; VAN DUIJN, C.M.; AULCHENKO, Y.S. A genomic background based method for association analysis in related individuals. **PLoS One** 2, e1274, 2007.
- AULCHENKO, Y.S.; RIPKE, S.; ISAACS, A.; VAN DUIJN, C.M. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. **Bioinformatics** 23(10), 1294–1296, 2007.
- 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** 177, 577–585, 2007.
- BOLGER, G.B.; RODGERS, L.; RIGGS, M. Differential CNS expression of alternative mRNA isoforms of the mammalian genes encoding cAMP-specific phosphodiesterases. **Gene** 149, 237–244, 1994.
- BOLORMAA, S.; HAYES, B.J.; SAVIN, K.; HAWKEN, R.; BARENDSE, W.; ARTHUR, P.F.; JOHNSTON, D.J.; HERD, R.M.; GODDARD, M.E. Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. **Journal of Animal Science** 89, 1684-1697, 2011.
- BOVINE GENOME SEQUENCING AND ANALYSIS CONSORTIUM. The genome Sequence of taurine cattle: A window to ruminant biology and evolution. **Science** 324, 522–528, 2009.
- CAMPFIELD, L.A.; SMITH, F.J.; BURN, P. The OB protein (leptin) pathway - a link between adipose tissue mass and central neural networks. **Hormone and Metabolic Research** 28, 619-32, 1996.
- CASAS, E.; SHACKELFORD, S. D.; KEELE, J.W.; KOOHMARAIE, M.; SMITH, T.P.L.; STONE, R.T. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. **Journal of Animal Science** 81, 2976–2983, 2003.
- FORTES, M.R.; KEMPER, K.; SASAZAKI, S.; REVERTER, A.; PRYCE, J.E.; BARENDSE, W.; BUNCH, R.; MCCULLOCH, R.; HARRISON, B.; BOLORMAA, S.; ZHANG, Y.D.; HAWKEN, R.J.; GODDARD, M.E.; LEHNERT, S.A. Evidence for pleiotropism and recent selection in the PLAG1 region in Australian Beef cattle. **Animal Genetics** 44(6), 636-647, 2013.
- GODDARD, M.E.; HAYES, B.J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. **Nature Review Genetics** 10, 381–391, 2009.
- GOMES, R.C.; SILVA, S.L.; CARVALHO, M.E.; REZENDE, F.M.; PINTO, L.F.B.; SANTANA, M.H.A.; STELLA, T.R.; MEIRELLES, F.V.; ROSSI JUNIOR, P.; LEME, P.R.; FERRAZ, J.B.S. Protein synthesis and degradation gene *SNPs* related to feed intake, feed efficiency, growth and ultrasound carcass traits in Nellore cattle. **Genetics and Molecular Research** 12, 2923-2936, 2013.
- GUTIERREZ-GIL, B.; WILLIAMS, J.L.; HOMER, D.; BURTON, D.; HALEY, C.S.; WIENER, P. Search for quantitative trait loci affecting growth and carcass traits in a cross population of beef and dairy cattle. **Journal of Animal Science** 87, 24–36, 2009.
- HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; CHAMBERLAIN, A.C.; VERBYLA, K.; GODDARD, M.E. Accuracy of genomic breeding values in multi-breed dairy cattle populations. **Genetics Selection Evolution** 41, 51, 2009.

- 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.
- JIANG, L.; LIU, J.; SUN, D.; MA, P.; DING, X.; YU, Y.; ZHANG, Q. Genome wide association studies for milk production traits in Chinese Holstein population. **PLoS One** 5, e13661, 2010.
- KINSELLA, R.J.; KÄHÄRI, A.; HAIDER, S.; ZAMORA, J.; PROCTOR, G.; SPUDICH, G.; ALMEIDA-KING, J.; STAINES, D.; DERWENT, P.; KERHORNOU, A.; KERSEY, P.; FLICEK, P. Ensembl BioMarts: a hub for data retrieval across taxonomic space. **Database (Oxford)**; Published online Jul 23, 2011.
- LU, D.; MILLER, S.; SARGOLZAEI, M.; KELLY, M.; VANDER VOORT, G.; CALDWELL, T.; WANG, Z.; PLASTOW, G.; MOORE, S.S. Genome-wide association analyses for growth and feed efficiency traits in beef cattle. **Journal of Animal Science** 91, 3612–3633, 2013.
- MAI, M.D.; RYCHTAROVA, J.; ZINK, V.; LASSEN, J.; GULDBRANDTSEN, B. Quantitative trait loci for milk production and functional traits in two Danish cattle breeds **Journal of Animal Breeding and Genetics** 127, 469–473, 2010.
- MCCLURE, M.C.; MORSCI, N.S.; SCHNABEL, R.D.; KIM, J.W.; YAO P.; ROLF, M.M.; MCKAY, S.D.; GREGG, S.J.; CHAPPLE, R.H.; NORTHCUTT, S.L.; TAYLOR, J.F. A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. **Animal Genetics** 41, 597–607, 2010.
- NALAILA, S.M.; STOCHARD, P.; MOORE, S.S.; LI, C.; WANG, Z. Whole-genome *QTL* scan for ultrasound and carcass merit traits in beef cattle using Bayesian shrinkage method. **Journal of Animal Breeding and Genetics** 129, 107–119, 2012.
- NKRUMAH, J.D.; SHERMAN, E.L.; LI, C.; MARQUES, E.; CREWS, D.H.; BARTUSIAK, R.; MURDOCH, B.; WANG, Z.; BASARAB, J.A.; MOORE, S.S. Primary genome scan to identify putative quantitative trait loci for feedlot growth rate, feed intake, and feed efficiency of beef cattle. **Journal of Animal Science** 85, 3170–3181, 2007.
- OWENS, F.N.; GILL, D.R.; SECRIST, D.S.; COLEMAN, S.W. Review of some aspects of growth and development of feedlot of feedlot cattle. **Journal of Animal Science** 73, 3152–3172, 1995.
- PAUSCH, H.; FLISIKOWSKI, K.; JUNG, S.; EMMERLING, R.; EDEL, C.; GÖTZ, K.; FRIES, R. Genome-wide association study identifies two major loci affecting calving ease and growthrelated traits in cattle. **Genetics** 187, 289–297, 2011.
- ROLF, M.M.; TAYLOR, J.F.; SCHNABEL, R.D.; MCKAY, S.D.; MCCLURE, M.C.; NORTHCUTT, S.L.; KERLEY, M.S.; WEABER, R.L. Genome-wide association analysis for feed efficiency in Angus cattle. **Animal Genetics** 43, 367–374, 2012.
- SAHANA, G.; GULDBRANDTSEN, B.; LUND, M.S. Genome-wide association study for calving traits in Danish and Swedish Holstein cattle. **Journal of Dairy Science** 94, 479–486, 2011.
- SANTANA, M.H.A.; ROSSI JUNIOR, P.; ALMEIDA, R.; CUCCO, D.C. Feed efficiency and its correlations with carcass traits measured by ultrasound in Nellore bulls. **Livestock Science** 145, 252–257, 2012.
- SARGOLZAEI, M.; CHESNAIS, J.; SCHENKEL, F. Efficient combined family and population imputation in large data sets. **Open Ind Session**, 30, 2012.

SNELLING, W.M.; ALLAN, M.F.; KEELE, J.W.; KUEHN, L.A.; MCDANELD, T.; SMITH, T.P.L.; SONSTEGARD, T.S.; THALLMAN, R.M.; BENNETT, G.L. Genome-wide association study of growth in crossbred beef cattle. **Journal of Animal Science** 88, 837–848, 2010.

SVISHCHEVA, G.R.; AXENOVICH, T.I.; BELONOGOVA, N.M.; VAN DUIJN, C.M.; AULCHENKO, Y.S. Rapid variance components-based method for whole-genome association analysis. **Nature Genetics** 44, 1166–1170, 2012.

UTSUNOMIYA, Y.T.; CARMO, A.S.; CARVALHEIRO, R.; NEVES, H.H.R.; MATOS, M.C.; ZAVAREZ, L.B.; O'BRIEN, A.M.P.; SÖLKNER, J.; MCEWAN, J.C.; COLE, J.B.; VAN TASSEL, C.P.; SCHENKEL, F.S.; SILVA, M.V.G.B.; PORTO NETO, L.R.; SONSTEGARD, T.S.; GARCIA, J.F. Genome-wide association study for birth weight in Nellore cattle points to previously described orthologous genes affecting human and bovine height. **BMC Genetics** 14, 52-64, 2013.

WILLIAMS, P.A.; COSME, J.; SRIDHAR, V.; JOHNSON, E.F.; MCREE, D.E. Mammalian microsomal cytochrome P450 monooxygenase: structural adaptations for membrane binding and functional diversity. **Molecular Cell** 5, 121–131, 2000.

ZHANG, Y.; ZAGNITKO, O.; RODIONOVA, I.; OSTERMAN, A.; GODZIK, A. The FGGY carbohydrate kinase family: insights into the evolution of functional specificities. **PLoS Computational Biology** 7, e1002318, 2011.

ZIMIN, A.V.; DELCHER, A.L.; FLOREA, L.; KELLEY, D.R.; SCHATZ, M.C.; PUIU, D.; HANRAHAN, F.; PERTEA, G.; VAN TASSEL, C.V.; SONSTEGARD, T.S.; MARÇAIS, G.; ROBERTS, M.; SUBRAMANIAN, P.; YPRKE, J.A.; SALZBERG, S.L. A whole-genome assembly of the domestic cow, *Bos taurus*. **Genome Biology** 10, R42, 2009.

4. CONCLUSÕES GERAIS

As medidas de eficiência alimentar, tais como consumo alimentar residual e consumo e ganho residuais, tiveram seus parâmetros genéticos estimados nesse estudo. Os dados desse tipo de fenótipo, juntamente com a ingestão alimentar, são raros em animais *Bos indicus*, principalmente bovinos da raça Nelore. As herdabilidades dessas três medidas (IMS, CAR e CGR) foram de média a alta e estas não apresentaram correlações genéticas antagônicas com as medidas de carcaça, principalmente na deposição de gordura subcutânea. Destas três medidas, vale ressaltar que o consumo e ganho residuais teve o maior valor de herdabilidade e, portanto, a resposta a seleção genética para essa medida seria maior em comparação com outras de eficiência alimentar.

Os marcadores moleculares do tipo *SNP*, previamente descritos na literatura, localizados em genes relacionados com a regulação do apetite e transporte iônico de animais *Bos taurus*, foram polimórficos em animais zebuínos. No entanto, o efeito desses marcadores não foi o mesmo observado em bovinos da raça Nelore. Os marcadores moleculares, descritos em animais taurinos, devem ser avaliados cuidadosamente em zebuínos antes do uso dos mesmos, tanto para a possível não associação com o fenótipo de interesse, quanto pelo monomorfismo alélico já descrito para outros *SNPs*.

O estudo de associação de amplo genoma é uma ferramenta robusta na avaliação de medidas quantitativas de indivíduos relacionados, como é o caso da maioria dos fenótipos avaliados em bovinos de corte em confinamento. Com o auxílio da imputação de genótipos, esse tipo de estudo melhora seu poder de detecção pelo aumento do tamanho amostral, mesmo com a redução do número de *SNPs* avaliados. A dimensão amostral é fundamental para estudos desse tipo.

Os estudos de associação, que utilizam painéis densos de marcadores, podem apontar regiões ao longo dos cromossomos autossômicos que têm influência em determinadas medidas. Esse estudo identificou essas regiões para a ingestão de matéria seca, consumo alimentar residual e ganho de peso diário. Esse direcionamento pode ser importante na busca por genes e processos biológicos envolvidos na regulação dessas medidas, principalmente processos ainda não descritos na literatura disponível até então. Claramente, os processos de regulação de apetite e transporte iônico possuem grande influência sobre a ingestão e eficiência alimentar. Alguns processos fisiológicos que regulam a ingestão alimentar parecem regular também o ganho de peso em confinamento de bovinos Nelore.

Adicionalmente, a variação fenotípica total, explicada por marcadores moleculares, pode ser considerável nesse tipo de estudo. As informações genômicas, aliadas com a avaliação genética, podem melhorar a acurácia das predições do valor genético de animais jovens candidatos a touros ou animais que possuem poucos filhos avaliados. Essas análises podem ser de grande valia para o melhoramento genético de bovinos de corte, pois informações mais acuradas de animais jovens podem acelerar o ganho genético anual pela redução do intervalo de gerações.

Complementarmente, pode ser realizada a confecção de painéis menos densos e específicos para determinadas raças e fenótipos. A utilização destes poderia ser realizada em larga escala dentro de programas de melhoramento genético a um custo inferior aos painéis mais densos. Esses produtos possibilitariam uma seleção genômica voltada para medidas de ingestão e eficiência alimentar da raça Nelore.