

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
IMUNOLOGIA E DIP/ GENÉTICA E BIOTECNOLOGIA

JUAN CARLOS AVILA LÓPEZ

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) PARA A
CARACTERÍSTICA LÁBIO LEPORINO EM BOVINOS DA RAÇA GIR
LEITEIRO**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

JUIZ DE FORA

2019

JUAN CARLOS AVILA LÓPEZ

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) PARA A
CARACTERÍSTICA LÁBIO LEPORINO EM BOVINOS DA RAÇA GIR
LEITEIRO**

Dissertação de Mestrado do
Curso de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas: Área: Genética e
Biotecnologia, para obtenção do Título de
Mestre em Ciências Biológicas: Área:
Genética e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Marco Antonio Machado

Co-orientador: Prof. Dr. Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

JUIZ DE FORA

2019

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

López, Juan Carlos Avila.

Estudo de associação ampla do genoma (GWAS) para a característica lábio leporino em bovinos da raça Gir Leiteiro / Juan Carlos Avila López. – 2019.

76 p.

Orientador: Marco Antonio Machado

Coorientador: Marcos Vinicius Gualberto Barbosa da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e Genética, 2019.

1. Fenda Labial. 2. Marcadores Moleculares. 3. Doenças congênitas. I. Machado, Marco Antonio, orient. II. da Silva, Marcos Vinicius Gualberto Barbosa, coorient. III. Título.

FICHA DE AVALIAÇÃO

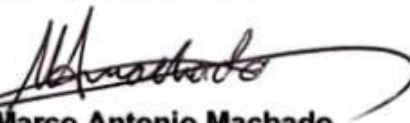
JUAN CARLOS AVILA LÓPEZ

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO AMPLA DO GENOMA (GWAS) PARA A CARACTERÍSTICA LÁBIO LEPORINO EM BOVINOS DA RAÇA GIR LEITEIRO

Dissertação de Mestrado submetida a banca examinadora do Curso de Pós-graduação em Ciências Biológicas – Ênfase em Genética e Biotecnologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 05/12/19.

BANCA EXAMINADORA:


Prof. Dr. Marco Antonio Machado

Orientador/ Embrapa/ Universidade Federal de Juiz de Fora


Dr. Marcos Vinicius Barbosa da Silva
Coorientador/ Embrapa


Prof. Dr. Lyderson Facio Viccini
Universidade Federal de Juiz de Fora


Dr. Joao Claudio do Carmo Panetto
Embrapa


Profa. Dra. Marta Fonseca Martins
Embrapa/ Universidade Federal de Juiz de Fora

À minha família que, com amor, paciência e esforço me permitiu realizar mais um sonho hoje, obrigada por dar em mim o exemplo de esforço e coragem, de não temer as adversidades, porque Deus está sempre comigo.

AGRADECIMENTOS

À Organização dos Estados Americanos (OEA) que me deu a oportunidade de fazer meus estudos de pós-graduação

Ao Diretor de Relações Internacionais (DRI), sempre atento às minhas necessidades pessoais e acadêmicas, além de ser o principal elo entre a universidade e as organizações internacionais de apoio aos estudantes.

À Universidade Federal de Juiz de Fora que abriu minhas portas e me permitiu seguir esse caminho.

À todas as autoridades, funcionários e amigos do Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, por confiarem em mim, abrirem as portas e me permitirem realizar todo o processo com sua empresa, especialmente meu orientador Marco Antonio Machado e o co-orientador Marcos Vinicius da Silva, que com o ensino de seu valioso conhecimento fez com que você crescesse como profissional no dia a dia, agradeço a cada um pela paciência, dedicação, apoio incondicional e amizade.

RESUMO

O Brasil possui o maior rebanho bovino do mundo, sendo que a genética da raça Gir está presente em mais de 80% dos rebanhos leiteiros, por possuir características fisiológicas especiais. Pela alta utilização de animais de genética superior, doenças relacionadas a diminuição da base genética podem se tornar mais frequentes. O lábio leporino é uma alteração congênita caracterizada pela falha no fechamento dos processos faciais, que impede a alimentação adequada do animal, além de desvalorizar o animal afetado e o seu rebanho. Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) podem ajudar no entendimento da herança e dos mecanismos moleculares envolvidos nessa característica indesejável. Deste modo, o objetivo desse trabalho foi identificar regiões genômicas e genes candidatos para a característica lábio leporino em bovinos da raça Gir Leiteiro. As amostras de animais caso e controle foram enviadas por produtores participantes do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro. Para tanto, foi utilizada a metodologia GWAS para casos e controles, onde o grupo caso foi representado por 16 animais possuidores do fenótipo lábio leporino e o grupo controle por 48 animais possuidores do fenótipo saudável e menos aparentado com o grupo caso, definidos por meio de uma matriz de similaridade genômica. O DNA foi extraído pela metodologia do fenol clorofórmio e avaliado por espectrofotometria de nano volume. As amostras foram submetidas à análise de array de SNPs por meio do BovineHD Genotyping BeadChip. O controle de qualidade dos genótipos foi realizado por meio do pacote computacional Golden Helix SVS 7 em que foram removidos marcadores não autossômicos com call rate <95%, frequência mínima de alelos (MAF) <2% e equilíbrio de Hardy-Weinberg <10⁻⁶. As análises de GWAS foram realizadas utilizando o modelo aditivo e o modelo dominante no mesmo pacote computacional e os resultados foram apresentados em gráficos do tipo Manhattan. Regiões genômicas onde foram obtidos resultados significativos foram exploradas para identificar genes candidatos localizados dentro ou próximo às regiões mapeadas. Nosso estudo foi capaz de encontrar 265 SNPs significativos divididos em 100 regiões genômicas, nas quais foram identificados 35 genes candidatos associados a fenda labial, o que fornece informações para futuras pesquisas sobre lábio leporino em bovinos.

Palavras-chave: Fenda Labial, Marcadores Moleculares, Doenças congênitas.

ABSTRACT

Brazil has the largest cattle herd in the world and the genetics of the Gir breed are present in more than 80% of dairy herds, due to their special physiological features. Due to the high use of genetically superior animals, diseases related to narrow genetic base may become more frequent. The cleft lip is a congenital alteration characterized by the failure to close the facial processes, which prevents proper feeding of the animal, in addition to devaluing the affected animal and its herd. Genome wide association studies (GWAS) can help understanding the inheritance and molecular mechanisms involved in this undesirable trait. Thus, the aim of this work was to identify genomic regions and candidate genes for cleft lip condition in Gir dairy cattle. Samples of case and control animals were sent by producers who participate in the Brazilian Dairy Gir Breeding Program. GWAS procedure was used to analyse 16 animals with cleft lip phenotype (case group) and 48 animals displaying healthy phenotype (control group) and less related to the case group, defined by a matrix of genomic similarity. DNA was extracted using chloroform phenol methodology and evaluated by nano volume spectrophotometry. All samples were subjected to SNP array analysis through the BovineHD Genotyping BeadChip. Genotype quality control was performed using the Golden Helix SVS 7 computational package, which removed non-autosomal markers with call rate <95%, minimum allele frequency (MAF) <2% and Hardy-Weinberg equilibrium 10^{-6}. GWAS analyses were performed using the additive and dominant models in the same data set and the results were displayed in Manhattan plots. Genomic regions where significant results were obtained were explored to detect candidate genes located within or near the mapped genomic regions. We were able to find 265 significant SNPs distributed into 100 genomic regions, in which 35 candidate genes associated with cleft labyrinth were identified, providing information for future research on the cleft lip condition in cattle.

Key words: Cleft Lip, Molecular Markers, congenital diseases.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Tabela 1. Resultados do GWAS para lábio leporino em gado Vorderwald, Montbeliarde.....	18
Figura 1. Gráfico de Manhattan do modelo aditivo do estudo de associação do genoma para o lábio leporino (caso/controle) em bovinos da raça Gir. Os valores de Log ₁₀ P de todo o genoma para cada efeito SNP são plotados em relação à sua posição em cada cromossomo. Os cromossomos são diferenciados por cores e numeração. As cores dos cromossomos são identificadas abaixo do gráfico.....	32
Figura 2. Gráfico de Manhattan do modelo dominante do estudo de associação do genoma para o lábio leporino (caso/controle) em bovinos da raça Gir. Os valores de Log ₁₀ P de todo o genoma para cada efeito SNP são plotados em relação à sua posição em cada cromossomo. Os cromossomos são diferenciados por cores e numeração. As cores dos cromossomos são identificadas abaixo do gráfico.....	33

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 Bovinocultura de leite no Brasil	13
2.2 Malformações congênitas	14
2.3 Lábio leporino	16
2.4 Técnicas de reprodução e risco de malformações congênitas	18
2.5 Ferramentas genômicas na produção animal	19
2.6. Estudos de associação ampla do genoma (GWAS)	20
2.6.1 Etapas do GWAS	22
2.6.2 Controle de qualidade nos GWAS	22
2.7 Estratificação da população	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Obejtivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1 Seleção da população alvo	26
4.2 Coleta de dados fenotípicos, demográficos, genealógicos e amostras biológicas	26
4.3 Extração de material genético (DNA) e genotipagem dos marcadores SNPs	27
4.4 Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e estratégias para a identificação de genes candidatos	28
4.5 Detalhamento do desenho experimental	29
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1 Controle de qualidade dos genótipos	30
5.2 Estudos de associação ampla do genoma	30
7 CONCLUSÕES	44
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45

1 INTRODUÇÃO

Os programas de seleção e melhoramento genético de bovinos leiteiros têm como objetivo principal aumentar a produtividade animal para várias características de interesse, no entanto, pela alta utilização de animais de genética superior, doenças relacionadas a diminuição da base genética podem se tornar mais frequentes (MARTÍNEZ & SUÁREZ, 2016; REXROAD *et al.*, 2019). Essas doenças genéticas podem causar grandes perdas devido ao fraco desempenho do animal, que na sua maioria são descartados e, se a doença permanecer sem ser detectada, a frequência dos alelos deletérios podem aumentar nas gerações subsequentes (KALE, 2018; SLMLANER, SOLBU, SCHAEFFER, 1991).

O lábio leporino é uma alteração congênita caracterizada pela falha no fechamento dos processos faciais que impede a alimentação adequada do animal, além de desvalorizar o animal afetado e também o seu rebanho (PRIETO & MENDOZA, 2006b; PALONE & VARGAS, 2016).

Os estudos de associação ampla do genoma (GWAS) podem ajudar no entendimento da herança e dos mecanismos moleculares envolvidos nessa característica indesejável (EGGEN, 2012) que poderão ser utilizados para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento (BUSH & MOORE, 2012).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bovinocultura de leite no Brasil

As raças zebuínas desempenham um papel importante na pecuária tropical, pois possuem características fisiológicas especiais, tais como resistência ao calor, resistência a carrapatos e parasitas intestinais, que as tornam mais adequadas para este tipo de ambiente (SILVA, 2010; KAUSHIK & GARG, 2003; LIAO *et al.*, 2013; QUIROZ, GRANADOS, OLIVA, 2014). Estima-se que mais de 70% da população bovina do mundo pertence ou é cruzada com estas raças e, no Brasil, a genética da raça Gir está presente em mais de 80% de rebanhos leiteiros (REIS FILHO *et al.*, 2010; LIAO *et al.*, 2013).

O Brasil possui o maior rebanho comercial do mundo que, de acordo com o censo agropecuário de 2018, o País possuía 213,7 milhões de cabeças de gado. Estima-se que o crescimento da produção aumentou 1,6% comparado com o ano anterior, somando 33,8 bilhões de litros. Pela primeira vez, a produtividade nacional de leite ultrapassou os 2 mil litros por vaca ao ano, crescimento de 4,7% frente a 2017. Acredita-se que a produtividade nacional aumentou devido às condições meteorológicas, melhoramento e nutrição de rebanhos e especialização de produtores (IBGE, 2019).

Nos últimos anos, visando melhorar a produção, tornou-se comum a realização de estudos genéticos em bovinos, no entanto têm sido escassos os estudos populacionais, que são necessários para compreender melhor a variabilidade genética, o fluxo de genes e a distância genética entre os rebanhos (MAIORANO *et al.*, 2018). O que tem sido utilizado para este fim é a informação genealógica, que demonstra a existência de pouca variabilidade na população corrente, o que indica que a população evoluiu a partir de uma base genética estreita (DE OLIVEIRA *et al.*, 2012). No entanto, a preocupação com endogamia, estrutura genética e a diversidade da população do gado Gir tem aumentado, pois já existem relatos sobre os efeitos adversos da endogamia na produção de leite, em características reprodutivas

(CHOUDHARY *et al.*, 2005; JOSÉ *et al.*, 2001; LIAO *et al.*, 2013), e aumento de mudanças no genoma, gerando polimorfismos (STAFUZZA *et al.*, 2017).

O genoma bovino (*Bos taurus*) é composto por mais de 2,7 bilhões de pares de base, sendo aproximadamente 94% distribuídos nos 29 cromossomos autossômicos, 5% no cromossomo sexual X e o restante no cromossomo Y e DNA mitocondrial (GEER *et al.*, 2010). Mutações genômicas podem ser introduzidas a cada nova geração, sendo o tipo mais abundante os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP) (MOUNTAIN, 1992).

Um dos grandes desafios para o melhoramento do gado de leite no Brasil é coletar os fenótipos mais relevantes, identificar as mutações causais e os mecanismos exatos pelos quais os fenótipos são produzidos e contribuir com os diferentes níveis mais elevados para as gerações seguintes (EGGEN, 2012).

2.2 Malformações congênitas

As malformações congênitas, anomalias congênitas ou defeitos de nascimento são alterações estruturais ou funcionais que podem ocorrer durante a concepção ou vida intrauterina, que podem ser detectados durante a prenhez, parto ou mais tarde durante a fase de produção do animal (OMS, 2019). Estes defeitos são quaisquer anormalidades na estrutura do corpo, defeitos microscópicos, erros de metabolismo, distúrbios fisiológicos, anormalidades celulares e moleculares, não são necessariamente patológicas e podem aparecer isoladas ou fazerem parte de uma síndrome (ARTURO, FIERRO, TASTEKIN, 2008; FRANCINE, PASCALE, ALINE, 2014; ROJAS & WALKER, 2012). No entanto, devem ser considerados como desvios do desenvolvimento normal e podem ser de relevância clínica significativa maiores ou menores (GONZALES, 2015). As maiores, se não forem corrigidas, comprometem profundamente a função corporal e podem até aumentar a mortalidade (ARTURO, FIERRO, TASTEKIN, 2008).

Em geral, as causas das malformações congênitas podem ser divididas em cinco grandes grupos: (1) defeitos de um único gene (genes mutantes); (2) anormalidades cromossômicas; (3) distúrbios multifatoriais que são o resultado da

interação entre predisposição genética e fatores ambientais; (4) fatores teratogênicos; e (5) aqueles de causa desconhecida (LAMMENS *et al.*, 2002).

Em bovinos, tem sido descrito que uma das principais causas ambientais que ocasionam malformações são os agentes teratogênicos. A suscetibilidade aos agentes tem relação com a genética do animal e a maneira como ele interage com fatores ambientais, o estágio de desenvolvimento alcançado no momento em que é exposto ao teratígeno e a dose do agente. O período mais sensível aos teratógenos se estende entre a terceira e a oitava semana de idade pós-fertilização, pois esta é a fase em que a maioria dos órgãos e sistemas estão sendo formados. Os principais agentes teratogênicos para bovinos são a ingestão dos gêneros de plantas *Veratrum*, *Lupinus*, *Astragalus*, *Oxytropis* e *Conium*, assim como diversos vírus, bactérias e parasitas (PAVARINI *et al.*, 2008; ROJAS & WALKER, 2012).

A influência da genética nas malformações congênitas tem sido de difícil estabelecimento, principalmente porque a maioria delas é caracterizada por diversas manifestações fenotípicas, que em muitos casos são aparentemente não relacionadas e que são variáveis nos indivíduos afetados. Por outro lado, os estudos indicam que, frequentemente no desenvolvimento das malformações, há o envolvimento de diversos genes, além de suas interações destes com o ambiente. Para outros casos, no entanto, podem existir determinação monogênica e que as diversas manifestações fenotípicas são produzidas por efeitos pleiotrópicos de um gene (ROJAS; WALKER, 2012).

As doenças poligênicas resultam de múltiplos fatores genéticos e/ou epigenéticos e não se encaixam nos padrões mendelianos tradicionais de herança. Não há uma compreensão das complexidades genéticas da maioria das doenças poligênicas, e a elucidação da patogênese molecular de distúrbios multifatoriais permanece pouco conhecida (REISNER, RIVERBARK, COLEMAN, 2015).

A incidência de anomalias congênitas no gado de leite é de difícil determinação, porque apenas as malformações letais são geralmente relatadas uma vez que alteram significativamente o fenótipo do animal. Há múltiplos casos que não são reportados porque os produtores tem a opinião de que a divulgação da presença de malformações congênitas pode depreciar seu rebanho (ROJAS-LLEONART *et al.*, 2010). Contudo, estima-se que a ocorrência destas anomalias é de 0,2% a 3% em todo o mundo, sendo que o conhecimento destas anomalias depende da frequência em que são estudadas e descritas (MARCOLONGO-PEREIRA *et al.*, 2010).

2.3 Lábio leporino

O lábio leporino, também conhecido por *queilosquise*, *cheilognathoschisis*, fenda labial, fissura labiopalatal ou fenda palatal primária (CALDAS *et al.*, 2014), é uma alteração craniofacial congênita produzida por defeitos embriológicos na formação da face (VERGARA; VELÁZQUEZ, 2012b). Essa doença é caracterizada por falhas de fechamento nos processos faciais, como os processos frontonasal, maxilar e mandibular (MORITOMO, TSUDA, MIYAMOTO, 2002), entre a quarta e décima segunda semana de gestação (VERGARA & VELÁZQUEZ, 2012a). Essa alteração pode ser classificada como síndrômica ou não-síndrômica, relacionada à presença ou ausência de outros defeitos físicos ou de desenvolvimento. No caso dos defeitos síndrômicos, por sua vez, podem ser classificados como cromossômicos, teratogênicos e não categorizados. No entanto, a maioria dos casos (70%) é de origem não síndrômica (PRIETO & MENDOZA, 2006).

De acordo com sua localização e morfologia, o lábio leporino não síndrômico pode ser classificado em três grandes grupos: unilateral (direita ou esquerda), média e bilateral. Os três casos podem ser classificados com ou sem fenda palatina (MORITOMO, TSUDA, MIYAMOTO, 2002; REINARTZ & DISTL, 2017). Em muitos dos processos relatados, a fenda labial é acompanhada pela perda do processo nasal e dos insidiosos. Além disso, tem-se observado um desvio facial lateral que pode ter diferentes graus de severidade (REINARTZ, SINA *et al.*, 2015). Essas deformações causam má oclusão dentária, problemas na função mastigatória e erupção anormal, aumentando a chance de dentes retidos impedindo a alimentação correta do animal (GUTIÉRREZ & OTERO, 2006). As fissuras de palato deixam o canal oral em contato com o nasal, podendo causar complicações respiratórias como sinusite, rinite ou broncopneumonia (ANTUNES & BERNARDO, 2011).

Algumas das raças mais comumente reportadas com malformações orofaciais são: Simental, Charolês, Czech Red Pied, Holandesa, Gir, Hereford, Japonês Brown, Shorthorn e Vorderwald Montbeliarde (REINARTZ & DISTL, 2017). A taxa de incidência de lábio leporino em gado leiteiro, é difícil de determinação, pois é uma condição raramente descrita. Estima-se que, no mundo, a frequência de fissuras labiopalatinas em bezerros contabiliza cerca de 5% de todos os defeitos congênitos (USTA, 2017).

Os fatores genéticos envolvidos nos diferentes tipos de fissura labiopalatina não sindrômica são difíceis de identificar devido aos níveis de penetrância, diferenças de sexo e outros fatores ambientais. Os estudos sobre lábio leporino sindrômico, têm dado pistas para identificar alguns genes que causam as fendas não-sindrômicas (AGBENORKU, 2013). Entre os fatores que têm sido reportados como causais de lábio leporino, estão a capacidade materna de manter as concentrações de zinco nos eritrócitos, concentrações de mioinositol, níveis adequados de vitaminas B6 e B12, capacidade de utilizar esses nutrientes e a incapacidade de metabolizá-los adequadamente, o que pode causar erros na síntese e transcrição do DNA. Uma relação próxima também foi encontrada na reação com certos medicamentos administrados, como antibióticos, anti-inflamatórios e analgésicos (AGBENORKU, 2013), assim como a reação com alcaloides da piperidina, tabaco silvestre (*Nicotiana glauca*), intoxicação com selênio e espécies lupinas, vírus *Cache Valley*, vírus *Akabane*, *Aino* e *Chuzan* e o vírus da diarreia viral bovina (BVD), sendo que todos eles podem induzir fenda lábio palatina em animais (USTA, 2017).

Em bezerros Shorthorn, o lábio leporino tem sido atribuído à homozigose de um gene autossômico recessivo simples (ZAFER, 2017), mas existe evidência em bovinos Angus, Jersey (LUPP *et al.*, 2012; USTA, 2017), Vorderwald, Montbeliarde (REINARTZ & DISTL, 2017), que indica maior probabilidade de transmissão genética poligênica (LUPP *et al.*, 2012; REINARTZ & DISTL, 2017; USTA, 2017). A pesquisa atual na busca das causas de lábio leporino é baseada em conjuntos de dados fornecidos por estudos GWAS, que demonstraram estatisticamente uma ligação entre o consumo de vitaminas (A, D) periconcepcional e variantes no genoma. Isso pode explicar parcialmente porque o alto consumo de vitaminas por gestantes parece proteger o feto da fenda labial (HAALAND *et al.*, 2018).

Em outros modelos animais, foram propostos outros genes candidatos para lábio leporino em suas diversas formas: *CRS1*, *CRS2*, *CPS-1*, *DCP-1*, *DCP2*, *MSX1*, *TGFB3* e *AP-2*. Em humanos, a deleção de *MSX1* e *IRF6* inclui fissuras orofaciais. Em ratos quando ocorre uma alteração no comportamento do gene *TGFB3*, é observada fenda palatina, por outro lado, na descendência dos ratos com alterações no gene de *AP-2*, são observadas alterações mais generalizadas (GUTIÉRREZ; OTERO, 2006; URIBE *et al.*, 2017). No estudo do genoma bovino publicado por REINARTZ & DISTL (2017), foram identificados dois genes candidatos para lábio leporino: *ABCB1* no BTA4 e *TENM4* no BTA29 (Tabela 1). No entanto, é recomendada

a realização de mais pesquisas para identificar outras mutações para diferentes tipos de lábio leporino (REINARTZ & DISTL, 2017). O estudo aprofundado desta doença poderá permitir entender os fatores ambientais e genéticos envolvidos, porque a informação existente ainda é controversa (TETTAMANTI *et al.*, 2017). Assim, a partir de novos dados consolidados para esta etiologia um sistema mais eficaz de aconselhamento genético pode ser estabelecido para prevenir a ocorrência destes tipos de anomalias (PALONE & VARGAS, 2016).

Tabela 1. Resultados do GWAS para lábio leporino em gado Vorderwald, Montbeliarde.

Gene	Nome	Localização	Função
ABCB1	ATP-binding cassette transporter subfamily B, member 1; Multidrug resistance protein 1	BTA4	Contribui para a variabilidade das funções proteicas e, portanto, na resistência a drogas, no prognóstico, na toxicidade e na doença.
TENM4	Teneurin transmembrane protein 4	BTA29	Implantação do blastocisto, Ligação da molécula de adesão celular, estabelecimento da conectividade neuronal adequada durante o desenvolvimento.

2.4 Técnicas de reprodução e risco de malformações congênitas

As técnicas de reprodução assistida vêm sendo utilizadas há muito tempo para solucionar problemas de fertilidade em medicina veterinária, além disso, ferramentas têm sido desenvolvidas para facilitar a seleção de características desejáveis para a produção de animais de genética superior (BRESSAN *et al.*, 2015; IETS & PERRY, 2012). No Brasil, a produção *in vitro* de embriões (PIV) tem sido particularmente importante uma vez que o Brasil é responsável por 85% dos embriões produzidos no mundo (BRESSAN *et al.*, 2015; IETS & PERRY, 2012). O principal usuário das tecnologias de melhoramento é o gado bovino que, de acordo com dados da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (IETS), em 2013, produziu 546.628 embriões bovinos derivados da fertilização *in vitro*, que representa 42% do total de embriões desta espécie produzidos em todo o mundo (DUBEIBE, 2016; IETS

& PERRY, 2012). Frequentemente, as gestações derivadas de processos de PIV, que são mantidos a termo, resultam em distúrbios graves na saúde do animal. Tem sido relatado que a PIV de embriões é rotineiramente acompanhada por problemas epigenéticos, principalmente em consequência da cultura *in vitro* (BRESSAN *et al.*, 2015). Esses distúrbios incluem aumento de peso ao nascimento, períodos prolongados de gestação, maiores taxas de aborto e taxas aumentadas de mortalidade perinatal (HASLER, 2000; JIANG *et al.*, 2017; SIRARD, 2017), bem como malformações congênitas sindrômicas e não sindrômicas (BRESSAN *et al.*, 2015; JIANG *et al.*, 2017; SIRARD, 2017).

Análises da expressão gênica em blastocistos bovinos produzidos sob diversas condições de cultura mostraram que a abundância de RNAs mensageiros longos é profundamente impactada pelo ambiente artificial (SIRARD, 2017). Os mecanismos epigenéticos têm sido agrupados em três categorias principais: metilação do DNA, modificações das histonas e posicionamento dos nucleossomos, destacando a interação entre os fatores epigenéticos. O mecanismo epigenético mais estudado é a metilação do DNA, uma vez que é o mais estável e o principal regulador da herança epigenética através das gerações (BRESSAN *et al.*, 2015).

2.5 Ferramentas genômicas na produção animal

Nas últimas décadas, a seleção genômica (GS) tem sido amplamente utilizada na pecuária para aumentar a taxa de ganho genético, por meio de maior precisão das avaliações das características produtivas e reprodutivas do animal e também a redução do intervalo de gerações (HAYES *et al.*, 2009; JENKO *et al.*, 2017). As predições dos valores genômicos (GEBV) são feitas utilizando a base de dados genotípicos (marcadores SNP) e a base de dados fenotípicos (PAREEK *et al.*, 2011).

A maioria das doenças mostra um agrupamento em padrões que demonstram que o background genético dos indivíduos desempenha um papel na suscetibilidade em níveis individuais (BERRY *et al.*, 2011; SEVILLA, 2007). A chance de que um parente apresente uma determinada patologia depende do componente genético da própria doença, em contraste, a hereditariedade é a fração da variação populacional que pode ser explicada por fatores genéticos. Doenças comuns de alta prevalência são influenciadas por fatores genéticos e ambientais que interagem entre

si e são chamados de características quantitativas ou QLTs (GODDARD, M. E. *et al.*, 2016; SEVILLA, 2007). Os QTLs são controlados por muitos genes e fatores ambientais e há grande interesse em analisá-los (SCHMID; BENNEWITZ, 2017). Assim, essas regiões genômicas, localizadas em diversas regiões do genoma, controlam diversas características e podem possuir efeitos pequenos, moderados ou grandes (KEMPER & GODDARD, 2012; NORDIC CATTLE GENETIC EVALUATION, 2019).

Com os avanços na identificação de milhões de SNPs no genoma bovino e a redução dos custos de genotipagem e ressequenciamento, existe uma oportunidade maior de usar informações de milhares de marcadores moleculares para seleção genômica (CHAGUNDA, MUJIBI, DUSINGIZIMANA, 2018; DAETWYLER *et al.*, 2014) que pode ser utilizada para selecionar positivamente ou negativamente características de interesse na produção do gado leiteiro visando o aumento da produção e qualidade do leite e desempenho geral do animal (CIEPŁOCH *et al.*, 2017; COUTINHO *et al.*, 2007; USDA, 2019). O desenvolvimento de painéis de marcadores moleculares de alta densidade permitiu a genotipagem de dezenas de milhares, até milhões de SNP por ensaio, possibilitando a criação de ferramentas usadas em estudos de associação genótipo-fenótipo (BOICHARD *et al.*, 2012; DASH *et al.*, 2018; FERNANDES *et al.*, 2015). Atualmente, o Illumina BovineHD BeadChip é a matriz de genotipagem genômica mais abrangente para investigar a variação genética em qualquer raça de gado de corte e leite. Esse array contém mais de 777.000 SNPs e permite uma ampla gama de aplicações, como seleção genômica ampla, identificação de *loci* de características quantitativas, avaliação de mérito genético, mapeamento de cruzados, estudos de desequilíbrio de ligação e caracterização de raças para avaliação da biodiversidade. Para a raça Gir, o BovineHD BeadChip possui 472,928 *loci* polimórficos validados, os quais foram submetidos a rigorosos testes funcionais para garantir desempenho e reprodutibilidade (ILLUMINA, 2015).

2.6. Estudos de associação ampla do genoma (GWAS)

Os GWAS permitem a identificação de associações entre milhares de *loci* genômicos e características complexas (LITTLE; IOANNIDIS, 2008) e esta

associação revela novas rotas e mecanismos biológicos para as características de interesse (BUSH & MOORE, 2012; MAREES *et al.*, 2018; GODDARD, MICHAEL & HAYES, 2009; YANG, J. *et al.*, 2013) e define melhor o papel relativo dos genes e do ambiente no risco de doenças (MILLS & RAHAL, 2019; VISSCHER *et al.*, 2017).

Os GWAS pressupõem que existem mutações causais em desequilíbrio de ligação (DL) com marcadores adjacentes em indivíduos de uma população, além de ter sucedido múltiplas gerações e recombinações (BEJARANO *et al.*, 2018). Deste modo é necessário identificar as regiões em DL, construindo um mapa de alta densidade baseado em marcadores moleculares próximos ao *locus* de interesse (NISHINO *et al.*, 2018; WEINWURM, SÖLKNER, WALDMANN, 2013).

Os GWAS têm sido realizados em famílias ou em populações. Em famílias, possibilitam identificar alelos transmitidos de pais para filhos, determinar a frequência e fazer comparação com a população geral (LAIRD *et al.*, 2019). Em populações, os GWAS são constituídos por indivíduos não aparentados com uma característica específica ou doença e indivíduos saudáveis não aparentados (caso-controle), no qual procura-se a diferença de frequência de alelos entre os grupos estudados (ZONDERVAN; CARDON, 2014).

Para a análise de associação entre grupos caso-controle, é necessária a observação da relação entre os indivíduos. Se estes não estiverem relacionados é aconselhável a utilização do teste χ^2 de Pearson para diferentes frequências de genótipos entre os métodos de regressão linear afetado e não-afetado. A estatística do qui-quadrado é uma ferramenta não paramétrica (livre de distribuição) projetada para analisar as diferenças de grupo quando a variável dependente é medida em um nível nominal. Como todas as estatísticas não paramétricas, o qui-quadrado é robusto com relação à distribuição dos dados. Especificamente, não exige igualdade de variâncias entre os grupos de estudo ou homocedasticidade nos dados. Permite avaliar as variáveis independentes dicotômicas e os estudos em múltiplos grupos (MCHUGH, 2013).

A metodologia estatística mais amplamente utilizada nos GWAS é a Bayesiana, pois apresenta vantagens em relação a métodos clássicos pois predizem os efeitos de todos os *loci* de forma simultânea, assumindo variâncias específicas para cada *locus*. Tudo isso com a pressuposição de que os marcadores explicam diferentes proporções da variação genética da característica analisada. Mostrando que os

efeitos dos marcadores são efeito de um determinado *locus* ajustado para todos os outros loci incluídos no modelo (ARMERO *et al.*, 2019; YANG, J. *et al.*, 2013).

Sabe-se que a maior parte do genoma é composta por regiões altamente saturadas de SNPs unidos pelo princípio do desequilíbrio de ligação (DL), com exceção de algumas regiões com alta taxa de recombinação (hotspots) e, com isso, podem formar blocos genômicos, denominados haplótipos, que segregam juntos na população (GABRIEL *et al.*, 2002; WALL & STEVISON, 2016). Então, pode-se dizer que os GWAS pressupõem que pelo menos um SNP está em DL com genes ou regiões genômicas envolvidas com a característica de interesse (LI & STEPHENS, 2003). Como limitantes dos GWAS estariam a adequação de modelos e metodologias estatísticas, o tamanho amostral, a colinearidade advinda do desequilíbrio de ligação entre os marcadores e a interpretação dos resultados que podem conduzir a erros (CANTOR, LANGE, SINSHEIMER, 2010; ELAM *et al.*, 2019; PEARSONS & MANOLIO, 2008).

2.6.1 Etapas do GWAS

Segundo (BUSH & MOORE, 2006; MCKINNEY *et al.*, 2009), tipicamente os GWAS são constituídos por cinco etapas: Planejamento e levantamento de informações para o estudo e fundamentação para a seleção dos grupos caso e controle; Coleta das amostras biológicas e genotipagem do material genético dos indivíduos selecionados; Realização do controle de qualidade sobre os dados gerados pela genotipagem; Realização da análise de associação propriamente dita para os SNPs que passarem pelo controle de qualidade; Validação dos SNPs que se apresentam associados no estudo.

2.6.2 Controle de qualidade nos GWAS

Os GWAS, como qualquer estudo, não são isentos de apresentar erros, sendo que, os mais comumente descritos, são os erros do tipo I (falso positivo) e II

(falso negativo) (MEDICINE & MANOLIO, 2010). Esses podem ser provocados por erros de genotipagem e também pelo grande número de SNP e amostras utilizadas pelo qual são necessários procedimentos que garantam o controle de qualidade (CQ) dos marcadores SNP genotipados (SABOURIN *et al.*, 2019; ZIEGLER, KÆNIG, THOMPSON, 2008). A não remoção de SNPs ou amostras que apresentem erros podem alterar os resultados da análise, sendo esse processo de vital importância para o estudo (BOLORMAA *et al.*, 2011; DO CARMO, 2012; SABOURIN *et al.*, 2019). Os critérios utilizados no CQ dos GWAS podem ser diversos, entre os mais destacados, estão CQ da amostra e CQ dos SNPs. O CQ da amostra inclui eliminação de amostras repetidas, a subestrutura da população e a estratificação da população. Em relação ao CQ dos SNPs, este é influenciado pelo *Call Rate* (eficiência da genotipagem) que é a proporção de indivíduos no estudo para os quais as informações correspondentes do SNP não estão ausentes, tendo como valores recomendados $\geq 98\%$; equilíbrio de Hardy-Weinberg; frequência do alelo menos comum (MAF) para o SNP (ANDERSON *et al.*, 2011; FREIMER & SABATTI, 2005; REED *et al.*, 2015; SOUTHAM *et al.*, 2011; STARK, 2005; TURNER *et al.*, 2012). Os SNPs que não atingirem o valor de *Call Rate* mínimo (98%) podem ser indicativos de associações falso-positivas (BRZYSKI *et al.*, 2017; ZANELLA, 2011). Os critérios no CQ são específicos para cada estudo, não havendo um padrão a ser seguido pois depende dos objetivos da pesquisa e da particularidade do conjunto de dados (DELANO *et al.*, 2008; FREIMER & SABATTI, 2005). Outro critério importante no controle de qualidade é a quantidade e qualidade das amostras de DNA, as quais podem interferir na detecção de SNPs, influenciando a emissão de fluorescência, podendo aumentar o número de *No Call* (FU *et al.*, 2009; PSIFIDI *et al.*, 2015).

2.7 Estratificação da população

Estratificação populacional é a presença de uma diferença sistemática nas frequências alélicas entre subpopulações, em uma população, devido a diferentes ancestrais-A presença de estratificação populacional em GWAS é considerada como um dos principais fatores de confusão para a interpretação dos resultados do estudo (DO CARMO, 2012; HELLWEGE *et al.*, 2018; LAURIE *et al.*, 2010; SUL & ESKIN,

2018; TUCKER, PRICE, BERGER, 2014). A diferença alélica entre populações estratificadas pode resultar na presença de associação significativa dos SNPs e fenótipos, entretanto sem efeito causal direto (HELLWEGE *et al.*, 2018), pelo qual é recomendado realizar a análise de componentes principais para a verificação da estratificação e identificar grupos originados por diferentes populações ancestrais, impactando diretamente os resultados das análises (BOUAZIZ, AMBROISE, GUEDJ, 2011; DEVLIN & ROEDER, 1999; PRICE *et al.*, 2006; SUL, ID, ESKIN, 2018; TUCKER, PRICE, BERGER, 2014); (LIU, *et al.*, 2013).

3 OBJETIVOS

3.1 Obejtivo Geral

Identificar regiões genômicas associadas à característica lábio leporino na raça Gir leiteiro.

3.2 Objetivos Específicos

1. Identificar SNPs associados à característica lábio leporino.
2. Identificar genes candidatos associados à característica lábio leporino.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção da população alvo

Grupos amostrais independentes foram analisados com a metodologia de casos e controles. O grupo dos casos foi composto por 16 animais (7 fêmeas, 7 machos e 2 não informados) da raça Gir, nascidos entre os anos de 2010 e 2017, filhos de 12 touros e 16 matrizes e escolhidos por apresentar o fenótipo de “lábio leporino”. A seleção dos animais se deu a partir dos rebanhos colaboradores do Programa Nacional de Melhoramento do Gir Leiteiro, desenvolvido pela parceria entre a Embrapa Gado de Leite e a Associação Brasileira dos Criadores de Gir Leiteiro (ABCGIL). O grupo dos controles foi composto por 48 animais machos da raça Gir Leiteiro, apresentando fenótipo saudável e adequado as características do animal modelo, descritas e requeridas pela ABCGIL. Os critérios de exclusão desse grupo incluíram aparente familiaridade com qualquer um dos membros do grupo de casos, selecionados por uma matriz de parentesco genômica, adicionando informações de linhagem obtidas no banco de dados da ABCZ (Associação Brasileira dos Criadores de Zebu).

4.2 Coleta de dados fenotípicos, demográficos, genealógicos e amostras biológicas

Para os animais do grupo caso, os dados fenotípicos, demográficos e genealógicos, assim como amostras de cada animal (sangue ou pelo), foram enviados pelos produtores e posteriormente confirmados na base de dados da consulta individual do Centro de Referência da Pecuária Brasileira – ZEBU da Associação Brasileira dos Criadores de Zebu (ABCZ, 2019).

As amostras foram coletadas de acordo com o guia de “coleta de amostras de sangue e pelo para extração de DNA” da Embrapa Gado de Leite e posteriormente

encaminhadas para o Laboratório de Genética Molecular desta instituição, seguindo as orientações no que diz respeito ao armazenamento, transporte e expedição.

4.3 Extração de material genético (DNA) e genotipagem dos marcadores SNPs

O DNA das amostras foi extraído por meio da metodologia de fenol/clorofórmio modificada de Sambrook *et al.*, (2001) e avaliado quanto a sua concentração e pureza por meio de espectrofotometria de nanovolume NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, EUA). As amostras foram submetidas a análise de SNPs em painel de alta densidade BovineHD Genotyping BeadChip (Illumina, San Diego, EUA), sob o ensaio de genotipagem Infinium HD na plataforma iScan, de acordo com as instruções do fabricante. As genotipagens foram contratadas de laboratório privado externo e os resultados encaminhados para a equipe da Embrapa Gado de Leite.

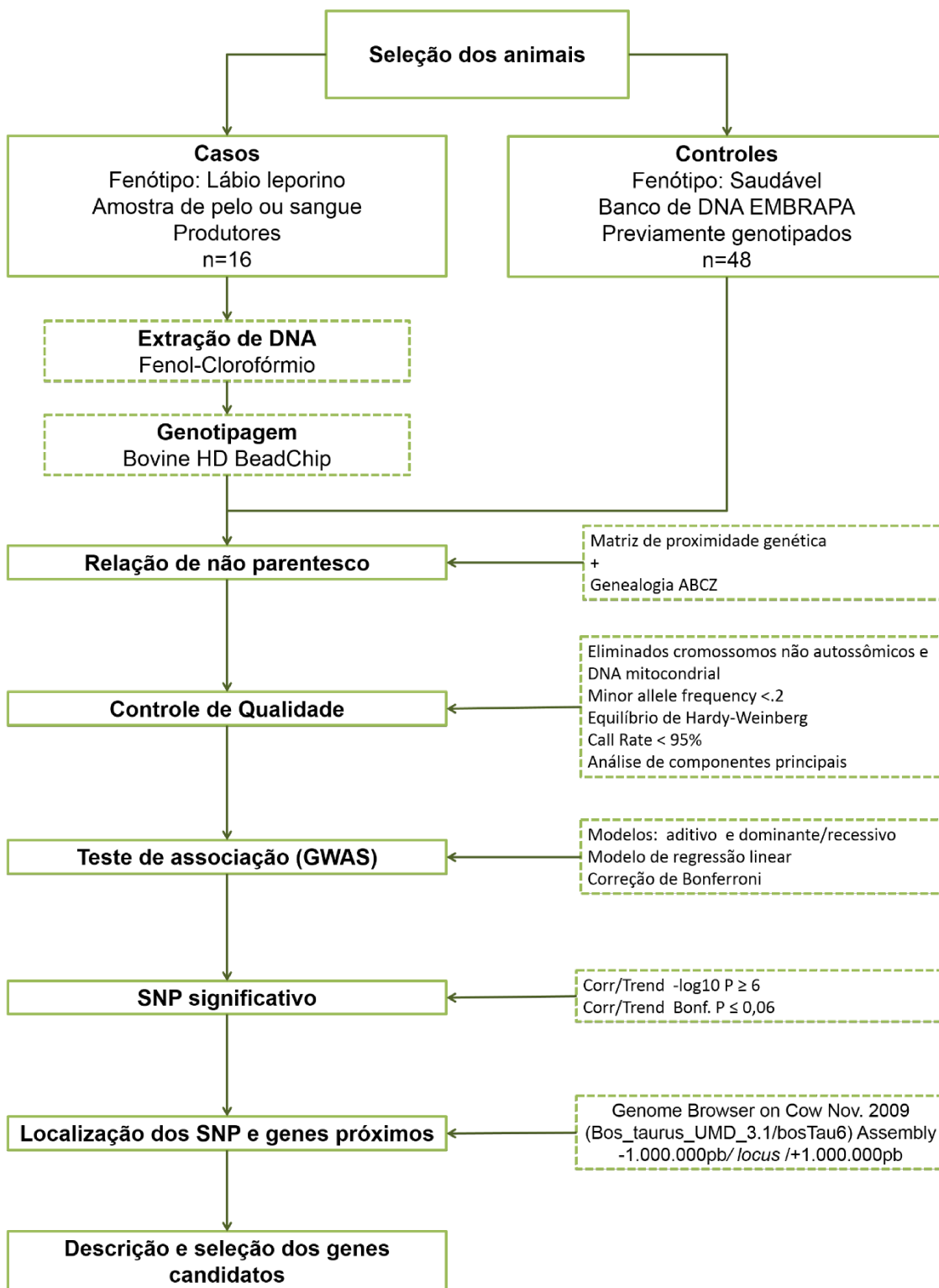
Antes da realização das análises de associação, os dados genotípicos de cada grupo amostral foram submetidos aos critérios de controle de qualidade utilizando o software SVS Golden Helix (Golden Helix, Bozeman, EUA), com intuito de reduzir associações espúrias e aumentar a precisão das análises genômicas. Desse modo, foi realizada uma filtragem inicial com remoção de todos os marcadores não autossômicos, ou seja, os SNP dos cromossomos X, Y e DNA mitocondrial. Nessa etapa também foram identificados e removidos os SNPs mapeados para a mesma posição genômica, os SNPs do conjunto de dados com *call rate* <95%, MAF < 2 % e o equilíbrio de Hardy-Weinberg <10⁻⁶. Também foi observado o escore de qualidade de genotipagem de cada SNP (GC score). Todos os casos e controles foram avaliados pela análise de componentes principais para estratificação populacional (ZONDERVAN *et al.*, 2014).

4.4 Estudos de associação ampla do genoma (GWAS) e estratégias para a identificação de genes candidatos

As análises foram conduzidas utilizando o pacote computacional *SNP and Variation Suite 7 - SVS7* (Golden Helix, Bozeman, EUA). As análises de associação genômica ampla foram realizadas usando dois modelos, aditivo e dominante, levando em consideração as informações desses modelos e as equações que estimam a chance relativa em *odds ratio* (RM) ou em coeficientes regressão (β). A correção de bonferroni foi calculada usando o procedimento de teste múltiplo da plataforma SVS7. Os resultados dos testes foram apresentados em gráficos do tipo “Manhattan” e Quantil-Quantil e os valores de controle genômico foram calculados ($\lambda_{GC} = 1$).

Um SNP foi considerado como significativo quando apresentava um *Corr/Trend* $\log_{10} P \geq 6$ e o *Corr/Trend* Bonf. $P \leq 0,06$. As regiões genômicas onde foram obtidos SNP significativos em cada modelo foram exploradas para identificar os genes candidatos subjacentes aos *loci*, tendo como ponto central o SNP identificado como significativo e abraçando uma área de $\pm 1.000.000$ pb. A localização de SNPs e anotações gênicas foi baseada na base de dados do UCSC Genome Browser on Cow Nov_2009 (Bos_taurus_UMD_3.1 - bostau6 - Genome - Assembly - NCBI).

4.5 Detalhamento do desenho experimental



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Controle de qualidade dos genótipos

O "*call rate*" médio dos marcadores antes do QC foi acima de 98%. As análises de QC removeram um total de 313.273 SNPs do conjunto de dados. Com base nos critérios amostrais nenhum animal foi excluído das análises. O total de marcadores autossômicos e de alta qualidade foi de 464.723 SNP correspondendo a aproximadamente 59.73% do total disponibilizado no ensaio empregado para análise.

5.2 Estudos de associação ampla do genoma

Para determinar a origem genética da doença, é necessário estar ciente da importância da etiologia, por isso foram revisados estudos semelhantes em outras espécies para tentar elucidar o tipo de herança do lábio leporino em bovinos. Na maioria dos resultados de GWAS relatados na literatura, o modelo de herança aditiva foi tomado como base, sendo que esse modelo indica que o risco de contrair a doença aumenta por um fator constante a cada cópia adicional do alelo de risco (CLARKE *et al.*, 2011). No entanto, esse modelo pode perder seu poder estatístico se, em alguns locais, o modelo de herança genética for recessivo ou dominante e, com isso, regiões genômicas podem não ser detectadas, uma vez que podem ser uma das principais causas da doença. BÖHMER *et al.*, (2018) investigaram por meio de meta-análise, se os *loci* de risco das fissuras labiais poderiam ser identificados por meio da análise dos efeitos genéticos dominantes ou recessivos com dados SNP encontrados anteriormente nos estudos da GWAS. No entanto, os dados obtidos neste estudo mostram que não há evidências suficientes para mostrar que os modelos dominantes ou recessivos conferem um risco aumentado de lábio leporino em populações não endogâmicas (BÖHMER *et al.*, 2018). Desse modo, com base na carência de estudos conclusivos na literatura, foram avaliados dois métodos (dominante e aditivo), cujos

resultados combinados podem aumentar a probabilidade de identificação de informações mais relevantes sobre a herança dessa característica.

Um total de 115 SNPs significativos foram encontrados pelo método aditivo e 204 SNPs pelo método dominante, sendo 54 SNPs em comum, sendo que a maioria destes com elevada probabilidade de associação ($P < 0,05$) com o lábio leporino. Esses dados podem estar apoiando a ideia de um modelo de herança genética dominante em nossa população de estudo.

Manhatan plots do estudo de associação ampla do genoma dos modelos aditivo e dominante são apresentados na Figura 1, onde vários SNPs foram identificados como possíveis candidatos ao fenótipo estudado. Para essas regiões genômicas, foram encontrados 265 SNPs significativos em todo o genoma.

Os resultados da busca por regiões associadas foram organizados em uma tabela (Anexo 1) para identificar os genes candidatos, alocando SNP significativamente associados e sua posição cromossômica determinada pelo GWAS. Áreas em cinza representam *overlap* ou *match* das duas metodologias (aditivo, dominante). Na última coluna são mostrados os genes próximos com evidência de causar lábio leporino.

A região genômica associada e sua vizinhança foram rastreadas quanto à anotação gênica e possíveis genes candidatos posicionais próximos a região foram identificados usando o *assembly* UMD3.1. A listagem de todos os SNP significativamente associados contendo sua posição cromossômica para o estudo de associação ampla do genoma para lábio leporino em bovinos leiteiros da raça Gir está descrita no Anexo 1.

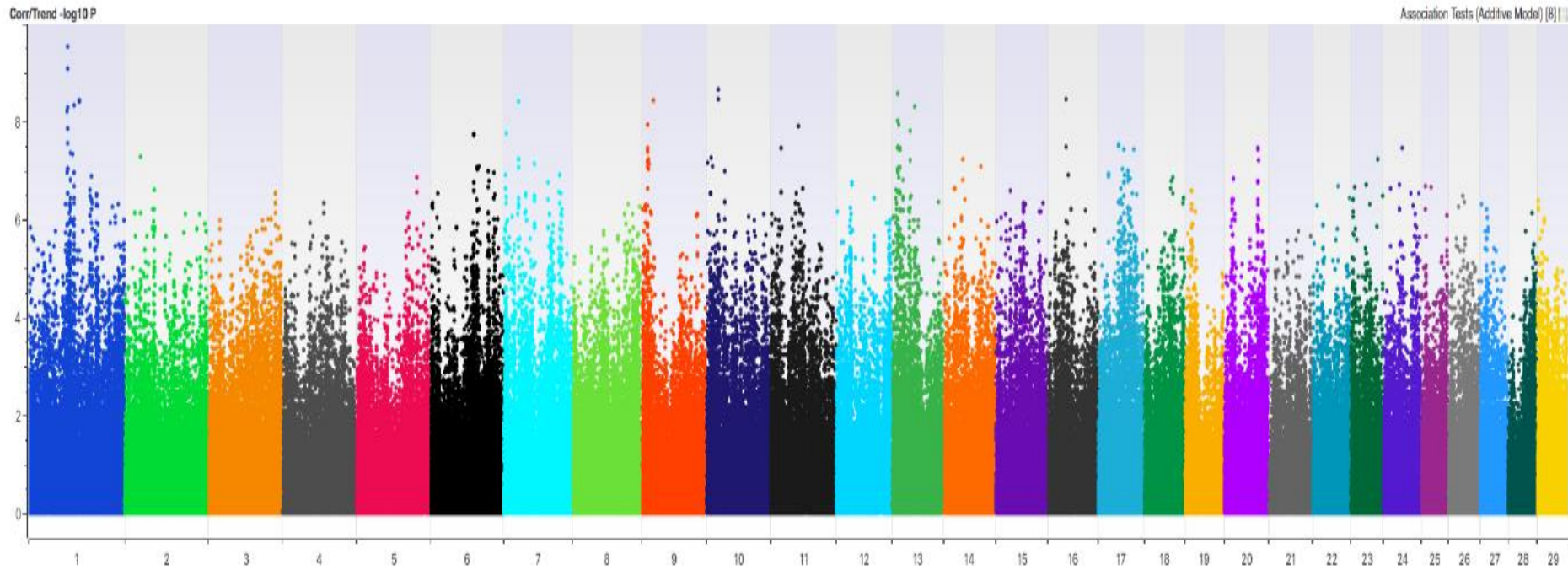


Figura 1. Gráfico de Manhattan referente ao modelo aditivo do estudo de associação ampla do genoma para o lábio leporino (caso/controle) em bovinos da raça Gir. Os valores de $\text{Log}_{10}P$ de todo o genoma para cada efeito SNP são plotados contra sua posição em cada cromossomo. Os cromossomos são diferenciados por cores e numeração.

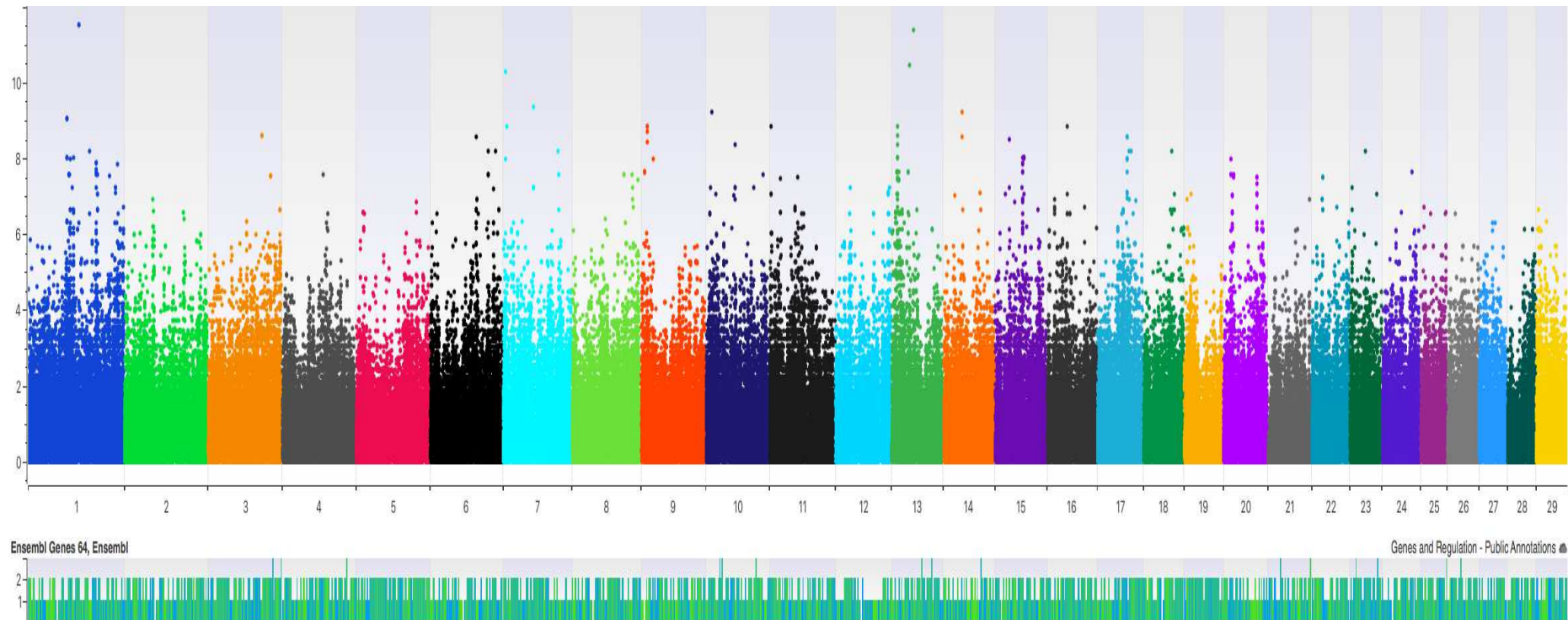


Figura 2. Gráfico de Manhattan referente ao modelo dominante do estudo de associação do genoma para o lábio leporino (caso/controle) em bovinos da raça Gir. Os valores de $\text{Log}_{10}P$ de todo o genoma para cada efeito SNP são plotados contra sua posição em cada cromossomo. Os cromossomos são diferenciados por cores e numeração.

Como uma primeira abordagem, foram explorados os genes mais próximos das regiões genômicas que foram significativamente identificadas, no sentido de encontrar relações com genes já descritos na literatura como potenciais responsáveis pelo fenótipo lábio leporino. Adicionalmente, os resultados das análises de associação identificaram várias regiões intergênicas significativas, sugerindo que existem variantes etiológicas do lábio leporino em bovinos leiteiros que se situam fora da sequência interna do gene, talvez em elementos reguladores, e podem funcionar como moduladores da expressão gênica. Apoiando esta teoria vários estudos demonstram que as regiões intergênicas são afetadas com mais frequência pela mutação de um único nucleotídeo do que outras regiões transcritas nas proximidades da sequência de codificação, como íntrons, promotores, potenciadores e regiões não traduzidas (MACINTYRE *et al.*, 2014; PASTINEN, 2010).

No total, as análises de associação (caso/controle) foram capazes de identificar 265 SNPs significativos distribuídos em 100 regiões genômicas, nas quais foram identificados 28 genes candidatos associados aos fenótipos lábio leporino, listados a seguir: IGSF11, BASP1, APC, BAMBI, GRIA2, XXYLT1, DMP1, NOX5, SMAD7, TBX2, FGF12, SPOCK1, TPM1, LEFTY2, CYP2S1, SLC33A1, FGD3, LACTB, ADAMTS6, ALKBH8, EPHB1, ZNF462, RPS27, ANKRD50. As funções fisiológicas de cada gene candidato identificado estão descritas na Figura 3.








Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6	Grupo 7
	 VIT B12					
BAMBI ALKBH8 SPRY1 TBX2 SMAD7 XXYL1 FGF12 ZNF462 LEFTY2	MMADHC LMRBD1	EPBH1 GRIA2	LACTB RPS27 MACROD2 ANKRD50 SLC33A1 SPOCK1 FGD3 APC CYP2S1 ADAMTS6 BASPI	TPM 1	NOX5 IGSF11	DMPI

Figura 3. Classificação dos genes encontrados nas análises de associação (caso/control) para a característica lábio leporino na raça Gir Leiteiro, em relação às funções fisiológicas. Na primeira coluna (Grupo 1), genes com função na formação embrionária e fetal. Na segunda coluna (Grupo 2), genes relacionados ao metabolismo da vitamina B12. Na terceira coluna (Grupo 3), genes relacionados à função do sistema nervoso e neuronal. Na quarta coluna (Grupo 4), genes relacionados à função e estrutura celular. Na quinta coluna (Grupo 5), genes relacionados ao crescimento e função do músculo. Na sexta coluna (Grupo 6), genes relacionados à função espermática. Na sétima e última coluna (Grupo 7), genes relacionados à formação e metabolismo mineral ósseo.

Como parte da descrição fisiológica de cada grupo de genes relacionados ao lábio leporino, o Grupo 1 contém nove genes relacionados ao desenvolvimento embrionário, os quais são discutidos a seguir. O gene *BAMBI* (inibidor ligado à membrana BMP e ativina) codifica uma glicoproteína transmembranar que funciona como reguladores negativos do TGF-beta durante a embriogênese precoce e particularmente durante a palatogênese (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). O estudo realizado em camundongos, conduzido por PARADA & CHAI (2012), sugere que a proteína gerada pelo gene *BAMBI* bloqueia a sinal BMP no desenvolvimento do embrião, gerando malformações como lábio leporino. Esse estudo foi dificultado pela alta taxa de letalidade embrionária precoce de camundongos nulos dos inibidores ligados a membrana BMP e ativina, portanto, a função epitelial da BMP, durante o desenvolvimento craniofacial, ainda não está totalmente esclarecida.

O gene *ALKBH8* (AlkB Homogo 8 ARNt Metiltransferase) é necessário para a sobrevivência normal após danos no DNA e pode inibir a apoptose e promover a

sobrevivência e angiogênese das células. (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Diversos estudos mostram que esse gene pode causar diversas doenças as quais incluem os distúrbios do desenvolvimento intelectual e físico. (SHIMADA *et al.*, 2009; SPELSBERG; WEBSTER; PIKLER, 1976) como mostram pesquisas conduzidas por KRGOVIC *et al.* (2011) onde foi descrito o fenótipo clínico em pacientes com deleção da região genômica contendo *ALKBH8*, que geralmente varia de acordo com o tamanho e a posição da deleção. As características fenotípicas mais comuns observadas nesses pacientes são retardo mental leve a grave, atraso no desenvolvimento, fenda palatina ou arco palatino alto e em muitos casos com lábio leporino.

O gene *SPRY1* (Sprouty RTK Sinalização Antagonista 1) funciona como um precursor antagonista do fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e pode modular negativamente a organogênese do aparelho respiratório (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). YANG *et al.* (2010) descrevem que, durante o desenvolvimento dos vertebrados, as proteínas Spry exibem padrões de expressão sobrepostos, particularmente em estruturas craniofaciais e surtos de membros. Por outra parte, YU *et al.* (2017) realizou um estudo GWAS, no qual o gene *SPRY1* é um gene candidato para nosso fenótipo de interesse. (YU *et al.*, 2017). A literatura mostra um estudo conduzido por ZHOU *et al.* (2019) no qual foram identificadas interações entre genes da família *SPRY* em 1.908 humanos com lábio leporino. Esse estudo revelou a importância de possíveis interações gene-gene para entender a arquitetura dessa característica.

O gene *TBX2* (T-Box Transcription Factor 2) participa na regulação transcricional dos genes necessários para a diferenciação do mesoderma e é necessário para a formação do canal atrioventricular cardíaco e palatogênese (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Um estudo realizado por ZIRZOW *et al.* (2009) mostra que os espectros fenotípicos de camundongos com deficiência de *Tbx1* se assemelham aos de pacientes heterozigotos da síndrome DiGeorge/velocardiofacial (DGS / VCFS), que é um distúrbio humano comum, geralmente associado a deleções no cromossomo 22q11, no qual o *TBX1* reside. Em outro estudo, realizado por LIU *et al.* (2018), camundongos nocaute homozigotos para o gene *Tbx2* exibem canal atrioventricular, edema pericárdico, fenda palatina, polidactilia e letalidade embrionária, indicando que o gene *TBX2* possui papel crucial durante o desenvolvimento embrionário.

O gene *SMAD7* (SMAD Family Member 7) é um antagonista de sinalização da superfamília do receptor TGF-1 beta (fator de crescimento transformador beta 1) (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). XIAOZHUAN *et al.* (2017) detectaram a expressão de *Smad7* em células fetais mesenquimais e parenquimatosas, relacionadas com a aparência de fenda palatina. (BARTZELA; CARELS; MALTHA (2017) sugeriram que o gene *XXYL1* (xilosido xilosiltransferase 1) tem uma relação estreita com a microssomia hemifacial por meio de microduplicações deste gene, e sugeriram que estas microduplicações têm um papel importante durante a organogênese principalmente facial.

O gene *FGF12* (fator de crescimento de fibroblastos 12) tem como tarefa a atividade do fator de crescimento e a ligação do canal iônico (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Os membros da família *FGF* possuem extensas atividades mitogênicas e de sobrevivência celular e estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, incluindo desenvolvimento embrionário, crescimento celular, morfogênese, reparo de tecidos, crescimento e invasão de tumores (STANIER & PAUWS, 2012).

Estudos elaborados por JUGESSUR (2011) e ZHANG *et al.* (2012), em humanos, indicam que o gene *FGF12* pode estar associado à fenda labial em populações da Europa e da Ásia. Por esse motivo, DE AQUINO *et al.*, (2013) decidiram fazer um estudo da associação desse gene na população brasileira, porém argumentam que a ancestralidade genética da população é muito variada e a predisposição a esses marcadores de doenças pode ser diferente na mesma população. Portanto, seus resultados indicaram que o gene *FGF12* apresenta uma falta de envolvimento com o lábio leporino nessa população, além de sugerir que é um gene de baixa penetrância para o lábio leporino e merece mais estudos.

O gene *ZNF462* (Zinc Finger Protein 462) é um fator mesodérmico nuclear do dedo de zinco envolvido na transcrição, regulando a estrutura e organização da cromatina. Participa da pluripotência e diferenciação das células-tronco embrionárias, regulando *SOX2*, *POU5F1 / OCT4* e *NANOG*. As doenças associadas ao *ZNF462* incluem a síndrome do dismorfismo facial da ptose-metopia e a síndrome da incapacidade intelectual não-sindrômica autossômica dominante (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Num estudo realizado por VIERA *et al.* (2008) foi identificado o gene *ZNF462* e verificaram que anomalias dentárias são parte do espectro DEK fenótipo lábio leporino. Assim, num estudo realizado por WEISS *et al.*

(2017), esses autores sugerem o envolvimento do gene *ZNF462* na regulação transcricional durante a embriogênese que afeta a migração da crista neural e o desenvolvimento do cérebro. Por outra parte, o gene *LEFTY2* (fator de determinação esquerdo-direito 2) codifica um ligante secretado da superfamília da proteína TGF beta. A pré proteína codificada é processada proteoliticamente para gerar a proteína madura, que desempenha um papel na determinação da assimetria esquerda-direita dos sistemas orgânicos durante o desenvolvimento (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). MENO *et al.* (1997), sugerem a relação desse gene como parte dos precursores do fenótipo do lábio leporino. Confirmando essa suposição, num estudo de correlação da simetria facial em crianças com fissura labial, conduzido por MILLER *et al.* (2014), foi sugerido que esse gene contribui diretamente para as características do espectro da fissura labial.

O Grupo 2 de genes é relacionado ao metabolismo da vitamina B12, a qual o papel dessa vitamina é pouco estabelecido em gado de leite, mas o metabolismo dela, em outras espécies, é de importância para o aparecimento de lábio leporino. Os genes *MMADHC* (gene de metabolismo da cobalamina associada D) e o gene *LMRBD1* (LMBR1 Domínio Contendo 1) codificam proteínas que ajuda a converter vitamina B12 (cobalamina) em adenosilcobalamina (AdoCbl) ou metilcobalamina (MeCbl), sendo ambos de função enzimática (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Como descrito na literatura, biologicamente, causam a elevação da homocisteína ou do ácido metilmalônico, ou ambos, no sangue e na urina e podem levar a defeitos congênitos, incluindo defeitos cardiovasculares e dismorfologia facial e lábio leporino (BLACK, 2008; GADHOK *et al.*, 2011). Como a deficiência de folato ou Cbl pode ter efeitos bioquímicos semelhantes, foi sugerido por MORENO-GARCÍA *et al.* (2013) que uma deficiência combinada de Cbl e folato contribui para os defeitos do tubo neural (NTD) e outros defeitos congênitos. Nesses casos, podem estar ocorrendo interações genótipo-ambiente, tanto pela quantidade de vitamina B12 ingerida pelo animal, quanto pelo seu metabolismo correto. No estudo realizado por CONSTANTINOU *et al.* (2015), eles explicam que o distúrbio da cobalamina F (cbfF), causado por mutações homozigotas ou heterozigotas compostas no gene *LMBRD1*, é uma causa reconhecida de atraso no desenvolvimento, pancitopenia e falta de crescimento que podem ocorrer no período neonatal. Ainda, existem casos com características atípicas de sutura incluindo metóticas proeminente, palato, agenesia

renal unilateral e anormalidades do fígado, que se estendem do espectro fenotípico da doença.

O Grupo 3 é formado por genes relacionados à função do sistema nervoso e neuronal, assim, o gene *EPBH1* (Ephrine receptor B1) foi identificado como mediador do guia axonal (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). DAVY, AUBIN & SORIANO (2004) mostraram que, em camundongos, a desativação deste gene produz lábio leporino com fenda palatina. Em estudos de síndrome craniofrontonasal em humanos, foram identificadas mutações nesse gene que resultam em uma variedade de defeitos, incluindo lábio leporino (TORII *et al.*, 2007) e, em pesquisas recentes conduzidas por XAVIER, MILETICH & COBOURNE (2016), têm sido relacionados ao desenvolvimento embrionário do lábio e do lábio leporino. Nesse caso, pode-se observar que o gene está relacionado ao lábio leporino síndrômico e não síndrômico, no entanto, as informações sobre esse assunto são limitadas. O gene *GRIA2* (subunidade 2 do tipo de receptor de glutamato iônico AMPA) codifica receptores de neurotransmissores excitadores predominantes no cérebro de mamíferos e são ativados em uma variedade de processos neurofisiológicos normais (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). CALCIA *et al.* (2013) relatam que, além de estar relacionado à função cognitiva, esse gene pode estar fortemente relacionado ao lábio leporino. Explicam também que os casos em que a deleção sobreposta existe, mas as mesmas características fenotípicas não ocorrem, podem ser devidas ao nível de penetrância e a um possível efeito de modificação de fatores genéticos.

O Grupo 4 inclui 11 genes fortemente relacionados à função celular. O gene *LACTB* (Lactamase Beta) codifica uma proteína chamada proteína mitocondrial que atua como um regulador do metabolismo lipídico mitocondrial (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Na literatura, já existem relatos de várias características fenotípicas relacionadas ao gene *LACTB*. Em modelos murinos, conduzidos por BAINZ *et al.* (2004) e por GAJERA *et al.* (2019), além de mostrar que o gene interfere na obesidade, mostra seu papel também na característica lábio leporino. Além disso, num estudo em seres humanos, usando casos e controles e estudos de associação familiar, a expressão de *LACTB* apresentou resultados significativos para o genótipo do lábio leporino (GE *et al.*, 2019). De qualquer maneira, o seu papel no desenvolvimento de lábio leporino não é muito claro, no entanto, pode-

se especular que *LACTB* tem um papel fisiológico no fluxo de metabólitos mitocondriais, o que poderia afetar o crescimento e desenvolvimento celular.

O gene *RPS27* (proteína ribossômica S27) codifica um membro da família S27e de proteínas ribossômicas e um componente da subunidade 40S. A proteína codificada contém um domínio de dedo de zinco do tipo C4 que pode se ligar ao zinco e se ligar ao ácido nucléico. Mutações nesse gene foram identificadas em vários pacientes com melanoma e em pelo menos um paciente com anemia de Diamond-Blackfan (DBA) (INSTITUTO DE CIÊNCIA WEIZMANN, 2019), a qual tem entre as anormalidades mais comumente relatadas microcefalia, hipertelorismo, epicanto, ptose, microtia, orelhas baixas, ponte nasal larga e deprimida, fenda labial/palato, palato alto e arqueado, micrognatia, linha fina anterior baixa (CLINTON & GAZDA, 2009).

A proteína codificada pelo gene *MACROD2* (ribossil- hidrolase 2 mono-ADP) transloca-se do núcleo para o citoplasma após dano ao DNA. As doenças associadas ao *MACROD2* incluem hipogonadismo hipogonadotrópico 21 com ou sem anosmia e síndrome de Kabuki que é tipicamente caracterizada por retardo de crescimento pós-natal, dismorfismo craniofacial, defeitos cardíacos e lábio leporino (INSTITUTO DE CIÊNCIA WEIZMANN, 2019; LEI *et al.*, 2016). Paik *et al.* (2016), observaram incidência de fenda palatina isolada em 50% a 69,7% dos pacientes e fenda palatina submucosa em 15,2% a 50% dos pacientes. O gene *ANKRD50* (Ankyrin Repeat Domain 50) pode causar, em humanos, a síndrome de deleção cromossômica 4q que é uma condição rara, com incidência estimada de 1 em 100.000. Segundo relatado por STREHLE *et al* (2012) e CONTE (2016), o espectro clínico geralmente inclui problemas no desenvolvimento craniofacial, digital, esquelético e cardíaco. Também é reportado que o gene *SLC33A1* (Solute Carrier Family 33 Member 1) está associado a anomalias tais como esfingolipidose, lábio leporino, aneurisma da aorta, família torácica, alterações morfológicas e aterosclerose (COMPUTATIONAL MOLECULAR DESIGN & METABOLOMICS LABORATORY, 2019; PIETROCOLA *et al.*, 2015).

O gene *SPOCK1* (SPARC Osteonectina, Cwcv e Kazal como domínios proteoglicanos 1) está envolvido na ligação do íon cálcio e a atividade do inibidor da endopeptidase do tipo cisteína (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Estudos conduzidos por BEATY *et al.* (2010) e ZHANG, CHEN & ROSS, (2012) apontam que a relação entre *SPOCK1* e lábio leporino poderia ser mediada por MafB

que é mais conhecido como um regulador do desenvolvimento embrionário inicial. Assim, num estudo realizado por Moreno *et al.* (2009) destinado a identificar o risco de lábio leporino, foi realizado um GWAS em 388 famílias multiplex de sete populações, revelando genes candidatos potenciais com base na expressão do gene ou papel conhecido nas síndromes labiais das fissuras que incluíam o gene *FGD3*.

O gene *APC* (Regulador da Via de Sinalização WNT da APC) codifica uma proteína supressora de tumor que atua como antagonista da via de sinalização de Wnt e participa de outros processos, como migração e adesão celular, ativação transcricional e apoptose. Num estudo em seres humanos, com uma população de etnia caucasiana, VIJAYAN *et al.* (2018) investigaram a associação direta desse gene e do lábio leporino. Este estudo mostrou, pela primeira vez, a associação direta desse gene candidato ao lábio leporino. Num estudo realizado por REYNOLDS *et al.* (2019) explicam como fendas sindrômicas e não sindrômicas orofaciais foram atribuídas a mutações em genes de componentes múltiplos de sinalização de Wnt. JACOBS *et al.* (2013) destacam que o *CYP2S1* pode modular a toxicidade induzida por dioxinas e ácido retinóico durante o desenvolvimento do palato. Em outras pesquisas em modelo murino, conduzidos por LAN & YU (2018), foi realizado um sequenciamento completo do exoma seguido por genótipos de alelos específicos e descobriram que a fenda palatina e os defeitos esqueléticos na linha de camundongo estudada segregam com uma mutação sem sentido no gene *ADAMTS6*. Na literatura, é descrito um estudo com modelos murinos, liderados por UZUMCUA *et al.* (2009), que indicam que a síndrome de Möbius poderia estar envolvida na regulação dos transcritos codificados pelo gene *BASP1*. A síndrome de Möbius é um distúrbio raro caracterizado principalmente por paralisia facial congênita, frequentemente acompanhada de anormalidades de abdução ocular e ocasionalmente associada a malformações orofaciais, de membros e músculo-esqueléticas (HERNÁNDEZ, ROJAS, GARCÍA, 2017).

Em relação ao Grupo 5, foi identificado um gene candidato relacionado com a função muscular. Esse gene, chamado de *TPM 1* (tropomiosina 1), é um membro da família das proteínas de ligação à actina da tropomiosina que participam do sistema contrátil dos músculos estriados e lisos e do citoesqueleto de células não musculares (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Evidências adicionais aportadas por RAFIGHDOOST *et al.*, (2019) suportam uma forte associação entre *TPM 1* e o risco de lábio leporino não sindrômica com ou sem fenda palatina. Outros trabalhos indicam

que polimorfismos de *TPM1* e sua regulação podem contribuir para o lábio leporino durante o desenvolvimento craniofacial em fases precoces da embriogênese (LUDWIG *et al.*, 2017; QIAN *et al.*, 2016), embora o seu papel específico para a morfogênese do palato não é clara (MORENO URIBE *et al.*, 2017).

Os genes do Grupo 6 a serem descritos possuem uma forte ligação com a função dos espermatozoides. O gene *NOX5* (NADPH-oxidase 5), que se expressa predominantemente em testículos e áreas ricas em linfócitos dos nodos linfáticos e do baço, codifica uma NADPH oxidase dependente de cálcio que gera superóxido e funciona como um canal de prótons dependente de cálcio que pode regular processos dependentes de redox em linfócitos e espermatozoides e pode desempenhar um papel no crescimento e apoptose celular (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). BANFI *et al.* (2001) sugerem que o superóxido e seus derivados estão envolvidos na regulação das funções fisiológicas, desde a detecção de oxigênio e regulação da pressão arterial até a ativação de linfócitos e a fusão de espermatozoides. Isso se torna muito importante quando pensamos nas técnicas de reprodução bovina e na idade dos touros destinados à reprodução. AITKEN & CLARKSON (1987) relataram que o esperma pode gerar seu próprio dano ao DNA como resultado de altos níveis de geração de radicais livres. A presença de tais danos aumenta a capacidade do esperma de gerar NADPH, o substrato para a geração de *Nox5*. Em conjunto a esse aumento no dano ao DNA, aumenta a incidência de mutações genéticas dominantes, como fenda labial e fenda palatina.

O gene *IGSF11* (Membro da Superfamília da Imunoglobulina 11) compartilha uma homologia significativa com o receptor coxsackievirus e adenovirus e a molécula seletiva de adesão celular endotelial (ESAM) (WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). ISHORST *et al.* (2018), utilizando GWAS em amostras humanas, indicaram ao gene *IGSF11* como candidato fortemente associado ao lábio leporino.

No Grupo 7, é descrito o papel do gene *DMP1* (fosfoproteína ácida da matriz dentina), envolvido no metabolismo ósseo mineral, e que codifica uma proteína da matriz extracelular a qual é essencial para a mineralização adequada do osso e da dentina, estando presente em várias células dos tecidos ósseo e dentário. Em humanos, sabe-se que mutações no gene causam hipofosfatemia autossômica recessiva, uma doença que se manifesta como raquitismo e osteomalácia. É importante enfatizar que a estrutura do gene é conservada em mamíferos

(WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE, 2019). Em um estudo realizado em porcos, LIU *et al.* (2019) relatam que, durante a morfogênese embrionária, o gene *DMP1* estava super expresso. Isso pode ser devido às altas demandas de mineralização óssea necessárias para esse estágio de desenvolvimento.

Já se sabe que em bovinos, a expressão fenotípica (que inclui casos unilaterais de direita ou esquerda e bilaterais, com ou sem fenda palatina), pode representar diferentes variantes genéticas (REINARTZ & DISTL, 2017). Além disso, tem sido descrito que o lábio leporino pode ser apresentado de maneira discreta, com lesões faciais imperceptíveis denominadas microformas, difíceis de diagnosticar, uma vez que a região do lábio apresenta variações sutis de tecidos moles, que podem ser ignoradas ao usar métodos tradicionais de exploração facial (HECKLER, OESTERLE, JABALEY, 2018).

A fenotipagem precisa dos casos e controles é crucial para entender a epidemiologia e a etiologia do lábio leporino, pois o poder de detectar efeitos é enfraquecido quando grupos heterogêneos são tratados como uma única entidade (DIXON *et al.*, 2011).

No presente trabalho, não foi possível obter informações detalhadas para verificar se existiam variações no fenótipo lábio leporino nos animais do grupo caso. Desta forma, dentro desse grupo podem existir animais que possuem lábio leporino sindrômico, cuja frequência em bovinos não é conhecida, mas alguns casos foram relatados (MOSSEY *et al.*, 2009; STUPPIA *et al.*, 2011). Esse ponto pode ser um fator complicador para a interpretação de nossos resultados, em relação à herança da característica lábio leporino, que pode ser um combinado de herança aditiva, dominante e recessiva e também no fato de que a herança provavelmente é quantitativa, indicando a expressão de vários genes que interferem no surgimento dessa característica. Relatos recentes, em humanos, mostraram que os mesmos genes poderiam estar contribuindo para o lábio leporino sindrômico e não sindrômico, talvez por penetração variável ou pela ação de diferentes modificadores (LESLIE & MARAZITA, 2013; STANIER, 2004). Este fato também é importante porque foi observado que a incidência de lábio leporino não sindrômico é altamente variável (VÉLEZ *et al.*, 1995). Enquanto mutações genéticas sindrômicas podem contribuir não mais do que 10% dos casos de lábio leporino, essas informações são importantes para uma melhor compreensão dos mecanismos genéticos, interações e novos candidatos (STANIER, 2004).

Nossas análises revelaram que os genes associados a cada fenótipo de fenda palatina mostram perfis funcionais diferentes. É possível que alguns desses genes candidatos estejam envolvidos em anormalidades da língua, palato, desenvolvimento fetal do crânio e induzam o lábio leporino como efeito secundário e mediado por interação com fatores ambientais. Os polimorfismos em genes identificados podem não ser caracterizados como mutações causais da doença e podem se constituir em reguladores fisiológicos de processos metabólicos que podem indiretamente resultar no fenótipo do lábio leporino. Muitas das associações que encontramos neste trabalho estão em regiões intragênicas onde ambientes epigenéticos e reguladores estão envolvidos.

7 CONCLUSÕES

As análises de associação ampla do genoma foram capazes de identificar diversas regiões genômicas e diversos genes candidatos relacionados ao fenótipo lábio leporino em bovinos.

Os SNPs identificados podem não ser caracterizados como mutações causais responsáveis pelo fenótipo, podendo constituir-se em reguladores fisiológicos de processos metabólicos que atuam indiretamente na expressão do fenótipo lábio leporino.

Análises aprofundadas das regiões genômicas e genes candidatos identificados nesse trabalho poderão fornecer informações para futuras pesquisas sobre a identificação dos mecanismos moleculares responsáveis pela característica lábio leporino em bovinos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABCGIL - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE GIR LEITEIRO. *CARACTERÍSTICAS DO GIR LEITEIRO*. Disponível em: <<http://girleiteiro.org.br/?conteudo,150>>. Acesso em: 17 abr. 2019.

AGBENORKU, P. Orofacial Clefts: A Worldwide Review of the Problem. *ISRN Plastic Surgery*, v. 2013, p. 1–7, 2013.

AITKEN, R.; CLARKSON, J. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *Journal of Reproduction and Fertility*, v. 81, p. 459–469, 1987.

AITKEN, R. J.; DE IULIIS, G. N. Origins and consequences of DNA damage in male germ cells. *Reproductive BioMedicine Online*, v. 14, n. 6, p. 727–733, 2007. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60676-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60676-1)>.

ANDERSON, C. A. *et al.* Europe PMC Funders Group Data quality control in genetic case-control association studies. v. 5, n. 9, p. 1564–1573, 2011.

ANTUNES, W.; BERNARDO, C. Occurrence of Two Cases of Cheiloschisis Related Inbreeding in. *CFMV*, v. 52, p. 46–49, 2011.

ARDILA SILVA, A. Programa de mejoramiento genético para características económicas en razas cebuinas lecheras. *Revista de Medicina Veterinaria*, n. 19, p. 11–20, 2010.

ARMERO, C. *et al.* Two-Stage Bayesian Approach for GWAS With Known Genealogy. v. 8600, 2019.

ARTURO, J.; FIERRO, A.; TASTEKIN, A. Malformaciones congénitas : clasificación y bases morfogénicas. 2008.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DOS CRIADORES DE ZEBU (ABCZ). *Centro De Referência Da Pecuária Brasileira*. Disponível em: <<http://www.zebu.org.br/ConsultaIndividual>>.

BAINS, R. K. *et al.* Visceral obesity without insulin resistance in late-onset obesity rats. *Endocrinology*, v. 145, n. 6, p. 2666–2679, 2004.

BALANCIN JÚNIOR, A. *et al.* Avaliação de desempenho produtivo e reprodutivo de animais mestiços do cruzamento Holandês x Gir. *Boletim de Indústria Animal*, v. 71, n. 4, p. 357–364, 2014.

BALDING, D. J. IEW A tutorial on statistical methods for population association studies. v. 7, p. 781–791, 2006.

BÁNFI, B. *et al.* A Ca²⁺-activated NADPH Oxidase in Testis, Spleen, and Lymph

Nodes. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 40, p. 37594–37601, 2001.

BARTZELA, T. N.; CARELS, C.; MALTHA, J. C. Update on 13 syndromes affecting craniofacial and dental structures. *Frontiers in Physiology*, v. 8, n. DEC, 2017.

BEJARANO, D. *et al.* Linkage disequilibrium levels and allele frequency distribution in Blanco Orejinegro and Romosinuano Creole cattle using medium density SNP chip data. v. 433, p. 426–433, 2018.

BERRY, D. P. *et al.* Genetics of animal health and disease in cattle. *Irish Veterinary Journal*, v. 64, n. 1, p. 5, 2011. Disponível em: <<http://www.irishvetjournal.org/content/64/1/5>>.

BIOINFORMATICS CHALLENGES IN GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES (GWAS). In: DE, Rishika; In: BUSH, William S; In: MOORE, Jason H. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*. [S.l: s.n.], 2006a. p. 304–304.

BLACK, M. M. Effects of vitamin B12 and folate deficiency on brain development in children. *Food and Nutrition Bulletin*, v. 29, n. 2 SUPPL., 2008.

BÖHMER, A. *et al.* Investigation of dominant and recessive inheritance models in genome-wide association studies data of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *Birth Defects Research*, v. 110, n. 4, p. 336–41, 2018.

BOICHARD, D. *et al.* Design of a Bovine Low-Density SNP Array Optimized for Imputation. v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

BOLORMAA, S. *et al.* Genome-wide association studies for feedlot and growth traits in cattle. n. April 2017, 2011.

BOTERO HERNÁNDEZ, J. A.; CAMARGO ROJAS, A. P.; ESPINOSA GARCÍA, E. T. Síndrome de Moebius: manifestaciones neurológicas, musculoesqueléticas y del lenguaje. *Repertorio de Medicina y Cirugía*, v. 26, n. 2, p. 109–112, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.reper.2017.06.001>>.

BOUAZIZ, M.; AMBROISE, C.; GUEDJ, M. Accounting for Population Stratification in Practice: A Comparison of the Main Strategies Dedicated to Genome-Wide Association Studies. v. 6, n. 12, 2011.

BRESSAN, F. F. *et al.* Challenges and perspectives to enhance cattle production via in vitro techniques: focus on epigenetics and cell-secreted vesicles. *Ciência Rural*, v. 45, n. 10, p. 1879–1886, 2015.

BRZYSKI, D. *et al.* Controlling the Rate of GWAS False Discoveries. *Genetics*, v. 205, n. January, p. 61–75, 2017.

BURTON, P. R.; TOBIN, M. D.; HOPPER, J. L. Genetic Epidemiology 1 Key concepts in genetic epidemiology. p. 941–951, 2005.

BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Chapter 11: Genome-Wide Association Studies. *PLoS Computational Biology*, v. 8, n. 12, 2012.

CALDAS, S. A. *et al.* Queilosquise bilateral em bovino - Relato de caso *. v. 36, n. 1, p. 55–59, 2014.

CANTOR, R. M.; LANGE, K.; SINSHEIMER, J. S. Prioritizing GWAS Results: A Review of Statistical Methods and Recommendations for Their Application. *The American Journal of Human Genetics*, v. 86, n. 1, p. 6–22, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.11.017>>.

CHAGUNDA, M. G. G.; MUJIBI, F. D. N.; DUSINGIZIMANA, T. Use of High Density Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Arrays to Assess Genetic Diversity and Population Structure of Dairy Cattle in Smallholder Dairy Systems: The Case of Girinka Programme in. v. 9, n. October, 2018.

CHEN, B.; COLE, J. W.; GROND-GINSBACH, C. Departure from Hardy Weinberg Equilibrium and Genotyping Error. v. 8, n. October, p. 1–6, 2017.

CHEN, Z. A new association test based on Chi-square partition for case-control GWA studies. *Genet. Epidemiol*, v. 35, p. 658–63, 2011.

CHOUDHARY, V. *et al.* DNA polymorphism of leptin gene in *Bos indicus* and *Bos taurus* cattle. *Genetics and Molecular Biology*, v. 28, n. 4, p. 740–742, 2005.

CIEPŁOCH, A. *et al.* Genetic disorders in beef cattle : a review. *Genes & Genomics*, v. 39, n. 5, p. 461–471, 2017.

CLARKE, G. *et al.* Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat protoc*, v. 6, n. 2, p. 121–33, 2011.

CLINTON, K.; GAZDA, H. *Diamond-Blackfan Anemia*. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7047/>>.

COMPUTATIONAL MOLECULAR DESIGN & METABOLOMICS LABORATORY. *Sphingolipids*. Disponível em: <https://lipidpedia.cmdm.tw/lipids_by_class/lmsp>.

CONTE, F. *et al.* Systematic analysis of copy number variants of a large cohort of orofacial cleft patients identifies candidate genes for orofacial clefts. *Human Genetics*, v. 135, n. 1, p. 41–59, 2016.

COUTINHO, L. L. *et al.* GENÔMICA ANIMAL. Disponível em: <https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/Repositorio/genomica_animal_000fzf12nmm02wx5ok0cpoo6aipz2t68.pdf>. Acesso em: 28 out. 2019.

DAETWYLER, H. D. *et al.* Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle. *Nature Publishing Group*, v. 46, n. 8, p. 858–865, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ng.3034>>.

DASH, S. *et al.* Evaluation of Bovine High-Density SNP Genotyping Array in Indigenous Dairy Cattle Breeds. *Animal Biotechnology*, v. 29, n. 2, p. 129–135, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/10495398.2017.1329150>>.

DAVY, A.; AUBIN, J.; SORIANO, P. Ephrin-B1 forward and reverse signaling are required during mouse development. *Genes and Development*, v. 18, n. 5, p. 572–583,

2004.

DE OLIVEIRA, A. P. *et al.* Pedigree analysis on the population of Gir cattle in Northeast Brazil. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 41, n. 5, p. 1153–1157, 2012.

DE, R.; BUSH, W. S.; MOORE, J. H. Clinical Bioinformatics. *Encyclopedic Reference of Genomics and Proteomics in Molecular Medicine*, n. May, p. 304–304, 2006b.

DELANO, D. *et al.* Array Differences in Genomic Coverage and Data Quality Impact GWAS Success. *Illumina Inc*, v. 1, n. 2, 2008.

DEVLIN, B.; ROEDER, K. Genomic Control for Association Studies. n. December, p. 997–1004, 1999.

DIXON, M. *et al.* Cleft lip and palate: synthesizing genetic and environmental influences. v. 12, n. 3, p. 167–178, 2011.

DO CARMO, A. *Estudo de associação genômica e análise de enriquecimento genético da criotolerância espermática em bovinos da raça nelore*. 2012. Universidade Estadual Paulista “Julio De Mesquita Filho”, 2012.

DUENK, P. *et al.* Benefits of Dominance over Additive Models for the Estimation of Average Effects in the Presence of Dominance. v. 7, n. October, p. 3405–3414, 2017.

EGGEN, A. The development and application of genomic selection as a new breeding paradigm. *Animal Frontiers*, v. 2, n. 1, p. 10–15, 2012.

ELAM, K. K. *et al.* Gene set enrichment analysis to create polygenic scores: a developmental examination of aggression. *Translational Psychiatry*, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41398-019-0513-7>>.

FERNANDES, J. DOS S. *et al.* Genotipagem de alta densidade para associação de característica reprodutiva em bovinos de corte. 2015, [S.l: s.n.], 2015. Disponível em: <<http://eventos.ufgd.edu.br/enepex/anais/arquivos/288.pdf>>.

FLORES-ALFARO, E.; BURGUETE-GARCÍA, A. I.; SALAZAR-MARTÍNEZ, E. Diseños de investigación en epidemiología genética. *Revista Panamericana de Salud Publica/Pan American Journal of Public Health*, v. 31, n. 1, p. 88–94, 2012.

FRANCINE, R.; PASCALE, S.; ALINE, H. Congenital Anomalies : Prevalence and Risk Factors. v. 2, n. 2, p. 58–63, 2014.

FREIMER, N. B.; SABATTI, C. Guidelines for association studies in Human Molecular Genetics. v. 14, n. 17, p. 2481–2483, 2005.

FU, W. *et al.* Missing call bias in high-throughput genotyping. v. 14, 2009.

G.MARTÍNEZ, V. SUÁREZ, M. G. Bienestar animal en bovinos de leche : selección de indicadores vinculados a la salud y producción. *Articulo*, v. 42, n. 2, p. 153–160, 2016.

GABRIEL, S. B. *et al.* The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome. n. June 2014, 2002.

GADHOK, A. *et al.* Serum homocysteine level and its association with folic acid and vitamin B12 in the third trimester of pregnancies complicated with intrauterine growth restriction. *Clin Lab*, v. 57, n. 11, p. 933–8, 2011.

GAJERA, M. *et al.* MicroRNA-655-3p and microRNA-497-5p inhibit cell proliferation in cultured human lip cells through the regulation of genes related to human cleft lip. *BMC Medical Genomics*, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2019.

GARCÍA-GÁMEZ, E. *et al.* Linkage disequilibrium and inbreeding estimation in Spanish Churra sheep. *???*, v. 13, n. 1, p. 1, 2012. Disponível em: <????>.

GAUR, G. K.; KAUSHIK, S. N.; GARG, R. C. The Gir cattle breed of India - characteristics and present status. *Animal Genetic Resources Information*, v. 33, p. 21–29, 2003.

GE, X. *et al.* Investigation of candidate genes of non-syndromic cleft lip with or without cleft palate, using both case-control and family-based association studies. *Medicine*, v. 98, n. 26, p. e16170, 2019.

GEER, L. Y. *et al.* The NCBI BioSystems database. v. 38, n. October 2009, p. 492–496, 2010.

GODDARD, M. E. *et al.* Genetics of complex traits: Prediction of phenotype, identification of causal polymorphisms and genetic architecture. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, v. 283, n. 1835, 2016.

GODDARD, M. E.; HAYES, B. J. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nature Publishing Group*, v. 10, n. juNe, p. 381–391, 2009.

GOLAN, D.; ROSSET, S. Mixed Models for Case-Control Genome-Wide Association Studies : Major Challenges and Partial Solutions. [S.d.].

GONZALES, E. M. Defectos congénitos. v. 54, n. 3, p. 148–159, 2015.

GUTIÉRREZ, S.; OTERO, L. Etiología genética del labio y paladar fisurado e hipodoncia ¿ entidades que comparten un mismo gen ? 2006.

HAALAND, Ø. A. *et al.* A genome-wide search for gene-environment effects in isolated cleft lip with or without cleft palate triads points to an interaction between maternal periconceptional vitamin use and variants in ESRRG. *Frontiers in Genetics*, v. 9, n. FEB, p. 1–16, 2018.

HASLER, J. F. In-vitro production of cattle embryos : problems with pregnancies and parturition. *Human Reproduction*, v. 15, n. 5, p. 47–58, 2000.

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. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030209703479>>.

HECKLER, F.; OESTERLE, L.; JABALEY, M. The Minimal Cleft Lip Revisited: Clinical and Anatomic Correlations. *Journal of Chemical Information and Modeling*, v. 53, n. 9,

p. 1689–1699, 2018.

HELLWEGE, J. *et al.* Population Stratification in Genetic Association Studies. p. 1–31, 2018.

IBGE. *Rebanho bovino diminui e produtividade nacional de leite ultrapassa 2 mil litros por animal ao ano*. Disponível em: <<https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/25482-ppm-2018-rebanho-bovino-diminui-e-produtividade-nacional-de-leite-ultrapassa-2-mil-litros-por-animal-ao-ano>>. Acesso em: 21 out. 2019.

IETS; PERRY, G. *2012 Statistics of embryo collection and transfer in domestic farm animals*. . [S.l: s.n.], 2012.

ILLUMINA. BovineHD Genotyping BeadChip. *Agrogenomics*, v. 05, p. 0–3, 2015.

ISHORST, N. *et al.* Nonsyndromic cleft palate: An association study at GWAS candidate loci in a multiethnic sample. *Birth Defects Research*, v. 110, n. 10, p. 871–882, 2018.

JENKO, J. *et al.* Cow genotyping strategies for genomic selection in a small dairy cattle population. *Journal of Dairy Science*, v. 100, n. 1, p. 439–452, 2017.

JIANG, Z. *et al.* Genetic and epigenetic risks of assisted reproduction. *Clinical Obstetrics and Gynaecology*, v. 44, p. 90–104, 2017.

JOSÉ, F. *et al.* Parâmetros Populacionais do Rebanho Sindi Registrado no Brasil Population Parameters of the Registered Red Sindi in Brazil. v. 30, p. 1989–1994, 2001.

JUGESSUR, A. *ET AL.* Fetal genetic risk of isolated cleft lip only (CLO) versus isolated cleft lip and palate (CLP): A sub-phenotype analysis using two population-based studies of orofacial clefts in Scandinavia. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol.*, v. 91, n. 2, p. 8592, 2011.

KALE, D. S. Genetic diseases in cattle : A review Genetic Diseases in Cattle : A Review. n. January 2014, 2018.

KEMPER, K. E.; GODDARD, M. E. Understanding and predicting complex traits : knowledge from cattle. v. 21, n. 1, p. 45–51, 2012.

KRGOVIC, D. *et al.* Submicroscopic interstitial deletion of chromosome 11q22.3 in a girl with mild mental retardation and facial dysmorphism: Case report. *Molecular Cytogenetics*, v. 4, n. 1, p. 17, 2011. Disponível em: <<http://www.molecularcytogenetics.org/content/4/1/17>>.

LAIRD, N. M. *et al.* The Role of Family-Based Designs in Genome-Wide Association Studies. v. 24, n. 4, p. 388–397, 2019.

LAMMENS, M. *et al.* Causes of Congenital Malformations. n. 2, 2002.

LAN, Y. ADAMTS6 in Craniofacial and Skeletal Development. *Grantome*, v. 21, 2018.

- LAURIE, C. C. *et al.* Quality control and quality assurance in genotypic data for genome-wide association studies. *National Institutes of Health*, v. 34, n. 6, p. 591–602, 2010.
- LEI, T. Y. *et al.* Application of high resolution SNP arrays in patients with congenital oral clefts in south China. *Journal of Genetics*, v. 95, n. 4, p. 801–809, 2016.
- LESLIE, E. J.; MARAZITA, M. L. Genetics of cleft lip and cleft palate. *American Journal of Medical Genetics, Part C: Seminars in Medical Genetics*, v. 163, n. 4, p. 246–258, 2013.
- LI, N.; STEPHENS, M. Modeling Linkage Disequilibrium and Identifying Recombination Hotspots Using Single-Nucleotide Polymorphism Data. v. 2233, n. December, p. 2213–2233, 2003.
- LIAO, X. *et al.* Whole genome sequencing of Gir cattle for identifying polymorphisms and loci under selection. v. 598, n. August, p. 592–598, 2013.
- LITTLE, J.; IOANNIDIS, J. P. A. Genome-wide association studies for complex traits : consensus , uncertainty and challenges. v. 9, n. May, p. 356–369, 2008.
- LIU, J. *et al.* Dynamic mRNA expression analysis of the secondary palatal morphogenesis in miniature pigs. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 20, n. 17, 2019.
- LIU, L. *et al.* Robust methods for population stratification in genome wide association studies. p. 1–12, 2013.
- LIU, N. *et al.* Functional variants in TBX2 are associated with a syndromic cardiovascular and skeletal developmental disorder. *Human Molecular Genetics*, v. 27, n. 14, p. 2454–2465, 2018.
- LUDWIG, K. U. *et al.* Imputation of orofacial clefting data identifies novel risk loci and sheds light on the genetic background of cleft lip ± cleft palate and cleft palate only. *Human Molecular Genetics*, v. 26, n. 4, p. 829–842, 2017.
- LUPP, B. *et al.* Right-sided cleft lip and jaw in a family of Vorderwald×Montbéliarde cattle. *Veterinary Journal*, v. 192, n. 3, p. 520–522, 2012.
- MACINTYRE, G. *et al.* Associating disease-related genetic variants in intergenic regions to the genes they impact. *PeerJ*, v. 2014, n. 1, p. 1–24, 2014.
- MAIORANO, A. M. *et al.* Assessing genetic architecture and signatures of selection of dual purpose Gir cattle populations using genomic information. *PLoS ONE*, v. 13, n. 8, p. 1–24, 2018.
- MARCOLONGO-PEREIRA, C. *et al.* Defeitos congênitos diagnosticados em ruminantes na Região Sul do Rio Grande do Sul 1. v. 30, n. 10, p. 816–826, 2010.
- MAREES, A. T. *et al.* A tutorial on conducting genome-wide association studies: Quality control and statistical analysis. *International Journal of Methods in Psychiatric Research*, v. 27, n. 2, p. 1–10, 2018.

MCHUGH, M. The Chi-square test of independence. *Biochemia Medica*, v. 23, n. 2, 2013.

MCKINNEY, B. A. *et al.* Capturing the Spectrum of Interaction Effects in Genetic Association Studies by Simulated Evaporative Cooling Network Analysis. v. 5, n. 3, 2009.

MEDICINE, G.; MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. 2010.

MILLS, M. C.; RAHAL, C. A scientometric review of genome-wide association studies. *Communications Biology*, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s42003-018-0261-x>>.

MORENO-GARCIA, M. A.; ROSENBLATT, D. S.; JEROME-MAJEWSKA, L. A. Vitamin B12 metabolism during pregnancy and in embryonic mouse models. *Nutrients*, v. 5, n. 9, p. 3531–3550, 2013.

MORENO URIBE, L. M. *et al.* A Population-Based Study of Effects of Genetic Loci on Orofacial Clefts. *Journal of Dental Research*, v. 96, n. 11, p. 1322–1329, 2017.

MORITOMO, Y.; TSUDA, T.; MIYAMOTO, H. Craniofacial Skeletal Abnormalities in Anomalous Calves with Clefts of the Face. *Journal of Veterinary Medical Science*, v. 61, n. 10, p. 1147–1152, 2002.

MOSSEY, P. *et al.* Cleft lip and palate. *Lancet*, v. 21, n. 374 (9703), p. 1773–85, 2009.

MOUNTAIN, J. Evolution of Modern Humans: Evidence from Nuclear DNA Polymorphisms. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, v. 337, n. 1280, p. 159–165, 1992.

NATURE. *Hardy Weinberg Equilibrium*. Disponível em: <<https://www.nature.com/scitable/definition/hardy-weinberg-equilibrium-122/>>. Acesso em: 15 out. 2019.

NEGRO, S. S. *et al.* Genotyping-by-sequencing and SNP-arrays are complementary for detecting quantitative trait loci by tagging different haplotypes in association studies. p. 1–22, 2019.

NISHINO, J. *et al.* Sample Size for Successful Genome-Wide Association Study of Major Depressive Disorder. v. 9, n. June, p. 1–8, 2018.

NORDIC CATTLE GENETIC EVALUATION. *Genetic Traits*. Disponível em: <<https://www.nordicebv.info/ntm-and-breeding-values/genetic-traits/>>. Acesso em: 20 out. 2019.

OMS. Anomalias congénitas. p. 1–6, 2019.

PAIK, J. M.; LIM, S. Y. Kabuki syndrome with cleft palate. *Archives of Plastic Surgery*, v. 43, n. 5, p. 474–476, 2016.

PARADA, C.; CHAI, Y. Roles of BMP Signaling Pathway in Lip and Palate

- Developmen. *Front Oral Biol*, v. 16, n. 1, p. 60–70, 2012.
- PAREEK, C. S. *et al.* From genotype to phenotype in bovine functional genomics. *Briefings in Functional Genomics*, v. 10, n. 3, p. 165–171, 2011.
- PASTINEN, T. Genome-wide allele-specific analysis: insights into regulatory variation. *Nat Rev Genet*, v. 11, n. 8, p. 533–8, 2010.
- PAVARINI, S. P. *et al.* Anomalias congênitas em fetos bovinos abortados no Sul do Brasil. *Pesquisa Veterinaria Brasileira*, v. 28, n. 3, p. 149–154, 2008.
- PEARSONS, T.; MANOLIO, T. How to Interpret a Genome-wide Association Study. *JAMA*, v. 299, n. 11, p. 1335–1344, 2008.
- PIETROCOLA, F. *et al.* Acetyl coenzyme A: A central metabolite and second messenger. *Cell Metabolism*, v. 21, n. 6, p. 805–821, 2015.
- PLATT, A.; VILHJA, B. J. Conditions Under Which Genome-Wide Association Studies Will be Positively Misleading. 2010.
- PRICE, A. L. *et al.* Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. v. 38, n. 8, p. 904–909, 2006.
- PRIETO, S. G.; MENDOZA, L. O. Etiología genética del labio y paladar fisurado e hipodoncia ¿entidades que comparten un mismo gen? *Universitas Odontológica*, v. 25, n. 57, p. 34–40, 2006a.
- PRIETO, S. G.; MENDOZA, L. O. Etiología genética del labio y paladar fisurado e hipodoncia ¿entidades que comparten un mismo gen? Genetic etiology of the cleft lip and palate and hypodontia. Entities who share a comun gene? *Univ Odontol Jun-Dic*, v. 25, n. 57, p. 34–40, 2006b. Disponível em: <<http://www.redalyc.org/pdf/2312/231220955006.pdf>>.
- PSIFIDI, A. *et al.* Comparison of Eleven Methods for Genomic DNA Extraction Suitable for Large-Scale Whole-Genome Genotyping and Long-Term DNA Banking Using Blood Samples. p. 1–18, 2015.
- QIAN, Y. *et al.* TPM1 polymorphisms and nonsyndromic orofacial clefts susceptibility in a Chinese Han population. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 170, n. 5, 2016.
- QUIROZ, J.; GRANADOS, L.; OLIVA, J. PRODUCTIVIDAD DE LA RAZA GYR EN UN SISTEMA DE LECHERÍA EN TABASCO , MÉXICO. v. 4, p. 250–251, 2014.
- RAFIGHDOOST, H. *et al.* Association of single nucleotide polymorphisms in TPM1 rs11071720, rs3803499, rs12148828, and rs1972041 with the risk of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate in a sample of the Iranian population, a preliminary report. *Annals of Human Genetics*, v. 83, n. 4, 2019.
- REIS FILHO, J. C. *et al.* Population structure of Brazilian Gyr dairy cattle. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v. 39, n. 12, p. 2640–2645, 2010.

REED, E. *et al.* Tutorial in Biostatistics A guide to genome-wide association analysis and post-analytic interrogation. n. September, 2015.

REINARTZ, S. *et al.* Phenotypic classification of variability of non-syndromic congenital cleft lip and jaw in Vorderwald × Montbéliarde cattle. *Acta Veterinaria Scandinavica*, v. 57, n. 1, p. 1–6, 2015.

REINARTZ, S.; DISTL, O. Breeding experiments and genome-wide association analysis elucidate two genetically different forms of non-syndromic congenital cleft lip and jaw in Vorderwald × Montbéliarde cattle. *Animal Genetics*, v. 48, n. 5, p. 523–530, 2017.

REISNER, H.; RIVERBARK, A. G.; COLEMAN, W. Doenças e o Genoma: Doenças Genéticas, Neoplásicas e do Desenvolvimento. *Patologia: Uma Abordagem por Estudos de Casos*. [S.l.: s.n.], 2015. p. 1–19.

REXROAD, C. *et al.* Genome to Phenome : Improving Animal Health , Production , and Well-Being – A New USDA Blueprint for Animal Genome Research. v. 10, n. May, p. 1–29, 2019.

ROJAS-LLEONART, I. *et al.* Malformaciones congénitas : consideraciones sobre su presentación fenotípica Congenital malformations : considerations on their phenotypic presentation. v. 11, p. 1–13, 2010.

ROJAS, M.; WALKER, L. Malformaciones Congénitas: Aspectos Generales y Genéticos. v. 30, n. 4, p. 1256–1265, 2012.

SABOURIN, J. A. *et al.* ComPaSS - GWAS : A method to reduce type I error in genome - wide association studies when replication data are not available. n. July 2018, p. 102–111, 2019.

SCHMID, M.; BENNEWITZ, J. Invited review: Genome-wide association analysis for quantitative traits in livestock - A selective review of statistical models and experimental designs. *Archives Animal Breeding*, v. 60, n. 3, p. 335–346, 2017.

SCIENCE-DIRECT. *Population stratification*. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/topics/medicine-and-dentistry/population-stratification>>.

SEO, D. *et al.* Estimation of linkage disequilibrium and analysis of genetic diversity in Korean chicken lines. *PLoS ONE*, v. 13, n. 2, p. 1–16, 2018.

SEVILLA, S. D. Metodología de los estudios de asociación genética. *Insuficiencia cardíaca*, v. 2, p. 111–114, 2007.

SHIMADA, K. *et al.* A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Research*, v. 69, n. 7, p. 3157–3164, 2009.

SIRARD, M.-A. The influence of in vitro fertilization and embryo culture on the embryo epigenetic constituents and the possible consequences in the bovine model. *Journal of Developmental Origins of Health and Disease*, v. 8, n. 04, p. 411–417, 2017.

SLMLANER, H.; SOLBU, H.; SCHAEFFER, L. Estimated Genetic Correlations Between Disease and Yield Traits in Dairy Cattle. *J dairy*, v. 74, n. 12, p. 4358–4365, 1991.

SOUTHAM, L. *et al.* The effect of genome-wide association scan quality control on imputation outcome for common variants. *European Journal of Human Genetics*, v. 19, n. 5, p. 610–614, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2010.242>>.

SPELSBERG, T.; WEBSTER, R.; PIKLER, G. Chromosomal proteins regulate steroid binding to chromatin. *Nature*, v. 262, n. 5563, p. 65–7, 1976.

STAFUZZA, N. B. *et al.* Single nucleotide variants and InDels identified from whole-genome re-sequencing of Guzerat, Gyr, Girolando and Holstein cattle breeds. *PLoS ONE*, v. 12, n. 3, p. 1–15, 2017.

STANIER, P. Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts. *Human Molecular Genetics*, v. 13, n. 90001, p. 73R–81, 2004.

STANIER, P.; PAUWS, E. Development of the lip and palate: FGF signalling. *Front Oral Biol.*, v. 16, p. 71–80, 2012.

STARK, A. E. The Hardy-Weinberg principle. v. 485, p. 2093, 2005.

STREHLE, E. *et al.* Genotype-phenotype analysis of 4q deletion syndrome: proposal of a critical region. *Am J Med Genet A.*, v. 158, n. 9, p. 2139–51, 2012.

STUPPIA, L. *et al.* Genetics of syndromic and nonsyndromic cleft lip and palate. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 22, n. 5, p. 1722–1726, 2011.

SUL, J. H.; ID, L. S. M.; ESKIN, E. Population structure in genetic studies: Confounding factors and mixed models. p. 1–22, 2018.

SUN, J. *et al.* Polymorphisms in the bovine ghrelin precursor (GHRL) and Syndecan-1 (SDC1) genes that are associated with growth traits in cattle. v. 1, 2010.

TETTAMANTI, L. *et al.* New insights in orofacial cleft: Epidemiological and genetic studies on Italian samples. *ORAL and Implantology*, v. 10, n. 1, p. 11–19, 2017.

TORII, C. *et al.* EFNB1 mutation at the ephrin ligand-receptor dimerization interface in a patient with craniofrontonasal syndrome. *Congenit Anom*, v. 47, p. 49–52, 2007.

TOVANI PALONE, M. R.; SALDIAS VARGAS, V. P. Factores genéticos y fisuras orofaciales no sindrómicas. *Revista de la Facultad de Medicina*, v. 64, n. 2, p. 381, 2016.

TUCKER, G.; PRICE, A. L.; BERGER, B. Improving the Power of GWAS and Avoiding. v. 197, n. July, p. 1045–1049, 2014.

TURNER, S. *et al.* NIH Public Access. p. 1–24, 2012.

USDA. *New Technologies for Agriculture Extension*. Disponível em: <<https://dairy->

cattle.extension.org/2019/08/dairy-cattle-genetics/>. Acesso em: 10 out. 2019.

UZUMCUA, A. *et al.* Mutational screening of *BASP1* and transcribed processed pseudogene TPΨg-*BASP1* in patients with Möbius syndrome. *Journal of genetics and genomics*, v. 36, n. 4, p. 251–256, 2009.

VÉLEZ, A. *et al.* Congenital lower lip pits (Van der Woude syndrome). *J Am Acad Dermatol.*, v. 32, n. 3, p. 520–1, 1995.

VERGARA, M.; VELÁZQUEZ, D. L. O. Descripción de un caso de labio leporino y paladar hendido. p. 1–6, 2012a.

VERGARA, M.; VELÁZQUEZ, D. L. O. Descripción de un caso de labio leporino y paladar hendido en *bubalus bubalis bubalis* (búfalo), Sucre , Colombia - Description of a case of harelip and cleft palate in *bubalus bubalis bubalis* (buffalo), Sucre , Colombia. p. 1–6, 2012b.

VISSCHER, P. M. *et al.* 10 Years of GWAS Discovery: Biology, Function, and Translation. *American Journal of Human Genetics*, v. 101, n. 1, p. 5–22, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.06.005>>.

WALL, J. D.; STEVISON, L. S. Detecting Recombination Hotspots from Patterns of Linkage Disequilibrium. v. 6, n. August, p. 2265–2271, 2016.

WEIGEL, K. A. Genomic selection of dairy cattle : A review of methods , strategies , and impact Dairy Cattle Selection in the Pre-genomic ERA. v. 1, n. 1, p. 1–15, 2017.

WEINWURM, S.; SÖLKNER, J.; WALDMANN, P. The Effect of Linkage Disequilibrium on Bayesian Genome-wide Association Methods *Journal of Biometrics & Biostatistics*. v. 4, n. 5, 2013.

WEIR, B. S. Linkage Disequilibrium and Association Mapping. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, v. 9, n. 1, p. 129–142, 2008.

WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE. *GeneCards*. Disponível em: <<https://www.genecards.org/>>. Acesso em: 30 dez. 2019.

XAVIER, G. M.; MILETICH, I.; COBOURNE, M. T. Ephrin ligands and eph receptors show regionally restricted expression in the developing palate and tongue. *Frontiers in Physiology*, v. 7, n. FEB, p. 1–10, 2016.

XIAOZHUAN, L. *et al.* Estudio preliminar sobre el mecanismo del paladar hendido inducido por el ácido retinoico todo trans en ratones. *Chinese Journal of Stomatology*, v. 52, n. 11, p. 690–4, 2017.

YANG, J. *et al.* Genome-Wide Complex Trait Analysis (GCTA): Methods, Data Analyses, and Interpretations. *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction, Methods in Molecular Biology*. 1019. ed. [S.l: s.n.], 2013. p. 215–236.

YANG, X. *et al.* Conditional expression of *Spry1* in neural crest causes craniofacial and cardiac defects. *BMC Developmental Biology*, v. 10, p. 1–12, 2010.

YU, Y. *et al.* Genome-wide analyses of non-syndromic cleft lip with palate identify 14 novel loci and genetic heterogeneity. *Nature Communications*, v. 8, n. 2, 2017.

ZAFER USTA, O. D. Congenital cleft lip - jaw - palate and cleft palate in German Holstein Calves with Common Ancestry Zafer Usta, Ottmar Distl. v. 13, n. 3, p. 73–80, 2017.

ZANELLA, R. IDENTIFICATION OF CHROMOSOMAL REGIONS ASSOCIATED. n. December, 2011.

ZHANG, X. *et al.* Roles of intracellular fibroblast growth factors in neural development and functions. *Science China Life Sciences*, v. 55, n. 12, p. 1038–1044, 2012.

ZHANG, Y.; CHEN, Q.; ROSS, C. Retinoic acid and tumor necrosis factor- α induced monocytic cell gene expression is regulated in part by induction of transcription factor MafB. *Exp Cell Res*. 2, v. 318, n. 8, p. 2407–16, 2012.

ZHOU, R. *et al.* Gene-Gene Interactions among SPRYs for Nonsyndromic Cleft Lip/Palate. *J Dent Res*, v. 98, n. 2, p. 180–5, 2019.

ZIEGLER, A.; KÄENIG, I. R.; THOMPSON, J. R. Biostatistical Aspects of Genome-Wide Association Studies. v. 50, p. 8–28, 2008.

ZIRZOW, S. *et al.* Expression and requirement of T-box transcription factors Tbx2 and Tbx3 during secondary palate development in the mouse. *Developmental Biology*, v. 336, n. 2, p. 145–155, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.09.020>>.

ZONDERVAN, K. T.; CARDON, L. R. Europe PMC Funders Group Designing candidate gene and genome-wide case-control association studies. v. 2, n. 10, p. 2492–2501, 2014. em

ANEXO 1 SNP identificados significativamente associados e sua posição cromossômica do estudo de associação ampla do genoma para lábio leporino bovinos leiteiros da raça Gir. As áreas em cinza representam um overlap ou match das duas metodologias. Na última coluna são colocados os genes próximos com evidência de causar lábio leporino.

Marcador	r.	Posição	Região	Modelo	Corr/Trend -log ₁₀ P	Corr/Trend Bonf. P	Sobreposição	Genes locais presentes	Jusante 1,000,000 pb	Montante 1,000,000 pb	Associação Lábio Leporino na Literatura
BovineHD0100017993	1	3478041	1.1	A	8	0		Intergenic Region			NÃO
BovineHD0100018080	1	63964753	1.1	A	7	0.05					
BovineHD0100018188	1	64382620	1.2	D	8	0		IGSF11		UPK1B, GSK3B, MIR6529B, MIR6529A, GPR156, B4GALT4, ARHGAP31, TMEM39A, POGLUT1, TIMMDC1, CD80, ADPRH, PLA1A, POPDC2, COX17, NR1T2	IGSF11
BovineHD0100018248	1	64491568	1.2	A+D	9	0	*				
BTB-00450945	1	64501909	1.2	A+D	9	0	*				
BovineHD0100018251	1	64514585	1.2	A	10	0					
BovineHD0100018252	1	64519877	1.2	A	8	0					
BTB-00450962	1	64525174	1.2	A+D	9	0	*				
BovineHD0100018253	1	64529316	1.2	A	8	0.01					
BovineHD0100018255	1	64539211	1.2	D	8	0					
BovineHD0100018256	1	64543639	1.2	D	8	0					
BovineHD0100018257	1	64550469	1.2	A	9	0					
BovineHD0100018258	1	64558373	1.2	A+D	9	0	*				
BovineHD0100018259	1	64564041	1.2	A	8	0.01					
BovineHD0100019090	1	67728915	1.3	D	8	0.01		SLC49A4	HCLS1, IQCB1, EAF2, SLC15A2, ILDR1, CD86, CASR, CSTA, CCDC58, FAM16A2, KPNA1, PARP9,DTX3L, HSPBAP1	PDIA5, SEC22A, ADCY5, HACD2	NÃO
BovineHD0100019091	1	67744189	1.3	D	8	0.01					
BovineHD0100019164	1	67977257	1.3	D	8	0.01					
BovineHD0100019301	1	68311654	1.4	D	8	0.01		ADCY5, HACD2, MUYLK,	CASR, CSTA, CCDC58, FAM162A,	UMPS, ITGB5, ZNF148, XXYL1	XXYL1
BovineHD0100019677	1	69311542	1.4	A	7	0.07					

BovineHD0100019708	1	69396098	1.4	D	8	0		CCDC14, ROPN1, KALRN	KPNA1, PARP9, DTX3L, PARP14, HSPBAP1, SLC49A4, PDIA5, SEC22A		
BovineHD0100019732	1	69441530	1.4	A	7	0.02					
BovineHD0100020984	1	73110547	1.4	A	7	0.02					
BovineHD0100020992	1	73123910	1.4	D	7	0.03					
Hapmap25308-BTA-153014	1	75505402	1.5	A	7	0.05		FGF12	MIR2285KB, PLAAT1, MB21D2	MIR10182	FGF12
BovineHD0100021720	1	75513388	1.5	D	8	0					
BovineHD0100021721	1	75529052	1.5	A	7	0.05					
BovineHD0100021722	1	75533713	1.5	A	8	0					
BovineHD0100023983	1	83769346	1.6	A+D	12	0	*	INTERGENIC REGION	MAGEF1, MIR2284Y- 3,EPHB3,LOC5 24771, THPO, POLR2H, CLCN2, FAM131A	PSMD2, ECE2, CAMK2N, ALG3, MIR1224, ABCF3, AP2M1,HTR3C, ABCC5,PARL, MAP6D1, YEATS2, KLHL24, B3GNT5, LAMP3, MCCC1, DCUN1D1	NÃO
BovineHD0100023984	1	83772844	1.6	A+D	12	0	*				
BovineHD0100028960	1	101442485	1.7	D	8	0		BCHE, S1	SERPINI1, PCDC10, SERPINI2		NÃO
BovineHD0100047140	1	104376768	1.7	A	7	0.06					
BovineHD0100031785	1	112353056	1.8	D	7	0.03		GMPS, SLC33A1	TIPARP, SSR, KCNA1, DHX36, ARHGFE26	MME, RAP2B, P2RY1	SLC33A1
BovineHD0100031854	1	112593811	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100031859	1	112607988	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100031893	1	112714790	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100031894	1	112721574	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100031895	1	112727489	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100031897	1	112734752	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100032423	1	114667886	1.8	D	8	0.01					
BovineHD0100032429	1	114708628	1.8	D	7	0.04					
BovineHD0100032457	1	114836736	1.8	D	7	0.04					

BovineHD0100038369	1	135036880	1.9	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	PCCB	EPHB1, ANAPC13	EPHB1
BovineHD0100041420	1	143868562	1.1	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	BACE2, MX2,MX1	TMPRSS2, RIPK4, C2CD2, ZBTB21, ABCG1, TFF2, TFF3, TMPRSS3, UBASH3A, RSPH1, WDR4, NDUFV3, PKNOX1, CBS, U2AF1	NÃO
BovineHD0100041422	1	143870308	1.1	D	7	0.03					
ARS-BFGL-NGS-115887	1	143871665	1.1	D	7	0.03					
BovineHD0100042770	1	147849217	1.1	D	8	0.01					
BovineHD0200007449	2	25880543	2.1	A	7	0.02		INTERGENIC REGION	CYBRD1, DCAF17, METTL8	GORASP2, GAD1, ERICH2, MIR12020, METTL5, SSB, KLKL23, PHOSPH02, PPIG, FASTKD1, KLHL41, BBS5	NÃO
BovineHD0200013431	2	46352770	2.2	D	7	0.06		INTERGENIC REGION		RND3, MMADHC, KIF5C	MMADHC
BovineHD0300025422	3	88700302	3.1	D	9	0		INTERGENIC REGION	MIR2285AP, MIR12043, JUN, MYSM1, OMA		OMA1
BovineHD0300025426	3	88704857	3.1	D	9	0					
BovineHD0300029483	3	102961610	3.2	D	8	0.01		KDM4A	RNF220, ERI3, MIR2414, DMAP1, SL6A9,B4GAL T2, ATP6V0B, DPH2, IPO133, ST3GAL3, MIR2415	PTPRF, ELOVL1, CDC20, MPL, T1E1, C3H1, TMEM125, EBNA1BP2, FAM183A, SLC2A1	NÃO
BovineHD0300029484	3	102966814	3.2	D	8	0.01					
BovineHD0300035667	3	102969842	3.2	D	8	0.01					
BovineHD0400018571	4	67555506	4.1	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	MTURN, PLEKHA8, FKBP14, SCRN, PRR15, CHN2	CREB5, JAZF1	NÃO
BovineHD0500028444	5	99485027	5.1	A	7	0.07		INTERGENIC REGION	ETV6, TAS2R42, TAS2R46, T2R65A, T2R12,BOTA- T2R10B, TAS2R10, T2R10C,, YBX3	STYK1, MAGOHB, KLRA1, KLRC1, LOC100336869, LOC100847738, KLRJ1, NKG2A, NKG2C, KLRK1, GABARAPL1, TMEM52B,	NÃO
BovineHD0500028444	5	99485027	5.1	D	7	0.07					

										OLR1, CLEC7A,CLEC1 A, CLEC1B,CLEC1 2B, CLEC12A	
BovineHD0600019529	6	70395267	6.1	A	8	0.01		SCFD2	DCUN1D4, LRRC66, SGCB, USP46, DANCR, MIR4449, RASL11B	FIP1L1, LNX1, UFM1, CHIC2, GSX2, PDGFRA	NÃO
BovineHD0600019533	6	70401692	6.1	A	8	0.01					NÃO
BovineHD0600019535	6	70405843	6.1	A	8	0.01					NÃO
BovineHD0600021087	6	75768332	6.2	D	9	0		INTERGENIC REGION			NÃO
BovineHD0600021140	6	76064318	6.3	A	7	0.04					
BovineHD0600021258	6	76551297	6.3	A+D	7	0.04	*	INTERGENIC REGION			NÃO
BovineHD0600021259	6	76554397	6.3	A+D	7	0.04	*				
BovineHD0600021805	6	78758680	6.4	A	7	0.04		ADGRL3			NÃO
BovineHD0600026391	6	95056090	6.5	D	8	0					
BovineHD0600026393	6	95057905	6.5	A	7	0.05					
BovineHD0600026406	6	95102598	6.5	D	8	0.01		ANXA3	CNOT6L, MRPL1, MIR2285BF-1	BMP2K, PAQR3, NAA11, GK2	NÃO
ARS-BFGL-NGS- 49632	6	95103588	6.5	D	8	0.01					
BovineHD0600026441	6	95197519	6.5	D	8	0.01					
BovineHD4100005543	6	104433969	6.6	A+D	7	0.03	*	INTERGENIC REGION	PTPN13,SLC1 0A6, AFF1, MIR2284AB, HSD17B13, HSD17B11, NUDT9, SPARCL1, DMP1	JAKMIP1, CRMP1, EVC, EVC2	DMP1
BovineHD0600030256	6	107479218	6.7	D	8	0		TMEM128	STX18, NSG1, ACOX3, CPZ, MIR777A, LRPAP1, HGFAC, ZBTB49, LYAR,	OTOP, DRD5, MIR2451, MIR2450A,MIR2 450B, MIR2450C, MIR2450D, NOP14, MFSD10, ADD1,	NÃO

										SH3BP2, TNIP2, RNF4	
BovineHD0700000641	7	2353599	7.1	A	7	0.06		INTERGENIC REGION	MGAT4B, LTC4S, CANX, HNRPH1, MIR11986, ADAMTS2, ZNF879	ZPF2, RNF187, HIST3H2A, TRIM17, TRIM11, IBA57, GJC2, GUK1, MRLP55, C7H10RF35, ARF1, SNAP47	NÃO
BovineHD0700001019	7	3629470	7.2	D	8	0				ATP13A1, GMIP, LPAR2, PBX4, CILP2, NDUFA13, GATAD2A, SUGP1, TM6SF2, NCAN, NR2C2AP, RFXANK, OC100271850-MEF2B, BORCS8, MEF2B, TMEM16A1, SLC25A42, ARMC6, DDX49, COPE, CERS1, COMP, CRT1, TEMEM59L, REX1BD, UBA52, KXD1, FKP8, ELL	
BovineHD0700001134	7	3983380	7.2	A+D	10	0	*	INTERGENIC REGION	IBA57, GJC2, GUK1, MRPL55, C7H10RF35, ARF1, SNAP47		NÃO

BovineHD0700001747	7	6114174	7.3	D	9	0		INTERGENIC REGION	CCDC124, RPL18A, INSL3, B3GNT3, MAP1S, CLGALT1, PGLS, SLC27A1, MVB12A, PLVAP, GTPBP3, DDA1, MRPL34, ABHD8, BABAM1, USHBP1, OCEL1, USE1, MYO9B, HAUS8	MIR8550, F2RL3, NWD1, TMEM38A, SMIM7, MED26, CHERP, CALR3, EPS15L1	NÃO
BovineHD0700006556	7	23893144	7.4	A	7	0.03		MIR2018	KIF3A, IL4, IL13, RAD50, IL5, IRF1, SLC22A5, SLC22A4, MIR2457, PDLIM4, P4HA2, MIR12040, CSF2, IL3, ACSL6	CDC42SE2, LYRM7, HINT1, CHSY3	NÃO
BovineHD0700006619	7	24154413	7.4	A	7	0.03					
BovineHD0700006629	7	24184478	7.4	A	7	0.04					
BovineHD0700006659	7	24301553	7.4	A	8	0					
BovineHD0700014551	7	50185044	7.5	A+D	9	0	*	SPOCK1	SMAD5, TRPC7	MIR874, MYOT, PKD2L2, WNT8A, NME5	SPOCK1
BovineHD0700014554	7	50196374	7.5	D	7	0.03					
BovineHD0700014557	7	50199773	7.5	D	7	0.03					
BovineHD0700014559	7	50201051	7.5	D	7	0.03					
BovineHD0700026522	7	90517484	7.6	D	8	0		LOC100616526, MIR9-2, MEF2C	TMEM161B	MIR3660, CETN3, MBLAC2, POLR3G, LYSMD3	NÃO
BovineHD0700026815	7	91638153	7.6	A	7	0.06					
BovineHD0700026816	7	91642722	7.6	A	7	0.06					
BovineHD0700033963	7	91652544	7.6	D	8	0.01					
BovineHD0800025439	8	85791395	8.1	D	8	0.01		FGD3	PRXL2C, CTSV, ZNF484, IARS1, NOL8, CENPP, OMD,	CARD19, NINJ1, FAM120A, PTPDC1	FGD3
BovineHD0800025467	8	85853805	8.1	D	8	0.01					

									OGN, ASPN, BICD2	OMD, ECM2,		
BovineHD0800028977	8	98134093	8.2	D	8	0.01						
Hapmap50182-BTA-100796	8	99804172	8.2	D	7	0.06		ZNF462, RAD23B, KLF4	TMEM38B	ACTL7B, ACTL7A, ABITRAM, CTNNAL1, MIR32, PTPN3		ZNF462
BovineHD0800029579	8	100134784	8.3	D	7	0.03		INTERGENIC REGION		ACTL7A, ACTL7B, ABITRAM, CTNNAL1, MIR32, PTPN, PALM2		NÃO
BovineHD0800032474	8	108156532	8.4	D	7	0.02		INTERGENIC REGION	TRIM32	TLR4		NÃO
BTB-01800430	9	5632136	9.1	D	8	0.01		INTERGENIC REGION				NÃO
BovineHD0900001164	9	5652503	9.1	D	8	0.01						
BovineHD0900001165	9	5654761	9.1	D	8	0.01						
BovineHD0900001166	9	5660100	9.1	D	8	0.01						
BovineHD0900002189	9	9022861	9.2	D	8	0		MIR450B	LMBRD1	SDHAF4		LMBRD
BovineHD0900002192	9	9033932	9.2	A	7	0.02						
BovineHD0900002194	9	9040734	9.2	A+D	9	0	*					
BovineHD0900002197	9	9044169	9.2	A+D	9	0	*					
BovineHD0900002198	9	9049268	9.2	A+D	9	0	*					
BovineHD0900002206	9	9083207	9.2	A	8	0.01						
BovineHD0900002210	9	9096058	9.2	A	7	0.02						
BovineHD0900002567	9	10452070	9.3	A	7	0.04		MIR2285CX, MIR30F, MIR30A	SDHAF4, B3GAT2			NÃO
BovineHD0900002568	9	10452773	9.3	A	7	0.03						
BovineHD0900002708	9	10900951	9.3	A	7	0.03						
BovineHD0900005221	9	19140198	9.4	A+D	8	0	*					NÃO
BovineHD100000326	10	1130276	10.1	A	7	0.03		APC	MCC, DCP2, REEP5, SRP19	EPB41L4A		APC
BovineHD1000002199	10	7017369	10.2	A+D	7	0.02	*	POC5	HMGCR, CRET1, POLK	SV2C, F2RL2, F2RL1, S100Z		NÃO

BovineHD1000002969	10	9083560	10.3	A+D	9	0	*	AP3B1	AGGF1, MRPL23, WDR41, OTP, TBCA	MIR2285V, MIR2284Z-1, LHFPL2, ARS8, DMGDH	NÃO
BovineHD1000005378	10	16170676	10.4	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	ANP32A, SPESP1, NOX5	GLCE, KIF23, RPLP1,TLE3	NOX5
BovineHD1000031160	10	18927441	10.5	A	9	0		PKM, PARP6, CELF6, HEXA, ARIH1, BBS4, MIR12031	THSDA, NR2E3	ADPGK,NPTN	NÃO
BovineHD1000006361	10	19362660	10.5	A	8	0					
BovineHD1000009722	10	29474121	10.6	A	7	0.05		INTERGENIC REGION	KATNBL1, EMC7, CHRM5, MIR2285AS-1, TMCO5B, GEM1	SCG5GJD2, ACTC1, AQR	NÃO
BovineHD1000013662	10	45469398	10.7	D	7	0.05		ZNF609	FRMD6, GNG2, RTRAF, NID2, PTGDR, PLEKH02, PIF1, OAZ2, ZNF609	TRIP4, PCLAF, CSNK1G1, PPIB, SNX22, SNX1, CIAO2A, HERC1, FBXL22	NÃO
BovineHD1000014211	10	47352491	10.8	D	8	0		INTERGENIC REGION	HERC1, FBXL22, USP3, APH1B, RAB8B, RPS27L, LACTB, TPM1	MIR190A, C2CD4B	TPM1, LACTB, RPS27
BovineHD1000014220	10	47378595	10.8	D	7	0.06					
BovineHD1000014240	10	47414242	10.8	D	7	0.03					
BovineHD1000014247	10	47429340	10.8	D	7	0.03					
BovineHD1000022348	10	78206096	10.9	D	7	0.03		INTERGENIC REGION	CHURC1, GPX2, RAB15, FNTB, MAX, FUT8	CCDC196	NÃO
BovineHD1000027253	10	94306580	10.1	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	TSHR,GTF2A1, STON2, SEL1L		NÃO
BovineHD1100000575	11	1614571	11.1	D	7	0.04		TPC3, MTLN, NPHP1,MALL	KCNIP3, BCL2L11	BUB1, TPC3, MTLN, NPHP, MALL, MAL, MRPS5, ZNF514, ZNF2, KCNIP, FAHD2A, GPAT2, ADRA2B, DUSP2, STARD7, TMEM127,	NÃO
BovineHD1100000577	11	1617633	11.1	D	7	0.04					
BovineHD1100000632	11	1810648	11.1	D	9	0					

										CIAO01, SNRP200, NCAPH, ARID5A,KANSL3 , LMAN2L, CNNM4, ANKRD39, SEMA4C	
BovineHD1100005374	11	17365662	11.2	A+D	7	0.02	*	INTERGENIC REGION			NÃO
BovineHD1100013158	11	45310345	11.3	A+D	8	0.01	*	INTERGENIC REGION	RANBP2, LIMS1, GCC2, SULT1C4, SULT1C3, SLC5A7	ST6GAL2, UXS1, ECRG4, APS3S1, NCK2, TTL, POLR1B, CHCHD5, SLC20A1	NÃO
BovineHD1200007335	12	24429217	12.1	D	7	0.03		INTERGENIC REGION	TRPC4, POSTN, SUPT20H	EXOSC8, ALG5, SMAD9, SERTM1, SPART, DCLK1	NÃO
BovineHD1200025199	12	86694823	12.2	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	ARGLU1, MIR2301	FAM155A, LIG4, ABHD13, TNSF13B, LOC107131142, TNFSF13B, LOC107131142	NÃO
BovineHD1200025211	12	86727096	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025212	12	86728986	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025213	12	86730102	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025218	12	86739634	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025219	12	86740250	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025220	12	86743729	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025223	12	86748139	12.2	D	7	0.04					
BovineHD1200025225	12	86749985	12.2	D	7	0.04					
ARS-BFGL-NGS-18439	12	88759054	12.3	D	7	0.03		INTERGENIC REGION		COL4A1, RAB20, CARS2, ANKRD10, ING1, ARGF7, TEX29	NÃO
BovineHD1300002374	13	8942006	13.1	A+D	7	0.02	*	MACROD2		FLRT3, MIR2285N-2, MIR2285DJ, SNRPB2, OTOR	MACROD2
BovineHD1300002375	13	8945660	13.1	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002379	13	8959057	13.1	A+D	8	0.01	*				
BovineHD1300002398	13	9028816	13.1	A	7	0.05					
BovineHD1300002407	13	9062781	13.1	A+D	9	0	*				

BovineHD1300002547	13	9537351	13.1	A+D	9	0	*				
BovineHD1300002613	13	9723285	13.1	A+D	9	0	*				
BovineHD1300002623	13	9749488	13.1	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002624	13	9752322	13.1	A+D	8	0	*				
BovineHD1300002628	13	9764993	13.1	A+D	8	0	*				
BovineHD1300002631	13	9771325	13.1	A+D	7	0.04	*				
BovineHD1300002632	13	9772916	13.1	A+D	7	0.04	*				
BovineHD1300002633	13	9779005	13.1	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002634	13	9782725	13.1	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002635	13	9793261	13.1	A+D	8	0	*				
ARS-BFGL-NGS-43836	13	10083710	13.2	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002720	13	10085244	13.2	A+D	8	0.01	*	INTERGENIC REGION	MACROD2	MIR2285DJ, SNRPB2,OTOR, NANP	MACROD2
BovineHD1300002724	13	10088928	13.2	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300002734	13	10123336	13.2	A+D	7	0.06	*				
BovineHD1300003528	13	12492226	13.3	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300003530	13	12497671	13.3	A+D	7	0.02	*	PROSER2	CCDC3, CDC123, NUDT5, SEC61A2, DHTKD1,	ECHDC3, USP6NL, CELF2, MIR7861	NÃO
BovineHD1300003534	13	12512640	13.3	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300003538	13	12525928	13.3	A+D	7	0.02	*				
BovineHD1300008058	13	27731432	13.4	D	8	0.01					
BovineHD1300008059	13	27732831	13.4	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	GAD2	OPTN, UCMA, PHYH, SEPHS1, BEND7, PRPF18, FRMD4A	NÃO
Hapmap41720-BTA-101335	13	30108205	13.5	A	7	0.03					
BovineHD1300008810	13	30174161	13.5	A+D	8	0.01	*	FAM171A1	FAM107B, CDNF, HSPA14, SUV39H2,DCR E1C, MEIG1, ACBD7, RPP38, NMT2	MINDY3	NÃO
BovineHD1300024959	13	36492650	13.6	A+D	8	0	*	INTERGENIC REGION	BAMBI, MAP3K8, LYZL1	MPP7, MIR2285P, ARMC4, MKX, RAB18	BAMBI

BovineHD1400005372	14	18662304	14.1	D	7	0.05		INTERGENIC REGION	ANXA13, FBX032, WDYHV1, ATAD2, ZHX1, C14HORF76, TBC1D31, DERL1,ZHX2		ZHX2
BovineHD1400009131	14	31687970	14.2	D	9	0		INTERGENIC REGION	MIR124A-2	ARMC1,MTFR1, DNAJC5B, TRIM55, CRH	NÃO
BovineHD1400009132	14	31691144	14.2	A+D	9	0	*				
BovineHD1400016872	14	60835985	14.3	A	7	0.04		INTERGENIC REGION	ABRA,OXR1	MIR2285CN	NÃO
BovineHD1400016875	14	60847518	14.3	D	7	0.04					
BTB-01296218	15	17344116	15.1	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	GUCY1A2, AKLBH8, ELMOD1	SLN, RAB39A, ACAT1, ATM	
BovineHD1500006085	15	23601435	15.2	D	8	0					
BovineHD1500006155	15	23843443	15.2	D	7	0.03		NCAM1	DLAT, PIH1D2, NKAPD1, TIMM8B, SDHD, IL18, TEX12, BCO2, PTS, BOLA	C15H11ORF34, NCAM1,DRD2,Z W10, USP28, HTR3A	NÃO
BovineHD1500008886	15	32703562	15.3	D	7	0.07		SORL1	GRIK4, MIR2284J, MIR2312, TBCEL, SC5D	MIR125B-1, MIRLET7A-2, MIR100	NÃO
BovineHD1500012195	15	43907749	15.4	D	7	0.03		TMEM41B	ADM, MIR6518, SBF2, SWAP70, MIR2284D, WEE1, ZNF143, IPO7	NRIP3, TMEM9B, C15H11ORF16, AKIP1, DENND2B, RPL27A, STK33, LMO1, MIR2285BX	NÃO
BovineHD1500012612	15	45118009	15.5	D	8	0.01					
BovineHD1500012625	15	45138343	15.5	D	7	0.07					
BovineHD1500012626	15	45139232	15.5	D	8	0.01					
BovineHD1500012636	15	45164343	15.5	D	7	0.06		INTERGENIC REGION	NRIP3, TMEM9B, C15HORF16,A KIP1, DENND2B, RPL27A, STK33, LMO, MIR2285BX, RIC3	TUB, LOC783210, OLFML1	NÃO
BovineHD1500012637	15	45172230	15.5	D	7	0.06					
BovineHD1500012638	15	45173403	15.5	D	7	0.06					
BovineHD1500012639	15	45174540	15.5	D	7	0.06					

BovineHD1500012641	15	45181102	15.5	D	7	0.06					
BovineHD1500012643	15	45185659	15.5	D	8	0.01					
BovineHD1500012651	15	45196091	15.5	D	8	0					
BovineHD1500012652	15	45197441	15.5	D	8	0.01					
BovineHD1500013601	15	47412757	15.6	D	8	0		FAM160A2	ZNF215, LOC530354, LOC100125776 , LOC506989, MRPL17, TPP1, TAF10, ILK, RRP8, TIMM10B, ARFIP2, TRIM3, HPX, APBB1, SMPD1, MIR2316, CAVIN3, CCKBR	LOC618803, LOC100847801, TRIM5, LOC616948, TRIM34, TRIM6, MGC137098, UBQLN3	NÃO
BovineHD1500013607	15	47432133	15.6	D	8	0					
BovineHD1500013674	15	47737486	15.6	D	8	0					
BovineHD1500013675	15	47738291	15.6	D	8	0					
BovineHD1500013676	15	47740646	15.6	D	8	0					
BovineHD1500013677	15	47741606	15.6	D	7	0.04					
BovineHD1500013677	15	47741606	15.6	D	7	0.04					
BovineHD1600003320	16	12450094	16.1	D	7	0.06		INTERGENIC REGION		CDC73, B3GALT2, GLRX2, RO60, UCLH5, RGS2, RGS13, RGS1	NÃO
BovineHD1600008373	16	29648137	16.2	A	7	0.02		TMEM63A, LEFTY2	LBR, SRP, EPHX1	PYCR2, SDE2, H3F3A, ACBD3, PARP1, STUM, PSEN2, COQ8A	LEFTY2
BovineHD1600008402	16	29692752	16.2	A	8	0					
BovineHD1600009272	16	32546024	16.3	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	TFB2M, SMYD3	EFCAB2, MIR7180, HNRNPU, COX20, DESI2, ADSS, C16HORF100	SMYD3
BovineHD1600009291	16	32607793	16.3	A+D	9	0	*				
BovineHD1700005041	17	17444950	17.1	A	7	0.06		INTERGENIC REGION	ZNF330	UCP1, ELMOD2, CLGN, SCOC, MGST2	NÃO
BovineHD1700005042	17	17447627	17.1	A	7	0.06					
BovineHD1700005043	17	17448332	17.1	A	7	0.06					
BovineHD1700009293	17	33428272	17.2	A	8	0.01		INTERGENIC REGION		ANKRD50	ANKRD50, SPRY1
BTB-01557882	17	33462719	17.2	A	8	0.01					
BovineHD1700009301	17	33482085	17.2	A	8	0.01					

BovineHD1700010836	17	39784781	17.3	A	7	0.04		INTERGENIC REGION		ULBP3, RAPGEF2	NÃO
BovineHD1700011778	17	42346858	17.4	A	7	0.02		GRIA2	TMEM144, GASK1	MIR2321, GLRBB	GRIA2
BovineHD1700011876	17	42840417	17.4	A	7	0.06					
BovineHD1700013695	17	48587301	17.5	D	8	0		INTERGENIC REGION	PIWIL1, FZD10	GLT1D1, SLC15A4	NÃO
BovineHD1700013696	17	48593019	17.5	A+D	9	0	*				
BovineHD1700013697	17	48593697	17.5	A+D	9	0	*				
BovineHD1700013699	17	48595733	17.5	A+D	8	0	*				
BovineHD1700013700	17	48596581	17.5	A+D	8	0	*				
BovineHD1700013705	17	48608257	17.5	A+D	8	0	*				
BovineHD1700013713	17	48648938	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013718	17	48670998	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013724	17	48691828	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013728	17	48696933	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013729	17	48698626	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013730	17	48700774	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013734	17	48706474	17.5	D	7	0.05					
BovineHD1700013736	17	48708769	17.5	D	7	0.04					
BovineHD1700013809	17	48850733	17.5	D	8	0.01					
BovineHD1700014748	17	52582358	17.6	D	7	0.06		INTERGENIC REGION		AACS, MIR10166, BRI3BP, DHX37, UBC, SCARB1	NÃO
BovineHD1700014761	17	52606632	17.6	A+D	8	0	*				
BovineHD1700015854	17	55890902	17.7	D	8	0		INTERGENIC REGION	VPS37B, DENR, HCAR1, KNTC1, RSRC2, ZCCHC8, CLIP1, VPS33A, DIABLO, MLX1P, PSMD9, HPD, RHOF, TMEM120B	MORN3, ORA11, RNF34, ANAPC5, CAMKK2, P2RX4, P2RX7, IFT81, ATP2A2, ANAPC7, ARPC3, MIR2285AN, GPN3, FAM216A, VPS29, RAD9B, PPTC7, TCTN1,	NÃO

										HVCN1, PPP1CC	
BovineHD1700016593	17	58513310	17.8	A	7	0.02		INTERGENIC REGION	BRAP, ACAD10, PRKAB1, HSPB8 ,	SUDS3, TAOK3, PEBP1, WSB2, RFC5, KSR2	NÃO
BovineHD1700018306	17	63643064	17.9	D	7	0.07		OAS1Y	RBM19, LHX5,SDSL,SD S, PLBD2, DTX1, CFAP73, RITA1, IQCD, SLC8B1, OAS2	OAS1X, OAS1Z, RPH3A, RPL6, TRAFD1, NAA25, ERP29, TMEM116, ADAM1B, PAPKAPK5, ALDH2	NÃO
BovineHD1800013647	18	46438172	18.1	D	8	0		INTERGENIC REGION	ZNF181, ZNF599, GRAMD1A, SCN1B, HPN, FXVD3, LGI4, FXVD1,FXVD7, FXVD5, LSR, USF2, HAMP, MAG, FFAR1, FFAR3, FFAR2	KRTDAP, DMNK, SBSN, GAPDHS, TMEM147, ATP4A, HAUS5, RMB42, ETV2, UPK1A, ZBTB32, IGFLR1, U2AF1L4, PSENN, LIN37, HSPB6, PRODH2, NPHS1, APLP1, NFKBID, HCST, TYROBP, LRFN3, SDHAF1, SYNE43, CLIP3, THAP8, OVOL3, POLR2I, TBCB, CAPNS1, COXA7A1, ZNF565, ZNF567,ZNF382, ZNF566	NÃO

BovineHD1800013914	18	47162893	18.2	A	7	0.06	ZNF382	GRAMD1A, SCN1B, HPN, FXVD3, LGI4, FXVD1,FXVD7, FXVD5, LSR, USF2, HAMP, MAG, FFAR1, FFAR3, FFAR2 KRTDAP, DMNK, SBSN, GAPDHS, TMEM147, ATP4A, HAUS5, RMB42, ETV2, UPK1A, ZBTB32, IGFLR1, U2AF1L4, PSENE1, LIN37, HSPB6, PRODH2, NPHS1, APLP1, NFKBID, HCST, TYROBP, LRFN3, SDHAF1, SYNE43, CLIP3, THAP8, OVOL3, POLR2I, TBCB, CAPNS1, COXA7A1, ZNF565,ZNF56 7,	ZNF566,ZNF383, ZNF570,ZNF420, ZNF345, ZFP30	ZNF382
BovineHD1800019754	18	50659212	18.3	D	7	0.04	CYP2S1	FBL, PSMC4, TTC9B, AKT2, PLD3, SERTAD1, SERTAD3, BLVRB, SPTBN4, SHKBP1, NUMBL, TIPKC, SNRPA, MIA, RAB4B,	CCDC97, HNRNPULL1, TGFB1, B9D2, BCKDHA, B3GNT8, DMAC2, CEACAM1, LIPE, CNFN, TMEM145, PRR19, PAFAH1B3, ERF, GSK3A,	CYP2S1

									MIR12057, EGLN2, CYP2B6	ZNF526, DEDD2, ZNF547, GRIK5, RABAC1	
BovineHD1900001215	19	5040206	19.1	D	7	0.06		INTERGENIC REGION		TOM1L1, COX11, STXBP4, HLF, MMD	NÃO
BovineHD1900003112	19	11607205	19.2	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	DHX40, CLTC, PTRH2, VMP1, MIR21,TUBD1, RPS6KB1, RNFT1, TBX4	TBX2, PPMID1D	TBX2
BovineHD2000003757	20	11691537	20.1	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	PIK3R1	CD180	NÃO
BovineHD2000003758	20	11692591	20.1	D	8	0.01					
BovineHD2000003762	20	11702075	20.1	D	8	0					
BovineHD2000004366	20	13749048	20.2	D	7	0.05		NLN	SREK1, MIR2285Z, MIR2285Q, SREK1, ERBIN	SGTB, TRAPPC13, TRIM23, PPWD1, CENPK, ADAMTS6, CWC27, SERK1IP1, SHISAL2B	NLN
BovineHD2000004368	20	13757199	20.2	D	7	0.05					
BovineHD2000004377	20	13786742	20.2	D	7	0.05					
BovineHD2000004378	20	13788171	20.2	D	7	0.05					
BovineHD2000004437	20	14079844	20.3	A	7	0.07		ADAMTS6	SREK1, MIR2285Z, MIR2285Q, SREK1, ERBIN, NLN, SGTB, TRAPPC13, TRIM23, PPWD1, CENPK,	CWC27, SERK1IP1, SHISAL2B, RGS7BP, RNF180	ADAMTS6
BovineHD2000004441	20	14121548	20.3	A	7	0.07					
Hapmap48788-BTA-49979	20	16553485	20.4	D	8	0.01		IPO11		DIMT1, KIF2A	IPO11
BovineHD2000005035	20	16589276	20.4	D	8	0.01					
BovineHD2000005085	20	16784854	20.4	D	7	0.02					
BovineHD2000014996	20	54750596	20.5	D	7	0.04		INTERGENIC REGION	CDH18		NÃO
BovineHD2000014999	20	54758986	20.5	D	7	0.04					

BovineHD2000015001	20	54775862	20.5	D	7	0.02					
BovineHD2000015008	20	54788923	20.5	D	7	0.02					
BovineHD2000015013	20	54800174	20.5	D	7	0.04					
BovineHD2000015089	20	55066879	20.6	A	7	0.02					
BovineHD2000015143	20	55296832	20.6	A+D	7	0.02	*			MYO10, RETREG1, ZNF622, MARCH11	BASP1
BovineHD2000015143	20	55296832	20.6	A+D	7	0.02	*	BASP1			
BovineHD2000015155	20	55347026	20.6	D	7	0.04					
BovineHD2000015435	20	56249149	20.6	A	7	0.03					
BovineHD2100019996	21	68374934	21.1	D	7	0.06		INTERGENIC REGION	MEG3, MIR 493, MIR665, RTL1, PEG11A, MIR432, MIR 433, MIR127, MEG8, MIR432, MIR136, MIR370, MIR379, MIR411A, MEG9, DIO3OS, DIO3	PPR2R5C, DYNC1H1, LOC786914, HSP90AA1, WDR20, CINP, TECPR2, ANKRD, TRAF3, AMN	NÃO
BovineHD2200004733	22	16390366	22.1	D	7	0.06				TOPAZ1, TCAIM, ZNF445, ZKSCAN7, ZNF197,ZNF35,Z NF502, KIAA1142, KIF15, IRAK2, VHL, BRK1, FANCD2OS, FANCD2, EMC3, CRELD1, IL17RC, JAGN1, CIDEA, RPUSD3, ARPC4, TADA3, CAMK1, OGG1, BRPF1, CPNE9, MTMR14, SETD5, THUMP3, SRGAP3	NÃO
BovineHD2200004737	22	16395455	22.1	D	7	0.06		ZNF445	KLHL40, HHATL, CCDC13, HIGD1A, ACKR2, CYP8B1, POMGNT2, MIR2368, ANO10		

BovineHD2200005034	22	17553919	22.2	D	7	0.02			KIF15, IRAK2, VHL, BRK1, FANCD2OS, FANCD2, EMC3, CRELD1, IL17RC, JAGN1, CIDEA, RPUSD3, ARPC4, TADA3, CAMK1, OGG1, BRPF1, CPNE9, MTMR14, SETD5, THUMP3		
BovineHD4100015511	22	17556085	22.2	D	7	0.02		SGARP3	RAD18, OXTR, CAV3, LMCD1		NÃO
BovineHD2300000742	23	3501646	23.1	D	7	0.03		INTERGENIC REGION	PRIM2, RAB23, BAG2, ZNF451, BEND6, MIR2375, MIR2285J-2	BMP5	NÃO
BovineHD2300007129	23	25587771	23.2	D	8	0		BOLA-DRA	EFHC1, TRAM2, TMEM14A, GSTA1, GSTA2, GSTA3, GSTA4, GSTA5, CILK1, FBX09, GCM1, ELVOVL5, BOLA-DQA2, BOLA-DQB, LOC100848815, BOLA-DRB3	BTNL2, LOC525599, LOC5004295, BLA-DBQ	NÃO
BovineHD2300012977	23	44755264	23.3	A+D	7	0.03	*	INTERGENIC REGION	EDN1, ADTRP	NEDD9, SMIM13, ELVOCL2, MAK, TMEM14C, PAK1IP1, GCNT2, TFAP2A	NÃO
BovineHD2400008514	24	31330694	24.1	A	7	0.02		INTERGENIC REGION	AQP4, KCTD1, TAF4B, SS18, MIR2380	ZNF521, MIR378C, MIR12051	NÃO

BovineHD2400013551	24	48577823	24.2	D	8	0.01		INTERGENIC REGION	SMAD2	SMAD7, DYM	SMAD7
--------------------	----	----------	------	---	---	------	--	-------------------	-------	------------	-------