

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS DE SELEÇÃO E VARIAÇÕES NO NÚMERO
DE CÓPIAS EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO**

Ana Lúcia Coutinho Teixeira

Goiânia, Goiás
Dezembro de 2020

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA
BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

Nome completo d (a) autor(a): Ana Lúcia Coufinho Teixeira

Título do trabalho: Identificação de Assinaturas de Seleção e Variações no Número de Cópias em Bovinos da Raça Curraleiro Pé Duro

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 23 / 03 / 2020

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(s) autor(a) e ao(s) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica; - Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão acei-tas.

ANA LÚCIA COUTINHO TEIXEIRA

IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS DE SELEÇÃO E VARIAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Zootecnia junto a Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Produção Animal

Linha de Pesquisa:

Interface entre desempenho produtivo, reprodutivo, aspectos genéticos e ambientais na produção animal

Orientador: Dr^a: Adriana Santana do Carmo

Comitê de orientação: Dr^o. Arthur dos Santos Mascioli

Dr^a: Maria Clorinda Soares Fioravanti

Goiânia, Goiás

Dezembro 2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Teixeira, Ana Lúcia Coutinho
IDENTIFICAÇÃO DE ASSINATURAS DE SELEÇÃO E VARIAÇÕES NO
NÚMERO DE CÓPIAS EM BOVINOS DA RAÇA CURRALEIRO PÉ DURO
[manuscrito] / Ana Lúcia Coutinho Teixeira. - 2020.
XI, 32 f.: il.

Orientador: Profa. Dr^a Adriana Santana do Carmo; co-orientadora
Dr^a Maria Clorinda Soares Fioravanti; co-orientador Dr^o Arthur dos
Santos Mascioli.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Goiânia, 2020.

Bibliografia. Apêndice.

Inclui fotografias, abreviaturas, gráfico, tabelas, algoritmos, lista
de figuras, lista de tabelas.

1. adaptabilidade. 2. EHH. 3. iHS. 4. raças localmente adaptadas.
5. resistência. I. Carmo, Dr^a Adriana Santana do, orient. II. Título.

CDU 635



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 72 da sessão de Defesa de Dissertação de **Ana Lucia Coutinho Teixeira** que confere o título de **Mestre (a) em Zootecnia** pelo Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, na área de concentração em Produção Animal.

Ao/s **27 dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte – (27/02/2020)** a partir das 14h00min, no (a) Escola de Veterinária e Zootecnia, Departamento de Zootecnia, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada **“Identificação de assinaturas de seleção e variações no número de cópias em bovinos da raça Curraleiro Pé-Duro”**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Adriana Santana do Carmo** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Paulo Hellmeister Filho – EVZ/UFG**, membro titular externo; **Thais Miranda Silva Freitas – Centro Universitário Montes Belos-GO**, membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram** sugestão de alteração do título. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação tendo sido a candidata **Aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela Orientadora **Adriana Santana do Carmo**, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Santana Do Carmo, Professora do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **THAIS MIRANDA SILVA FREITAS, Usuário Externo**, em 27/02/2020, às 16:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Paulo Hellmeister Filho, Professor do Magistério Superior**, em 27/02/2020, às 16:30, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1171601** e o código CRC **1F42A208**.

Ainda que eu tenha o dom de profetizar e conhecer todos os mistérios e toda a ciência; ainda que eu tenha tamanha fé, a ponto de transportar montes, se não tiver amor, nada serei.

1 Co 13:2

“Dedico esta pesquisa primeiramente a Deus, autor do meu destino, companheiro de todos os momentos. Sustento da minha alma, que me alimentou com calma e esperança durante toda a jornada. A minha família pelo incentivo, confiança e amor incondicional.”

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por ser fundamental em minha vida, consolo presente, autor do meu caminho, guia e socorro nos momentos de medo e angústia.

A minha mãe Berenice de Sá Coutinho, que me ensinou os valores da vida e incentivou a buscar os meus objetivos, sempre mostrando que eu podia contar com ela nos momentos difíceis e lembrando-me sempre que o que temos de mais importante é o conhecimento.

Ao meu pai Luiz Câmara Teixeira, por ser um uma pessoa simples, mas de coração gigante que sempre mostrou a mim e meus irmãos a importância de correr atrás dos próprios objetivos e alcançá-los por nós mesmos.

Ao meu esposo, amigo, companheiro e conselheiro de todos os momentos Ronaldo Rosa da Silva, que sempre me apoiou e incentivou a completar mais essa etapa, que nos momentos que eu pensei em desistir ele estava lá para me dar a mão e dizer: “eu confio em você, continua que você consegue”.

Aos meus irmãos, Marilúcia Coutinho, Vera Lúcia Coutinho, Telma Lúcia Coutinho, Josemir Coutinho e Luciano Coutinho, por sempre terem me incentivado, ajudado e ensinado a fazer a tarefinha do primário quando eu não sabia.

A minha orientadora Dr^a. Adriana Santana do Carmo, pelo conhecimento compartilhado, por contribuir com a realização do meu sonho; pelos incentivos e motivação. Receba meu reconhecimento e gratidão!

Aos meus co-orientadores, Arthur dos Santos Mascioli e Dr^a: Maria Clorinda Soares Fioravanti.

A minha “migs” Priscilla Neves Silvestre, pela companhia e por ter feito parte de mais essa etapa da minha vida, foi um caminho tortuoso, porem conseguimos vencer mais uma.

A minha amiga Camila Silveira, pelo incentivo, conselhos e empurrões, aos meus pastores Paulo Sergio Carmo e Ana Cristina Carmo pelas orações e conselhos.

Aos meus dois meninos lindos, Chester e Scott, por me receberem com alegria, independente da dificuldade do dia, mamãe ama.

Aos responsáveis pelo projeto, “REDE PRO-CENTRO OESTE”, por terem cedido gentilmente o banco de dados para a realização desse trabalho.

A Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-graduação em Zootecnia, tanto em nível estrutural como em nível pessoal, e pela oportunidade de completar mais essa etapa.

A CAPES pelo auxílio financeiro e concessão da bolsa de estudo para a condução do mestrado.

A todos aqueles que contribuíram direta e indiretamente para a realização deste trabalho, torcendo e me apoiando.

Muito obrigada!

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Efeitos da seleção na variação fenotípica da população.....	06
FIGURA 2 -Transformação dos escores iHS em $P_{ihs} = -\log_2\phi + [1-2 \Phi_{ihs} - 0,5]$, onde Φ_{ihs} representa a função de distribuição acumulada Gaussiana de iHS (B). Os marcadores com valores de P_{ihs} estatisticamente significativos ($P < 0,0001$) encontram-se acima da linha tracejada.....	35
FIGURA 3-Visualização dos genes contidos na região genômica BTA20:36500000-42300000.....	36
FIGURA 4 -Porcentagem de QTLs encontrados no banco de dados QTdb bovino na região BTA20: 36500000-42300000.....	38
FIGURA 5 -Número e tipo (deleção ou duplicação) de CNVs únicos encontrados em cada um dos cromossomos autossômicos da raça Curraleiro Pé Duro.....	50

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1-Coordenadas geográficas dos municípios e contingente amostral dos grupos regionais criados segundo um critério geopolítico de classificação de bovinos Curraleiro Pé-Duro.....	21
TABELA 1-Análise descritiva dos CNVs detectados na raça Curraleiro Pé Duro.....	27
QUADRO 2- Variações no número de cópias identificados em pelo menos 4% da população de Curraleiro Pé Duro.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

BRX1	Homólogo da Proteína BRX1 da Biogênese do Ribossomo
CPD	Curraleiro Pé Duro
CNVs	Variação no número de cópias
DL	Desequilíbrio de Ligação
DGAT1	Diacilglicerol O-aciltransferase 1
DP	Desvio Padrão
EHH	Homozigose do Haplótipo Estendido
EHW	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
FAB4	Proteína de Ligação a Ácidos Graxos 4
GH	Hormônio do Crescimento
GOLPH3	Fosfoproteína de Golgi 3
GDNF	Fator neurotrófico derivado de célula glial
iHS	Escore de Integração dos Haplótipos
IL7R	Receptor Interleucina 7
LEP	Leptina
LRH	Haplótipos de Longo Alcance
NPR3	Receptor 3 do peptídeo natriurético atrial
PB	Pares de Base
PRL	Prolactina
QTLs	Locos de Características Quantitativas
SNP	Nucleotídeo de Polimorfismo Único
SS	Assinatura de Seleção
SLC1A3	Transportador de aminoácidos excitatório 1
TARS	Treonina - tRNA ligase citoplasmático
TTC23L	Tetratricopeptídeo repete proteína 2

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	13
2.1.1 Origem e histórico da raça Curraleiro Pé-Duro.....	13
2.1.2 Origem das assinaturas de seleção.....	14
2.1.3 Uso de marcadores moleculares para identificação de assinaturas de seleção	16
2.1.4. Principais metodologias de detecção de assinaturas de seleção	17
2.1.5. Seleção para características de adaptabilidade	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
3.1 Obtenção de amostras e genótipos.....	20
3.2 Detecção das assinaturas de seleção	21
3.2.1 Controle de qualidade (CQ) de SNPs	21
3.2.2 Inferência das fases de ligação	22
3.2.3 Detecção de assinaturas de seleção.....	22
3.3 Identificação de CNVs na raça Curraleiro Pé Duro.....	22
3.3.1 Detecção dos CNVs.....	22
3.4 Análise de enriquecimento funcional	23
4. RESULTADO E DISCUSSÃO	23
5. CONCLUSÃO	30
6. REFÊRENCIAS	31
APÊNDICES.....	39

RESUMO

A utilização de novas tecnologias moleculares na produção animal tem crescido significativamente nos últimos anos, já que permitem entender a arquitetura genética das características de interesse. Sendo assim, no presente trabalho objetivou-se identificar as assinaturas de seleção e as variações no número de cópias (CNVs) presentes no Curraleiro Pé-Duro (CPD), com o intuito de identificar os genes relacionados à capacidade produtiva e adaptativa dessa raça. Para tanto foram utilizados Illumina® BovineHD BeadChip de 126 bovinos CPD, provenientes de 20 propriedades distintas. Para a detecção de assinatura de seleção, o controle de qualidade dos SNPs foi realizado com base na taxa de determinação de SNP e amostra igual ou superior a 90% e SNPs com frequência alélica menor inferior a 3% utilizando o programa Plink versão 2.0. A construção dos haplótipos cromossômicos foi realizada utilizando o programa Beagle. A identificação das assinaturas foi realizada pelas metodologias: Escore de Integração dos Haplótipos (iHS), Homozigose do Haplótipo Estendido (EHH) e teste de haplótipos de longo alcance (LRH). Para a identificação de CNVs, foi feita por meio do software PennCNV, com ajuste para o conteúdo de Guanina e Citosina (GC) de uma janela genômica de 500 pares de base (pb). O controle de qualidade foi realizado usando desvio padrão de LRR inferior a 0,3, desvio padrão de BAF inferior a 0,01 e fator de ondulação inferior a 0,05, amostras que apresentaram mais de 150 CNVs e marcadores com tamanho menor do que 5 mil pb foram removidos. A identificação de assinaturas de seleção, mostrou-se como efetiva na identificação de regiões genômicas associadas as características de produção, sendo as mesmas relacionadas principalmente a adaptabilidade, pois apresentam genes responsáveis ligados a termotolerancia e resistência a doenças. Os CNVs estão em regiões do genoma que abrigam genes relacionados com termotolerância, reprodução e balanço energético negativo. Os resultados encontrados em ambos os estudos reforçam regiões do cromossomo BTA 20 como potenciais candidatos para a seleção dessas características.

Palavras-chaves: adaptabilidade, EHH, iHS, raças localmente adaptadas, resistência

ABSTRACT

The use of new molecular technologies in animal production has grown significantly in recent years, as it allows us to understand the genetic architecture of the traits of interest. Thus, the present work aimed to identify the selection signatures and the copy number variations (CNVs) present in Curraleiro Pé-Duro (CPD), in order to identify genes related to the productive and adaptive capacity of this breed. For this purpose, Illumina® BovineHD BeadChip genotypes of 120 CPD cattle from 20 different properties were used. For selection signature detection, the quality control of SNPs was performed based on the SNP and sample call rate equal to or greater than 90% and SNPs with minor allelic frequency less than 3% using the software Plink. The construction of chromosomal haplotypes was performed using the Beagle software. Signatures were identified by the following methodologies: Haplotype Integration Score (iHS), Extended Haplotype Homozygosity (EHH) and Long Range Haplotype Test (LRH). The identification of CNVs was performed using PennCNV software, adjusting the Guanine and Cytosine (GC) content of a 500 base pair (bp) genomic window. Quality control was performed using LRR standard deviation less than 0.3, BAF standard deviation less than 0.01 and wave factor less than 0.05, samples with more than 150 CNVs and markers smaller than 5,000 bp has been removed. The identification of selection signatures proved to be effective in identifying genomic regions associated with production traits, and they are mainly related to adaptability, as they are related to thermotolerance and disease resistance. CNVs are in regions of the genome that harbor genes related to thermotolerance, reproduction and negative energy balance. The results found in both studies reinforce regions of the BTA 20 chromosome as potential candidates for the selection of these characteristics

Keywords: adaptability, EHH, iHS, locally adapted breeds

1. INTRODUÇÃO

A seleção para fenótipos desejáveis vem sendo praticada em bovinos desde sua domesticação, que ocorreu há aproximadamente 10.000 anos¹. Este processo de domesticação acarretou mudanças acentuadas em características comportamentais e morfológicas nas subespécies, concomitantemente com o desenvolvimento das raças e dos programas de melhoramento genético, acarretando o aparecimento de uma gama de variedade nos padrões e nos tipos raciais conhecidos atualmente^{2,3}.

Desde a divulgação do genoma de referência bovino e do desenvolvimento de microarranjos de polimorfismos de sítio único (SNP -*Single Nucleotide Polimorphism*), o uso de marcadores moleculares vem sendo amplamente utilizado para compreender a relação entre os genes e as características de interesse econômico. Dentre os marcadores mais estudados, podemos destacar as variações no número de cópias (CNV -*Copy Number Variant*) como os que apresentam maior efeito em características de difícil mensuração e seleção como resistência a doenças e ecto e endoparasitas, reprodução e adaptação².

Com o auxílio dos marcadores moleculares, também é possível realizar análises genéticas mais complexas, o que configura um enorme avanço para o monitoramento de espécies locais². Dentre as diferentes abordagens genômicas, podemos citar a identificação de assinaturas de seleção (SS - *Signature of Selection*) como um método eficiente na prospecção de regiões associadas a características de produção.

As SS, são geralmente associadas aos genes ligados a aspectos fisiológicos ou reprodutivos³, composição da carcaça⁴ ou padrões raciais^{5,6}. Ainda podem estar relacionadas a miscigenação⁷ ou mesmo ao histórico de seleção nas raças que apresentam ancestrais, aptidão produtiva e origem geográfica comum ou distinta^{8,9}.

Entende-se que o processo de seleção ocasiona desvios em relação aos padrões esperados de variação molecular quando comparados aos padrões de uma população que está em neutralidade. Com isso, cada modelo de seleção tende a ocasionar mudanças específicas nos padrões de variação tanto nos loci selecionados, quanto nos neutros que estão ligados a eles. Tais marcas deixadas pela seleção no genoma são conhecidas como assinaturas de seleção, podendo ser utilizadas para identificar os genes sujeitos a seleção⁵.

Raças localmente adaptadas são de grande importância para o estudo de características de adaptabilidade aos trópicos, pois contém uma série de informações que levem a descoberta/validação de genes/regiões genômicas envolvidos com essa característica.

Além disso, quanto maior o número de informações e conhecimento sobre uma raça localmente adaptada, maior o seu potencial de utilização nos sistemas de produção minimizando seu risco de extinção.

Por isso, as raças localmente adaptadas de bovinos brasileiras trazem em seus genes, um enorme potencial de utilização apresentando uma especificidade ecológica e produtiva que podem ser exploradas do ponto de vista genético. Dessa forma, o objetivo do presente trabalho é identificar os CNVs e as assinaturas de seleção em animais da raça Curraleiro Pé-Duro (CPD).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1.1 Origem e histórico da raça Curraleiro Pé-Duro

Os rebanhos de bovinos da raça CPD, tem sua origem em animais que foram trazidos pelos Portugueses da Península Ibérica para o Brasil, no período do descobrimento entre 1533 e 1534. Esses animais foram trazidos com intuito de fornecer subsídios para os colonos, levando em consideração que os povos indígenas se alimentavam basicamente de frutas, raízes e proteína animal obtida da caça e da pesca^{5,6}. De acordo com Primo⁷, as raças bovídeas brasileiras locais apresentam em sua formação, animais da raça baio-avermelhado de Portugal.

O crescimento e o desenvolvimento da raça ocorreram com interferência humana mínima, em sistemas extensivos de produção. A pressão de seleção exercida pelo ambiente ocasionou a sobrevivência apenas dos indivíduos que melhor se adaptaram ao meio, o que resultou na seleção de animais adaptados aos trópicos, isto é, pouco exigentes do ponto de vista nutricional e resistentes a doenças e parasitas⁸.

No processo de formação das raças, é importante pontuar que esta é resultado de adaptação e evolução no decorrer dos séculos, submetidas a diferentes pressões de seleção, que são impostas pelas condições climáticas, doenças, disponibilidade de alimentos e critérios impostos pelo homem. Sendo assim, esse processo está diretamente relacionado à perda de diversidade genética, e posteriormente à fixação e surgimento de características específicas⁹.

No ano de 2012, o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA), reconheceu a CPD como uma raça tradicional localmente adaptada, permitido assim que fosse registrada como tal, mesmo tendo sua origem em raças europeias (*Bos primigenius taurus*)⁹.

Atualmente, a raça CPD encontra-se nos biomas brasileiros Cerrado e Caatinga, sendo conhecido em alguns estados como Pé-Duro (Piauí e Maranhão) ou Curraleiro (Goiás e Tocantins)^{10,11}.

Apesar de a raça contar com um rebanho relativamente pequeno no Brasil, avalia-se que existam mais de 5.000 animais, com uma distribuição desuniforme, onde algumas regiões, como os estados de Goiás e Tocantins, apresentam maior concentração de criadores^{10,11}.

Nos últimos anos, novos estudos têm sido realizados com relação às características fenotípicas, bioquímicas, epidemiológicas e sanitárias demonstrando que esses animais são extremamente adaptados aos trópicos, podendo representar uma alternativa em sistemas de produção desenvolvidos em regiões como o sertão brasileiro, onde as temperaturas são elevadas e os recursos hídricos e nutricionais são críticos^{12,13,14}.

2.1.2 Origem das assinaturas de seleção

Quando uma determinada população possui diferentes fenótipos e ocorre o aumento do número de animais que apresentam vantagem adaptativa para sobrevivência e reprodução em um determinado ambiente, ocorre o que denominamos de seleção¹⁵, que pode ser um processo natural ou artificial.

A seleção natural é um dos processos evolutivos mais importantes na geração de novas espécies e ocorre quando o fenótipo considerado favorável é selecionado pelo ambiente, isto é, quando não há nenhuma interferência do homem. Já a seleção artificial, ocorre quando o homem determina quais animais serão acasalados e transmitirão seus genótipos para as próximas gerações. Sendo assim, esse tipo de seleção ocorre devido ao interesse do homem em melhorar alguma característica específica.

No que se refere aos efeitos da seleção na variação fenotípica da população, podemos classificá-la como demonstrado na Figura 1, onde: A: Direcional, quando favorece extremos fenotípicos existentes na população; B: Estabilizadora, quando favorece a manutenção dos fenótipos intermediários e; C: Disruptiva, quando favorece mais de um fenótipo da população de maneira simultânea¹⁶.

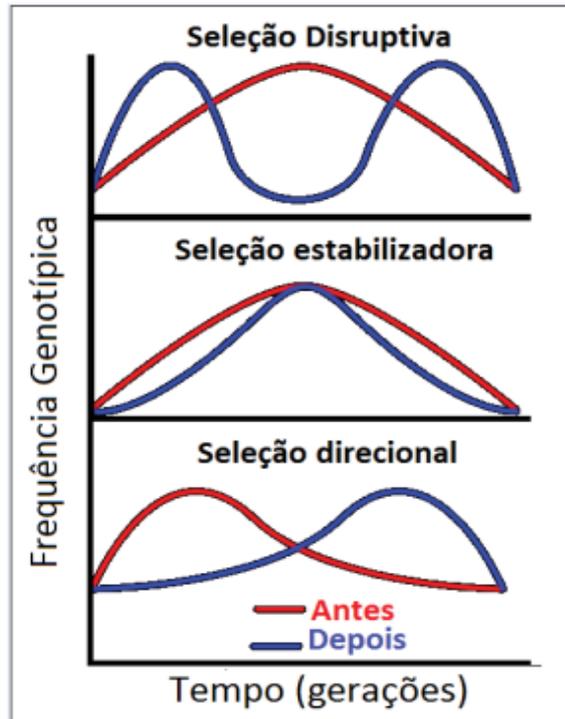


FIGURA 1 - Efeitos da seleção na variação fenotípica da população¹⁷.

Do ponto de vista molecular, a seleção pode ser definida como um processo que acarreta alteração na frequência dos alelos de modo não aleatório, devido aos efeitos ambientais ou humanos exercidos sob determinado fenótipo¹⁸. Desse modo, a seleção pode ser classificada como: Positiva (Darwiniana), Negativa (Purificadora) ou Balanceadora¹⁹.

A seleção Positiva ocorre quando alelos recentemente introduzidos na população e que conferem vantagens adaptativas aos indivíduos, tem sua frequência aumentada e podem apresentar-se posteriormente fixados. Já na seleção Negativa, os alelos deletérios ou que conferem valor adaptativo reduzido, tem suas frequências diminuídas, até que estejam ausentes na população. Ambos os processos provocam redução direta da diversidade genética¹⁹.

Em contrapartida, a seleção balanceadora ocorre quando os alelos em heterozigose são vantajosos, o que provoca o aumento da variabilidade genética em determinada população. Tal diversidade genética é mantida através de mecanismos como sobredominância²⁰.

Mesmo que não haja correspondência clara entre as classificações já estabelecidas para seleção nos estudos de genética quantitativa e molecular, a principal forma de seleção positiva é supostamente direcional²¹ principalmente se os genes que estão sob seleção apresentarem modo de ação aditivo. Como as principais características de interesse zootécnico apresentam

este modo de ação, as regiões genômicas que foram alteradas por seleção positiva, tem sido o ponto principal de estudos que visam compreender o controle e a arquitetura genética dessas características nas diferentes espécies animais²¹.

Alguns estudos tem mostrado a ocorrência de seleção em regiões genômicas onde se localizam genes diretamente associados à características de produção, como o observado no gene GDF8 (Fator de Diferenciação 8) que é diretamente relacionado com o fenótipo da musculatura dupla²², o gene DGAT1 (*Diacylglycerol O-acyltransferase 1*), que está associado ao teor de gordura presente no leite de bovinos leiteiros²³, o gene LEPR (*Leptin Receptor*), associado com o balanço de energia, deposição de gordura na carcaça e ao crescimento em *Bos taurus*²⁴, o gene FAB4 (*Fatty Acid Binding Protein 4*), que está relacionado ao metabolismo de lipídios e homeostase de adipócitos²⁵, dentre outros.

O processo de seleção no qual cada população é submetida aumenta ou diminui a frequência alélica de regiões específicas do genoma, o que estabelece a formação de padrões genômicos¹⁸. Isso acontece devido ao desequilíbrio de ligação (DL), causado pela associação não aleatória de alelos em loci diferentes, o que acarreta um desvio nas frequências alélicas observadas quando comparadas às esperadas em populações em equilíbrio de Hardy Weinberg²⁶.

Os padrões genômicos identificados em diferentes populações devido à seleção positiva são denominados de Assinaturas de Seleção¹⁵ e podem ocorrer tanto na seleção artificial quanto natural, onde mutações favoráveis são transmitidas para as próximas gerações. Como as mutações consideradas favoráveis e sob seleção encontram-se em DL com alguns dos seus loci adjacentes, estes loci serão segregados “de carona”, de modo dependente dos genes sob seleção, formando blocos denominados de haplótipos¹⁵.

Os haplótipos serão transmitidos para as próximas gerações, o que conserva não somente o alelo de interesse, mas toda a região do genoma que se encontra adjacente e em DL a ele, caracterizando assim a região uma assinatura²⁷. A identificação dessas assinaturas pode ajudar a entender o processo evolutivo, além de possibilitar a identificação de regiões genômicas associadas às características de interesse nas diferentes raças e espécies²⁸.

2.1.3 Uso de marcadores moleculares para identificação de assinaturas de seleção

Os marcadores moleculares podem ser definidos como qualquer fenótipo molecular oriundo de gene expresso ou de seguimento específico de DNA²⁹ e são considerados como

uma importante ferramenta para identificar e acessar a variação genética entre os indivíduos³. Os marcadores moleculares mais utilizados atualmente na produção animal são os SNPs e CNVs.

Os SNPs são variações que ocorrem na sequência de DNA e afetam somente uma das bases nitrogenadas em aproximadamente 1% da população^{30,31}. Uma série de fatores tem contribuído para o crescente interesse no uso de SNPs como marcadores para análises genéticas, como o fato de que são encontrados em abundância no genoma, sua facilidade de genotipagem provida pelas tecnologias atuais, e por estarem localizados em regiões codificantes e regulatórias que influenciam na expressão gênica de proteínas mutantes^{32,33}.

Podem ser aplicados em estudos de filogenia e mapeamento genético de características de interesse zootécnico, usando como base o desequilíbrio de ligação³⁴, como também em análise de estrutura populacional e seleção assistida. Sua aplicabilidade, ainda pode ser vista na análise genética de doenças de características complexas; farmacogenômica e nutrigenômica e, tem sido muito usado em testes de paternidade em bovinos e nos estudos de seleção genômica ampla utilizando várias espécies domésticas^{34,35,36,37}.

As CNVs são originadas como inserções, deleções, duplicações e inversões na sequência de DNA e alguns trabalhos ressaltam a associação desses marcadores com características quantitativas de difícil seleção em bovinos como reprodução, longevidade, adaptabilidade e susceptibilidade a infestação por nematoides intestinais^{38,39}.

Atualmente, dados provenientes da genotipagem de alta densidade de SNPs tem sido utilizado de maneira ampla na identificação de CNVs e na detecção das SS, pois permitem o acompanhamento da segregação de alelos por gerações e o reconhecimento dos padrões de haplótipos e de frequências alélicas na população. A identificação de assinaturas de seleção em todo o genoma e sua associação com características quantitativas contribuem para a compreensão da arquitetura genéticas das características, além de possibilitar a escolha de marcadores ou genes candidatos para programas de seleção assistida⁴⁰.

2.1.4. Principais metodologias de detecção de assinaturas de seleção

São vários os métodos usados para detecção de assinaturas de seleção através de dados genômicos, sendo a maioria deles fundamentado na distribuição das frequências alélicas ente populações⁴¹. Entretanto, as mais utilizadas atualmente na identificação de SS, são os testes de homozigose dos haplótipos, descritos como: Homozigose do Haplótipo Estendido – *EHH*;

Homozigose Relativa do Haplótipos Estendido – *REHH* e o Escore de Integração de Haplótipos – *iHS*.

O método homozigose do haplótipo estendido relaciona as frequências dos alelos e a extensão do DL ao redor destes. Nesse método, o DL é utilizado para medir a associação entre um único alelo núcleo, em um locus, com múltiplos loci em diferentes distâncias. Sendo assim, com o decaimento do DL ao se distanciar do alelo núcleo testado, a EHH decresce, e ao construir a curva entre a EHH e a distância da região núcleo, a área sob esta será maior tanto quanto mais extenso for a homozigose dos haplótipos ao redor do alelo núcleo testado¹⁴.

Para a obtenção da estatística *iHS* são utilizadas as integrais da estatística EHH (“integrated” EHH - *iHH*) para os alelos derivados e ancestrais dos marcadores, o que resulta na área sob a curva da EHH, na qual a distância entre os alelos está no eixo x e a EHH no eixo y. Os alelos ancestrais são os considerados idênticos por descendência (“identity by descent” - IBD), presentes em ancestrais comuns da raça, sendo os derivados, os demais alelos com origem desconhecida na população (mutação ou fluxo gênico)⁴².

As fórmulas utilizadas para a detecção das SS pelas metodologias supracitadas encontram-se descrita abaixo

a) Homozigose do Haplótipo Estendido (“extended haplotype homozygosity” - *EHH*)¹⁷.

$$EHH_t = \frac{\sum_{i=1}^s (2^{eti})^s}{(2^{ct})}$$

Em que:

EHH_t : homozigose do haplótipo estendido de um SNP núcleo testado (t);

ct : número de amostras de um haplótipo núcleo particular (em teste);

eti : número de amostras de cada haplótipo estendido presente no bloco;

s : é o número de haplótipos estendidos do bloco.

b) Integral da EHH (“integrated” EHH - *iHH*)⁴².

$$iHHT = \int EHH_t$$

Em que:

EHH: homozigose do haplótipo estendido de um SNP núcleo testado (t);

iHHT : integral da EHH do SNP núcleo testado (t).

c) Escore de Integração dos Haplótipos (“integrated haplotype score” - iHS)⁴².

$$iHS = \frac{\ln\left(\frac{iHH_A}{iHH_D}\right) - Ep\left[\ln\left(\frac{iHH_A}{iHH_D}\right)\right]}{SD_p\left[\ln\left(\frac{iHH_A}{iHH_D}\right)\right]}$$

Em que:

iHH_A : integral da EHH de alelos ancestrais, em relação a um SNP núcleo testado;

iHH_D : integral da EHH de alelos derivados, em relação a um SNP núcleo testado;

Ep e SDp: esperança e desvio-padrão de $\ln\left(\frac{iHH_A}{iHH_D}\right)$, estimados à partir da distribuição empírica de SNP cuja frequência do alelo derivado p corresponda a frequência no SNP núcleo.

2.1.5. Seleção para características de adaptabilidade

De modo geral, as raças bovinas podem ser amplamente divididas entre raças taurina, de origens europeia e africana, raças zebuínas, de origem indiana, e populações de animais mestiços, provenientes do cruzamento entre raças. Um pequeno número dessas raças tem distribuição mundial, enquanto muitas delas evoluíram em áreas restritas e permanecem em nível local ou regional⁴³.

Os países tropicais são ricos em uma ampla diversidade de raças crioulas, cujas características permanecem na maior parte não descritas. Essas características são o resultado de várias forças, como o histórico genético das populações ancestrais, a influência do ambiente agroecológico no qual elas evoluíram e as preferências e práticas dos criadores⁴³.

As raças tropicais bovinas desenvolveram atributos e funções específicas, para se adaptar a uma ampla gama de restrições ambientais e sistemas de produção como a capacidade de tolerar alta temperatura ambiente, com um efeito reduzido em suas habilidades de produção, resistência a parasitas internos ou externos e doenças infecciosas, valorização de dietas irregulares, tolerância a condições adversas e capacidade de recuperação em épocas mais favoráveis e habilidade de trabalho. Essas características podem ser de grande utilidade no futuro para enfrentar os efeitos deletérios das mudanças climáticas^{43,44}.

As características fisiológicas necessárias para a expressão desses fenótipos são complexas e sua base genética ainda não foi elucidada. No entanto, alguns estudos de identificação de assinaturas de seleção e com marcadores CNV fornecem algumas

informações sobre o contexto genético de algumas características de adaptação de raças tropicais bovinas locais que podem ser úteis no futuro para enfrentar os efeitos diretos e indiretos da mudança climática na pecuária^{43,44}.

Levando em consideração que a raça CPD foi formada no Brasil e que todo o processo de seleção da raça ocorreu no território nacional, e que a mesma é muito bem adaptada aos trópicos devido a sua rusticidade previamente atestada por diversos trabalhos, a raça pode ser considerada como um excelente modelo para estudos da evolução da adaptação e para identificação de genes associados as características de adaptabilidade ao sistema de produção tropical.

Sendo assim, a presente dissertação objetiva identificar as assinaturas de seleção e os marcadores do tipo CNV na raça CPD com o intuito de identificar genes candidatos para implementação em programas de seleção, novas estratégias de cruzamento para introgressão desses genes, e para o uso em biotecnologias de ponta como a edição gênica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção de amostras e genótipos

Para este trabalho, foram utilizados genótipos SNP de 126 bovinos CPD, provenientes de 20 propriedades rurais distintas, cedidos pela professora Maria Clorinda Soares Fioravanti da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás, onde os mesmos compõem o banco de dados do projeto “REDE PRO-CENTRO OESTE Caracterização, Conservação e Uso das Raças Bovinas Locais Brasileiras: Curraleiro e Pantaneiro”.

A coleta e a genotipagem do material biológico das amostras utilizadas no presente experimento foi realizada pelo médico veterinário Marcelo Corrêa da Silva⁴⁵ como parte da metodologia da tese intitulada “Genômica de populações e genética geográfica de bovinos Pantaneiros e Curraleiro Pé-Duro com uso de polimorfismos de base única (SNP) ”.

A seleção das amostras foi realizada pela avaliação visual dos indivíduos, sendo priorizados animais com padrão racial CPD sem indicio de características de bovinos zebuínos (*Bos taurus indicus*). A estatística descritiva do número de amostras coletadas por propriedade rural e região do país está descrita no Quadro 1.

Quadro 1 – Coordenadas geográficas dos municípios e contingente amostral dos grupos regionais criados segundo um critério geopolítico de classificação de bovinos Curraleiro Pé-Duro³.

Grupo	Estados	Municípios	Longitude	Latitude	(n)	
Curraleiro Pé-Duro (n=126)	CPD-GO	Água Fria de Goiás	-47,7954	-14,9065	047	
		Campestre de Goiás	-49,7000	-16,7875	07	
	Goiás (n=56)	Cavalcante	-47,6961	-13,6352	07	
		Mimoso de Goiás	-48,3084	-15,0171	07	
		Monte Alegre de Goiás	-46,9234	-13,2946	07	
		Pilar de Goiás	-49,5216	-14,5872	07	
		Pirenópolis	-49,0113	-15,8089	07	
		Planaltina	-47,7518	-15,2834	07	
	CPD-TO	Chapada da Natividade		-47,8462	-11,5420	07
			Guaraí	-48,4415	-8,7391	07
		Tocantins (n=27)	Porto Nacional	-48,4966	-10,5442	06
			Sucupira	-48,8351	-12,1135	06
	CPD-PI	Piauí (n=43)	Campo Maior*	-42,1456	-4,8775	17
			Elesbão Veloso	-42,1903	-6,1874	07
			Oeiras	-42,1649	-6,9667	07
Palmeirais			-42,9565	-5,8825	06	
São João do Piauí			-42,2500	-8,3248	06	

As amostras foram genotipadas com o ensaio *Bovine SNP50 Genotyping BeadChip* (Illumina, San Diego, EUA) composto por 53.714 SNPs e seguiu o protocolo cedido pelo fabricante em uma empresa terceirizada.

3.2 Detecção das assinaturas de seleção

3.2.1 Controle de qualidade (CQ) de SNPs

O controle de qualidade dos SNPs foi realizado inicialmente em 53.714 SNPs por amostra, sendo mantidos para a detecção das SS apenas marcadores que se localizam nos

cromossomos autossômicos, que apresentaram taxa de determinação de SNP e amostra igual ou superior a 90% e SNPs com frequência alélica menor superior a 3%⁴⁶. O controle de qualidade foi realizado utilizando o programa Plink versão 2.0⁴⁷.

Assim como outros autores^{48,49,50} não foi utilizado como critério de controle de qualidade o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), pois os filtros utilizados já proporcionaram controle de qualidade adequada propiciando resultados acurados.

3.2.2 Inferência das fases de ligação

Para utilizar a metodologia de detecção de SS escolhida, é necessário que previamente sejam realizadas a inferência das fases de ligação dos SNPs e a construção dos haplótipos cromossômicos. Para tal, foi utilizado o software Beagle⁵¹.

Para manipular o arquivo de dados provenientes da genotipagem de SNPs, o tornado passível de análise pelo programa Beagle, foram utilizados scripts customizados do programa R⁴⁷.

3.2.3 Detecção de assinaturas de seleção

A identificação das assinaturas foi realizada pela metodologia denominada de Escore de Integração dos Haplótipos (“integrated haplotype score” - iHS)⁵². A detecção das SS foi realizada pelo pacote rehh⁵³ do programa R⁴⁷. As assinaturas de seleção consideradas significativas foram as que apresentaram $P < 0.001$.

No presente trabalho foram considerados como alelos ancestrais o banco de dados disponível online no material suplementar⁴⁶.

3.3 Identificação de CNVs na raça Curraleiro Pé Duro

3.3.1 Detecção dos CNVs

A identificação dos CNVs foi realizada pelo software PennCNV⁵⁴. Esse programa computacional é gratuito e utiliza dados de intensidade de sinal dos microarranjos de SNP da empresa Illumina, como as informações do Log da razão de R (*Log R Ratio* - LRR) e a frequência do alelo B (*B allele frequency* - BAF) para a identificação de marcadores CNV.

A detecção dos marcadores foi realizada com ajuste para o conteúdo de Guanina e Citosina (GC) de uma janela genômica de 500 pares de base (pb) antes e depois da localização de cada um dos SNPs do microarranjos. Os cromossomos sexuais e os SNPs com coordenadas não identificadas ou duplicados foram excluídos da análise.

Após a detecção foi realizado o controle de qualidade dos CNVs encontrados, mantendo para as análises posteriores apenas os marcadores que apresentam os seguintes critérios: desvio padrão de LRR inferior a 0,3, desvio padrão de BAF inferior a 0,01 e fator de ondulação inferior a 0,05. Adicionalmente foram removidos do banco de dados amostras que apresentaram mais de 150 CNVs e marcadores com tamanho menor do que 5.000 pb. As estatísticas descritivas dos CNVs foram realizadas através do software R⁴⁷.

3.4 Análise de enriquecimento funcional

Após a detecção das SS e do CNVs foi realizada a análise de enriquecimento funcional para identificar os genes presentes nas regiões genômicas e os QTLs previamente descritos na literatura e que estão localizados nas regiões que apresentaram significância estatística ($P < 0,001$). O programa BEDtools⁵⁵ foi utilizado para mapear os genes e os QTLs provenientes do banco de dados Ensembl genes 79, montagem *Bos taurus* UMD 3.1⁵⁶ e do banco de dados QTLdbase de bovinos^{57,58}, respectivamente. A análise de enriquecimento funcional foi realizada com o programa Panther⁵⁹.

4. RESULTADO E DISCUSSÃO

Após o controle de qualidade dos genótipos, foram mantidas 126 amostras e 30.644 SNPs para a identificação das SS. A densidade de SNPs restantes é considerada suficiente para a realização do estudo proposto, entretanto, uma maior densidade de SNPs, obtidos por painéis de alta densidade como o de 700K, favorece o processo de inferência das fases de ligação e imputação de genótipos faltantes, já que apresentam forte desequilíbrio de ligação entre os marcadores e reduzem os erros de imputação^{46,60}. O número de SNPs por cromossomos autossômicos após o CQ encontra-se no Apêndice 1.

A análise iHS demonstrou a existência de uma região genômica sob seleção ($P < 0,0001$) no cromossomo BTA20:36500000-42300000 (Figura 2). A localização cromossômica dos marcadores e a dispersão dos valores de iHS, calculados para cada um dos

marcadores encontra-se no Apêndice 2. A distribuição iHS é aproximadamente normal, com média zero e variância um ($iHS \sim N(0, 1)$), como verificada no Apêndice 3, o que possibilita que os marcadores e cromossomos possam ser comparados entre si.

A assinatura de seleção encontrada no BTA20 se localiza na mesma região que o autor⁶¹, observou ser responsável por explicar 0,63% da variância fenotípica encontrada em resistência à mastite no gado Holandês. De acordo com esse autor, a região BTA20:32174117-61609342, que se encontra em sobreposição com a SS observada nesse estudo, é reconhecidamente associada à mastite clínica.

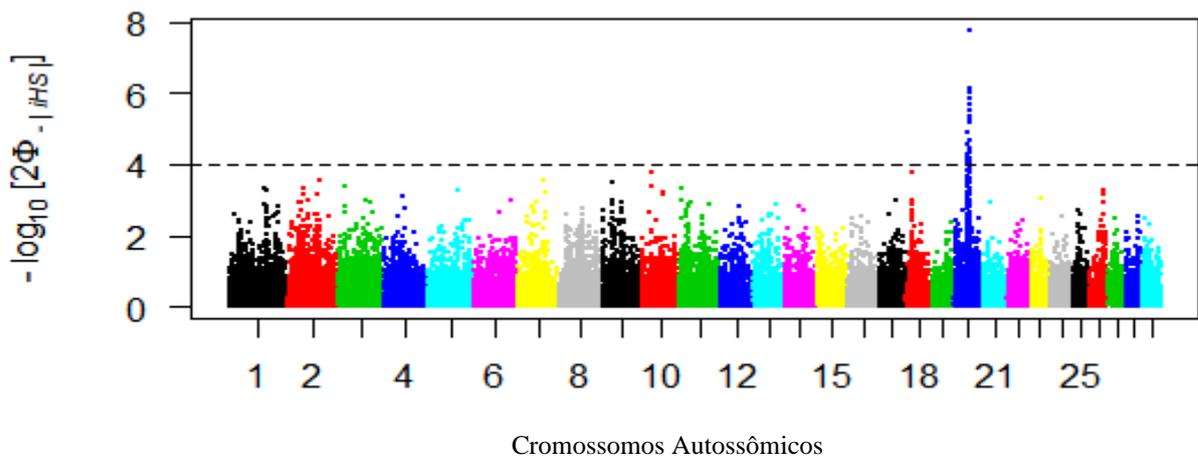
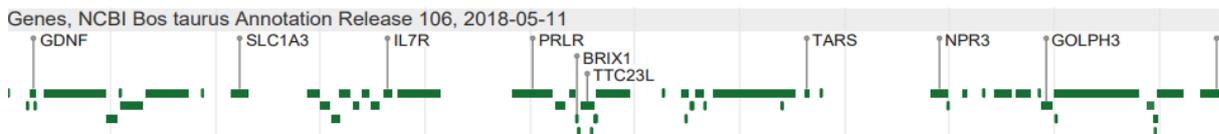


FIGURA 2 - Transformação dos escores iHS em $P_{ihs} = -\log_{10}[1-2|\Phi_{ihs} - 0,5|]$, onde Φ_{ihs} representa a função de distribuição acumulada Gaussiana de iHS (B). Os marcadores com valores de P_{ihs} estatisticamente significativos ($P < 0,0001$) encontram-se acima da linha tracejada.

A SS encontrada no presente estudo se sobrepõe as assinaturas de seleção encontradas por⁶², que observou a associação entre a região BTA20: 37.7–38.5 Mb associada com a presença de pêlo SLICK. Esse tipo de pelagem apresenta relevância na tolerância térmica para algumas raças adaptadas, sendo um produto da seleção natural, bem como um critério de seleção moderno para muitos criadores em climas tropicais e subtropicais^{63,64,65}. Tal pêlo é descrito muito curto, onde o mesmo é observado principalmente em bovinos *Bos taurus* tropicais de descendência Crioula na América Central e do Sul, em comparação com o pêlo mais comprido geralmente observado em *Bos taurus* de outras zonas climáticas. O pêlo SLICK já foi encontrado nas raças Senepol, Carora, Crioula Limonero e Romosinuano^{63,64,65,66}, todas raças consideradas adaptadas aos trópicos e com origem em países como Espanha e Portugal, assim como o CPD.

Essa região do cromossomo 20 também está relacionada com a sobrevivência de bovinos à *Tripanossoma*⁶⁷. Os autores afirmam que genes presentes nesta região são responsáveis por tornar o animal mais resiliente à doença, já que favorecem o controle da anemia dos animais doentes, sendo associados a diversos QTLs responsáveis por características de sobrevivência⁶⁷.

De acordo com o genoma bovino de referência (UMD 3.1), a assinatura de seleção encontrada nos animais CPD contém nove genes, sendo eles: GDNF (*Glial cell derived neurotrophic factor*), SLC1A3 (*Excitatory amino acid transporter 1*), IL7R (*Interleukin 7 receptor*), PRPL (*Prolactin receptor*), BRX1 (*Ribosome biogenesis protein BRX1 homolog*), TTC23L (*Tetratricopeptide repeat protein 23-like*), TARS (*Threonine--tRNA ligase, cytoplasmic*), NPR3 (*Atrial natriuretic peptide receptor 3*), GOLPH3 (*Golgi phosphoprotein 3*) (Figura 3). A descrição e a função dos genes encontram-se no Quadro 2. Os genes TTC23L e NPR3 não apresentam função conhecida;



FUGURA 3 - Visualização dos genes pelo software Chrome Browser contidos na região genômica BTA20:36500000-42300000.

Dentre os genes que merecem destaque, podemos citar o PRLR, que está associado a características de produção e escore de células somáticas⁶⁸. Verificou que a prolactina aumentou significativamente em quartos de úbere com alta contagem de células somáticas e mastite crônica⁶⁹ e está correlacionada positivamente com o número de neutrófilos no leite, sugerindo que a prolactina pode regular positivamente a expressão de citocinas.

A anotação da região onde encontra-se a assinatura de seleção da raça CPD demonstrou a ocorrência de 462 QTLs já previamente descritos na literatura e depositados no banco de dados bovinos QTLdb. De modo geral, os QTLs estão relacionados às características de produção de leite, como porcentagem de gordura e proteína no leite, textura do pêlo, principalmente pêlo do tipo SLICK e sobrevivência e conversão alimentar residual (Figura 4).

Muitos dos QTLs já descritos na região estão envolvidos com características de adaptabilidade e produção de leite, reforçando a adaptabilidade dessa raça para a produção

nos trópicos. O que reforça que a identificação de assinaturas de seleção é uma abordagem efetiva para definir quais regiões genômicas estão potencialmente associadas às características de produção submetidas à pressão de seleção artificial ou natural.

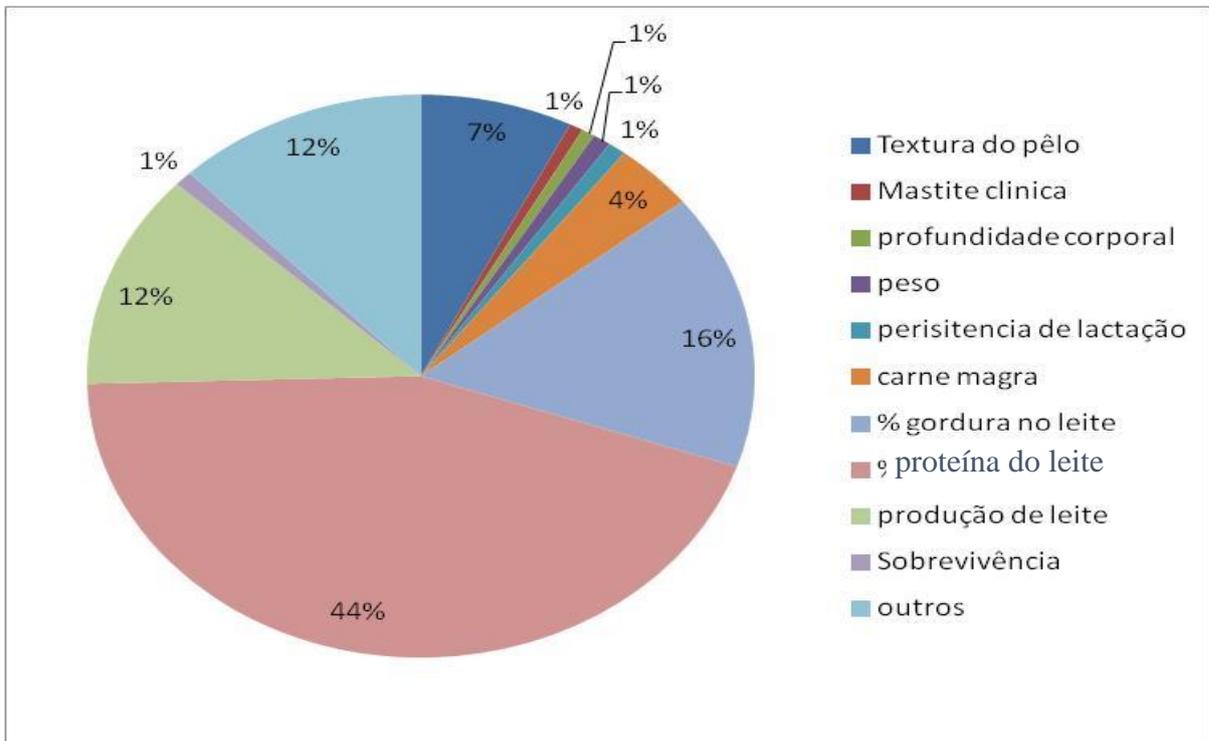


FIGURA 4 - Porcentagem de QTLs encontrados no banco de dados QTdb bovino na região BTA20: 36500000-42300000.

Com relação as análises de CNVs, foram identificados 770 CNVs antes do controle de qualidade nos cromossomos autossômicos das amostras analisadas ($n = 126$ animais). Após passar pelo controle de qualidade restaram 635 CNVs, o que representa uma redução de 17,53%, o que condiz como que foi demonstrado em outros estudos realizados em bovinos^{70,71,72}. Destes, 339 CNVs são únicos, sendo 17 deleções e 322 duplicações.

Sendo assim, com o protocolo de detecção utilizado, foi possível observar que a raça CPD apresenta 18,9 duplicações para cada deleção. O número elevado de duplicações encontradas pode ser explicado pelo histórico demográfico da raça, já que a mesma foi formada majoritariamente pela seleção natural. Esse tipo de seleção tende a remover da população variações deletérias, que em sua maioria são deleções, o que aumenta a frequência de duplicações já que as mesmas estão associadas a vantagens adaptativas⁷³. O número maior de duplicações na raça também pode representar um achado importante já que esse tipo de

evento tem maior chance de ser intragênico e afetar a codificação de proteínas do que as deleções^{74,75}.

A análise descritiva dos CNVs e o número de eventos encontrados por cromossomo na raça CPD estão demonstrados no Tabela 1 e Figura 5, respectivamente. De modo geral, os CNVs encontrados na raça apresentam características similares às encontradas em outras raças de bovinos^{71,72,76,77}. Entretanto, o número de CNVs encontrados foi menor na raça CPD. Essa divergência pode ter acontecido devido ao uso do microarranjos de 50.000 SNPs, o que pode não ter sido uma quantidade adequada de marcadores SNP para identificar todos os CNVs presentes na raça. Apesar da raça CPD ser taurina, a mesma não foi contemplada no desenvolvimento do microarranjos, o que pode ter comprometido a frequência dos SNPs genotipados acarretando o que denominamos de *ascertainment bias*. Esse tipo de viés aumenta o espaço entre marcadores, o que pode impactar negativamente a eficiência da detecção⁷⁸.

TABELA - 1 Análise descritiva dos CNVs detectados na raça Curraleiro Pé Duro.

	Mediana	Máximo	Mínimo	Média	Dp
número de snps/CNV	4,53	10,00	3,00	4,00	1,74
tamanho dos cnvs (pb)	144628,67	1362022,00	5163,00	110215,50	138845,91

Dp – desvio padrão; pb – pares de base

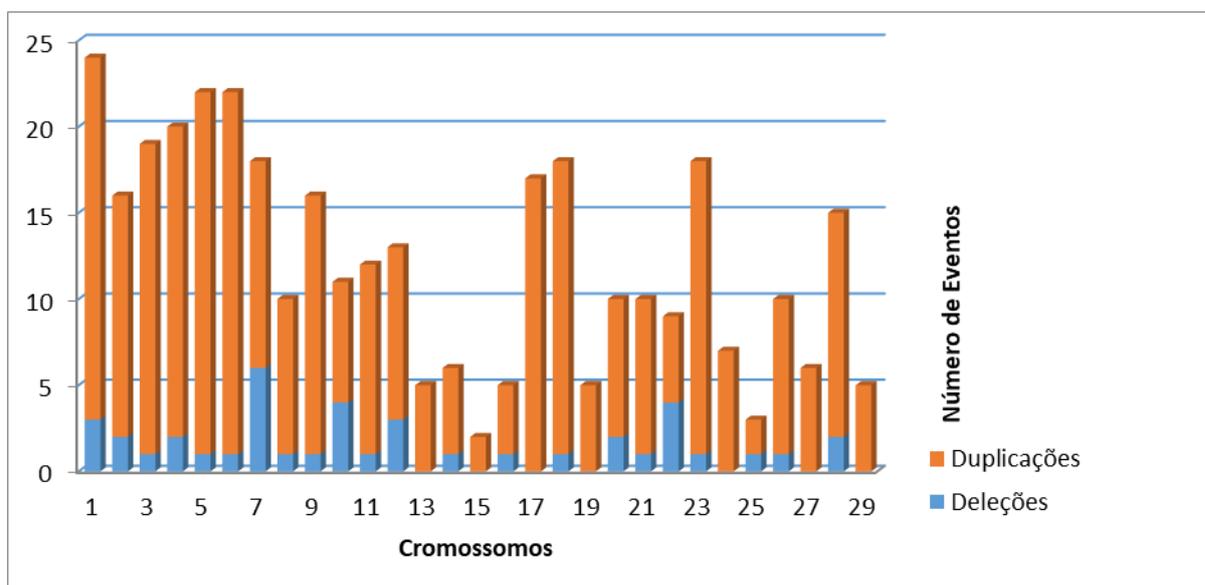


FIGURA 5 - Número e tipo (deleção ou duplicação) de CNVs únicos encontrados em cada um dos cromossomos autossômicos da raça Curraleiro Pé Duro.

Para a realização da identificação dos CNVs localizados em genes e suas respectivas funções, foram utilizados apenas os CNVs encontrados em pelo menos 4% da população estudada (Quadro 2). Dessa forma, foi possível observar que os mesmos se encontram em sobreposição com 123 genes, dos quais 56 são únicos. Os diversos CNVs encontrados na população estudada em baixa frequência indicam que essas variantes podem não estar associadas a características sob seleção positiva na raça CPD⁷⁹.

QUADRO 2- Variações no número de cópias identificados em pelo menos 4% da população de Curraleiro Pé Duro

CNV	Cromossomo	Posição (pb)	Frequência na população
1	4	93313430-93462288	31,0
2	23	34673581-35007295	25,4
3	23	34673581-34935332	13,5
4	17	40034778-40222707	9,5
5	20	27422842-27531454	9,5
6	11	83972216-84083499	7,9
7	23	34673581-34854207	7,9
8	5	59364363-59598727	7,9
9	4	92436001-92518922	7,1
10	5	77342835-77563893	7,1
11	17	39987851-40222707	6,3
12	21	15563937-15705393	6,3
13	23	34673581-35106094	5,6
14	26	42933219-43087057	5,6
15	28	2469724-2638563	5,6
16	11	83938054-84005567	4,8
17	12	24668970-24803254	4,8
18	20	59342623-59463186	4,8
19	3	115164918-115301282	4,8
20	5	103472289-103659884	4,8
21	15	22427547-22489913	4,0
22	18	15809537-15883183	4,0
23	21	15522832-15705393	4,0
24	23	34673581-35069770	4,0
25	23	34811200-35007295	4,0
26	3	120446774-120647330	4,0
27	3	95254105-95463621	4,0

Dentre os genes que apresentam CNVs e de importância para a adaptabilidade dessa raça, podemos destacar os envolvidos no sistema imunológico como IL-18 e vários genes que

codificam proteínas relacionadas à prolactina (PRP1, 2, 3, 6, 8, 9, 14, VII), e que se encontram associadas à via de sinalização de citoquinas no sistema imune⁸⁰.

Os genes IL-18 e PRPs também foram identificados em um estudo de associação genômica realizado em vacas Jersey, como relacionados à resposta metabólica à cetose⁸¹ e como diferencialmente expressos nos linfonodos mesentéricos de animais da raça Angus resistentes a nematódeos⁸².

Além de estarem relacionadas ao sistema imune, as PRPs são moléculas encontradas majoritariamente na placenta e que se expressam especificamente em células binucleadas trofoblásticas em bovinos. O PRP é membro da família prolactina (PRL) / hormônio do crescimento (GH) dos quais pelo menos treze membros ocorrem em bovinos, e suas sequências de nucleotídeos são significativamente análogas à PRL e PL nessa espécie^{83,84}.

Em bovinos e roedores, um grande número de PRP foi encontrado na placenta e com base em seus perfis de expressão durante a gestação, essas proteínas parecem funcionar na coordenação da gravidez, imunorregulação e regulação da implantação na interface feto materno⁸⁵.

O gene LEP (Leptina) também foi encontrado em sobreposição com CNVs na raça CPD e apresenta associação direta com a reprodução e metabolismo de bovinos. A leptina é uma substância secretada pelas células do tecido adiposo, isto é, uma adipocitocina, sendo muito importante na sinalização ao cérebro e aos tecidos periféricos sobre o balanço energético e as reservas corporais em mamíferos^{86,87}.

Inicialmente, sua função principal estava associada apenas à saciedade nas diferentes espécies, entretanto, diversos estudos demonstraram a sua função na adaptação a situações de baixa disponibilidade de energia, agindo como fator necessário para manutenção da homeostase energética e da quantidade de reservas corporais compatíveis com a vida^{88,89,90}.

A diminuição na concentração de leptina em animais subalimentados pode ser interpretada como um sinal para estimular a ingestão de alimentos, a secreção de glicocorticoides, a diminuição da atividade tireoidiana, o gasto de energia, a sensibilidade à insulina e a síntese de proteínas, além de bloquear as funções reprodutivas temporariamente. Estes mecanismos têm por finalidade preservar a vida diante de uma condição de estresse alimentar⁸⁸.

CNVs encontrados dentro de genes relacionados ao sistema imune e a reprodução corroboram com o fato de que esses marcadores podem estar diretamente relacionados às características de maior adaptabilidade da raça, considerando que a mesma, de modo geral, foi

selecionada em ambientes de pouca disponibilidade de alimento e expostas a um grande desafio ambiental.

Após a classificação funcional dos genes, foi possível subdividi-los pela categoria funcional em processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e classes de proteínas como demonstrado no apêndice 5.

Dentre os genes mais frequentes na população CPD, a maioria deles está associada a funções moleculares (n=68), processos biológicos (n=50) e componentes celulares (n=49), sendo os termos mais bem representados os Processos celulares (GO:0009987) e Célula (GO:0005623). Muitas das categorias funcionais encontradas no presente trabalho foram previamente relatadas como importantes para a expressão de fenótipos como reprodução (idade do primeiro estro, fertilidade, intervalo entre partos)⁹¹, resistência a endo e ectoparasitas⁹², tolerância ao calor⁹³, resistência a doenças⁹⁴, bem como características de crescimento e de qualidade de carcaça e carne⁹⁵.

Portanto, uma investigação mais aprofundada dessas regiões pode revelar informações importantes para entender os mecanismos subjacentes que afetam características economicamente importantes.

Os CNVs identificados como mais frequentes estavam localizados em 66 QTLs previamente identificados em outros estudos e depositados no banco de dados *cattle QTLdb*. Desse total, 41 QTLs estão associados a características de produção, 7 estão associados a características de resistência a doenças e 16 associados à reprodução. Esse resultado corrobora com a hipótese de que os CNVs encontrados na raça podem estar diretamente correlacionados a essas características e podem ser responsáveis pelas particularidades encontradas na raça.

5. CONCLUSÃO

As assinaturas de seleção encontradas na raça CPD estão relacionadas principalmente com sua adaptabilidade aos trópicos, uma vez que contém genes como o receptor de prolactina (PRLR), receptor de Interleucina 7, Fosfoproteína de Golgi 3 (GOLPH3), dentre outros, associados as características como termotolerância e resistência a doenças como mastite e tripanossoma.

Os CNVs identificados na raça CPD, estão sobrepostos com os genes PRP e LEP, relacionados com características de adaptação, o que os tornam potenciais candidatos a serem utilizados para detectar os animais de maior valor adaptativo.

6. REFERÊNCIAS

1. Bianchini W, Silveira AC, Jorge AM, Arrigoni MB, Martins CL, Rodrigues E, Hadlich JC, Andrighetto C. Effecto fgenetic group on carcass straits and frash and aged beef tenderness from Young cattle. R. Bras. Zootec. 2007;36(6):2109-2117.
2. Coutinho LL, Rosário MF. Biotecnologia Animal. Estudos Avançados. 2010;24(70):123-147.
3. Polido PB, Ferreira FG, Alberton O, Souza SGHde. Marcadores Moleculares Aplicados no Melhoramento Genético de Bovinos. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama; 2012;15(2):161-169.
4. Rahmatalla SA, Muller U, Strucken EM, Reissmann M, Brockmann GA. The F279Y polymorphism of the GHR gene and its relation to milk production and somatic cell score in German Holstein dairy cattle. 2011 J Appl Genet. 52(4):459-65.
5. Mariante AS, & Egito AA. Animal genetic resources in Brazil: result of five centuries of natural selection. Theriogenology; 2002;57:223–235.
6. Primo AT. América: conquista e colonização. Ed. Movimento, Porto Alegre; 2004. p. 183.
7. Primo AT. Os bovinos ibéricos nas Américas. En: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Rio de Janeiro; 1993. p. 183–199.
8. Mariante AS, Cavalcante N. Animais do descobrimento: raças domésticas da história do Brasil. Brasília: EMBRAPA; 2000. p. 228.
9. Silva MC, Boaventura VM, Fioravanti MCS. Dossiê Pecuária: História do povoamento bovino no Brasil central. Revista UFG/dezembro 2012; Ano XIII n° 13.
10. Fioravanti MCS, Sereno JRB, Neiva ACGR, Abud LJ, Lobo JR, Andrade DF, Cardoso WS, Machado JRL. Reintrodução do gado Curraleiro na comunidade quilombola Kalunga de Cavalcante, Goiás, Brasil: resultados parciais. In: Simpósio Internacional de Savanas Tropicais, 2 e Simpósio Nacional do Cerrado, 9. Brasília. Anais Brasília: EMBRAPA; 2008b. v. único. p. cd.
11. Fioravanti MCS, Juliano RS, Costa GL, Abud LJ, Cardoso WS. Características dos criatórios de bovinos da raça Curraleiro nos Estados de Goiás e Tocantins. In: Simpósio Internacional de Savanas Tropicais, 2 e Simpósio Nacional do Cerrado 9. Brasília: Anais Brasília: EMBRAPA; 2008a. v. único. p. CD.
12. Carvalho GMC, Fé da Silva LR, Almeida MJO, Lima Neto AF, Beffa LM. Avaliações fenotípicas da raça bovina Curraleiro Pé duro do semiárido do Brasil. Archivos de Zootecnia, Córdoba; 2013;62(237):9-20.

13. Lobo JR. Resposta imune inespecífica e específica humoral de bezerros Curraleiro e Nelore vacinados com *Mycobacterium bovis* – bvg. [Dissertação]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2009.
14. Juliano RS, Fioravanti MCS, Brito WMED, Abreu UGP, Souza SN. Soroepidemiologia da leucemia bovina (Ib) em bovinos Curraleiros dos Estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Ciência Animal Brasileira*; 2014;15,(3):289-295.
15. Nielsen R. Molecular signatures of natural selection. *Annual review of genetics*, Palo Alto; 2005;39:197–218.
16. Bulmer MG. The effect of selection on genetic variability: a simulation study. *Genetical Research*, London; 1976;28(2):101–117.
17. http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/08592502092013Evolucao_Aula_4.pdf
18. Vitti JJ, Grossman SR, Sabeti PC. Detecting natural selection in genomic data. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto; 2013;47:97–120.
19. Oleksyk TK, Smith MW, O'Brien SJ. Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, London; 2010;365(1537):185–205.
20. Andrés AM, Hubisz MJ, Indap A, Torgerson DG, Degenhardt JD, Boyko AR, Gutenkunst RN, White TJ, Green ED, Bustamante CD, Clark AG, Nielsen R. Targets of balancing selection in the human genome. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford; 2009;26:(12):2755–2764.
21. Akey J. Constructing genomic maps of positive selection in humans: where do we go from here? *Genome Research*; 2009;19:711-722.
22. Wiener P, Burton D, Ajmore-Marsan P. Signatures of selection? Patterns of microsatellite diversity on a chromosome containing a selected locus. *Heredity*; 2003;90:350-358.
23. Hayes BJ, Lien S, Nilsen H. The origin of selection signatures on bovine chromosome 6. *Animal Genetics*; 2008;39:105-111.
24. Guo Y, Chen H, Lan X. Novel SNPs of the bovine LEPR gene and their association with growth traits. *Biochemical Genetics*; 2008;46:828-834.
25. Hoashi S, Hinenoya T, Tanaka A. Association between fatty acid compositions and genotypes of FABP4 and LXR-alpha in Japanese Black cattle. *BMC Genetics*; 2008;9(84).
26. Lewontin RC. The interaction of selection and linkage. I. General considerations; Heterotic Models. *Genetics*, Heidelberg; 1964(49):49-67.

27. Charlesworth D. Balancing Selection and Its Effects on Sequences in Nearby Genome Regions. *PLoS Genetics*; 2006;2(4):0379-0384.
28. Sabeti PC, Schaffner SF, Fry B, Lohmueller J, Varilly P, Shamovsky O, Palma A, Mikkelsen TS, Altshuler D, Lander ES. Positive natural selection in the human lineage. *Science*, New York; 2006;312(5780):1614–20.
29. Teneva A. Molecular Markers in Animal Genomics. *Biotechnology in Animal Husbandry*; 2006;25(5-6):17-23.
30. Gibson & Muse. *A Primer of Genome Science*. 2nd Edition. Sinauer Associates; 2004. p. 110.
31. Caetano AR. Marcadores SNP: conceitos básicos, aplicações no manejo e no melhoramento animal e perspectivas para o future. *R. Bras. de Zootec.* 2009;38:64-71.
32. Yang LW. et al. Review on the Development of Genotyping Methods for Assessing Farm Animal Diversity. *J of Anim. Sci. and Biotechnology*; 2013;4:2.
33. Maeda M, Murayama N, Ishii H. A simple and rapid method for HLA-DQA1 genotyping by digestion of PCR-Amplified DNA with allele specific restriction endonucleases. *Tissue Antigens*; 1989;34(5):290-298.
34. Lee MA, Keane OM, Glass BC. Establishment of a pipeline to analyse non-synonymous SNPs in *Bos Taurus*. *BMC Genomics*; 2006;7:12.
35. Heaton MP, Leymaster KA, Kalbfleisch TS. SNPs for parentage testing and traceability in globally diverse breeds of sheep. *PLoS ONE*; 2014;9:10.
36. Kijas JW, Lenstra JA, Hayes B. Genome-wide analysis of the world's sheep breeds reveals high levels of historic mixture and strong recent selection. *PLoS Biology*; 2012;10(2).
37. Matukumalli LK, Grefenstette JJ, Hyten DL. Application of machine learning in SNP discovery. *BMC Bioinformatics*; 2006;7:9.
38. Seroussi E, Glick G, Shirak A. Analysis of copy loss and gain variations in Holstein cattle autosomes using BeadChip SNPs. *BMC Genomics*; 2010;11:673.
39. Liu GE, Brown T, Hebert DA. Initial analysis of copy number variations in cattle selected for resistance or susceptibility to intestinal nematodes. *Mammalian Genome*; 2011;22:111-21.
40. Somavilla AL, Sonstegard TS, Higa RH, Rosa AN, Siqueira F, Silva LOC, Torres Júnior RAA, Coutinho LL, Mudadu MA, Alencar MM, Regitano LCA. A genome-wide scan for selection signatures in Nelore cattle. *Animal Genetics*, Oxford; 2014;45(6):771–781.

41. Stella A, Ajmone-Marsan P, Lazzari B, Boettchier P. Identification of selection signatures in cattle breeds selected for dairy production. *Genetics*, Austin; 2010;185(4):1451–1461.
42. Mcmanus C, Castanheira M, Paiva SR, Louvandini H, Fioravanti MCS, Paludo GR, Biachini E.; Corrêa PS. Use of multivariate analyses for determining heat tolerance in Brazilian cattle. *Tropical Animal Health and Production*, Edimburgo; 2011;43:623-630.
43. Naves M, Flori L, Thevenon S, Gauthier M. Adaptation of tropical cattle breeds to their environment, in the perspective of climatic change. 2015; p.148.
44. Hawken RJ, Zhang YD, Fortes MRS, Collis E, Barris WC. Genome wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. *Journal of Animal Science*; 2012;90:1398–1410.
45. Silva, M. C. Genômica de populações e genética geográfica de bovinos Pantaneiros e Curraleiro Pé-Duro com uso de polimorfismos de base única (SNP). [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás; 2015.
46. Utsunomiya YT, Pérez O'Brien AM, Sonstegard TS, Van Tassell CP, do Carmo AS, Mészáros G, Solkner J, Garcia JF. Detecting Loci under Recent Positive Selection in Dairy and Beef Cattle by Combining Different Genome-Wide Scan Methods. *PLoS ONE*; 2013;8:1-11.
47. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, 2013. <http://www.R-project.org/>.
48. Chan EKF, Hawken R, Reverter A. The combined effect of SNP-marker and phenotype attributes in genome-wide association studies. *Animal Genetics*; 2008;40:149-156.
49. Teo YY. Common statistical issues in genome-wide association studies: a review on power, data quality control, genotype calling and population structure. *Current Opinion in Lipidology*; 2008;19:133–143.
50. Urbinati, I. Assinaturas de seleção em bovinos da raça canchim. [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista; 2014.
51. Browning SR, Browning BL. Rapid and accurate haplotype phasing and missing-data inference for whole-genome association studies by use of localized haplotype clustering. *American Journal of Human Genetics*; 2007;81:1084-1097.
52. Voight BF, Kudaravalli S, Wen X, Pritchard JL. A map of recent positive selection in the human genome. *PLoS Biology*; 2006;4:0446-0458.

53. Gautier M, Vitalis R. rehh: Searching for footprints of selection using Haplotype Homozygosity based tests. R package version 1.0, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402612>.
54. Wang K. et al. PennCNV: An integrated hidden Markov model designed for high resolution copy number variation detection in whole-genome SNP genotyping data. *Genome Research*; 2007;17(11):1665–1674: Disponível em: <https://github.com/WGLab/PennCNV/releases>.
55. http://www.cesadufs.com.br/ORBI/public/uploadCatalogo/08592502092013Evolucao_Aula_4.pdf
56. Vitti JJ, Grossman SR, Sabeti PC. Detecting natural selection in genomic data. *Annual Review of Genetics*, Palo Alto; 2013;47:97–120.
57. Oleksyk TK, Smith MW, O'Brien SJ. Genome-wide scans for footprints of natural selection. *Philosophical transactions of the Royal Society B*, London; 2010;365(1537):185–205.
58. Andrés AM, Hubisz MJ, Indap A, Torgerson DG, Degenhardt JD, Boyko AR, Gutenkunst RN, White TJ, Green ED, Bustmante CD, Clark AG, Nielsen R. Targets of balancing selection in the human genome. *Molecular Biology and Evolution*, Oxford; 2009;26:(12):2755–2764.
59. Akey J. Constructing genomic maps of positive selection in humans: where do we go from here? *Genome Research*; 2009;19:711-722.
60. Hickey JM, Crossa J, Babu R, de los Campos G. Factors affecting the accuracy of genotype imputation in populations from several maize breeding programs. *Crop Science*; 2012;52:654–663.
61. Tiezzi, F. A genome-wide association study for clinical mastitis in first parity US Holstein cows using single-step approach and genomic matrix re-weighting procedure. *PLoS One* 10.2 (2015): e0114919.
62. Huson, HJ. Genome-wide association study and ancestral origins of the slick-hair coat in tropically adapted cattle. *Frontiers in genetics*; 2014;5:101. doi:10.3389/fgene.2014.00101.
63. Olson TA, Lucena C, Chase CC, Jr, Hammond AC. Evidence of a major gene influencing hair length and heat tolerance in *Bos taurus* cattle. *J. Anim. Sci.* 2003;81: 80–90.
64. Mariasegaram M, Chase CC, Jr, Chaparro JX, Olson TA, Breneman RA, Niedz RP. The slick hair coat locus maps to chromosome 20 in Senepol-derived cattle. *Anim. Genet.* 2007;38:54–59.

65. Landaeta HA, Nava ZS, Fonseca HJP, Godoy R, Calles M, Iragorri JL. Variability of hair coat and skin traits as related to adaptation in Criollo Limonero cattle. *Trop. Anim. Health Prod.* 2011;43:657–663.
66. Brenneman RA., Chase CC, Jr, Olson TA, Riley DG, Coleman SW. Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds. *Anim. Genet.* 2007;38:50–53.
67. Waaij VD, Hillechien E. Breeding for trypanotolerance in African cattle. 2001.
68. Meredith BK, Kearney FJ, Finlay EK, Bradley DG, Fahey AG. Genome-wide associations for milk production and somatic cell score in Holstein-Friesian cattle in Ireland. *BMC Genetics*; 2012. doi: 10.1186/1471-2156-13-21 PMID: 22449276.
69. Boutet P, Sulon J, Closset R, Detilleux J, Beckers JF. Prolactin Induced Activation of Nuclear Factor κ B in Bovine Mammary Epithelial Cells: Role in Chronic Mastitis. *J Dairy Sci.* 2007;90:155–164. PMID: 17183084.
70. Fernandes AC. Identificação de CNVRs associadas ao teor de colesterol na carne de bovinos da raça Nelore. [TCC]. Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Zootecnia; 2017
71. Hou Y, Bickhart DM, Hvinden ML, Li C, Song J, Boichard DA, Fritz S, Eggen A, Denise S, Wiggans GR, et al. Fine mapping of copy number variations on two cattle genome assemblies using high density SNP array. *BMC Genomics.* 2012;13:376.
72. Hou Y, Liu GE, Bickhart DM, Cardone MF, Wang K, Kim ES, Matukumalli LK, Ventura M, Song J, Vanraden PM, et al. Genomic characteristics of cattle copy number variations. *BMC Genomics.* 2011;12:127.
73. Redon R. Global variation in copy number in the human genome. *Nature*; 2006;444(7118):444–454.
74. Conrad DF. Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*; 2010;464:704–712.
75. Truty R, Paul J, Kennemer M. Prevalence and properties of intragenic copy-number variation in Mendelian disease genes. *Genet Med.* 2019;21:114–123. doi:10.1038/s41436-018-0033-5.
76. Xu L, Hou Y, Bickhart D, Song J, Liu G. Comparative analysis of CNV calling algorithms: literature survey and a case study using bovine high-density SNP data. *Microarrays.* 2013;2(3):171.
77. Hou Y, Bickhart DM, Chung H, Hutchison JL, Norman HD, Connor EE, Liu GE. Analysis of copy number variations in Holstein cows identify potential mechanisms contributing to differences in residual feed intake. *Funct Integr Genomics.* 2012;12(4):717–23.

78. Lachance J, Tishkoff S. SNP ascertainment bias in population genetic analyses: Why it is important, and how to correct it. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*; 2013;35. 10.1002/bies.201300014.
79. da Silva, JM. "Genome-wide copy number variation (CNV) detection in Nelore cattle reveals highly frequent variants in genome regions harboring QTLs affecting production traits." *BMC genomics*; 2016;17(1):454.
80. Henao-Mejia J. "Inflammasomes and metabolic disease." *Annual review of physiology*; 2014;76:57-78.
81. Gaddis KLP. "Genome-wide association study for ketosis in US Jerseys using producer-recorded data." *Journal of dairy Science*; 2018;10(1.1):413-424.
82. Araújo R.N. "Use of a candidate gene array to delineate gene expression patterns in cattle selected for resistance or susceptibility to intestinal nematodes." *Veterinary parasitology*; 2009;162(1-2):106-115.
83. Takahashi T. Biology of the PRL family in bovine placenta. I. Bovine placental lactogen: expression, structure and proposed roles. *Anim Sci J.* 2006;77:10–17. doi: 10.1111/j.1740-0929.2006.00314.x
84. Ushizawa K, Hashizume K. Biology of the PRL family in bovine placenta. II. Bovine prolactin-related proteins: their expression, structure and proposed roles. *Anim Sci J.* 2006;77:18–27. doi: 10.1111/j.1740-0929.2006.00315.x.
85. Anthony RV, Pratt SL, Liang R, Holland MD. Placental–fetal hormonal interactions: impact on fetal growth. *Journal of Animal Science*; 1995;73:1861–1871
86. Costa JV, Duarte JS. Tecido adiposo e adipocinas. *Acta Méd Port*, 2006;19:251-256.
87. Guimarães DED, Sardinha FLC, Mizurini DM, Tavares do Carmo MG. Adipocitocinas: uma nova visão do tecido adiposo. *Rev Nutr.* 2007;20:549-559.
88. Ahima RS, Prabakaran D, Mantzoros C, Qu D, Lowell, B, Maratos-Flier E, Flier J. Role of leptin in the in the neuroendocrine response to nesting. *Nature*; 1996;382:250-252.
89. Williams GL, et al. "Leptin and its role in the central regulation of reproduction in cattle." *Domestic Animal Endocrinology*; 2002;23(1-2):339-349.
90. Zieba, D. A., et al. "Regulatory roles of leptin in reproduction and metabolism: a comparative review." *Domestic animal endocrinology*; 2005;29(1):166-185.
91. Sartori R, Bastos MR, Baruselli PS, Gimenes LU, Ereno RL, Barros CM. Physiological differences and implications to reproductive management of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle in a tropical environment. *Reprod Domest Rumin Vii.* 2010;67:357–75.

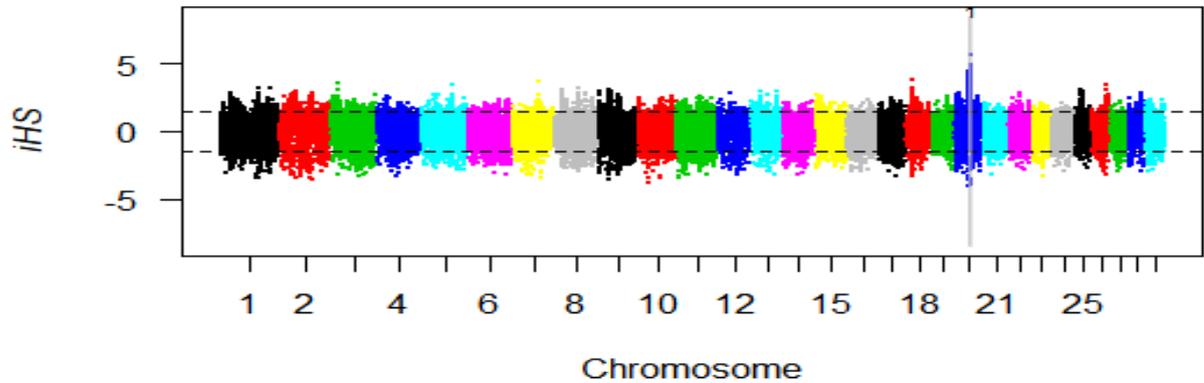
92. Piper EK, Jonsson NN, Gondro C, Lew-Tabor AE, Moolhuijzen P, Vance ME, Jackson LA. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Clin Vaccine Immunol*; 2009;16(7):1074–86.
93. Beatty DT, Barnes A, Taylor E, Pethick D, McCarthy M, Maloney SK. Physiological responses of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle to prolonged, continuous heat and humidity. *J Anim Sci*. 2006;84(4):972–85.
94. Brunelle BW, Greenlee JJ, Seabury CM, Brown II CE, Nicholson EM. Frequencies of polymorphisms associated with BSE resistance differ significantly between *Bos taurus*, *Bos indicus*, and composite cattle. *BMC Vet Res*. 2008;4:36.
95. Bolormaa S, Pryce JE, Kemper KE, Hayes BJ, Zhang Y, Tier B, Barendse W, Reverter A, Goddard ME. Detection of quantitative trait loci in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using genome-wide association studies. *Genet Sel Evol*. 2013;45:43.

APÊNDICES

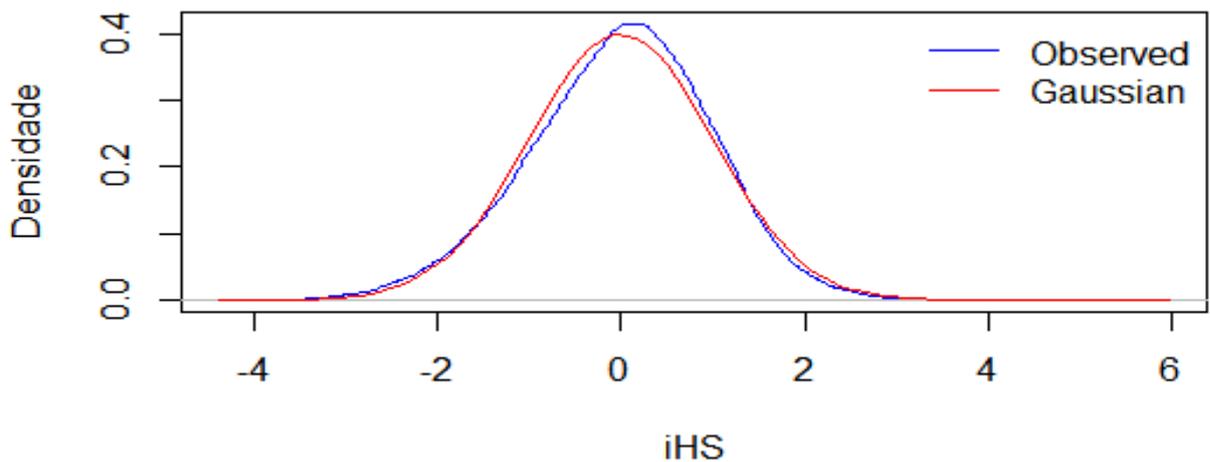
Apêndice 1 - Número de marcadores do tipo polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) por cromossomo autossômico após o controle de qualidade.

Cromossomo	Nº SNPs
1	2741
2	2213
3	2063
10	1758
11	1820
12	1407
13	1416
14	1447
15	1390
16	1376
17	1300
18	1079
19	1124
20	1254
21	1141
22	1051
23	881
24	1078
25	771
26	880
27	785
28	811
29	858

Apêndice 2 - Distribuição dos Escores de Integração dos Haplótipos (“integrated haplotype score” - iHS) de cada marcador SNP por cromossomo.



Apêndice 3- Curva da distribuição aproximada da normal padrão, com média zero e variância um ($iHS \sim N(0,1)$), dos valores de iHS para todos os SNPs utilizados no estudo, comparada à curva de distribuição Gaussiana padrão.



Apêndice 4 - Nome e descrição das principais funções dos genes localizados sob a assinatura de seleção.

Nome do Gene	Gene (Entrez)	GO - Função Molecular	GO - Componentes Celulares	GO -Processos Biológicos	GO-Via Metabólica
Receptor Interleucina 7	IL7R			Processo celular (GO: 0009987) e resposta a estímulos (GO:0050896)	
Fosfoproteína de Golgi 3	GOLPH3	Ligação de fosfatidilino	Cisterna Golgi (GO:0031985)	Fusão da vesícula com a membrana	

		itol fosfato (GO:1901981)		plasmática (GO:0099500)	
Fator neurotrófico derivado de célula glial	GDNF	Atividade de citocinas (GO:0005125)	Atividade do fator de crescimento (GO:0008083)	Via de sinalização TGF-beta-> Transformando o fator de crescimento beta	Via de sinalização TGF-beta-> Transformando o fator de crescimento beta
Receptor de prolactina	PRLR	Ligação de citocinas (GO:0019955)	Atividade do receptor de citocina (GO:0004896)		Via de sinalização mediada por hormônio (GO:0009755)
Homólogo da proteína BRX1 da biogênese do ribossomo	BRX1	Ligação de RNA (GO:0003723)	Nucléolo (GO:0005730)		
Treonina - tRNA ligase citoplasmático	TARS	Atividade catalítica, atuando no RNA (GO:0140098)	Atividade ligase (GO:0016874)	Processo metabólico do tRNA (GO:0006399)	
Transportador de aminoácidos excitatório 1	SLC1A3	Cátion transmembranaar carga atividade (GO:0008324)		Transporte de aminoácidos (GO:0006865)	Via do grupo III do receptor metabólico do glutamato-> Transportador excitatório de aminoácidos

Apêndice 5 - Termos ontológicos subdivididos por categorias funcionais relacionados aos genes que contém variações no número de cópias na raça Curraleiro Pé Duro.

Termos ontológicos	Número de genes	*	**	Categoria Funcional
Regulação de transcrição (GO:0140110)	2	3,8	4,0	Processos Biológicos
Transdução molecular (GO:0060089)	9	17,0	18,0	
Ligação (GO:0005488)	13	24,5	26,0	
Regulação função molecular (GO:0098772)	10	18,9	20,0	
Atividade catalítica (GO:0003824)	16	30,2	32,0	
Resposta a estímulo (GO:0050896)	11	20,8	16,2	

Processos sistema imune (GO:0002376)	1	1,9	1,5	Funções Moleculares
Processos de desenvolvimento (GO:0032502)	1	1,9	1,5	
Processos celulares (GO:0009987)	24	45,3	35,3	
Processos multicelulares (GO:0032501)	1	1,9	1,5	
Processos metabólicos	13	24,5	19,1	
Regulação Biológica (GO:0065007)	15	28,3	22,1	
Localização (GO:0051179)	2	3,8	2,9	
Membrana (GO:0016020)	1	1,9	2,0	Componente celular
Complexo proteico (GO:0032991)	8	15,1	16,3	
Organela (GO:0043226)	11	20,8	22,4	
Região extracelular (GO:0005576)	9	17,0	18,4	
Célula(GO:0005623)	20	37,7	40,8	
Hidrolase (PC00121)	5	9,4	17,2	Classes de proteínas
Modelador de enzima (PC00095)	3	5,7	10,3	
Liase (PC00144)	1	1,9	3,4	
Transferase (PC00220)	2	3,8	6,9	
Ligação ácido nucleico (PC00171)	4	7,5	13,8	
Fator transcrição (PC00218)	2	3,8	6,9	
Proteína citoesqueleto (PC00085)	1	1,9	3,4	
Matriz proteína extracelular (PC00102)	1	1,9	3,4	
Sinalização molecular (PC00207)	10	18,9	34,5	

*Porcentagem de genes por termo ontológico em cada uma das categorias funcionais considerando todos os genes com frequência igual ou superior à 4% (n =57) na população estudada;

** Porcentagem de genes por termo ontológico considerando apenas os genes com categorias funcionais conhecidas.