

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA



TESE DE DOUTORADO

**Investigação de genes candidatos para
características reprodutivas e efeito pleiotrópico
para características de produção em bovinos.**

ORIENTADO: Pablo Augusto de Souza Fonseca

ORIENTADORA: Maria Raquel Santos Carvalho

Junho
2018

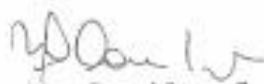
- 043 Fonseca, Pablo Augusto de Souza.
Investigação de genes candidatos para características reprodutivas e efeito pleiotrópico para características de produção em bovinos [manuscrito] / Pablo Augusto de Souza Fonseca. – 2018.
- 65 f. : il. ; 29,5 cm.
- Orientadora: Profa. Dr.^a Maria Raquel Santos Carvalho.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas.
1. Genética. 2. Bovino - Reprodução. 3. Pleiotropia Genética. 4. Estudos de Associação Genética. I. Carvalho, Maria Raquel Santos. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.
- CDU: 575

Ficha elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

"Investigação de genes candidatos para características reprodutivas e efeito pleiotrópico para características de produção em bovinos."

Pablo Augusto de Souza Fonseca

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Maria Raquel Santos Carvalho
UFMG



Fabiano Fonseca e Silva
UFV



Marcilio Nichi
Universidade de São Paulo



Fabio Luiz Duranelo Toral
UFMG



Renan Pedro de Souza
UFMG

Belo Horizonte, 29 de junho de 2018.

Pablo Augusto de Souza Fonseca

Investigação de genes candidatos para características reprodutivas e efeito pleiotrópico para características de produção em bovinos

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Genética do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Genética.

Área de Concentração: Genômica e Bioinformática

Orientadora: *Profa. Dra. Maria Raquel Santos Carvalho*

BELO HORIZONTE
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - UFMG
2018

À minha família, por todo apoio,
incentivo, alegrias e aprendizado.

Dedico

v

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

“A única maneira de descobrir o que acontecerá com um sistema complexo quando perturbado é perturbar o sistema, não simplesmente observá-lo passivamente.”

George Box

Agradecimentos

Aos criadores, fazendas, instituições e animais que tornaram este trabalho possível.

À professora Maria Raquel Carvalho, pela orientação, pela amizade e pelos conselhos fundamentais, não somente para realização deste trabalho, como também para meu crescimento profissional e pessoal ao longo destes 10 anos de convivência.

Aos Professores Ricardo Ventura e Renan Pedra de Souza, por todas as conversas, conselhos científicos e não-científicos e por toda a confiança ao longo dos anos.

À banca por terem aceitado o convite de participarem de um momento tão importante.

Aos meus amigos de graduação, em especial, João Locke, Pedro Lamounier e Laura Coelho, pelas inúmeras horas de conversa, estudo, colaborações e diversão. Aos meus amigos de Pós-graduação Thiago Peixoto e Mateus Gouveia pelas colaborações científicas tão frutíferas.

Aos meus amigos de LGHM. Aos atuais e todos que tive ao longo destes 10 anos de laboratório. Contudo, agradeço especialmente, Izinara Rosse e Raphael Steinberg por terem sido os responsáveis pelo meu acolhimento e treinamento no laboratório; se obtive sucesso ao longo destes anos, devo muito a vocês. Além destes, agradeço profundamente, Gabriela Salazar, Aline Martins e Marlene de Miranda pelas horas e horas de conversa, pela companhia em congressos e pelo auxílio em todo meu processo de aprendizagem. Às alunas que tive o prazer de orientar, conviver e me tornar amigo, Ana Emília e Luiza Diniz, muito obrigado por tudo. Estes 10 anos de LGHM não poderiam ter resultado em amizades mais fortes e aprendizados mais profundos.

À minha família. Aos meus irmãos César e Izabela, pela amizade imensurável e inabalável, pelo apoio incondicional, pela motivação e por serem modelos de força de vontade, altruísmo e alegria. Aos meus primos Guilherme, Matheus e Débora pela companhia, amizade e por serem mais irmãos em minha vida. Ao meu primo/sobrinho Gustavo, por toda alegria que me traz e por todo o carinho que tem por mim. Aos meus tios, principalmente, Marco Aurélio e Júnia; e Paulinho e Fatinha. Agradeço por todos os tipos de apoio possíveis, pelo carinho, confiança plena e conselhos. Ao meu amigo de infância, Guilherme Henrique, por todas as alegrias e por ter participado de cada etapa da minha vida até o momento. Aos meus pais, Marília e Carlos, por, em hipótese alguma, terem medido esforços para me auxiliar em cada decisão tomada, em cada passo dado e em cada fracasso. Agradeço por terem me criado da

melhor forma possível, incentivando meus estudos e, em muitos momentos, colocado o meu bem acima de qualquer outra coisa.

À minha companheira, confidente, porto-seguro, parceira científica e namorada, Fernanda Caroline. Todo seu amor e apoio incondicional tornaram cada objetivo que, de início, seria impossível, um sucesso. Tudo que foi alcançado ao longo desses anos eu não saberia dizer se o mesmo aconteceria sem você. Agradeço aos meus sogros, Maikson e Soraia e ao meu cunhado, Filipe, por terem me recebido de braços abertos em sua família e por todo apoio e confiança em mim depositada nestes anos.

A special acknowledgement to Professor Angela Cánovas that kindling received me at the University of Guelph. The one-year internship under your advisor could not be better. Thank you for all the advices, opportunities and for always believe in my potential. Additionally, a great thank to all my friends from Centre for Genetic Improvement of Livestock (CGIL). Without all of you, the Canadian winter would be a way more severe. A special thank for Luiz Brito, Samir Id-Lahoucine, Stephanie Lam, Aroa Suarez Vega, Victoria Asseltine, Evert Varela and all Cánovas's Lab, work with a group composed by people like you was a great experience. An immeasurable thank you to Gabriele Marras, Shadi Nayeri and Elvis Ticiani, my roommates that were a very good company and much more than friends. Finally, for all the Guelph's "Brazilian mafia" (Hinayah Rojas, Fabieli Feitosa, Ana Melo, Ivan Lange, Victor Pedrosa, Giovana Vargas, Murilo Carvalho, José Spricigo e Carolle Spricigo). With a group like this, it was possible to feel like if I were in Brazil every day.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Instituto de Ciências Biológicas e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, pela oportunidade da realização do curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), pela concessão da bolsa de estudos.

A todos que em algum momento contribuíram, mesmo que da menor maneira possível, me auxiliando, incentivando e inspirando para que eu alcançasse meus objetivos. Sou extremamente grato a cada uma destas pessoas.

Sumário

| | |
|--|----|
| I- Lista de Figuras..... | 10 |
| II- Lista de tabelas | 10 |
| III- Lista de Abreviaturas | 10 |
| IV- Resumo | 13 |
| V- Abstract | 14 |
| 1- Introdução Geral..... | 15 |
| 1.1 Distúrbios reprodutivos e prejuízos econômicos em rebanhos bovinos | 15 |
| 1.2 Caracterização fenotípica, frequência de distúrbios reprodutivos e identificação de genes/regiões candidatas associadas com a subfertilidade na raça Gir: trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa | 23 |
| 1.3 Integrando resultados de diversas ômicas e raças para identificar componentes genéticos em comum: A importância da biologia de sistemas..... | 27 |
| 2. Capítulo 1 - A in family case-control GWAS identifies genes/candidate regions for gonadal asymmetry and sperm abnormalities in Dairy-Gyr breed | 30 |
| 3. Capítulo 2 - Investigating the genetic relationships of spermatid and testicular traits within and among cattle breeds: A systematic review with functional analysis | 32 |
| 4. Capítulo 3 - Combining multi-OMICs information to identify key-regulator genes for pleiotropic effect on fertility and production traits in beef cattle | 34 |
| 5. Discussão Geral | 36 |
| 6- Conclusão..... | 41 |
| 7.Referências | 42 |
| 8. Produção científica | 52 |
| 9. Anexos..... | 56 |
| Artigos publicados..... | 56 |
| Artigos submetidos..... | 60 |
| 10. Anexos suplementares | 67 |

I- Lista de Figuras

Figura 1: Características morfológicas testiculares de animais hipoplásicos e saudáveis.. ... 186

Figura 2: Relação entre medidas testiculares e idade. 219

Figura 3: Defeitos espermáticos observados durante a avaliação andrológica dos animais.. 264

II- Lista de tabelas

Tabela 1: Classificação dos touros quanto à aptidão reprodutiva 253

III- Lista de Abreviaturas

M: Metros

OXT: Ocitocina

PRL: Prolactina

DHT: di-hidrotestosterona

CYP19A1: Cytochrome P450 Family 19 Subfamily A Member 1

GnRH: Gonadotropin Releasing Hormone

LH: Hormônio luteinizante

FSH: Hormônio folículo-estimulante

SC: Circunferência escrotal

MOT: Motilidade espermática progressiva

DM: Defeito espermáticos maiores

DT: Defeitos espermáticos totais

GCP: Gota citoplasmática proximal

GCD: Gota citoplasmática distal

Kg: Quilogramas

cm: Centímetros

LT: Largura total

GWAS: Genome-wide association study

LD: Linkage disequilibrium

TUBB: Tubulin Beta Class 1

ICK: Intestinal Cell Kinase

ROS1: ROS Proto-Oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase

CCL2: C-C Motif Chemokine Ligand 2

GOPC: Golgi Associated PDZ and Coiled-coil Motif Containing

UBD: Ubiquitin D

MDC1: Mediator of DNA Damage Checkpoint 1

MCM3: Minichromosome Maintenance Complex Component 3

TAB2: TGF-Beta Activated Kinase 1/MAP3K7 Binding Protein 2

WssGBLUP: Weighted Single-Step Best Linear Unbiased Predictor

TEX11: Testis Expressed 11

IRAK1: Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1

CDK16: Cyclin Dependent Kinase 16

ATP7A: ATPase Copper Transporting Alpha

ATRX: Alpha Thalassemia/Mental Retardation Syndrome X-linked

HDAC6: Histone Deacetylase 6

FMR1: Fragile X Mental Retardation 1

L1CAM: L1 Cell Adhesion Molecule

MECP2: Methyl-CpG Binding Protein 2

TRPV4: Transient Receptor Potential Cation Channel Subfamily V Member 4

DYNLL1: Dynein Light Chain LC8-Type 1

MOS: MOS Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase

FABP5: Fatty Acid Binding Protein 5

ZFPM2: Zinc Finger Protein, FOG Family Member 2

QTL: Quantitative trait *loci*

MYC: MYC Proto-Oncogene, BHLH Transcription Factor

PPARG: Peroxisome Proliferator Activated Receptor Gamma

GSK3B: Glycogen Synthase Kinase 3 Beta

TG: Thyroglobulin

IYD: Iodotyrosin Deiodinase

TEX28: Testis expresse 28

TKTL1: Transketolase Like 1

DGAT1: Diacylglycerol O-Acyltransferase 1

CDN: Canadian Dairy Network

IV- Resumo

Distúrbios reprodutivos são uma das principais causas de prejuízos econômicos em rebanhos bovinos. Um declínio na eficiência reprodutiva vem sendo observado em raças bovinas submetidas a processos de seleção intensivo para características de produção e reprodução. Este efeito oposto pode ser explicado como consequência da seleção unidirecional, do efeito carona, ou consequência de possível efeito pleiotrópico. Neste estudo, diferentes técnicas de alto rendimento foram combinadas com o intuito de identificar genes candidatos para características reprodutivas em bovinos. Primeiramente, um estudo de associação em escala genômica (GWAS) foi realizado para a identificação de regiões candidatas para os fenótipos de hipoplasia gonadal e anormalidades espermáticas em animais da raça Gir. A partir desta análise, foram identificados importantes candidatos funcionais para os fenótipos avaliados, como é o caso dos genes *AR*, *TUBB* e *GOPC*. Em seguida, uma revisão sistemática com priorização funcional foi realizada para a identificação de genes candidatos para características espermáticas e testiculares em diversas raças por meio da integração de dados de GWAS publicados. Os resultados desta análise reforçam a heterogeneidade genética de fenótipos reprodutivos e uma maior estabilidade de características testiculares, compartilhando uma maior proporção de genes candidatos entre estudos. Com esta estratégia, foram identificadas regiões com indícios de especialização para características reprodutivas (BTAX, BTA14 e BTA17) e com padrões de compartilhamento espécie-específicos. Com o intuito de identificar possíveis genes reguladores para o efeito pleiotrópico associado a características de produção e reprodução, uma estratégia multi-ômicas e multi-raças foi realizada. Resultados de RNA-seq e GWAS para características associadas ao desenvolvimento da puberdade em fêmeas das raças Brangus, Brahman e Tropical Composite foram integrados e comparados com um mapa genômico de efeito pleiotrópico. Com essa estratégia, foram identificados genes mapeados em regiões com um alto sinal de efeito pleiotrópico, compartilhados entre estudos e com evidência de efeito funcional. Destaca-se aqui a forte associação dos genes candidatos relacionados com a atividade de hormônios tireoidianos, como por exemplo, os genes *TG* e *IYD*. Os resultados aqui obtidos, possibilitaram a identificação de processos biológicos compartilhados entre fenótipos reprodutivos, contribuindo para a compreensão da arquitetura genética e dos processos biológicos envolvidos na regulação destas características. Além disso, os genes candidatos aqui identificados podem ser utilizados para a prospecção de variantes associadas a fenótipos reprodutivos. Futuramente, estas variantes poderão, ser utilizadas em programas de

melhoramento genético, visando à redução da frequência de distúrbios reprodutivos nos rebanhos.

V- Abstract

Reproductive disorders are one of the major causes of economic loss in bovine herds. A decrease in reproduction efficiency has been observed in bovine breeds under intensive artificial selection. This may be explained by unidirectional selection, hitchhiking effect or can be a consequence of a pleiotropic effect. In this study, different high throughput methodologies were combined in order to identify candidate genes for bovine reproductive traits. Initially, a Genome-wide association study (GWAS) was developed to identify candidate genomic regions for gonadal hypoplasia and spermatic abnormalities in the Gyr breed. This approach allowed identification of important functional candidate genes for these phenotypes; for example, *AR*, *TUBB* and *GOPC*. Following this approach, a systematic review along with a prioritization analysis were conducted to identify candidate genes for spermatic and testicular traits among taurine and indicine breeds, integrating published GWAS data. The results of this analysis reinforce the genetic heterogeneity of reproductive phenotypes. Testicular traits presented lower variance, when compared to spermatic traits, and, the co-occurrence of specific candidate genes, emerging in more than one GWAS, was larger for testicular traits. Using this systematic review and prioritization analysis approach, regions suggesting specialization in the control of reproductive traits, having a species-specific pattern were identified in taurine chromosomes BTAX, BTA14 and BTA17. In addition, to identify genes potentially able to underlie or regulate pleiotropic effects affecting both production and reproduction traits, a multi-omics and multi-breed approach was developed. RNA-seq and GWAS data for traits related to puberty development in Brangus, Brahman and Tropical Composite females were integrated and compared with a map of the pleiotropic effect across the bovine genome. This approach allowed the identification of candidate genes in regions having a high pleiotropic effect signal shared among studies and high evidence of functional effect. It is important to highlight the strong association observed between the candidate genes and the activity of thyroid hormones; for example, the *TG* and *IYD* genes. The results obtained in the present study allow the identification of biological processes shared among reproductive phenotypes; contribute to the knowledge of the genetic architecture and the biological processes related to the regulation of reproductive traits. In addition, the candidate genes identified in the present study can be used to unravel genetic variants associated with reproductive phenotypes. A better understanding of

genes and genetic variants underlying pleiotropic effects can be helpful in reducing the reproductive loss associated with genetic selection programs.

1- Introdução Geral

1.1 Distúrbios reprodutivos e prejuízos econômicos em rebanhos bovinos

Distúrbios reprodutivos são umas das principais causas de prejuízo para o setor agropecuário em todo o mundo, de forma que a seleção de animais baseada na eficiência reprodutiva pode resultar em forte impacto no sucesso econômico de um rebanho (Bellows *et al.*, 2002; Hudson *et al.*, 2010; Inchaisri *et al.*, 2010; Shalloo *et al.*, 2014). Nas últimas décadas, um avanço significativo foi alcançado na melhoria de características de produção em rebanhos selecionados para produção de leite ou de carne (Haskell *et al.*, 2014; García-Ruiz *et al.*, 2016; Lamb *et al.*, 2016; Thundathil *et al.*, 2016; Weller *et al.*, 2017). Contudo, ao mesmo tempo, a eficiência reprodutiva dos animais submetidos a intensos processos de seleção para aumento de produção vem apresentando uma constante queda ao longo das últimas décadas (Lucy, 2001; Sangsritavong *et al.*, 2002; Sartori *et al.*, 2002; Barbat *et al.*, 2010; Berry *et al.*, 2016; García-Ruiz *et al.*, 2016; Thundathil *et al.*, 2016). Isto pode ser consequência da seleção unidirecional, do efeito carona, ou consequência direta do processo de seleção, onde os mesmos alelos que aumentam a produção de leite podem estar reduzindo a fertilidade (Walsh, S. *et al.*, 2011).

Hudson *et al.* (2010) e Inchaisri *et al.* (2010) avaliaram o prejuízo causado em rebanhos leiteiros devido a cenários reprodutivos ruins. Respectivamente, estes prejuízos foram estimados em 110 Libras e 231 Euros por vaca/ano, quando comparado a um cenário de características reprodutivas satisfatórias. Além disso, Shalloo *et al.* (2014) estimou um prejuízo de aproximadamente 9 Euros por vaca/por ano com o decréscimo em 1% da taxa de sucesso reprodutivo. É importante ressaltar que este cenário não levou em consideração os gastos indiretos acarretados pela redução na viabilidade de expansão do rebanho, assim como a necessidade de utilização de reprodutores externos. A partir destes valores, é possível observar que problemas reprodutivos têm potencial para e afetar diretamente a viabilidade e manutenção dos rebanhos devido ao grande potencial de prejuízos, que podem incidir sobre o produtor.

No caso da economia brasileira, esse prejuízo pode ter consequências significativas. A pecuária bovina é um dos setores de maior importância para a economia brasileira, visto que o Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo, tendo posição de destaque tanto para a produção de leite, quanto para a produção de carne. No ranking mundial, o Brasil é o quarto maior produtor de leite (>30M de toneladas em 2016) e o maior exportador de carne bovina,

tendo produzido, aproximadamente, 9M de toneladas em 2016 (Fao, 2016). Nos últimos 40 anos, a produção leiteira e de carne, aumentou cerca de quatro vezes no Brasil, fato que não pode ser explicado somente pelo aumento do tamanho populacional, reforçando o impacto da seleção e melhoria de condições nos rebanhos (Embrapa/Sgi, 2017). Em 2016, o setor agropecuário movimentou mais de R\$ 150 bilhões em valor bruto. Cerca de 5% deste valor tem origem na produção leiteira, enquanto cerca de 14% tem origem na produção de carne (Embrapa/Sgi, 2017). Estes valores ressaltam a importância da agropecuária para o País, mais especificamente, da produção de carne e leite.

Levando-se em consideração a importância da produção agropecuária para a economia brasileira e o impacto de distúrbios reprodutivos sobre os lucros desse setor, a investigação dos processos biológicos envolvidos na regulação biológica da reprodução é um passo crucial. A precocidade sexual é uma das características com maior pressão de seleção dentro de um rebanho devido ao potencial de redução do intervalo geracional causado pela sua melhoria. Por sua vez, precocidade sexual é diretamente ligada ao desenvolvimento da puberdade. A regulação da instalação e da progressão da puberdade é realizada pela ação de diversos genes, que atuam em diferentes vias metabólicas, responsáveis por controlar o desenvolvimento de uma série de fenótipos, como crescimento corporal, expressão de neuropeptídeos, desenvolvimento sexual, entre outros (Dorn e Biro, 2011). Os órgãos, glândulas e tecidos, que desempenham funções cruciais para o desenvolvimento da puberdade, como por exemplo, a pituitária, o hipotálamo e a tireoide, também são responsáveis pela regulação de diversas vias metabólicas e processos celulares envolvidos em características de produção (Viitala *et al.*, 2006; Cánovas *et al.*, 2014; Fernández *et al.*, 2017; Nguyen *et al.*, 2017). Os hormônios tireoidianos, por exemplo, estão envolvidos em diversas características de produção ou traços reprodutivos em gado. Genes responsáveis por regular os níveis desses hormônios foram descritos como diferencialmente expressos em estudos que avaliaram eficiência alimentar, estágios da lactação, deposição de gordura e desenvolvimento embrionário (Capuco *et al.*, 2001; Pezzi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Meyerholz *et al.*, 2015; Ashkar *et al.*, 2016; Weber *et al.*, 2016; Schering *et al.*, 2017). Além disso, polimorfismos no gene codificador da tireoglobulina, uma das principais proteínas responsáveis pela produção dos hormônios tireoidianos T3 e T4, já foram associados com importantes traços de produção (Fontanesi *et al.*, 2014; Tait *et al.*, 2016). Em somatório, alterações nos níveis de hormônios tireoidianos durante a gravidez são associados com alterações na progressão da gravidez e perdas gestacionais em diversas espécies (Twig *et al.*, 2012). Ocitocina (OXT) e prolactina (PRL) são exemplos, respectivamente, de um neuropeptídeo e de uma proteína que possuem ação relacionada com

traços de produção (quantidade de leite produzido, conteúdo proteico etc.) (Dybus, 2002; Brym *et al.*, 2005; Hameed *et al.*, 2014). Adicionalmente, estas moléculas atuam diretamente no testículo, regulando a produção de testosterona. A atuação da PRL na síntese de testosterona se dá por meio da potencialização do efeito do hormônio luteinizante, sintetizado pela hipófise, sobre a síntese de testosterona e espermatogênese (Hafiez *et al.*, 1972; Rastrelli *et al.*, 2015). Tratamentos utilizando PRL em animais hipofisectomizados resultam na indução da espermatogênese e na restauração dos níveis de testosterona plasmática (Rastrelli *et al.*, 2015). No caso da OXT, este neuropeptídeo é produzido pelas células da neurohipófise e postula-se que sua atuação ocorra no aumento de função da 5 α -redutase, a enzima responsável por converter a testosterona em dihidrotestosterona (DHT), sua forma mais ativa. Há vias alternativas para produção e degradação da testosterona. Em uma via alternativa, CYP19A1 converte testosterona em 19-OH-testosterona, 19-oxo-testosterona e finalmente em estrógeno. Desta forma, o balanço entre estas vias vai determinar a quantidade de testosterona e a quantidade de estrógeno aos quais o indivíduo está exposto. A relação existente entre o desenvolvimento da puberdade e as alterações associadas com características de produção e fertilidade, fazem os genes responsáveis por regular estes processos importantes candidatos para efeitos pleiotrópicos envolvendo este.

A correlação negativa entre características de produção e eficiência reprodutiva já é algo bem estabelecido na literatura. Contudo, as bases genéticas desse processo são pouco conhecidas. Um bom exemplo desta correlação negativa, que se aplica a rebanhos selecionados para leite ou para carne, é a associação existente entre eficiência alimentar e eficiência reprodutiva (Mu *et al.*, 2016). Os custos alimentares representam uma grande parcela dos gastos com rebanhos, fazendo com que nas últimas décadas um esforço seja feito com o intuito de aumentar a eficiência alimentar nos rebanhos (Mu *et al.*, 2016). Entretanto, o aumento da eficiência alimentar foi acompanhado do aumento de alguns fenótipos indesejados. Por exemplo, animais que apresentam uma maior eficiência alimentar tendem a apresentar menor motilidade e menor viabilidade espermática, assim como menor circunferência escrotal e com o número de dias para o parto (Awda *et al.*, 2013; Mu *et al.*, 2016).

Distúrbios reprodutivos em touros representam uma importante parcela da totalidade das alterações reprodutivas observadas nos rebanhos. Machos geralmente possuem maior capacidade de transmissão dos componentes genéticos, uma vez que produzem mais prole em comparação às fêmeas. Além disso, alguns estudos têm relatado que uma porcentagem significativa das falhas reprodutivas em bovinos leiteiros é atribuível à infertilidade masculina (Dejarnette *et al.*, 2004). Em rebanhos brasileiros, distúrbios reprodutivos em machos atingem

frequências de até 15%, como no caso da raça Gir (Andreussi *et al.*, 2014). O distúrbio reprodutivo observado com maior frequência entre os rebanhos Gir é a hipoplasia testicular. A hipoplasia testicular é um defeito congênito caracterizado por uma falha no desenvolvimento do epitélio seminífero é observada, resultando em características morfológicas distintas do testículo quando comparado a testículos normais, assim como redução na fertilidade (Figura 1). As medidas do testículo bovino variam entre raças, porém, estima-se que, o testículo bovino tenha de 300-400 gramas com 10-13 cm de comprimento e 5-6,5 cm de largura. O parênquima testicular é o principal responsável pelo volume gonadal, sendo composto, basicamente, pelos túbulos seminíferos e o tecido intersticial. Os túbulos seminíferos contêm o tecido germinativo (espermatozoides) e um conjunto de células especializadas para o suporte da produção de espermatozoides, as células de Sertoli. O tecido intersticial é formado por uma rede de tecido conjuntivo frouxo, que preenche o espaço entre os túbulos seminíferos e os vasos sanguíneos. O principal tipo celular que reside no tecido intersticial são as células de Leydig. Estas células organizam-se em clusters no tecido intersticial, sendo responsáveis pela produção de andrógenos nos testículos. A abundância de células de Leydig no interstício é um critério de classificação testicular entre espécies. Bovinos são classificados no grupo 2, juntamente com macacos, elefantes, e humanos (Fawcett *et al.*, 1973). Os animais desse grupo possuem um tecido intersticial bem frouxo, com células de Leydig espalhadas pelo interstício associadas fortemente ao sistema linfático. Nestes animais, as células de Leydig são responsáveis somente por ~15% do volume testicular.

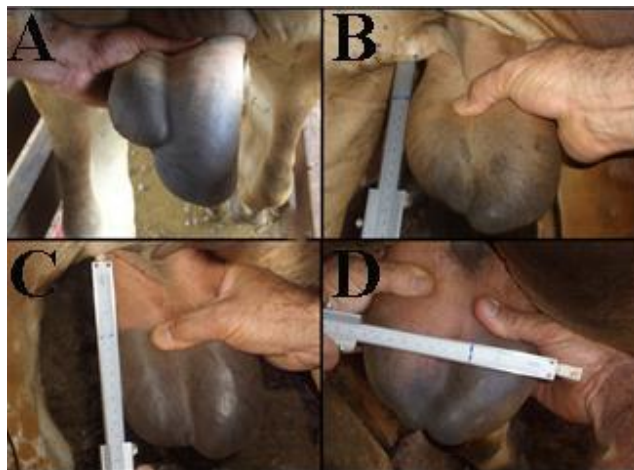


Figura 1: Características morfológicas testiculares de animais hipoplásicos e saudáveis. Os animais A, B e C apresentam hipoplasia testicular com graus de assimetria diferentes, enquanto o animal D é clinicamente normal. Adaptado de (Moura, 2013).

O componente ambiental influi fortemente no desenvolvimento das características reprodutivas em bovinos. Características femininas, como idade ao primeiro parto, e características masculinas, como melhores parâmetros reprodutivos possuem correlação direta com o peso do animal (Corrêa *et al.*, 2006; Boligon *et al.*, 2008). Isso pode ser explicado pela relação existente entre a eficiência reprodutiva e os aspectos nutricionais aos quais o animal está sujeito (Mcnamara e Shields, 2013; Leroy *et al.*, 2014). Além disso, variações sazonais influenciam a composição lipídica do leite nos animais e estão associadas, também com a qualidade do sêmen (Argov-Argaman *et al.*, 2013). O efeito sazonal também é observado sobre a taxa de sucesso das inseminações artificiais em bovinos, estando principalmente relacionado ao estado nutricional durante o inverno e ao estresse térmico no verão (Bouhroum *et al.*, 2014).

Bovinos, em geral, são considerados espécies com reprodução contínua (não-sazonal) (Tucker, 1982). Contudo, a ação do eixo hipotalâmico-pituitário-gonadal é regulada de maneira sazonal, sendo que o pico de produção de gonadotrofinas é observado no equinócio de primavera e uma maior produção de testosterona é observada em resposta à resposta a uma maior produção de LH no solstício de verão (Stumpf *et al.*, 1993). Estes resultados indicam uma influência da estação do ano no controle das funções testiculares. Geralmente, o período reprodutivo é estabelecido nos meses mais quentes em regiões subtropicais. Contudo, altas temperaturas podem causar estresse térmico devido a falhas nos mecanismos de termorregulação e dissipação de calor (Armstrong, 1994; West, 2003; Marai *et al.*, 2008). Basicamente, todos os tecidos celulares no testículo são afetados pelo aumento da temperatura. Porém, células germinativas tendem a ser mais sensíveis às elevações bruscas de temperatura (Waites e Setchell, 1990). Os impactos da elevação da temperatura são observados em todas as etapas de desenvolvimento de espermatozoide, sendo que espermatócitos em prófase meiótica geralmente entram em processo de morte celular, enquanto espermatozoides em estágios posteriores de maturação apresentam alterações metabólicas e estruturais graves (Setchell *et al.*, 1971). Estas alterações nas células espermáticas são causadas pela interferência das altas temperaturas sobre o metabolismo oxidativo da glicose como resultado de disfunções mitocondriais e da criação de radicais oxidativos (Nichi *et al.*, 2006). Desta forma, exposições contínuas a altas temperaturas podem desencadear estresse térmico, levando a alterações significativas na espermatogênese e no epitélio testicular.

Como citado anteriormente, o desenvolvimento da puberdade é desencadeado por uma série de alterações hormonais que regulam o funcionamento de diversos tecidos. No caso dos

testículos, um rápido crescimento é observado durante a transição do período pré-puberal para puberal. Este rápido crescimento pode ser explicado pelas alterações hormonais destes períodos. Em bovinos, o período infantil ocorre do nascimento até aproximadamente 2 meses de idade. Este período é caracterizado por baixa produção de gonadotrofinas e testosterona, com poucas alterações na composição celular do testículo. Neste período, o epitélio do interstício testicular é composto basicamente por células mesenquimais. As células de Leydig correspondem a uma grande parcela destas se encontra em avançado estágio de degeneração (células de origem embrionária). No caso dos túbulos seminíferos e células de Sertoli, são observados cordões sólidos, sem lúmen, e células indiferenciadas. O aumento da secreção de gonadotrofinas é um evento marcante para o início do período pré-puberal. Este período ocorre entre os 2 e 6 meses de idade, sendo acompanhado por uma série de alterações na composição celular dos testículos. O aumento da secreção de gonadotrofinas é controlado pelo aumento da secreção pulsátil do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH). Os pulsos de liberação de GnRH aumentam drasticamente neste período, indo de menos de 1 por dia no primeiro mês de vida, até 12-16 por dia, aos 4 meses de vida. O aumento dos pulsos de GnRH é acompanhado por um aumento significativo nos pulsos de LH.

A secreção pulsátil de LH é um evento crucial para a proliferação, diferenciação e função das células de Leydig (Schanbacher, 1979). Neste período, as células mesenquimais do testículo podem proliferar e se diferenciar em células de Leydig ou miofibroblastos. Uma outra característica importante da secreção pulsátil de LH, é a regulação da produção de testosterona. O padrão pulsátil é de extrema importância, uma vez que a exposição contínua das células de Leydig ao LH resulta em uma regulação negativa dos receptores de LH, assim, reduzindo a produção de testosterona. A secreção de LH no período pré-puberal também está associada com a idade em que a puberdade é atingida, sendo que pulsos mais frequentes e precoces são observados em animais que atingem a puberdade precocemente (Evans *et al.*, 1995; Aravindakshan *et al.*, 2000). O período pré-puberal também é caracterizado por um aumento progressivo da ocupação do parênquima testicular pelos túbulos seminíferos, assim como, pelo aumento de diâmetro dos mesmos (Curtis e Amann, 1981; Evans *et al.*, 1996). Além disso, observa-se um aumento da proliferação e diferenciação das células de Sertoli, devido ao maior número de sítios de ligação do hormônio folículo estimulante (FSH) e, conseqüente, aumento da concentração de FSH nos túbulos seminíferos (Schanbacher, 1979).

O período puberal estende-se de 6 a 12 meses de idade, sendo que zebuínos (*Bos indicus*) tendem a atingir a puberdade de maneira mais tardia quando comparados a taurinos (*Bos taurus*) (Nogueira, 2004). Este período é caracterizado pela redução da secreção de gonadotrofinas,

aumento na secreção de testosterona e início da presença de espermatozoides no ejaculado. Durante a puberdade, inicia-se a fase de rápido crescimento testicular (Figura 2a), caracterizada por um aumento significativo da massa de células de Leydig, aumento do diâmetro e comprimento dos túbulos seminíferos e completa diferenciação e aumento na quantidade das células de Sertoli (Curtis e Amann, 1981; Wrobel, 1990). Além disso, o aumento da concentração de testosterona proporciona o início da espermatogênese, atingindo níveis máximos de proliferação de células germinativas entre os 4-8 meses de idade (Curtis e Amann, 1981). A fase de crescimento testicular geralmente é mais rápida, atingindo um *plateau* mais rapidamente, em animais que atingem a puberdade precocemente, o que é salientado quando animais taurinos e zebuínos são comparados (Figura 2b). Desta forma, a correta progressão dos períodos pré-puberal e puberal é de crucial importância para o desenvolvimento testicular típico.

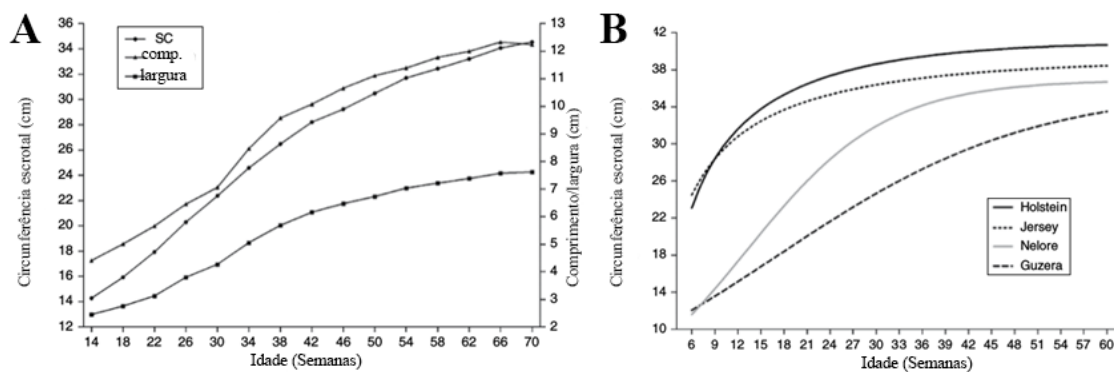


Figura 2: Relação entre medidas testiculares e idade. A) Curvas do comportamento da circunferência escrotal (em cm) e da razão comprimento/largura (em cm) em função da idade (em semanas) em animais Angus e Angus X Charolais (n=111). B) Curvas de crescimento da circunferência escrotal (em cm) em função da idade (em semanas) para diferentes raças (Holstein, Jersey, Nelore e Guzera). Adaptado de Hopper (2014).

Devido à grande variedade de processos biológicos envolvidos no desenvolvimento do testículo, um conjunto de características pode ser atribuído às medidas testiculares. Em geral, medidas testiculares, como a circunferência escrotal (SC), apresentam maior herdabilidade quando comparadas a medidas espermáticas (Coulter *et al.*, 1976; Latimer *et al.*, 1982; Knights *et al.*, 1984; Gipson *et al.*, 1987; Meyer *et al.*, 1991; Keeton *et al.*, 1996; Vargas *et al.*, 1998; Eler *et al.*, 2004; Corbet *et al.*, 2009; Van Melis *et al.*, 2010; Garmyn *et al.*, 2011). Além disso, medidas testiculares apresentam correlação positiva com diversas medidas de produção, como por exemplo, peso na desmama (0,56; 0,36), área do músculo *longissimus dorsi* (0,28) e espessura da gordura na região dorsal (0,17) (Lunstra *et al.*, 1988; Smith *et al.*, 1989a; Boligon

et al., 2010; Yokoo *et al.*, 2010). Além de características de produção, medidas testiculares também apresentam correlação positiva com medidas espermáticas, como no caso de concentração (0,54) e motilidade (0,36) espermáticas e porcentagem de esperma normal (0,33). Desta forma, tanto a seleção direta para medidas testiculares, quanto a seleção para algum destes traços de produção podem resultar no aumento das medidas testiculares, com um potencial aumento da eficiência reprodutiva. É importante ressaltar que medidas testiculares também apresentam uma correlação genética com características reprodutivas em fêmeas. Por exemplo, filhas de touros com maiores medidas testiculares tendem a apresentar uma menor idade na primeira ovulação, na primeira gravidez e ao primeiro parto (Toelle e Robison, 1985; Vargas *et al.*, 1998). Além disso, a circunferência escrotal apresentou alta correlação com a porcentagem de filhas fêmeas atingindo a puberdade em 425 dias (0,95) e idade na puberdade (-0,91) (Gregory *et al.*, 1991).

Devido à importância das medidas testiculares, seja pela grande variedade de processos biológicos envolvidos, ou pela elevada correlação com outras características de elevada importância, somado à grande frequência de alterações testiculares nos rebanhos, o estudo dos fatores causadores destas alterações importância é fundamental. Como citado anteriormente, em rebanhos brasileiros, a hipoplasia gonadal é a principal alteração testicular observada nos rebanhos.

Geralmente, a hipoplasia testicular se manifesta durante a puberdade, após a fase de rápido crescimento testicular. Esta alteração deve ser diferenciada de outras, como por exemplo, a atrofia testicular ou testículos naturalmente pequenos. A diferenciação da hipoplasia testicular de outras alterações é uma tarefa complexa, devido aos diversos fatores confundidores e a ausência de uma classificação sistemática, que faça a diferenciação das diversas alterações testiculares.

Touros com hipoplasia testicular estão presentes em rebanhos independentemente da nutrição e apresentam fertilidade reduzida, desta forma, não sendo recomendados para uso na reprodução (Moura, 2013). Em alguns casos, os distúrbios reprodutivos são de fácil detecção, como por exemplo, a identificação de animais criptorquídicos, caracterizados pela ausência de um ou ambos os testículos na bolsa escrotal, devido a interrupção do trajeto normal de migração do testículo da cavidade abdominal para a bolsa escrotal (Do Nascimento e De Lima Santos, 2000), o que resulta em infertilidade. Nestes casos, os touros são rapidamente identificados e removidos do rebanho. Porém, existem situações em que a identificação não é uma tarefa trivial, acarretando muitas vezes, na identificação destes animais somente no momento da primeira reprodução. Isso ocorre quando há a presença de animais subférteis no rebanho, os quais

chegam a compor de 20-40% de alguns rebanhos bovinos (Kastelic e Thundathil, 2008). A subfertilidade é caracterizada por um sucesso reprodutivo inferior à média geral da população, porém, sem a presença de infertilidade (Gnoth *et al.*, 2005). Estes animais podem apresentar a morfologia dos órgãos reprodutores externos aparentemente normais e gerar prole no rebanho, uma vez que são capazes de se reproduzir. Contudo, como será discutido a seguir, características reprodutivas podem apresentar uma herdabilidade de moderada à alta (Druet *et al.*, 2009). De forma que as características, que implicam na subfertilidade dos animais continuariam a segregar no rebanho. Portanto, o desenvolvimento de estratégias, que identifiquem precocemente animais com propensão ao desenvolvimento de distúrbios reprodutivos, é uma etapa crucial para a redução dos impactos econômicos ocasionados por estas alterações.

Motivados pelo alto impacto financeiro causado por distúrbios reprodutivos em rebanhos bovinos, somado à necessidade de uma melhor descrição/entendimento dos componentes genéticos envolvidos na regulação de características reprodutivas, nosso grupo de pesquisa vem desenvolvendo trabalhos nesse campo de pesquisa. A seguir, alguns destes trabalhos serão brevemente apresentados, com o intuito de melhor contextualizar os trabalhos, que serão apresentados nesta tese.

1.2 Caracterização fenotípica, frequência de distúrbios reprodutivos e identificação de genes/regiões candidatas associadas com a subfertilidade na raça Gir: trabalhos prévios do nosso grupo de pesquisa

O rebanho leiteiro brasileiro é composto tanto por raças taurinas (*Bos taurus*), quanto por raças zebuínas (*Bos indicus*). Contudo, cerca de 70% do rebanho nacional é formado por animais zebuínos ou mestiços (Alvim *et al.*, 2005). A raça Gir, originária da Índia, se destaca entre as demais raças zebuínas devido ao fato dos animais serem extremamente adaptados ao clima tropical, resistentes a endo- e ectoparasitas, estresse térmico e às doenças tropicais (Gaur *et al.*, 2003). A rusticidade do Gir, aliada com o seu grande potencial para a produção leiteira fez com que essa raça se tornasse altamente difundida por todo o Brasil. A raça Gir atingiu um patamar de excelência em produção ao longo de 25 anos de seleção. Grande parte deste sucesso se deve aos programas de melhoramento genético, pois, a partir deles, a raça tem alcançado ganhos genéticos da ordem de 1% ao ano para a produção de leite. O melhoramento genético observado para a raça Gir segue uma tendência mundial em relação ao aumento da produção e qualidade do leite. Contudo, como descrito previamente, a frequência de distúrbios

reprodutivos nesta raça permanece elevado (Andreussi *et al.*, 2014), sendo a subfertilidade um dos grandes problemas envolvendo esta raça.

Com o intuito de investigar a subfertilidade na raça Gir, um estudo colaborativo foi estabelecido entre pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e Embrapa Gado de Leite, coordenado por Vicente Ribeiro do Vale-Filho (Escola de Veterinária, UFMG). Maria Raquel S. Carvalho (Instituto de Ciências Biológicas, FMG) e Marcos Vinicius Barbosa da Silva (CNPGL, Embrapa). Os esforços iniciais deste estudo colaborativo resultaram na tese de doutorado do aluno Guilherme Silva Moura pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, defendida e aprovada no ano de 2013. Este trabalho dividiu-se em duas etapas: 1) caracterização do perfil clínico-andrológico e análise comparativa do sêmen entre touros normais e com hipoplasia testicular na raça Gir-leiteiro; 2) identificação de marcadores moleculares para subfertilidade em touros da raça Gir-leiteiro.

Na primeira etapa deste trabalho, objetivou-se demonstrar aspectos clínico-andrológicos e de qualidade de sêmen em touros normais e em touros com hipoplasia testicular, detectados em seis rebanhos Gir-L referência no Estado de Minas Gerais. Este experimento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFMG, na reunião do dia 23/11/2011, sendo protocolado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – EV/UFMG com o nº de protocolo 227/11. Nesta etapa, 311 touros da raça Gir-leiteiro foram submetidos a uma minuciosa avaliação andrológica. Esta avaliação ocorreu no período de 2009 a 2012. Nesta data, dentre os 311 touros, 240 se apresentaram cronologicamente adultos (23-60 meses). Entres estes, 168 apresentaram-se clinicamente normais, enquanto 18 foram diagnosticados com hipoplasia testicular, com sêmen de baixa qualidade, apresentando-se subfêrteis. O restante dos animais adultos (n = 54) apresentavam outros distúrbios espermáticos como imaturidade sexual, maturidade sexual retardada, criptorquidismo, espermiogênese imperfeita, degeneração testicular e disfunções da cabeça e da cauda do epidídimo (Vale Filho *et al.*, 2010). Os critérios de classificação destes animais estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos touros quanto à aptidão reprodutiva (Adaptado de Moura, 2013).

| Classificação | Característica* |
|----------------------------------|--|
| Normal | MOT > 50%; DM < 15%; DT < 30% |
| Imaturo | MOT < 50%; DM > 15%; DT > 30%; Qualquer DM individualmente > 5%; Idade < 24 meses |
| Maturidade sexual retardada | MOT < 50%; DM > 15%; DT > 30%; Qualquer DM individualmente > 5%; Idade > 24 meses |
| Hipoplasia testicular | Assimetria testicular; Baixa concentração; Baixa MOT; Alta patologia; Azoospermia; Idade > 24 meses |
| Degeneração testicular | Baixa concentração; Baixa MOT; Alta patologia; Já se apresentou normal anteriormente |
| Criptorquidia | Ausência de um ou ambos os testículos na bolsa escrotal |
| Disfunção da cabeça do epidídimo | Alta concentração; Baixa MOT; Alta patologia; Alta porcentagem de GCP; Alta porcentagem de PI fraturadas |
| Disfunção da cauda do epidídimo | Alta concentração; Baixa MOT; Alta patologia; Alta porcentagem de GCD; Sem presença de PI fraturadas |
| Espermatogênese Imperfeita | Defeitos no acrossoma; “Knobben Sperm” |

Nota: MOT = motilidade espermática progressiva; DM = defeitos espermáticos maiores; DT = defeitos espermáticos totais; GCP = gota citoplasmática proximal; GCD = gota citoplasmática distal

No momento da análise andrológica, para cada animal foram anotados o nome, o número de registro, a data de nascimento, o nome do pai, o nome da mãe, bem como o peso vivo (Kg), a circunferência escrotal (cm) e as biometrias dos testículos. Para mensurar o peso, utilizou-se uma balança mecânica tipo tronco e os animais tiveram seu peso aferido individualmente. O perímetro escrotal foi mensurado utilizando-se de fita milimétrica no seu local de maior diâmetro. No momento da mensuração, a fita milimétrica envolveu as gônadas e pele escrotal. Além disso, os testículos foram mensurados individualmente em seu comprimento e largura utilizando-se de um paquímetro. A partir destas medidas biométricas, o volume testicular foi estabelecido utilizando a fórmula: $VOL = 2 [(r^2) \times \pi \times h]$, onde r = raio calculado utilizando a largura (LT/2), h = comprimento testicular, e $\pi = 3,14$ (Fields *et al.*, 1979). As características morfológicas do sêmen foram avaliadas da seguinte maneira: uma gota do sêmen foi posicionada em lâmina para avaliação do turbilhonamento espermático (*score* avaliado que varia de 1-5), outra gota foi posicionada em lâmina sob lamínula para a avaliação da motilidade espermática progressiva (MOT - % de espermatozoides móveis) e do vigor espermático (*score* avaliado que varia de 1-5) em microscopia ótica com aumento de 100x. A concentração espermática foi avaliada em câmara de Neubauer, utilizando-se uma alíquota de 20 μ l da amostra de sêmen, a qual foi diluída em 1000 μ l de uma solução formol-salina a 1%. Além disso, a morfologia espermática foi aferida avaliando-se o percentual de defeitos espermáticos maiores e menores. Todas estas análises foram realizadas no “Laboratório Multiusuário”, do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG. Na Figura 2, são apresentados algumas das alterações espermáticas observadas na avaliação andrológica realizada.



Figura 3: Defeitos espermáticos observados durante a avaliação andrológica dos animais; A) Animal com oligospermia e espermatozoides apresentando defeitos na peça intermediária; B) Animal com azoospermia e espermatozoides apresentando gota citoplasmática proximal; C) Espermatozoides apresentando contorno anormal, gota citoplasmática distal e cabeça piriforme; D) Concentração espermática normal e espermatozoides com cabeça piriforme, gota citoplasmática proximal e contorno anormal. Fonte: Adaptado de Moura (2013).

Como resultado destas análises, uma frequência de 5,76% de animais portadores de hipoplasia gonadal foi observada na amostra de 311 animais. Os animais foram considerados hipoplásicos quando apresentaram diferença maiores que 1,0 cm de comprimento e 0,5 cm de largura entre os testículos. Dentre estes animais, uma grande variedade de alterações espermáticas foi observada. Neste estudo não foi encontrada influência do grupo de fazenda, nem de grupo de idade, sobre a frequência de animais com hipoplasia testicular nos rebanhos estudados. Isto demonstra que a presença de hipoplasia testicular em um rebanho não está relacionada a interações externas ao animal como clima, manejo ou nutrição, sugerindo que o principal fator que contribuiu para esses fenótipos seja de ordem genética.

Na segunda etapa deste estudo, um estudo de associação em escala genômica (*Genome-wide association study* - GWAS) foi conduzido com o intuito de identificar genes/regiões genômicas associadas aos fenótipos avaliados no trabalho descrito acima. Uma avaliação preliminar destes resultados foi parte da tese de doutorado do aluno Guilherme da Silva Moura. No primeiro capítulo desta tese, estes dados foram reanalisados, na busca de um modelo mais adequado para as características da amostra em estudo.

1.3 Integrando resultados de diversas ômicas e raças para identificar componentes genéticos em comum: A importância da biologia de sistemas

Movidos pela grande importância de características reprodutivas na manutenção de rebanhos bovinos, uma grande quantidade de trabalhos foi publicada nas últimas décadas com o intuito de identificar variantes genéticas e processos biológicos associados ao desenvolvimento destas características (Fortes *et al.*, 2013). Contudo, como resultado direto deste grande número de estudos, observa-se a identificação de um grande número de regiões genômicas associadas a estas características. Quando os resultados entre estudos são comparados, uma série de fatores confundidores podem ser encontrados, o que pode dificultar a identificação dos fatores genéticos semelhantes em mais de um estudo. Isto torna a elucidação dos componentes biológicos envolvidos no desenvolvimento das características em estudo, uma tarefa ainda mais complexa.

Quando diferentes raças são comparadas, é possível observar-se que diferentes regiões do genoma sofrem diferentes níveis de pressão de seleção. Estas diferenças tornam-se ainda mais evidentes quando raças selecionadas para diferentes propósitos (carne ou leite) ou diferentes espécies (*Bos indicus* ou *Bos taurus*) são comparadas (Hanotte *et al.*, 2000; Kishore *et al.*, 2014; O'Brien *et al.*, 2014; Gutiérrez-Gil *et al.*, 2015; Menegassi *et al.*, 2015; Kasarapu *et al.*, 2017). Estas diferenças podem ser explicadas por diferentes padrões de desequilíbrio de

ligação (LD) ou diferentes frequências alélicas para marcadores associados a determinadas características, por exemplo. Analisando essas diferenças com enfoque na eficiência reprodutiva, animais zebuínos tendem a apresentar puberdade mais tardia, como já citado (Brito *et al.*, 2004; Nogueira, 2004). Além disso, quando a proporção de genes enriquecidos para marcadores de origem taurina ou zebuína é analisada, é possível identificar uma diferença no balanço de genes relacionados com produção leiteira e reprodução (Kasarapu *et al.*, 2017). Genes relacionados com a produção leiteira tendem a ser enriquecidos com marcadores de origem taurina, enquanto genes relacionados com processos envolvendo a reprodução são enriquecidos para marcadores de origem zebuína (Kasarapu *et al.*, 2017).

A integração de resultados obtidos em múltiplas raças e populações, pode auxiliar na identificação de marcadores, genes ou vias metabólicas compartilhadas entre diferentes populações, quando traços similares são analisados. Este processo de comparação é extremamente útil para a identificação de genes com potencial efeito na regulação do desenvolvimento destas características. Além disso, a combinação de resultados de técnicas de alto rendimento pode permitir um aumento no poder de detecção, resultando em informações mais completas. Desta forma, os resultados de técnicas de alto rendimento devem passar por um minucioso processo de filtragem, seleção de variantes candidatas e interpretação biológica, de forma a reduzir o número de falsos positivos. A importância deste tipo de processamento é ainda mais clara, quando resultados de *GWAS* são analisados. Apesar da identificação de regiões candidatas, o *GWAS* geralmente pode não identificar a variante causal do fenótipo avaliado. Isto pode ser explicado pelo fato de que os marcadores presentes na plataforma de genotipagem são selecionados de forma a representar a região genômica baseado no LD deste marcador em relação às outras variantes presentes em seu entorno. Desta forma, o marcador associado ao fenótipo pelo *GWAS* pode não ser a verdadeira variante causal. Uma avaliação mais precisa das regiões candidatas identificadas nos *GWAS* é de extrema importância para a identificação da real variante causal e, conseqüentemente, para uma melhor compreensão dos processos biológicos envolvidos no desenvolvimento do fenótipo (Raychaudhuri *et al.*, 2009; Freedman *et al.*, 2011).

A biologia de sistemas (*systems biology*) é a área responsável por integrar informações de sistemas complexos em uma abordagem multidisciplinar envolvendo diversas áreas da Biologia, Matemática, Estatística e Ciências da computação (Kitano, 2002a; b; Suravajhala *et al.*, 2016). Em geral, sistemas biológicos interagem de uma maneira coordenada e não linear, de modo a criar um sistema coerente (Kitano, 2002a). A biologia de sistemas tem como objetivo analisar as interações destes sistemas complexos de uma maneira não reducionista, de modo a

entender todas as etapas que levam à expressão de um fenótipo complexo. Diferentes abordagens podem ser selecionadas dentro da biologia de sistemas. A genômica funcional ou genômica de sistemas (*systems genomics*) é uma excelente alternativa quando um determinado fenótipo já foi analisado por meio de diversas técnicas de alto-rendimento. Este termo foi inicialmente cunhado em 2006 para integração de dados de transcriptômica, proteômica, metabolômica, genética e genômica para a melhoria de resultados na área de melhoramento animal (Kadarmideen *et al.*, 2006). Esta integração ocorre a partir do nível individual de cada ômica, onde estes resultados são combinados e analisados mediante anotação funcional, análise de processos biológicos, vias metabólicas, padrões de interação proteína-proteína, etc. Este processo tem como objetivo utilizar a grande quantidade de informação disponível em uma abordagem multi-ômica de modo a reconstruir todos (ou o máximo possível) os pontos que constituem o sistema complexo em análise. Portanto, a biologia de sistemas é uma excelente ferramenta para a identificação e elucidação da arquitetura genética de fenótipos complexos, como por exemplo, características reprodutivas. Além disso, ela pode auxiliar no entendimento das diferenças e similaridades entre os resultados obtidos para diferentes populações e diferentes estudos. Por fim, uma análise utilizando a abordagem da biologia de sistemas tem o potencial de facilitar o entendimento das correlações existentes entre diferentes tipos de fenótipos, por exemplo, a correlação existente entre produção e eficiência reprodutiva em bovinos. Portanto, auxiliando na identificação de genes centrais, responsáveis por regular os efeitos pleiotrópicos envolvendo estas características. Consequentemente, além de aumentar o conhecimento acerca dos processos biológicos envolvendo estas características, os resultados obtidos por estas análises podem auxiliar na prevenção de efeitos colaterais indesejáveis da seleção (Rauw *et al.*, 1998; Kadri *et al.*, 2014; Saatchi *et al.*, 2014; De Camargo *et al.*, 2015; Tsuruta *et al.*, 2017). No capítulo 3 desta tese, a identificação de genes com potencial de regulação do efeito pleiotrópico, envolvendo características reprodutivas e de produção, será abordada.

2. Capítulo 1 - A in family case-control GWAS identifies genes/candidate regions for gonadal asymmetry and sperm abnormalities in Dairy-Gyr breed

Artigo a ser submetido à Theriogenology (ver anexo suplementar 1)

Abstract

In recent years, much effort has been directed to evaluating the effects of inbreeding depression in herds selected for production traits. The increase in milk production along with a decrease in fertility rates has led to the focus on identifying underlying genetic mechanisms of these processes in order to ensure better results in animal breeding. Gonadal hypoplasia and/or testicular asymmetry, when associated with spermatogenic abnormalities, have potential for economic harm to breeders. The aim of the present study was to investigate the genetic basis of gonadal hypoplasia and/or testicular asymmetry along with spermatogenic abnormalities associated or not with testicular asymmetry and/or gonadal hypoplasia. For this investigation, an in-family GWAS was performed on 30 affected bulls and 30 normal bulls of the Bos indicus Dairy-Gyr breed (sibs or half-sibs of the affected bulls). 390,721 markers were used to perform a weighted single step GWAS (WssGBLUP). Using this methodology, it was possible to identify windows explaining a significant proportion of the genetic variance for the evaluated phenotypes. Additionally, these windows showed a high consistency of shared genes among different phenotypes. From the functional analysis, 10 positional and functional candidate genes were selected based on their roles in crucial biological processes: AR, TUBB, ICK, ROS1, CCL2, GOPC, UBD, MDC1, MCM3 and TAB2. The accurate selection of candidate genes and regions from a whole genome study, with high consistency among related phenotypes, reinforces that the in-family case-control GWAS design used here is a good alternative for investigating pathological phenotypes.

Keywords: GWAS; WssGBLUP; gonadal asymmetry; sperm abnormalities; sperm; Dairy-Gyr

3. Capítulo 2 - Investigating the genetic relationships of spermatic and testicular traits within and among cattle breeds: A systematic review with functional analysis

Artigo a ser submetido ao Journal of Animal Science (ver anexo suplementar 2)

Abstract

Reduced bull fertility imposes economic losses in bovine herds. Specifically, testicular and spermatic traits are important indicators of reproductive efficiency. Several Genome-wide association studies (GWAS) have identified genomic regions associated with these fertility traits. The aims of this study were: 1) to perform a systematic review of GWAS results for spermatic and testicular traits in cattle; and, 2) identify key functional candidate genes for these traits. The identification of functional candidate genes was performed using a systems biology approach, where genes shared between traits and studies, were evaluated by a guilt by association gene prioritization (GUILDify and ToppGene software) in order to identify the best functional candidates. These candidate genes were integrated and analyzed in order to identify overlapping patterns among traits and breeds. Results showed that GWAS for testicular related traits have been developed for beef breeds only, while the majority of GWAS for spermatic related traits were conducted using dairy breeds. When comparing traits measured within the same study, the highest number of genes shared between different traits were observed, indicating a high impact of the population genetic structure and environmental effects. Several chromosomal regions were enriched for functional candidate genes associated to fertility traits. Moreover, multiple functional candidate genes were enriched for markers in a species-specific basis, taurine (*Bos taurus*) or indicine (*Bos indicus*). For the different candidate regions identified in the GWAS in the literature, functional candidate genes were detected: BTAX (*TEX11*, *IRAK*, *CDK16*, *ATP7A*, *ATRX*, *HDAC6*, *FMR1*, *LICAM*, *MECP2*, etc.), BTA17 (*TRPV4* and *DYNLL1*) and BTA14 (*MOS*, *FABP5*, *ZFPM2*). These genes are responsible for regulating important metabolic pathways or biological processes associated with fertility, such as, progression of spermatogenesis, control of ciliary activity, development of Sertoli cells, DNA integrity in spermatozoa and homeostasis of testicular cells. This study represents the first systematic review on male fertility traits in cattle using a system biology approach to identify key candidate genes for these traits.

Keywords: fertility, sperm, testis, functional candidates, GWAS, prioritization

4. Capítulo 3 - Combining multi-OMICs information to identify key-regulator genes for pleiotropic effect on fertility and production traits in beef cattle

Artigo submetido à Plos One (ver Anexo complementar 3)

Abstract

The identification of biological processes related to the regulation of complex traits is a difficult task. Commonly, complex traits are regulated through a multitude of genes contributing each to a small part of the total genetic variance. Additionally, some *loci* can simultaneously regulate several complex traits, a phenomenon defined as pleiotropy. The lack of understanding on the biological processes responsible for the regulation of these traits results in the decrease of selection efficiency and the selection of undesirable hitchhiking effects. The identification of pleiotropic key-regulator genes can assist in developing important tools for investigating biological processes underlying complex traits. A multi-breed and multi-OMICs approach was applied to study the pleiotropic effects of key-regulator genes using three independent beef cattle populations evaluated for fertility traits. A pleiotropic map for 32 traits related to growth, feed efficiency, carcass and meat quality, and reproduction was used to identify genes shared among the different populations and breeds in pleiotropic regions. Furthermore, data-mining analyses were performed using the Cattle QTL database (CattleQTLdb) to identify the QTL category annotated in the regions around the genes shared among breeds. This approach allowed the identification of a main gene network (composed of 38 genes) shared among breeds. This gene network was significantly associated with thyroid activity, among other biological processes, and displayed a high regulatory potential. In addition, it was possible to identify genes with pleiotropic effects related to crucial biological processes that regulate economically relevant traits associated with fertility, production and health, such as *MYC*, *PPARG*, *GSK3B*, *TG* and *IYD* genes. These genes will be further investigated to better understand the biological processes involved in the expression of complex traits and assist in the identification of functional variants associated with undesirable phenotypes, such as decreased fertility, poor feed efficiency and negative energetic balance.

Keywords: *pleiotropic effect; production; reproduction traits, systems biology, multi-OMIC, beef cattle.*

5. Discussão Geral

Os resultados obtidos e apresentados ao longo dos capítulos, que constituem esta tese, reforçam a grande heterogeneidade genética presente em fenótipos reprodutivos, especialmente entre raças bovinas. Interessantemente, os resultados obtidos no primeiro e segundo capítulos dessa tese podem ser contrastados de maneira a reforçar alguns resultados. Primeiramente, foi notória a maior proporção de genes candidatos posicionais compartilhados entre fenótipos testiculares. Medidas como circunferência, volume, comprimento e largura apresentaram uma sobreposição muito maior dos genes candidatos posicionais do que a observada quando fenótipos espermáticos foram comparados entre si. Além disso, fenótipos testiculares apresentaram maior número de genes compartilhados com fenótipos espermáticos do que entre fenótipos espermáticos comparados entre si. Estes resultados reforçam a teoria já vigente na literatura, de que fenótipos testiculares possam ser uma medida mais estável e eficiente para a seleção de animais visando a eficiência reprodutiva. Esta teoria baseia-se no fato de características testiculares apresentarem uma maior herdabilidade, quando comparadas à características espermáticas (Keeton *et al.*, 1996; Eler *et al.*, 2004; Corbet *et al.*, 2009; Garmyn *et al.*, 2011). Isto poderia ser explicado por um número menor de variantes, com um maior efeito, responsáveis por regular esse tipo de característica. Além disso, um menor efeito de componentes ambientais ou uma maior precisão das técnicas de obtenção de fenótipos testiculares pode auxiliar na explicação deste padrão. Inclusive, existem evidências de maior interferência de fatores ambientais sobre fenótipos espermáticos e uma maior imprecisão ou variação nos métodos de mensuração dos mesmos. Além desta maior estabilidade, medidas testiculares apresentam uma ótima correlação com outras medidas reprodutivas em machos e fêmeas (Eler *et al.*, 2004). Em somatório, a seleção para medidas testiculares pode auxiliar direta e/ou indiretamente na seleção de características de produção, devido à grande correlação genética existente entre medidas testiculares e características de produção (Awda *et al.*, 2013). Como apresentado anteriormente, o correto desenvolvimento do epitélio testicular durante as etapas pré-puberal e puberal é crucial para taxas de fertilidade satisfatórias, seja pelo controle de produção hormonal ou espermatogênese *per se*.

O maior grau de sobreposição entre os resultados obtidos para diferentes fenótipos dentro de uma mesma população, identificado no Capítulo 2 desta tese, levanta novas considerações sobre a diversidade genética associada às características reprodutivas. Estes resultados são reforçados pelo alto grau de sobreposição dos genes candidatos posicionais entre os diferentes fenótipos avaliados no capítulo desta tese. Estes resultados podem indicar um

grande efeito de variantes específicas (ou com diferentes frequências alélicas) em determinadas populações, ou até mesmo uma importante ação dos fatores ambientais compartilhados por uma certa população. A presença de uma possível estruturação genética da população abre precedentes para a identificação de variantes que afetam grupos específicos, sejam estes, populações, raças ou espécies.

Os resultados apresentados no Capítulo 1 contribuem justamente nesta direção. A amostra selecionada para o estudo foi constituída de animais aparentados provenientes de diferentes fazendas. Contudo, estas fazendas mantinham uma certa proximidade geográfica e fluxo gênico. Além disso, esses animais apresentavam uma frequência elevada de distúrbios reprodutivos. Os resultados obtidos pelo *weighted single step genomic best linear unbiased predictor* (WssGBLUP) GWAS (Wang *et al.*, 2012) indicaram uma elevada sobreposição entre as regiões associadas para os fenótipos avaliados. Como foi possível observar no Capítulo 2, as sobreposições genéticas (ou seja, o compartilhamento de genes identificados para diferentes fenótipos) entre os fenótipos avaliados no Capítulo 1 tendem a ser maiores que as demais sobreposições de fenótipos medidos em um mesmo estudo que estão presentes na literatura. Portanto, estes resultados indicam uma importância de se avaliar variantes segregando dentro de populações específicas. A utilização destas variantes pode gerar resultados muito mais rápidos em um processo de seleção, uma vez que as frequências alélicas e os padrões de LD serão pouco alterados quando analisados na população inteira em questão.

Analisando a mesma perspectiva, contudo em uma outra escala, temos os resultados apresentados no Capítulo 2. A integração de resultados em uma estratégia onde múltiplas raças foram comparadas, possibilitou a identificação de genes compartilhados de maneira raça- ou espécie-específica. As diferentes estratégias de seleção entre raças, resultam em diferentes padrões de LD e regiões com sinais de assinatura de seleção (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2015). Esta diferença torna-se ainda mais marcante quando zebuínos e taurinos são comparados (O'Brien *et al.*, 2014; Kasarapu *et al.*, 2017). Nos resultados obtidos nas análises realizadas no Capítulo 2, a maioria dos genes presentes na lista de top 100 genes priorizados foram compartilhados entre raças zebuínas. Adicionalmente, estes genes são enriquecidos para a presença de marcadores com uma maior probabilidade de origem zebuína. A maior presença de genes candidatos associados a características em raças zebuínas vai de encontro ao indicado por Kasarapu *et al.* (2017). Em uma análise de associação entre marcadores e a probabilidade de origem zebuína ou taurina para os mesmos, os autores identificaram que genes responsáveis por regular processos biológicos relacionados à reprodução são enriquecidos para a presença de marcadores com origem zebuína (Kasarapu *et al.* 2017). Interessantemente, não foram

encontrados genes compartilhados somente entre taurinos nesta lista. Além disso, somente três genes (*LICAM*, *MECP2* e *IRAK1*) foram compartilhados entre todos os grupos. Estes resultados reforçam a heterogeneidade genética da característica e a presença de estruturação populacional. Apesar deste nível de estruturação, ao longo das análises, foi possível identificar importantes genes candidatos funcionais e regiões genômicas com indícios de especialização para o controle de características reprodutivas. O mais notório exemplo são regiões no cromossoma X. O cromossoma X abriga a maioria dos genes presentes na lista de genes priorizados obtidos no Capítulo 2, onde duas regiões emergem contendo interessantes candidatos e com padrões de compartilhamento intra- e interespecíficos bem interessantes. A primeira região é correspondente às coordenadas onde estão mapeados os genes compartilhados entre todos os grupos comparados no Capítulo 2 (BTAX:39,9-40,2 Mb). Além dos genes descritos no Capítulo 2 (*LICAM*, *MECP2*, *IRAK1*), outros genes mapeados nessa região já foram associados diretamente com características reprodutivas ou apresentam alta expressão em tecidos como o testículo, como é o caso dos genes *TEX28* e *TKTL1*, respectivamente (Stouffs *et al.*, 2009; Litchfield *et al.*, 2015). A segunda região é responsável por abrigar o gene *TEX11*. Este gene é amplamente associado com características espermáticas em diversas espécies (Yang *et al.*, 2008; Yang, F. *et al.*, 2015; Yatsenko *et al.*, 2015). Além disso, a região onde este gene está mapeado já foi associada com características reprodutivas em bovinos em diversos estudos (Fortes, M. R. *et al.*, 2013; De Camargo *et al.*, 2015). Os cromossomos sexuais (X e Y) são enriquecidos para a presença de genes associados a processos reprodutivos, como a espermatogênese e o desenvolvimento testicular, por exemplo (Kawakura *et al.*, 1996; Stouffs *et al.*, 2009; Hu e Namekawa, 2015). Contudo, é importante ressaltar que as plataformas de genotipagem disponíveis comercialmente para bovinos não contêm (ou contêm poucos) marcadores Y-específicos. Portanto, podemos imaginar que exista um efeito semelhante para genes contidos no cromossoma Y. Porém, a ausência de marcadores nos chips de genotipagem impede que essas associações sejam identificadas em estudos de GWAS convencionais. Alternativamente, alterações no cromossomo Y tendem a se associar a infertilidade, portanto, tem menor potencial para se espalharem nos rebanhos. Por outro lado, um fenótipo consistentemente associado a alterações reprodutivas é o aumento de produção leiteira, o que afasta a hipótese de efeitos diretos do cromossomo Y. Efeitos transgeracionais ainda seriam possíveis. Regiões em cromossomas autossômicos também precisam ser destacadas, por exemplo, regiões nos cromossomas 14 e 17. Estas regiões podem ser alvos de estudos futuros visando à prospecção de variantes causais em genes candidatos funcionais para a aplicação das mesmas em processos de seleção artificial.

Outra característica importante destas regiões é a presença de genes associados a características de produção. O melhor exemplo disto é a região do cromossoma 14, onde existe a assinatura de seleção para o *DGATI* (Gutiérrez-Gil *et al.*, 2015). Esta região já foi associada com diversas características de produção, como quantidade de leite produzido, quantidade de proteína e/ou gordura no leite, e deposição de gordura na carne (Thaller *et al.*, 2003; Kühn *et al.*, 2004; Hayes *et al.*, 2009). Além disso, esta região também corresponde ao maior sinal de efeito pleiotrópico ao longo do genoma bovino (Bolormaa *et al.*, 2014). A existência de efeito pleiotrópico envolvendo características de produção e eficiência reprodutiva pode ser uma importante ferramenta para redução da frequência de efeitos negativos associados à seleção, como por exemplo, a redução da eficiência reprodutiva. A identificação de marcadores em genes, que desempenham funções cruciais na regulação de efeitos pleiotrópicos, pode auxiliar em uma melhor estimação de índices utilizados em estratégias de seleção, como a seleção por índices de múltiplas características (*multi-trait selection indices*). Nesta estratégia, a seleção no rebanho se dá por diferentes ênfases para determinadas características (Pravia *et al.*, 2014; Govignon-Gion *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2018). Por exemplo, o lifetime profit index, utilizado pela Canadian Dairy Network (CDN), é composto atualmente por 6 características com diferentes ênfases, entre elas, quantidade de proteína e gordura no leite, resistência à mastite e fertilidade (VanRaden, 2004).

O Capítulo 3 desta tese teve justamente como objetivo, a identificação de genes candidatos para o papel de reguladores principais de efeito pleiotrópico. Diferentemente dos outros capítulos, os resultados utilizados neste trabalho foram obtidos por meio de estudos que avaliaram o desenvolvimento da puberdade em fêmeas bovinas (Hawken *et al.*, 2012; Cánovas *et al.*, 2014; Nguyen *et al.*, 2017). Apesar desta diferença, existe uma semelhança significativa entre os processos de desenvolvimento da puberdade entre fêmeas e machos, principalmente no que diz respeito ao eixo hipófise-hipotalâmico-gonadal (Schams *et al.*, 1981). O desenvolvimento da puberdade em bovinos é correlacionado com diversas características de produção, como no caso da taxa de crescimento, peso seco à desmama e escore de marmoreio, em que uma correlação negativa é observada (Johnston *et al.*, 2009). Além disso, acompanhado do desenvolvimento da puberdade e das alterações do sistema reprodutivo, uma série de alterações secundárias no organismo são observadas (Dorn e Biro, 2011). Portanto, a análise dos genes associados com o desenvolvimento da puberdade pode ser uma estratégia muito útil para a identificação de genes com efeitos pleiotrópicos. Com intuito de atingir estes objetivos, uma estratégia de integração de resultados multi-ômicas e multi-raças foi utilizada. Além disso,

estes resultados foram analisados sob uma estratégia de biologia de sistemas. O principal resultado a ser salientado dessa estratégia foi a capacidade da biologia de sistemas de recuperar um conjunto de genes, dentre aqueles com o maior potencial funcional para efeito pleiotrópico, associados com o mesmo conjunto de processos biológicos. Neste caso, o processo biológico em questão é a regulação da atividade e/ou produção de hormônios tireoidianos. Dentre os 38 principais genes identificados ao final da análise, 31 tiveram alguma associação com funções da tireoide. As funções desempenhadas pelos hormônios tireoidianos estão envolvidas na regulação de diversos processos biológicos associados com características economicamente relevantes. Os hormônios tireoidianos estão envolvidos com o controle do metabolismo basal. Em bovinos, genes associados com a regulação da ação e/ou produção de hormônios tireoidianos já foram associados a eficiência alimentar, estágios da lactação, deposição e gordura, desenvolvimento embrionário e características reprodutivas em machos e fêmeas (Capuco *et al.*, 2001; Pezzi *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2009; Dittrich *et al.*, 2011; Meyerholz *et al.*, 2015; Ashkar *et al.*, 2016; Fernández *et al.*, 2017; Schering *et al.*, 2017). Devido a essa ampla associação com diversas características, genes que regulam a atividade de hormônios tireoidianos são ótimos candidatos para o controle do efeito pleiotrópico. Em síntese, é importante ressaltar que um dos principais genes relacionados com a produção de hormônios tireoidianos, a Tireoglobulina (*TG*), está mapeada no cromossoma 14. Mais especificamente, a *TG* é mapeada na mesma assinatura de seleção do gene *DGATI*, onde observa-se o maior sinal de efeito pleiotrópico no genoma bovino. Portanto, devido a intensa pressão de seleção nesta região, a existência de um efeito carona ou de seleção indireta de marcadores na *TG* poderia estar ocorrendo. Interessantemente, é importante relembrar que no Capítulo 2 o cromossoma 14 apresentou um papel de destaque quanto à presença de genes candidatos compartilhados entre diferentes fenótipos reprodutivos.

A identificação de genes candidatos é um passo crucial para a melhoria dos processos de seleção artificial. Contudo, ainda não se trata da última etapa. A investigação a fundo destas regiões deve ser realizada, de modo a identificar marcadores associados a alterações de função destes genes. Porém, uma vez que os principais candidatos sejam levantados, ocorrerá uma melhoria substancial na compreensão da arquitetura genética e dos processos biológicos envolvidos nas características em análise.

6- Conclusão

Características reprodutivas apresentam uma grande heterogeneidade etiológica, incluindo genética. Os resultados obtidos no presente trabalho contribuem para um melhor entendimento dos padrões desta heterogeneidade intra- e interespecificamente. Características testiculares tendem a ser fenótipos mais estáveis e com maior potencial de seleção em relação a características espermáticas. Em síntese, fenótipos testiculares apresentaram as maiores porcentagens de sobreposição de genes candidatos com outros fenótipos, inclusive espermáticos. Portanto, a utilização preferencial de fenótipos testiculares em programas de seleção pode auxiliar nos ganhos de eficiência reprodutiva. Este ponto é ainda mais importante para animais pertencentes à rebanhos leiteiros, onde a realização de medições testiculares é menos frequente. Os cromossomas X, 14 e 17 apresentaram as maiores quantidades de genes candidatos para fenótipos reprodutivos. Além disso, esses cromossomas, também possuem uma grande quantidade de genes relacionados com características de produção. Estes resultados auxiliam na compreensão das razões de queda de eficiência reprodutiva em rebanhos submetidos a intensas pressões de seleção. A identificação de genes candidatos para a regulação de efeitos pleiotrópicos relacionados com fenótipos reprodutivos e de produção, realizada no presente trabalho, é um importante passo para o melhor entendimento deste processo. A partir destes resultados, um importante efeito relacionado à regulação da tireoide foi identificado. Os resultados aqui obtidos, auxiliam no melhor entendimento da arquitetura genética e dos processos biológicos associados ao desenvolvimento de características reprodutivas. Em somatório, estes resultados trazem um novo conhecimento que pode auxiliar na identificação das causas biológicas associadas às correlações genéticas observadas entre diferentes características de produção e reprodução em bovinos. Sendo assim, de grande relevância para o melhoramento genético e setor agropecuário. Além disso, os genes candidatos aqui levantados podem ser utilizados para a prospecção de variantes causais para serem utilizadas em programas de seleção, visando ao aumento da eficiência reprodutiva em rebanhos bovinos.

7.Referências

ALVIM, M. et al. Sistema de produção de leite com recria de novilhas em sistemas silvipastoris. **EMBRAPA gado de leite**, v. 1, p. 1-10, 2005.

ANDREUSSI, P. A. T. et al. Testicular histomorphometric evaluation of zebu bull breeds. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 57, n. 6, p. 900-907, 2014. ISSN 1516-8913.

ARAVINDAKSHAN, J. et al. Pattern of gonadotropin secretion and ultrasonographic evaluation of developmental changes in the testis of early and late maturing bull calves. **Theriogenology**, v. 54, n. 3, p. 339-354, 2000. ISSN 0093-691X.

ARGOV-ARGAMAN, N. et al. Season-induced variation in lipid composition is associated with semen quality in Holstein bulls. **Reproduction**, v. 145, n. 5, p. 479-489, 2013. ISSN 1470-1626.

ARMSTRONG, D. Heat stress interaction with shade and cooling. **Journal of dairy science**, v. 77, n. 7, p. 2044-2050, 1994. ISSN 0022-0302.

ASHKAR, F. A. et al. Thyroid hormones alter the transcriptome of in vitro-produced bovine blastocysts. **Zygote**, v. 24, n. 2, p. 266-276, 2016. ISSN 0967-1994.

AWDA, B. et al. The relationship between feed efficiency traits and fertility in young beef bulls. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 93, n. 2, p. 185-192, 2013. ISSN 0008-3984.

BARBAT, A. et al. Female fertility in French dairy breeds: current situation and strategies for improvement. **Journal of Reproduction and Development**, v. 56, n. S, p. S15-S21, 2010. ISSN 0916-8818.

BELLOWS, D.; OTT, S.; BELLOWS, R. Cost of Reproductive Diseases and Conditions in Cattle1. **The Professional Animal Scientist**, v. 18, n. 1, p. 26-32, 2002. ISSN 1080-7446.

BERRY, D. et al. Milk production and fertility in cattle. **Annual review of animal biosciences**, v. 4, p. 269-290, 2016. ISSN 2165-8102.

BOLIGON, A. et al. Estimation of genetic parameters for body weights, scrotal circumference, and testicular volume measured at different ages in Nelore cattle 1. **Journal of animal science**, v. 88, n. 4, p. 1215-1219, 2010. ISSN 1525-3163.

BOLIGON, A. A.; ALBUQUERQUE, L. G. D.; RORATO, P. R. N. Genetic associations among weights and reproductive traits in Nelore cattle. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 37, n. 4, p. 596-601, 2008. ISSN 1516-3598.

BOLORMAA, S. et al. A multi-trait, meta-analysis for detecting pleiotropic polymorphisms for stature, fatness and reproduction in beef cattle. **PLoS genetics**, v. 10, n. 3, p. e1004198, 2014. ISSN 1553-7404.

BOUHROUM, N.; BENSALHI, B.; NIAR, A. Effect of season on artificial insemination in Holstein dairy cows. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 178-1881, 2014.

BRITO, L. F. et al. Sexual development in early-and late-maturing Bos indicus and Bos indicus× Bos taurus crossbred bulls in Brazil. **Theriogenology**, v. 62, n. 7, p. 1198-1217, 2004. ISSN 0093-691X.

BRYM, P.; KAMIŃSKI, S.; WÓJCIK, E. Nucleotide sequence polymorphism within exon 4 of the bovine prolactin gene and its associations with milk performance traits. **Journal of Applied Genetics**, v. 46, n. 2, p. 179-185, 2005. ISSN 1234-1983.

CÁNOVAS, A. et al. Multi-tissue omics analyses reveal molecular regulatory networks for puberty in composite beef cattle. **PloS one**, v. 9, n. 7, p. e102551, 2014. ISSN 1932-6203.

CAPUCO, A. et al. Effect of Somatotropin on Thyroid Hormones and Cytokines in Lactating Dairy Cows During Ad Libitum and Restricted Feed Intake1. **Journal of dairy science**, v. 84, n. 11, p. 2430-2439, 2001. ISSN 0022-0302.

CORBET, N. et al. Genetic variation in growth, hormonal and seminal traits of young tropically adapted bulls. Proceedings of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics, 2009. p.121-124.

CORRÊA, A. et al. Características do sêmen e maturidade sexual de touros jovens da raça Tabapuã (Bos taurus indicus) em diferentes manejos alimentares Semen characteristics and sexual maturity of young Tabapuã (Bos taurus indicus) bulls under different feeding management. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 5, p. 823-830, 2006. ISSN 0102-0935.

COULTER, G.; ROUNSAVILLE, T.; FOOTE, R. Heritability of Testicular Size and Consistency in Holstein Bulls 1. **Journal of animal science**, v. 43, n. 1, p. 9-12, 1976. ISSN 0021-8812.

CURTIS, S. K.; AMANN, R. Testicular Development and Establishment of Spermatogenesis in Holstein Bulls 1, 2. **Journal of Animal Science**, v. 53, n. 6, p. 1645-1657, 1981. ISSN 0021-8812.

DE CAMARGO, G. M. F. et al. Non-synonymous mutations mapped to chromosome X associated with andrological and growth traits in beef cattle. **BMC genomics**, v. 16, n. 1, p. 384, 2015. ISSN 1471-2164.

DEJARNETTE, J. et al. Sustaining the fertility of artificially inseminated dairy cattle: the role of the artificial insemination industry. **Journal of dairy Science**, v. 87, p. E93-E104, 2004. ISSN 0022-0302.

DITTRICH, R. et al. Thyroid hormone receptors and reproduction. **Journal of reproductive immunology**, v. 90, n. 1, p. 58-66, 2011. ISSN 0165-0378.

DO NASCIMENTO, E. F.; DE LIMA SANTOS, R. **Patologia Da Reprodução Dos Animais Domésticos**. Grupo Gen-Guanabara Koogan, 2000. ISBN 8527718227.

DORN, L. D.; BIRO, F. M. Puberty and its measurement: A decade in review. **Journal of research on adolescence**, v. 21, n. 1, p. 180-195, 2011. ISSN 1532-7795.

DRUET, T. et al. Estimation of genetic parameters and genome scan for 15 semen characteristics traits of Holstein bulls. **Journal of Animal Breeding and Genetics**, v. 126, n. 4, p. 269-277, 2009. ISSN 1439-0388.

DYBUS, A. Associations of growth hormone (GH) and prolactin (PRL) genes polymorphisms with milk production traits in Polish Black-and-White cattle. **Anim Sci Pap Rep**, v. 20, n. 20, p. 203-212, 2002.

ELER, J. P. et al. Additive genetic relationships between heifer pregnancy and scrotal circumference in Nelore cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 9, p. 2519-2527, 2004. ISSN 1525-3163.

EMBRAPA/SGI. Qualidade da carne. Disponível em: <https://www.embrapa.br/qualidade-da-carne>. Acessado em 24/05/2017.

EVANS, A. et al. Differences in early patterns of gonadotrophin secretion between early and late maturing bulls, and changes in semen characteristics at puberty. **Theriogenology**, v. 43, n. 3, p. 569-578, 1995. ISSN 0093-691X.

EVANS, A. et al. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. **Theriogenology**, v. 46, n. 2, p. 345-357, 1996. ISSN 0093-691X.

FAO, I. WFP (2015), The State of Food Insecurity in the World 2015. Meeting the 2015 international hunger targets: taking stock of uneven progress. **Food and Agriculture Organization Publications, Rome**, 2016.

FAWCETT, D. W.; NEAVES, W. B.; FLORES, M. N. Comparative observations on intertubular lymphatics and the organization of the interstitial tissue of the mammalian testis. **Biology of Reproduction**, v. 9, n. 5, p. 500-532, 1973. ISSN 0006-3363.

FERNANDES, S. B. et al. Efficiency of multi-trait, indirect, and trait-assisted genomic selection for improvement of biomass sorghum. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 131, n. 3, p. 747-755, 2018. ISSN 0040-5752.

FERNÁNDEZ, M. et al. Bovine thyroglobulin gene polymorphisms and their association with sexual precocity in Guzerat bulls. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 52, n. 5, p. 911-913, 2017. ISSN 1439-0531.

FIELDS, M.; BURNS, W.; WARNICK, A. Age, Season and Breed Effects on Testicular Volume and Semen Traits in Young Beef Bulls 1, 2. **Journal of Animal Science**, v. 48, n. 6, p. 1299-1304, 1979. ISSN 0021-8812.

FONTANESI, L. et al. A candidate gene association study for nine economically important traits in Italian Holstein cattle. **Animal genetics**, v. 45, n. 4, p. 576-580, 2014. ISSN 1365-2052.

FORTES, M. R. et al. Genomic regions associated with fertility traits in male and female cattle: advances from microsatellites to high-density chips and beyond. **Animal reproduction science**, v. 141, n. 1-2, p. 1-19, 2013. ISSN 0378-4320.

FREEDMAN, M. L. et al. Principles for the post-GWAS functional characterization of cancer risk loci. **Nature genetics**, v. 43, n. 6, p. 513, 2011. ISSN 1546-1718.

GARCÍA-RUIZ, A. et al. Changes in genetic selection differentials and generation intervals in US Holstein dairy cattle as a result of genomic selection. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 28, p. E3995-E4004, 2016. ISSN 0027-8424.

GARMYN, A. et al. Estimation of genetic parameters and effects of cytoplasmic line on scrotal circumference and semen quality traits in Angus bulls. **Journal of animal science**, v. 89, n. 3, p. 693-698, 2011. ISSN 1525-3163.

GAUR, G.; KAUSHIK, S.; GARG, R. The Gir cattle breed of India-characteristics and present status. **Animal Genetic Resources/Recursos génétiques animales/Recursos genéticos animales**, v. 33, p. 21-29, 2003. ISSN 2076-4022.

GIPSON, T. et al. Genetic and phenotypic parameter estimates for scrotal circumference and semen traits in young beef bulls. **Theriogenology**, v. 28, n. 5, p. 547-555, 1987. ISSN 0093-691X.

GNOTH, C. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Human reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1144-1147, 2005. ISSN 1460-2350.

GOVIGNON-GION, A. et al. Multiple trait genetic evaluation of clinical mastitis in three dairy cattle breeds. **animal**, v. 10, n. 4, p. 558-565, 2016. ISSN 1751-7311.

GREGORY, K. et al. Breed effects and heterosis in advanced generations of composite populations for puberty and scrotal traits of beef cattle. **Journal of animal science**, v. 69, n. 7, p. 2795-2807, 1991. ISSN 0021-8812.

GUTIÉRREZ-GIL, B.; ARRANZ, J. J.; WIENER, P. An interpretive review of selective sweep studies in *Bos taurus* cattle populations: identification of unique and shared selection signals across breeds. **Frontiers in genetics**, v. 6, p. 167, 2015. ISSN 1664-8021.

HAFIEZ, A.; LLOYD, C.; BARTKE, A. The role of prolactin in the regulation of testis function: the effects of prolactin and luteinizing hormone on the plasma levels of testosterone and androstenedione in hypophysectomized rats. **Journal of Endocrinology**, v. 52, n. 2, p. 327-331, 1972. ISSN 0022-0795.

HAMEED, A. et al. Effect of oxytocin on enzyme activities in bovine milk. **International Dairy Journal**, v. 39, n. 2, p. 229-231, 2014. ISSN 0958-6946.

HANOTTE, O. et al. Geographic distribution and frequency of a taurine *Bos taurus* and an indicine *Bos indicus* Y specific allele amongst sub-Saharan African cattle breeds. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 4, p. 387-396, 2000. ISSN 1365-294X.

- HASKELL, M. J.; SIMM, G.; TURNER, S. P. Genetic selection for temperament traits in dairy and beef cattle. **Frontiers in genetics**, v. 5, p. 368, 2014. ISSN 1664-8021.
- HAWKEN, R. et al. Genome-wide association studies of female reproduction in tropically adapted beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 90, n. 5, p. 1398-1410, 2012. ISSN 0021-8812.
- HAYES, B. J. et al. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of dairy science**, v. 92, n. 2, p. 433-443, 2009. ISSN 0022-0302.
- HU, Y.-C.; NAMEKAWA, S. H. Functional significance of the sex chromosomes during spermatogenesis. **Reproduction**, v. 149, n. 6, p. R265-R277, 2015. ISSN 1470-1626.
- HUDSON, C. et al. Fertility in UK dairy herds: preliminary findings of a large-scale study. **Cattle Practice**, v. 18, n. 2, p. 89-94, 2010. ISSN 0969-1251.
- INCHAISRI, C. et al. Economic consequences of reproductive performance in dairy cattle. **Theriogenology**, v. 74, n. 5, p. 835-846, 2010. ISSN 0093-691X.
- JOHNSTON, D. et al. Genetics of heifer puberty in two tropical beef genotypes in northern Australia and associations with heifer-and steer-production traits. **Animal Production Science**, v. 49, n. 6, p. 399-412, 2009. ISSN 1836-5787.
- KADARMIDEEN, H. N.; VON ROHR, P.; JANSS, L. L. From genetical genomics to systems genetics: potential applications in quantitative genomics and animal breeding. **Mammalian Genome**, v. 17, n. 6, p. 548-564, 2006. ISSN 0938-8990.
- KADRI, N. K. et al. A 660-Kb deletion with antagonistic effects on fertility and milk production segregates at high frequency in Nordic Red cattle: additional evidence for the common occurrence of balancing selection in livestock. **PLoS genetics**, v. 10, n. 1, p. e1004049, 2014. ISSN 1553-7404.
- KASARAPU, P. et al. The *Bos taurus*–*Bos indicus* balance in fertility and milk related genes. **PLoS one**, v. 12, n. 8, p. e0181930, 2017. ISSN 1932-6203.
- KASTELIC, J.; THUNDATHIL, J. Breeding soundness evaluation and semen analysis for predicting bull fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 43, n. s2, p. 368-373, 2008. ISSN 1439-0531.
- KAWAKURA, K. et al. Deletion of the SRY region on the Y chromosome detected in bovine gonadal hypoplasia (XY female) by PCR. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 72, n. 2-3, p. 183-184, 1996. ISSN 1424-8581.
- KEETON, L. et al. Estimation of variance components and prediction of breeding values for scrotal circumference and weaning weight in Limousin cattle. **Journal of animal science**, v. 74, n. 1, p. 31-36, 1996. ISSN 0021-8812.
- KISHORE, A. et al. Peripheral blood mononuclear cells: a potential cellular system to understand differential heat shock response across native cattle (*Bos indicus*), exotic cattle (*Bos*

taurus), and riverine buffaloes (*Bubalus bubalis*) of India. **Cell Stress and Chaperones**, v. 19, n. 5, p. 613-621, 2014. ISSN 1355-8145.

KITANO, H. Computational systems biology. **Nature**, v. 420, n. 6912, p. 206, 2002a. ISSN 1476-4687.

KITANO, H. Systems biology: a brief overview. **Science**, v. 295, n. 5560, p. 1662-1664, 2002b. ISSN 0036-8075.

KNIGHTS, S. A. et al. Estimates of Heritabilities and of Genetic and Phenotypic Correlations among Growth and Reproductive Traits in Yearling Angus Bulls 1. **Journal of animal science**, v. 58, n. 4, p. 887-893, 1984. ISSN 0021-8812.

KÜHN, C. et al. Evidence for multiple alleles at the DGAT1 locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. **Genetics**, v. 167, n. 4, p. 1873-1881, 2004. ISSN 0016-6731.

LAMB, G. et al. Invited Review: Advantages of current and future reproductive technologies for beef cattle production1, 2. **The Professional Animal Scientist**, v. 32, n. 2, p. 162-171, 2016. ISSN 1080-7446.

LATIMER, F. et al. Scrotal measurements in beef bulls: Heritability estimates, breed and test station effects. **Journal of animal science**, v. 54, n. 3, p. 473-479, 1982. ISSN 0021-8812.

LEROY, J. et al. Dietary fat supplementation and the consequences for oocyte and embryo quality: hype or significant benefit for dairy cow reproduction? **Reproduction in domestic animals**, v. 49, n. 3, p. 353-361, 2014. ISSN 1439-0531.

LITCHFIELD, K. et al. Whole-exome sequencing reveals the mutational spectrum of testicular germ cell tumours. **Nature communications**, v. 6, p. 5973, 2015. ISSN 2041-1723.

LUCY, M. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: where will it end? **Journal of dairy science**, v. 84, n. 6, p. 1277-1293, 2001. ISSN 0022-0302.

LUNSTRA, D.; GREGORY, K.; CUNDIFF, L. Heritability estimates and adjustment factors for the effects of bull age and age of dam on yearling testicular size in breeds of bulls. **Theriogenology**, v. 30, n. 1, p. 127-136, 1988. ISSN 0093-691X.

MARAI, I. et al. Reproductive performance traits as affected by heat stress and its alleviation in sheep. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 8, n. 3, 2008.

MCNAMARA, J. P.; SHIELDS, S. L. Reproduction during lactation of dairy cattle: integrating nutritional aspects of reproductive control in a systems research approach. **Animal Frontiers**, v. 3, n. 4, p. 76-83, 2013. ISSN 2160-6056.

MENEGASSI, S. R. O. et al. Scrotal infrared digital thermography as a predictor of seasonal effects on sperm traits in Braford bulls. **International journal of biometeorology**, v. 59, n. 3, p. 357-364, 2015. ISSN 0020-7128.

- MEYER, K. et al. Estimates of covariances between reproduction and growth in Australian beef cattle. **Journal of Animal Science**, v. 69, n. 9, p. 3533-3543, 1991. ISSN 0021-8812.
- MEYERHOLZ, M. M. et al. Peripheral thyroid hormone levels and hepatic thyroid hormone deiodinase gene expression in dairy heifers on the day of ovulation and during the early peri-implantation period. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v. 58, n. 1, p. 52, 2015. ISSN 1751-0147.
- MOURA, G. S. Estudo clínico-andrológico e genético-molecular da subfertilidade em touros da raça Gir Leiteiro (*Bos taurus indicus*) no Estado de Minas Gerais. Tese de Doutorado. Defendida em Abril de 2013.
- MU, Y. et al. Genetic correlations between female fertility and postweaning growth and feed efficiency traits in multibreed beef cattle. **Canadian Journal of Animal Science**, v. 96, n. 3, p. 448-455, 2016. ISSN 0008-3984.
- NGUYEN, L. et al. Global differential gene expression in the pituitary gland and the ovaries of pre-and postpubertal Brahman heifers. **Journal of animal science**, v. 95, n. 2, p. 599-615, 2017. ISSN 0021-8812.
- NICHI, M. et al. Seasonal variation in semen quality in *Bos indicus* and *Bos taurus* bulls raised under tropical conditions. **Theriogenology**, v. 66, n. 4, p. 822-828, 2006. ISSN 0093-691X.
- NOGUEIRA, G. Puberty in south american *bos indicus* (Zebu) cattle. **Animal reproduction science**, v. 82, p. 361-372, 2004. ISSN 0378-4320.
- O'BRIEN, A. M. P. et al. Linkage disequilibrium levels in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle using medium and high density SNP chip data and different minor allele frequency distributions. **Livestock Science**, v. 166, p. 121-132, 2014. ISSN 1871-1413.
- PEZZI, C. et al. 5'-Deiodinase activity and circulating thyronines in lactating cows. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 1, p. 152-158, 2003. ISSN 0022-0302.
- PRAVIA, M.; RAVAGNOLO, O.; URIOSTE, J. Development of selection indexes for a beef cattle production system from available EPDs. **Proc. 10th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod., Vancouver, Canada.** <https://asas.confex.com/asas/WCGALP14/webprogram/Paper9770.html>, 2014.
- RASTRELLI, G.; CORONA, G.; MAGGI, M. The role of prolactin in andrology: what is new? **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 16, n. 3, p. 233-248, 2015. ISSN 1389-9155.
- RAUW, W. et al. Undesirable side effects of selection for high production efficiency in farm animals: a review. **Livestock production science**, v. 56, n. 1, p. 15-33, 1998. ISSN 0301-6226.
- RAYCHAUDHURI, S. et al. Identifying relationships among genomic disease regions: predicting genes at pathogenic SNP associations and rare deletions. **PLoS genetics**, v. 5, n. 6, p. e1000534, 2009. ISSN 1553-7404.

- SAATCHI, M. et al. Large-effect pleiotropic or closely linked QTL segregate within and across ten US cattle breeds. **BMC genomics**, v. 15, n. 1, p. 442, 2014. ISSN 1471-2164.
- SANGSRITAVONG, S. et al. High feed intake increases liver blood flow and metabolism of progesterone and estradiol-17 β in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**, v. 85, n. 11, p. 2831-2842, 2002. ISSN 0022-0302.
- SARTORI, R.; ROSA, G.; WILTBANK, M. Ovarian structures and circulating steroids in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. **Journal of dairy science**, v. 85, n. 11, p. 2813-2822, 2002. ISSN 0022-0302.
- SCHAMS, D. et al. Endocrine patterns associated with puberty in male and female cattle. **Journal of reproduction and fertility. Supplement**, v. 30, p. 103-110, 1981. ISSN 0449-3087.
- SCHANBACHER, B. Relationship of in vitro gonadotropin binding to bovine testes and the onset of spermatogenesis. **Journal of animal science**, v. 48, n. 3, p. 591-597, 1979. ISSN 0021-8812.
- SCHERING, L. et al. Increased expression of thyroid hormone responsive protein (THRSP) is the result but not the cause of higher intramuscular fat content in cattle. **International journal of biological sciences**, v. 13, n. 5, p. 532, 2017.
- SETCHELL, B.; VOGLMAYR, J.; HINKS, N. The effect of local heating on the flow and composition of rete testis fluid in the conscious ram. **Journal of reproduction and fertility**, v. 24, n. 1, p. 81-89, 1971. ISSN 1470-1626.
- SHALLOO, L.; CROMIE, A.; MCHUGH, N. Effect of fertility on the economics of pasture-based dairy systems. **Animal**, v. 8, n. s1, p. 222-231, 2014. ISSN 1751-7311.
- SMITH, B.; BRINKS, J.; RICHARDSON, G. Estimation of Genetic Parameters among Breeding Soundness Examination Components and Growth Traits in Yearling Bulls 1. **Journal of animal science**, v. 67, n. 11, p. 2892-2896, 1989. ISSN 0021-8812.
- STOUFFS, K. et al. Male infertility and the involvement of the X chromosome. **Human reproduction update**, v. 15, n. 6, p. 623-637, 2009. ISSN 1460-2369.
- STUMPF, T. et al. Season of the year influences concentration and pattern of gonadotropins and testosterone in circulation of the bovine male. **Biology of reproduction**, v. 49, n. 5, p. 1089-1095, 1993. ISSN 0006-3363.
- SURAVAJHALA, P.; KOGELMAN, L. J.; KADARMIDEEN, H. N. Multi-omic data integration and analysis using systems genomics approaches: methods and applications in animal production, health and welfare. **Genetics Selection Evolution**, v. 48, n. 1, p. 38, 2016. ISSN 1297-9686.
- TAIT, R. et al. Estimates of epistatic and pleiotropic effects of () and () genetic markers on beef heifer performance traits enhanced by selection. **Journal of animal science**, v. 94, n. 3, p. 920-926, 2016. ISSN 0021-8812.

- THALLER, G. et al. DGAT1, a new positional and functional candidate gene for intramuscular fat deposition in cattle. **Animal genetics**, v. 34, n. 5, p. 354-357, 2003. ISSN 1365-2052.
- THUNDATHIL, J. C.; DANCE, A. L.; KASTELIC, J. P. Fertility management of bulls to improve beef cattle productivity. **Theriogenology**, v. 86, n. 1, p. 397-405, 2016. ISSN 0093-691X.
- TOELLE, V.; ROBISON, O. Estimates of Genetic Correlations between Testicular Measurements and Female Reproductive Traits in Cattle 1. **Journal of animal science**, v. 60, n. 1, p. 89-100, 1985. ISSN 0021-8812.
- TSURUTA, S. et al. Genomic analysis of cow mortality and milk production using a threshold-linear model. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 9, p. 7295-7305, 2017. ISSN 0022-0302.
- TUCKER, H. A. Seasonality in cattle. **Theriogenology**, v. 17, n. 1, p. 53-59, 1982. ISSN 0093-691X.
- TWIG, G. et al. Pathogenesis of infertility and recurrent pregnancy loss in thyroid autoimmunity. **Journal of autoimmunity**, v. 38, n. 2-3, p. J275-J281, 2012. ISSN 0896-8411.
- VALE FILHO, V.; ANDRADE, V.; AZEVEDO, N. Avaliação andrológica e seleção de tourinhos zebu para reprodução. **SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE**, v. 7, p. 363-400, 2010.
- VAN MELIS, M. et al. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy, and stayability in Nellore cattle. **Journal of animal science**, v. 88, n. 12, p. 3809-3813, 2010. ISSN 1525-3163.
- VANRADEN, P. Invited review: Selection on net merit to improve lifetime profit. **Journal of dairy science**, v. 87, n. 10, p. 3125-3131, 2004. ISSN 0022-0302.
- VARGAS, C. et al. Estimation of genetic parameters for scrotal circumference, age at puberty in heifers, and hip height in Brahman cattle. **Journal of animal science**, v. 76, n. 10, p. 2536-2541, 1998. ISSN 0021-8812.
- VIITALA, S. et al. The role of the bovine growth hormone receptor and prolactin receptor genes in milk, fat and protein production in Finnish Ayrshire dairy cattle. **Genetics**, v. 173, n. 4, p. 2151-2164, 2006. ISSN 0016-6731.
- WAITES, G.; SETCHELL, B. Physiology of the mammalian testis. **Marshall's physiology of reproduction**, v. 2, p. 1-105, 1990.
- WALSH, S.; WILLIAMS, E.; EVANS, A. A review of the causes of poor fertility in high milk producing dairy cows. **Animal reproduction science**, v. 123, n. 3-4, p. 127-138, 2011. ISSN 0378-4320.
- WANG, H. et al. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. **Genetics Research**, v. 94, n. 2, p. 73-83, 2012. ISSN 1469-5073.

- WANG, Y. H. et al. Gene expression patterns during intramuscular fat development in cattle. **Journal of Animal Science**, v. 87, n. 1, p. 119-130, 2009. ISSN 0021-8812.
- WEBER, K. L. et al. Identification of gene networks for residual feed intake in Angus cattle using genomic prediction and RNA-seq. **PLoS One**, v. 11, n. 3, p. e0152274, 2016. ISSN 1932-6203.
- WELLER, J.; EZRA, E.; RON, M. Invited review: A perspective on the future of genomic selection in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 100, n. 11, p. 8633-8644, 2017. ISSN 0022-0302.
- WEST, J. Effects of heat-stress on production in dairy cattle. **Journal of dairy science**, v. 86, n. 6, p. 2131-2144, 2003. ISSN 0022-0302.
- WROBEL, K. H. The postnatal development of the bovine Leydig cell population. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 25, n. 2, p. 51-60, 1990. ISSN 1439-0531.
- YANG, F. et al. Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor. **Genes & development**, v. 22, n. 5, p. 682-691, 2008. ISSN 0890-9369.
- YANG, F. et al. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. **EMBO molecular medicine**, v. 7, n. 9, p. 1198-1210, 2015. ISSN 1757-4676.
- YATSENKO, A. N. et al. X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 22, p. 2097-2107, 2015. ISSN 0028-4793.
- YOKOO, M. et al. Genetic associations between carcass traits measured by real-time ultrasound and scrotal circumference and growth traits in Nelore cattle 1. **Journal of Animal Science**, v. 88, n. 1, p. 52-58, 2010. ISSN 1525-3163.

8. Produção científica

Artigos completos publicados (Anexos):

- 4 artigos completos
- **Fonseca P.A.S.**, Leal T.P., Santos F.C., Gouveia M.H., Id-Lahoucine S., Rosse I.C., Ventura R.V., Bruneli F.A.T., Machado M.A., Tarazona-Santos E., Carvalho M.R.S. (2017). Reducing cryptic relatedness in genomic datasets via a central node exclusion algorithm. *Molecular ecology resources*, 18(3), 435-447.
- **Fonseca P.A.S.**, dos Santos F.C., Rosse I.C., Ventura R.V., Brunelli F.A.T., Penna V. M., Verneque R.S., Machado M.A., Silva M.V.G.B., Carvalho M.R.S, Peixoto M.G.C.D. (2016). Retelling the recent evolution of genetic diversity for Guzerá: Inferences from LD decay, runs of homozygosity and Ne over the generations. *Livestock Science*, 193, 110-117.
- dos Santos F.C., Peixoto M.G.C.D., **Fonseca P.A.S.**, Pires M.D.F.Á., Ventura R.V., Rosse I.C., Bruneli F.A.T, Machado M.A., Carvalho, M. R. S. (2017). Identification of candidate genes for reactivity in Guzerat (*Bos indicus*) cattle: a Genome-wide Association Study. *PloS One*, 12(1), e0169163.
- Borsatto T., Sperb-Ludwig F., Lima S.E., Carvalho M.R.S., **Fonseca P.A.S.**, Camelo Jr J.S., Boy R., Schwartz I.V.D. (2017). Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. *PloS One*, 12(5), e0177503.

Artigos em processo de submissão

Submetidos ou a submeter (Anexos):

- Martins A.A.S, Paiva G.M, Matosinho C.G.R, Coser E.M, **Fonseca P.A.S**, Haase V.G, Carvalho M.R.S. Working memory and arithmetic impairments without approximate number sense impairment, in FMR1 premutation and gray zone pupils with normal intelligence. *Journal of Medical Genetics Part A*.
- Ventura R., Brito L.F., Oliveira-Junior G., Daetwyler H., Schenkel F., Sargolzaei M., Vandervoort G., Silva F., Miller S., Carvalho M., Santana M., Mattos E., **Fonseca P.A.S.**, Eler J., Ferraz J.B. A comprehensive comparison of HD SNP panels and an alternative ultra-HD panel for genomic analyses in Nellore cattle. Submitted to *Animal Production Science*.
- Peixoto M.G.C.D., Cardoso D.F., de Camargo G.F., Rosse I.C., Fonseca P.A.S., Bruneli F.A.T., dos Santos F.C., Lopes F.C.F, Carvalho M.R.S., Tonhati H., Filho A.E.V., Gama A.S. Variation in milk fatty acid unsaturation indices associated with stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) gene polymorphism in Guzerá and Gir cow. Submitted to *Animal breeding and Genetics*.

Manuscriptos em preparação:

- S. Id-Lahoucine, A. Cánovas, C. Jaton, **P.A.S. Fonseca**, F. Miglior, S. Miller, M. Sargolzaei, J. P. Chesnais, F. S. Schenkel, J. F. Medrano and J. Casellas. Bayesian analysis of transmission ratio distortion. *Journal of Animal Science*.
- A. Canovas, M. Thomas, **P.A.S. Fonseca**, S. Id-Lahoucine, J. Casellas, and J. F. Medrano. From one to all biological components the new approach of System Biology. *Canadian Journal of animal Science*.
- A. Livernois, **P.A.S. Fonseca**, L. F. Brito, B. Mallard, A. Cánovas. Multi-strategy genome-wide association studies to identify genomic regions and functional SNP affecting residual feed intake, meat tenderness, and fertility and their pleiotropic effect in beef cattle.
- Asselstine V., Miglior F., **Fonseca P.A.S.**, Islas-Trejo A., Medrano J.F., Cánovas A. Genetic mechanism associated with host defense to mastitis. *Journal of Dairy Science*.
- Salazar G.C., Chami A.M., **Fonseca P.A.S.** dos Santos, F.C., Matosinhos C.G.R., Ferreira S.B., Rosse I.C., Haase V.G., Aguiar M.J.B., Carvalho M.R.S. Identification of a cluster of apoptosis genes on 2q31.1-q35: Do genes in this cluster, and not SATB2, explain ectodermal dysplasia in 2q33.1 deletion syndrome? To submit to *Journal of Medical Genetics*
- Chami A.M., Salazar G.C., dos Santos, F.C., Ferreira S.B., Coser E., Rosse I.C., **Fonseca P.A.S.**, Haase V.G., Carvalho M.R.S., Aguiar M.J.B. 2q33.1 deletion syndrome in a girl presenting developmental brain abnormalities: clinical report and literature review. To submit to *Genetics and Molecular Research*.
- Leal T.P., **Fonseca P.A.S.**, Scliar M.O., Araujo G.S., Rodrigues M.R., Lima-Costa M.F., Tarazona-Santos, E.M., Gouveia M.H. NAToRA: Network Algorithm To Relatedness Analysis. *Bioinformatics*.

Resumos expandidos publicados

- 3 resumos expandidos publicados no World Congress on Genetics Applied to Livestock Production
- **Fonseca P.A.S.**, Id-Lahoucine S., Reverter A., Medrano J. F., Fortes M., Casellas J., Miglior F., Brito L. F., Carvalho M. R. S., Schenkel F. S., Nguyen L. T., Porto-Neto L. R., Thomas M. G., Canovas A. Identification of pleiotropic key-regulatory genes related to economically relevant traits in beef cattle through systems biology approach. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018, Auckland, New Zeland. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018.
- Id-Lahoucine S., Casellas, J., **Fonseca P.A.S.**, Miglior, F., Sargolzaei, M., Brito, L.F., Miller, S., Chesnais J., Lohouis M., Schenkel F.S., Medrano J.F., Cánovas, A. Genome scan for regions with transmission ratio distortion in cattle. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018, Auckland, New Zeland. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018.

- Lam S., Miglior F., **Fonseca P.A.S.**, Seymour D., Asseltine V., Brito L.F., Schenkel F. S., Canovas A. Identification of variants associated with divergent feed efficiency groups using multiple RNA-sequencing datasets from dairy and beef cattle. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018, Auckland, New Zeland. World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018.

Produção técnica

- Peixoto M.G.C.D., Verneque, R.S., Panetto J.C.C., Santos G.G.; Brunelli F.A.T., Penna V.M., Machado C.H.C., Machado M.A., Lôbo R.B, Carvalho M.R.S., Cunha A.P., Geraldo C.C., Lima G.F.D.C., Silva L.A., **Fonseca P.A.S.**, Faria P.L., Araújo-Lemos P.F.B. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para leite: resultados do Teste de Progênie, do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos da ABCZ e do Núcleo MOET. 2011.
- Santos F.C., Rosse I.C., Peixoto M.G.C.D., Carvalho M.R.S., Brunelli F.A.T., Santos G.G., **Fonseca P.A.S.** Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para Leite - Documentos 168. 2014.
- **Fonseca P.A.S.**, Matosinhos C.G.R., Rosse I.C., Pires M.F.A., Gama M.A.S., Lopes F.C.F., Machado M.A, Silva M.V.G.B., Peixoto M.G.C.D., Carvalho M.R.S. Programa Nacional de Melhoramento do Guzerá para leite: resultados do Teste de Progênie, do Programa de Melhoramento Genético de Zebuínos da ABCZ e do Núcleo MOET - Resultados de Projetos de Pesquisa. 2018.

Resumos publicados em anais de eventos

- 43 resumos publicados em anais de eventos

Cursos/disciplinas ministrados

- Introdução ao R: Manipulação de dados e aplicações (FUNDEP/UFMG – Novembro 2017, 15 horas)
- Introdução ao R: Manipulação de dados e aplicações (Programa de Pós Graduação em Genética UFMG - Junho 2018, 30 horas)
- Análises funcionais de dados genômicos (Universidade Federal de Viçosa – Março 2018)

Orientações de trabalhos de conclusão de curso (TCCs)

- Ana Emília de Paiva. Identificação de variantes causais em genes associados com distúrbios reprodutivos em bovinos da raça Gir-Leiteiro. Início: 2016. Iniciação científica (Graduando em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais (Orientador).

- Luíza de Almeida Ferreira Diniz. Predição, in silico, do efeito de SNPs sobre sítios de reconhecimento de fatores de transcrição em regiões regulatórias de genes candidatos para distúrbios reprodutivos em bovinos. Início: 2016. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Abi - Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais (Orientador).

Atividades extra-curriculares

- Tutor de ensino à distância na Diretoria de Inovação e Metodologias de Ensino - GIZ/PROGRAD-UFMG (2015-2017)
- Representante discente no Programa de Pós-Graduação em Genética da UFMG (2015-2017)

Organização de eventos

- II Congresso de Inovação e Metodologias de Ensino. 2016. (Congresso).
- Encontro ICB/UFMG 2016 - Integração entre Pós-graduação e Educação Básica: o ensino de Biologia em evidência. 2016.
- Encontro de Ciências, Ensino e Cultura do ICB/UFMG: conversas e controvérsias que iluminam a ciência. 2015.
- V Encontro de Genética de Minas Gerais. 2014.

Prêmios e menções honrosas

- Indicação ao III Prêmio cientistas e empreendedores do ano Instituto NanoCell, Genética Humana: Além do DNA. - 2017
- Menção honrosa por participação no Prêmio Sílvio de Almeida Toledo Filho do 62º Congresso Nacional de Genética, Sociedade Brasileira de Genética, Sociedade Brasileira de Genética - 2016
- Prêmio Sílvio de Almeida Toledo Filho - Melhor trabalho da área de Genética Evolução e Melhoramento Animal do 61º Congresso brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética. - 2015
- Menção honrosa pela participação no prêmio Paulo Sodero Martins no 61º Congresso brasileiro de Genética, Sociedade Brasileira de Genética. -2015
- Prêmio Romeu Cardoso Guimarães, Universidade Federal de Minas Gerais. - 2014
- Melhor Pôster da área Melhoramento Genético - Two new candidate regions for bovine behavior identified through a genome-wide association study in the Guzera breed in Brazil, V Encontro de Genética de M, SBG-MG / UFMG. – 2014

9. Anexos

Artigos publicados


Received: 20 April 2017 | Revised: 4 December 2017 | Accepted: 14 December 2017

DOI: 10.1111/1755-0998.12746

RESOURCE ARTICLE

WILEY MOLECULAR ECOLOGY
RESOURCES

Reducing cryptic relatedness in genomic data sets via a central node exclusion algorithm

Pablo A. S. Fonseca¹ | Thiago P. Leal¹ | Fernanda C. Santos¹ | Mateus H. Gouveia¹ | Samir Id-Lahoucine² | Izinara C. Rosse¹ | Ricardo V. Ventura^{2,3} | Frank A. T. Bruneli⁴ | Marco A. Machado⁴ | Maria Gabriela C. D. Peixoto⁴ | Eduardo Tarazona-Santos¹ | Maria Raquel S. Carvalho¹ 

¹Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

²Center for Genetic Improvement of Livestock, University of Guelph, Guelph, ON, Canada

³Beef Improvement Opportunities, Guelph, ON, Canada

⁴Embrapa Dairy Cattle, Juiz de Fora, MG, Brazil

Correspondence

Maria Raquel S. Carvalho, Departamento de Biologia Geral, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.
Email: mraquel@icb.ufmg.br

Funding information

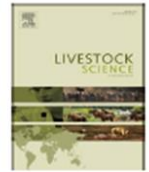
This study was supported by funding from Fundação de Amparo a Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). MG was supported by FAPEMIG-CVZ APQ 01353 and CVZ APQ 3182-5.04/07. MR has a fellowship from CNPq—312068/2015-8 and was supported by CNPq—505338/2008-A and 481018/2008-5 projects. MG, RV and MA have fellowships from FAPEMIG. PA, FC and IC have CAPES fellowships.

Abstract

Cryptic relatedness is a confounding factor in genetic diversity and genetic association studies. Development of strategies to reduce cryptic relatedness in a sample is a crucial step for downstream genetic analyses. This study uses a node selection algorithm, based on network degrees of centrality, to evaluate its applicability and impact on evaluation of genetic diversity and population stratification. 1,036 Guzerá (*Bos indicus*) females were genotyped using Illumina Bovine SNP50 v2 BeadChip. Four strategies were compared. The first and second strategies consist on a iterative exclusion of most related individuals based on PLINK kinship coefficient (ϕ_{ij}) and VanRaden's ϕ_{ij} , respectively. The third and fourth strategies were based on a node selection algorithm. The fourth strategy, *Network G matrix*, preserved the larger number of individuals with a better diversity and representation from the initial sample. Determining the most probable number of populations was directly affected by the kinship metric. *Network G matrix* was the better strategy for reducing relatedness due to producing a larger sample, with more distant individuals, a more similar distribution when compared with the full data set in the MDS plots and keeping a better representation of the population structure. Resampling strategies using VanRaden's ϕ_{ij} as a relationship metric was better to infer the relationships among individuals. Moreover, the resampling strategies directly impact the genomic inflation values in genomewide association studies. The use of the node selection algorithm also implies better selection of the most central individuals to be removed, providing a more representative sample.

KEYWORDS

bovine, cryptic relatedness, genetic diversity, inbreeding, population genetic structure



Retelling the recent evolution of genetic diversity for Guzerá: Inferences from LD decay, runs of homozygosity and Ne over the generations



Pablo Augusto de Souza Fonseca^a, Fernanda Caroline dos Santos^a, Izinara Cruz Rosse^a, Ricardo Vieira Ventura^{b,c}, Frank Ângelo Tomita Brunelli^d, Vânia Maldini Penna^e, Rui da Silva Verneque^d, Marco Antônio Machado^d, Marcos Vinícius Gualberto Barbosa da Silva^d, Maria Raquel Santos Carvalho^{a,*}, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto^d

^a Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^b Center for Genetic Improvement of Livestock, University of Guelph, Guelph, ON, Canada N1G 2W1

^c Beef Improvement Opportunities, Guelph, ON, Canada N1K 1E5

^d Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora 36038-330, Brazil

^e Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Genetic diversity
Genome-wide genotyping
Genetic structure
Bovine
Guzerá

ABSTRACT

Genetic diversity is the one of the most important issues in conservation studies of livestock breeds or endangered species. In the present study, we tested the feasibility of describing the recent evolution in genetic diversity through genome-wide SNP genotyping and estimates of linkage disequilibrium decay patterns, effective population size, inbreeding coefficient based on runs of homozygosity and population structure. We choose the bovine indicine breed Guzerá because it has suffered recent bottlenecks which have been registered historically. A sample of 1036 females was genotyped using Illumina BovineSNP50. A resampling strategy was applied to correct for sampling biases caused by the population structure in herds, and by the extensive use of some sires for artificial reproduction. A subsample of 210 animals and 32,806 markers with MAF > 0.01 was used. Very low linkage disequilibrium was detected for distances greater than 120 Kb between two markers. Furthermore, three points of decrease in effective population size between generations were detected, which coincide with the historically registered bottlenecks. The inbreeding coefficient, based on runs of homozygosity, confirmed a strong contribution of the last 20–30 generations to current inbreeding. In the population structure analysis, the most probable number of sub-populations is 2, reflecting selection purpose (beef or dual-purpose). Taken together, these results allow a retelling of the recent evolution of this breed. The strategy described here will be useful for other breeds or even species for which a careful historical registry is not available for conservation proposals.

1. Introduction

Studies aiming at the conservation of genetic diversity provide the best approaches to selection strategies for the long time survival of a breed or population under artificial selection. Monitoring of genetic diversity is fundamental in any artificial selection process for any population. Over time, some breeds have been moved to different parts of the world, some have disappeared, and some new breeds have been established.

Many studies have established tools for analyzing the evolution of

genetic diversity over long periods of time. However, the efficiency of such tools for describing the recent evolution of genetic diversity is a topic that appears less frequently in literature. In Brazil, the establishment of new breeds derived from the Zebu took place mostly since 1860 and these newly established breeds experienced many fluctuations in population size. These fluctuations offered interesting models for evaluating the efficiency of these tools to describe the recent evolution in genetic diversity.

In studies based on microsatellites, a genomic scale estimate of genetic diversity is not possible due to the low number of individuals

* Corresponding author.

E-mail addresses: pasf2009@ufmg.br (P.A. de Souza Fonseca), fernandacs1990@ufmg.br (F.C. dos Santos), izinara.rosse@gmail.com (I.C. Rosse), rventura@uoguelph.ca (R.V. Ventura), frank.brunelli@embrapa.br (F.Â.T. Brunelli), cbmg@cbmgguera.com.br (V.M. Penna), rui.verneque@embrapa.br (R. da Silva Verneque), marco.machado@embrapa.br (M.A. Machado), marcos.vb.silva@embrapa.br (M.V.G.B. da Silva), mraquel@icb.ufmg.br (M.R.S. Carvalho), gabriela.peixoto@embrapa.br (M.G.C.D. Peixoto).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.10.006>

Received 6 April 2016; Received in revised form 28 June 2016; Accepted 12 October 2016
1871-1413/© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

RESEARCH ARTICLE

Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients

Taciane Borsatto^{1,2*}, Fernanda Sperb-Ludwig^{1,2}, Samyra E. Lima^{2,3}, Maria R. S. Carvalho⁴, Pablo A. S. Fonseca⁴, José S. Camelo, Jr.⁵, Erlane M. Ribeiro⁶, Paula F. V. de Medeiros⁷, Charles M. Lourenço⁵, Carolina F. M. de Souza⁸, Raquel Boy⁹, Têmis M. Félix⁸, Camila M. Bittar^{1,8}, Louise L. C. Pinto¹⁰, Eurico C. Neto¹¹, Henk J. Blom¹², Ida V. D. Schwartz^{1,2,8}

1 Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, Brazil, **2** BRAIN Laboratory, Center for Experimental Research (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, RS, Brazil, **3** Centro Universitário Ritter dos Reis, Porto Alegre, RS, Brazil, **4** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil, **5** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, **6** Hospital Infantil Albert Sabin, Fortaleza, CE, Brazil, **7** Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, PB, Brazil, **8** Medical Genetics Service, HCPA, Porto Alegre, RS, Brazil, **9** Departamento de Pediatria, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil, **10** Hospital Infantil Joana de Gusmão, Florianópolis, SC, Brazil, **11** CTN Diagnósticos, Porto Alegre, RS, Brazil, **12** Laboratory of Clinical Biochemistry and Metabolism, Department of General Pediatrics, Adolescent Medicine and Neonatology, University Medical Centre Freiburg, Freiburg, Germany



* taciborsatto@hotmail.com

OPEN ACCESS

Citation: Borsatto T, Sperb-Ludwig F, Lima SE, S. Carvalho MR, S. Fonseca PA, S. Camelo J, Jr, et al. (2017) Biotinidase deficiency: Genotype-biochemical phenotype association in Brazilian patients. PLoS ONE 12(5): e0177503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177503>

Editor: Anna Carla Goldberg, Hospital Israelita Albert Einstein, BRAZIL

Received: November 17, 2016

Accepted: April 30, 2017

Published: May 12, 2017

Copyright: © 2017 Borsatto et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study received financial support from Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos/ Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA) for research materials and publication fee. Post Graduate Program in Genetics and Molecular Biology (Universidade Federal do Rio Grande do Sul) funded the translation. ECN has a commercial affiliation (CTN Diagnósticos) which did not have

Abstract

Introduction

The association between the *BTD* genotype and biochemical phenotype [profound biotinidase deficiency (BD), partial BD or heterozygous activity] is not always consistent. This study aimed to investigate the genotype-biochemical phenotype association in patients with low biotinidase activity.

Methods

All exons, the 5'UTR and the promoter of the *BTD* gene were sequenced in 72 Brazilian individuals who exhibited low biotinidase activity. For each patient, the expected biochemical phenotype based on the known genotype was compared with the observed biochemical phenotype. Additional non-genetic factors that could affect the biotinidase activity were also analysed.

Results

Most individuals were identified by neonatal screening (n = 66/72). When consecutive results for the same patient were compared, age, prematurity and neonatal jaundice appeared to affect the level of biotinidase activity. The biochemical phenotype at the time of the second blood collection changed in 11/22 patients compared to results from the first sample. Three novel variants were found: c.1337T>C (p.L446P), c.1466A>G (p.N489S) and c.962G>A (p.W321*). Some patients with the same genotype presented different

RESEARCH ARTICLE

Identification of Candidate Genes for Reactivity in Guzerat (*Bos indicus*) Cattle: A Genome-Wide Association Study

Fernanda Caroline dos Santos¹*, Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto²*, Pablo Augusto de Souza Fonseca¹, Maria de Fátima Ávila Pires², Ricardo Vieira Ventura^{3,4}, Izinara da Cruz Rosse¹, Frank Angelo Tomita Bruneli², Marco Antonio Machado², Maria Raquel Santos Carvalho¹*

1 Departamento de Biologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, **2** Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Brazil, **3** Center for Genetic Improvement of Livestock, University of Guelph, Guelph, Canada, **4** Beef Improvement Opportunities, Guelph, Canada

* These authors contributed equally to this work.
* ma.raquel.carvalho@gmail.com



 OPEN ACCESS

Citation: dos Santos FC, Peixoto MGCD, Fonseca PAdS, Pires MdFÁ, Ventura RV, Rosse IdC., et al. (2017) Identification of Candidate Genes for Reactivity in Guzerat (*Bos indicus*) Cattle: A Genome-Wide Association Study. PLoS ONE 12 (1): e0169163. doi:10.1371/journal.pone.0169163

Editor: Roberta Davoli, Università degli Studi di Bologna, ITALY

Received: July 14, 2016

Accepted: December 13, 2016

Published: January 26, 2017

Copyright: © 2017 dos Santos et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa). Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto was supported by the

Abstract

Temperament is fundamental to animal production due to its direct influence on the animal-herdsman relationship. When compared to calm animals, the aggressive, anxious or fearful ones exhibit less weight gain, lower reproductive efficiency, decreased milk production and higher herd maintenance costs, all of which contribute to reduced profits. However, temperament is a trait that is complex and difficult to assess. Recently, a new quantitative system, REATEST[®], for assessing reactivity, a phenotype of temperament, was developed. Herein, we describe the results of a Genome-wide association study for reactivity, assessed using REATEST[®] with a sample of 754 females from five dual-purpose (milk and meat production) Guzerat (*Bos indicus*) herds. Genotyping was performed using a 50k SNP chip and a two-step mixed model approach (Grammar-Gamma) with a one-by-one marker regression was used to identify QTLs. QTLs for reactivity were identified on chromosomes BTA1, BTA5, BTA14, and BTA25. Five intronic and two intergenic markers were significantly associated with reactivity. *POU1F1*, *DRD3*, *VWA3A*, *ZBTB20*, *EPHA6*, *SNRPF* and *NTN4* were identified as candidate genes. Previous QTL reports for temperament traits, covering areas surrounding the SNPs/genes identified here, further corroborate these associations. The seven genes identified in the present study explain 20.5% of reactivity variance and give a better understanding of temperament biology.

Introduction

Temperament is a complex trait comprising many phenotypes including curiosity, exploration, aggressiveness, reactivity, passivity, physical movements, persistent habits, emotions, alertness and response to novelty [1]. Like other behavioral traits, temperament is influenced by a complex network of interacting genetic components, environmental factors, genetic-



🏠 Home

✍ Author

🗨 Review

Submission Confirmation

🖨 Print

Thank you for your submission

Submitted to

American Journal of Medical Genetics: Part A

Manuscript ID

18-0212

Title

Working memory and arithmetic impairments without approximate number sense impairment, in FMR1 premutation and gray zone pupils with normal intelligence

Authors

Martins, Aline

Moreira Paiva, Giulia

Matosinho, Carolina

Coser, Elisangela

Fonseca, Pablo

Haase, Vitor

Carvalho, Maria Raquel

Date Submitted

13-Mar-2018

Working memory and arithmetic impairments without approximate number sense impairment, in *FMR1* premutation and gray zone pupils with normal intelligence

Martins, A.A.S, Paiva, G.M, Matosinho, C.G.R, Coser, E.M, Fonseca, P.A.S, Haase, V.G, Carvalho, M.R.S

ABSTRACT

Individuals of normal intelligence with premutations of the mental retardation 1 (*FMR1*) gene present math learning difficulties (MD) and working memory (WM) impairments. The association between *FMR1* gray zone alleles and MD has never been investigated. Here, we describe a two phase study. In the first phase, 2,184 school-age children were screened for math achievement. In the second phase, 384 children with normal intelligence were neuropsychologically assessed, followed by *FMR1* genotyping. 61 girls and 60 boys were identified as performing below the PR 25 in mathematics (MD) and 146 girls and 112 boys with performance above PR 25 were identified as controls. Eight pupils presented expanded alleles. One girl presented a premutation (55 CGG); three children presented gray-zone alleles (45-54 CGG), four children present alleles in the extended gray zone range (41-44 CGG). The girl with the premutation and one boy with a gray zone allele presented impairments in WM and arithmetic performance below PR 6-7, compatible with the diagnosis of developmental dyscalculia. The probability of random co-occurrence of dyscalculia and an expanded *FMR1* allele was estimated as 0.001. The difficulties detected in these children were not associated with inaccuracy of non-symbolic number representations or literacy impairments. Dyscalculia in these children seems to be associated mainly with WM impairments. These findings are similar to those observed in individuals with the *FMR1* premutation and extend to persons with gray zone alleles. *FMR1* expansions in the gray zone may contribute to dyscalculia in otherwise healthy and normally intelligent children.

KEYWORDS

FMR1, Math learning disability, dyscalculia, *FMR1* neuropsychological profile, working memory, developmental dyscalculia

A comprehensive comparison of HD SNP panels and an alternative ultra-HD panel for genomic analyses in Nellore cattle

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Animal Production Science</i> |
| Manuscript ID | AN18305 |
| Manuscript Type: | Research paper |
| Date Submitted by the Author: | 13-May-2018 |
| Complete List of Authors: | Ventura, Ricardo Brito, Luiz Fernando; University of Guelph , Animal Biosciences; University of Guelph Oliveira Junior, Gerson Daetwyler, Hans Schenkel, Flavio; University of Guelph, Animal Biosciences; University of Guelph Sargolzaei, Mehdi; University of Guelph Vandervoort, Gordon Silva, Fabyano; Animal Science Miller, Stephen Carvalho, Minos Santana, Miquel Mattos, Elisangela Fonseca, Pablo Eler, Joanir; Universidade de Sao Paulo Ferraz, Jose Bento |
| Keyword: | Genomics, Cattle breeding, Cattle |

A comprehensive comparison of HD SNP panels and an alternative 1 ultra-HD panel for genomic analyses in Nellore cattle

Ricardo V. Ventura, Luiz F. Brito, Gerson A. Oliveira Junior, Hans D. Daetwyler, Flavio S. Schenkel, Mehdi Sargolzaei, Gordon Vandervoort, Fabyano Fonseca e Silva, Stephen P. Miller, Minos E. Carvalho, Miguel H. A. Santana, Elisangela C. Mattos, Pablo Fonseca, Joanir P. Eler and Jose Bento Sterman Ferraz

Abstract

The outcome of genomic analyses depends on the genotyping platform and density of SNP chip panels used for genotyping. There are evidences that some of them might not work very well for Zebu cattle (*Bos taurus indicus*) when compared to taurine breeds (*Bos taurus taurus*). In addition, the availability of panels with low to moderate number of overlapping markers is a limitation for breeding programs, especially when animals are genotyped using different SNP panels. In this study, we compared the performance of medium and high-density (HD) commercially available panels and investigated the feasibility of developing an ultra-HD panel (SP) containing markers from two HD panels (HD_I and HD_A) for various genomic analyses. The SP contained a total of 1,123,442 SNPs. After performing linkage disequilibrium pruning, HD_A, HD_I and SP contained 429,624; 365,225 and 658,770 markers distributed across the whole genome and the overall mean proportion of markers pruned out per chromosome for HD_A, HD_I and SP was 15.17%, 43.18%, 38.63%, respectively. A greater level of linkage disequilibrium was observed among markers from the HD_I compared to HD_A. HD_I panel presented the highest mean number of runs of homozygosity (ROH) segments per animal (45.48%, an increment of 5.11% compared to SP) and also longer segments on average (3,057.95 Kb per segment), in comparison with both HD_A and SP. HD_I also showed the highest mean number of SNPs per segment. Consequently, the majority of animals presented the highest genomic inbreeding levels when genotyped using HD_I. The visual examination of marker distribution along the genome illustrated uncovered regions among the different panels. Haplotype blocks comparison among the different HD panels and the average haplotype size constructed based on HD_A was smaller compared HD_I. The average number of SNPs per block was less similar for HD_A compared to HD_I. Both the HD_A and HD_I panels achieved high imputation accuracies when used as the lower density panels for imputation to SP. However, imputation accuracies from HD_A to SP were greater compared to imputation from HD_I to SP. Imputation from one HD panel to the other is also feasible. Low- and medium-density panels, composed of markers that are subsets of both HD_A and HD_I panels should be developed in order to achieve better imputation accuracies to both HD levels. The genomic

analyses performed in this study revealed significant differences based on the SNP panel used. This information should be taken into account when deciding on the genotyping platforms to be used for genomic studies in Nellore cattle.



Variation in milk fatty acid unsaturation indices associated with stearyl-CoA desaturase-1 (SCD1) gene polymorphism in Guzerá and Gir cows

| | |
|-------------------------------|--|
| Journal: | <i>Journal of Animal Breeding and Genetics</i> |
| Manuscript ID | JABG-18-0100 |
| Manuscript Type: | Original Article |
| Date Submitted by the Author: | 28-May-2018 |
| Complete List of Authors: | Peixoto, Maria Gabriela; Embrapa Gado de Leite, Produção e Bem-estar Animal Cardoso, Diercles; Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias Campus de Jaboticabal, Departamento de Zootecnia Camarqo, Gregório Miquel; Universidade Federal da Bahia, Departamento de Zootecnia Rosse, Izinara; Universidade do Estado de Minas Gerais Fonseca, Pablo Augusto; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral Bruneli, Frank Angelo; Embrapa Gado de Leite, Produção e Bem-estar Animal Santos, Fernanda Caroline; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral Lopes, Fernando Cesar; Embrapa Gado de Leite, Produção e Bem-estar Animal Carvalho, Maria Raquel; Universidade Federal de Minas Gerais Instituto de Ciências Biológicas, Departamento de Biologia Geral Tonhati, Humberto; Sao Paulo State University, Vercesi Filho, Aníbal Euqênio; Instituto de Zootecnia, Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios Gama, Marco Antônio; Embrapa Gado de Leite, Saúde Animal e Qualidade do leite |
| Subject Area: | animal breeding, cattle, genotype, marker assisted selection, phenotype, genetic variation |

Variation in milk fatty acid unsaturation indices associated with stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) gene polymorphism in Guzera and Gir cows

Maria Gabriela Campolina Diniz Peixoto, Diercles Francisco Cardoso, Gregório Miguel Ferreira de Camargo, Izinara da Cruz Rosse, Pablo Augusto de Souza Fonseca, Frank Angelo Tomita Bruneli, Fernanda Caroline dos Santos, Fernando Cesar Ferraz Lopes, Maria Raquel Santos Carvalho, Humberto Tonhati, Aníbal Eugênio Vercesi Filho, Marco Antônio Sundfeld Gama

SUMMARY

Genetic variation in stearoyl-CoA desaturase-1 (SCD1) activity has been reported in taurine breeds. In this pilot study, we investigated the variation in SCD1 indices (a proxy for SCD1 activity) in milk fat from Gir and Guzera cows fed on the same diet, and sought possible polymorphisms in the *SCD1* gene in these breeds. Milk fat *cis*-9 C18:1 and rumenic acid (RA) contents, as well as the SCD1 indices (except SCD18), varied 2- to 3-fold among cows, with the variations being slightly greater in Guzera, notably for the SCD14 index. Six single nucleotide polymorphism (SNPs) were found in the *SCD1* gene: in Gir cows, the SNPs mapped to intron 4 (g.8646A>G) and exon 5 (g.10330G>A), whereas in Guzera cows, the SNPs mapped to introns 1 (g.2096C>T) and 4 (g.8646A>G) and to exon 5 (g.10153A>G, g.10213C>T, g.10329T>C, g.10330G>A). Lower SCD14 and SCDRA indices ($P<0.05$) were observed for the haplotype GGCTCTAG found in exon 5, suggesting that genotype effects on SCD1 activity may be substrate specific. The SNPs found in introns 1 and 4 also affected ($P<0.05$) the SCD14 and SCDRA indices. These results indicate the perspective to select Guzera and Gir cows for a healthier milk fat composition.

Keywords: Δ -9 desaturase enzyme, human health, milk fat composition, zebu cattle

10. Anexos suplementares