

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO DE VARIÁVEIS
RELACIONADAS COM A SAÚDE DO CASCO E CONFORMAÇÃO NA RAÇA
HOLANDESA**

LUIS PAULO BATISTA SOUSA JUNIOR

SALVADOR - BAHIA
SETEMBRO DE 2023



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOTECNIA

**INVESTIGAÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO DE VARIÁVEIS
RELACIONADAS COM A SAÚDE DO CASCO E CONFORMAÇÃO NA RAÇA
HOLANDESA**

LUIS PAULO BATISTA SOUSA JUNIOR
ZOOTECNISTA

SALVADOR - BAHIA
SETEMBRO DE 2023

LUIS PAULO BATISTA SOUSA JUNIOR

**INVESTIGAÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO DE VARIÁVEIS
RELACIONADAS COM A SAÚDE DO CASCO E CONFORMAÇÃO NA RAÇA
HOLANDESA**

Tese apresentada ao Programa de
Doutorado em Zootecnia, da
Universidade Federal da Bahia
como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor em
Zootecnia.

Área de Concentração:
Melhoramento Animal

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Batista Pinto

**SALVADOR - BAHIA
SETEMBRO DE 2023**

Dados internacionais de catalogação-na-publicação
(SIBI/UFBA/Biblioteca Universitária Reitor Macedo Costa)

Sousa Junior, Luis Paulo Batista.

Investigação do controle genético de variáveis relacionadas com a saúde do casco e conformação na raça holandesa / Luis Paulo Batista Sousa Junior. - 2023.
131 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Luís Fernando Batista Pinto.

Tese (doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia, Salvador, 2023.

1. Zootecnia. 2. Bovinos de leite - Melhoramento genético. 3. Holandês (Bovino) - Melhoramento genético. 4. Bovinos de leite - Produtividade. I. Pinto, Luís Fernando Batista. II. Universidade Federal da Bahia. Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia. III. Título.

CDD - 636.2142

CDU - 636.082

**INVESTIGAÇÃO DO CONTROLE GENÉTICO DE VARIÁVEIS
RELACIONADAS COM A SAÚDE DO CASCO E CONFORMAÇÃO NA
RAÇA HOLANDESA**

Luis Paulo Batista Sousa Júnior

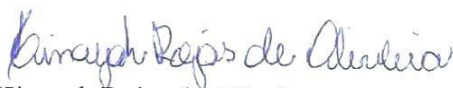
**Tese defendida e aprovada para obtenção do grau de
Doutor em Zootecnia**

Salvador, 15 de setembro de 2023


Comissão examinadora:



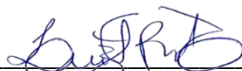
Dr. Luís Fernando Batista Pinto
Universidade Federal da Bahia
Orientador / Presidente



Dra. Hinayah Rojas de Oliveira
Purdue University



Dr. Júlio César de Carvalho Baleiro
Universidade de São Paulo



Dr. Luiz Fernando Brito
Purdue University



Dra. Valdecy Aparecida Rocha da Cruz
Universidade Federal da Bahia

LISTA DE FIGURAS

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para várias características de saúde do casco em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Figura 1. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para o índice de saúde do casco usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.	31
Figura 2. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para dermatite digital (a), erosão do talão (b) e dermatite interdigital (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.....	32
Figura 3. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para hiperplasia interdigital (a), hemorragia de sola (b) e doença da linha branca (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.	33
Figura 4. Gráfico de Manhattan da análise de associação do genoma para úlcera de sola (a) e úlcera da pinça (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.	34

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para características de conformação corporal em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Figura 1. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para o índice composto de pontuação para Pés e Pernas usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.....	87
Figura 2. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para ângulo do pé (a) e profundidade do talão (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.....	88
Figura 3. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para qualidade óssea (a), visão da perna dianteira (b) e locomoção (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.....	89
Figura 4. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para vista traseira da perna traseira (a) e vista lateral da perna traseira (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense.	90
Figura 5. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para escore de condição corporal (a), profundidade corporal (b) e largura do peito (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs	

estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.91

Figura 6. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para capacidade leiteira (a), altura frontal (b) e estatura (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.92

LISTA DE TABELAS

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para várias características de saúde do casco em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Tabela 1. Estatísticas descritivas dos pseudo-fenótipos usados para as análises de associação genômica de características de saúde do casco no gado Holandês canadense.	27
Tabela 2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao índice de saúde do casco e os genes posicionais correspondentes identificados.	36
Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à dermatite digital (DD), erosão do talão (ET) e dermatite interdigital (DI) e os genes posicionais correspondentes identificados para cada característica.	39
Tabela 4. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupos de genes identificados para dermatite digital em bovinos da raça Holandesa Canadense.	44
Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à hiperplasia interdigital (HI), hemorragia da sola (HS) e doença da linha branca (DLB), e os genes posicionais correspondentes identificados para cada traço.	46
Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados a úlcera de sola (US) e úlcera da pinça (UP) e os genes posicionais correspondentes identificados para cada característica.	49
Tabela 7. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para úlcera de sola (US) e hemorragia de sola (HS) em bovinos da raça Holandesa Canadense.	51
Tabela 8. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupos de genes identificados para a doença da linha branca em bovinos da raça Holandesa Canadense.	53

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para características de conformação corporal em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Tabela 1. Estatísticas descritivas dos pseudo-fenótipos usados para as análises de associação genômica ampla de características de saúde do casco no gado Holandês canadense.	83
Tabela 2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao índice composto de pontuação para Pés e Pernas e os genes posicionais correspondentes identificados.	94
Tabela 3. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para escore de condição corporal (ECC), qualidade óssea (QO), índice composto de pontuação para Pés e Pernas (IPP) e vista lateral da perna traseira (VLPT) em gado Holandês canadense.	95

Tabela 4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao ângulo do pé (ANG) e profundidade do talão (PT) e os genes posicionais correspondentes identificados.	99
Tabela 5. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para ângulo do pé (ANG) em bovinos da raça Holandesa canadense.	100
Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à qualidade óssea (QO), visão da perna dianteira (VPD) e locomoção (LOC) e os genes posicionais correspondentes identificados.	104
Tabela 7. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à vista traseira da perna traseira (VTPT) e à vista lateral da perna traseira (VLPT) e os genes posicionais correspondentes identificados.	106
Tabela 8. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao escore de condição corporal (ECC) e largura do peito (LP) e os genes posicionais correspondentes identificados.	111
Tabela 9. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à profundidade corporal (PC) e os genes posicionais correspondentes identificados.	113
Tabela 10. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à capacidade leiteira (CL), altura frontal (AF) e estatura (ES) e os genes posicionais correspondentes identificados.	116

LISTA DE SIGLAS

AF - altura frontal
ANG - ângulo do pé
CL - capacidade leiteira
CNV - variação no número de cópias
CQ - controle de qualidade
DD - dermatite digital
dEBVs - valores genéticos estimados de-regredidos
DI - dermatite interdigital
DLB - doença da linha branca
ECC - escore de condição corporal
ES - estatura
ET - erosão de talão
FDR - razão de falsas descoberta
GEBV - valores genéticos genômicos
GO - Ontologia genética
GRM - matriz de relacionamento baseada na genômica
GWAS - Estudo de Associação Genômica Ampla
HD - alta densidade
HI - hiperplasia interdigital
HS - hemorragia da sola
IPP - escore composto de pés e pernas
ISC - índice de saúde do casco
L - comprimento do genoma
LD - desequilíbrio de ligação
LOC - locomoção
LP - largura de peito
MAF - alelos de menor frequência
MD - média densidade
Me - número de segmentos cromossômicos independentes
MLM - modelo linear misto
Ne- tamanho efetivo da população
PC - profundidade corporal
PT - profundidade de talão
QO - qualidade óssea
QTL - loci de características quantitativas
SNP - polimorfismo de nucleotídeo único
UP - úlcera da pinça
US - úlcera de sola
VLPT - vista lateral das pernas traseiras
VTPT - vista traseira das pernas traseiras
WGS - Sequenciamento completo de genoma

SUMÁRIO

Associação genômica ampla e análises genômicas funcionais para características de saúde do casco e conformação corporal em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Resumo Geral.....	11
Abstract	14
Introdução Geral.....	11
Revisão de literatura Geral.....	14
Referências Bibliográficas	19

Capítulo 01

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para várias características de saúde do casco em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Resumo.....	23
Abstract	24
Introdução	25
Material e Métodos	26
Declaração de ética	26
Animais e fenótipos.....	26
Imputação Genotípica e Controle de Qualidade	27
Análises de associação genômica ampla.....	28
Correção de testes múltiplos	29
Análises genômicas funcionais	29
Resultados e Discussão	30
Análises de associação	30
Índice de saúde do casco	34
Doenças infecciosas	37
Doenças não infecciosas	44
Conclusões	58
Referências Bibliográficas	58

Capítulo 02

Associação genoma ampla e análises genômicas funcionais para características de conformação corporal em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

	Página
Resumo.....	78
Abstract	79
Introdução	80
Material e Métodos	81
Declaração de ética	81
Animais e fenótipos.....	81
Imputação Genotípica e Controle de Qualidade	84
Análises de associação genômica ampla.....	84
Correção de testes múltiplos	85
Análises genômicas funcionais	86
Resultados e Discussão	86
Análises de associação	86
Índice composto de pontuação de pés e pernas.....	93
Características de pontuação composta dos cascos.....	96
Características que compõem o escore de mobilidade.....	101
Características de força leiteira	1088
Conclusões	1188
Referências Bibliográficas	1188
Considerações Finais e Implicações.....	130
 APÊNDICE I.....	 118
APÊNDICE II	118
APÊNDICE III.....	131
APÊNDICE IV	131

RESUMO GERAL

Os principais objetivos deste estudo foram realizar estudos de associação genômica ampla, usando painéis de alta densidade imputados, de gado Holandês norte-americano, para oito características relacionadas a saúde do casco: dermatite digital (DD), úlcera de sola (US), hemorragia de sola (HS), doença da linha branca (DLB), erosão de talão (ET), dermatite interdigital (DI), hiperplasia interdigital (HI) e úlcera de pinça (UP), um índice de saúde do casco (ISC), para treze características de conformação corporal: escore de condição corporal (ECC), profundidade corporal (PC), qualidade óssea (QO), largura de peito (LP), capacidade leiteira (CL), ângulo do pé (ANG), visão das pernas dianteiras (VPD), profundidade do talão (PT), altura frontal (AF), locomoção (LOC), visão traseira das pernas traseiras (VTPT), visão lateral das pernas traseiras (VLPT) e estatura (ST) e um índice composto de pontuação de pés e pernas (IPP). Valores genéticos estimados de-regredidos (dEBVs) de 39.135 animais da raça Holandesa foram usados como pseudofenótipos para as análises de associação. O controle de qualidade de genótipos, faseamento de genótipos e imputação de genótipos foram realizados usando os softwares PLINK, Eagle e Minimac4, respectivamente. Um modelo linear misto foi usado para estimar os efeitos SNP no pacote GCTA. As análises genômicas funcionais foram realizadas utilizando o pacote GALLO R e a plataforma DAVID. Um total de 22 SNPs significativos foram encontrados para DD, 34 para ET, 14 para DI, 22 para HI, 28 para HS, 33 para US, 24 para UP, 43 para DLB, 15 para ISC, 20 para ECC, 60 para PC, 13 para QO, 17 para LP, 27 para CL, 13 para IPP, 8 para ANG, 7 para VPD, 19 para PT, 4 para AF, 10 para LOC, 13 para VTPT, 15 para VLPT e 7 para ST. Os marcadores significativos foram localizados em todo o genoma, exceto nos cromossomos BTA 27. Além disso, essas regiões genômicas se sobrepõem a vários loci de características quantitativas (QTL) previamente relatados para características de exterior, de saúde, carne e carcaça, leite, produção e reprodução. As análises de enriquecimento identificaram 71 termos de ontologia genética significativos. Esses achados indicam que as características de saúde dos cascos e de conformação são altamente poligênicas e influenciadas por uma ampla gama de processos biológicos.

Palavras-chave: Gado leiteiro, resistência a doenças, doença dos cascos, medidas

ABSTRACT

The main objectives of this study were to perform genome-wide association studies using imputed high-density genetic markers data from North American Holstein cattle, for eight hoof-related traits: digital dermatitis (DD), sole ulcer (US), sole hemorrhage (HS), white line lesion (DLB), heel horn erosion (ET), interdigital dermatitis (DI), interdigital hyperplasia (HI) toe ulcer (UP) and a hoof health index (ISC), for thirteen body conformation traits: body condition score (BCS), body depth (PC), bone quality (QO), chest width (LP), dairy capacity (CL), foot angle (ANG), front legs view (VPD), heel depth (PT), height at front end (AF), locomotion (LOC), rear legs rear view (VTPT), rear legs side view (VLPT) and stature (ST) and a composite feet and leg score (IPP). De-regressed estimated breeding values (dEBVs) from 39,135 Holstein animals were used as pseudo-phenotypes for the association analyses. The molecular marker quality control, genotype phasing, and genotype imputation were performed using the PLINK, Eagle, and Minimac4 software, respectively. A mixed linear model was used to estimate SNP effects in the GCTA package. The functional genomic analyses were performed using the GALLO R package and the DAVID platform. A total of 22 significant SNPs were found for DD, 34 for ET, 14 for DI, 22 for HI, 28 for HS, 33 for US, 24 for UP, 43 for DLB, 15 for ISC, 20 for ECC, 60 for PC, 13 for QO, 17 for LP, 27 for CL, 13 for IPP, 8 for ANG, 7 for VPD, 19 for PT, 4 for AF, 10 for LOC, 13 for VTPT, 15 for VLPT and 7 for ST. The significant markers were located across the whole genome, except on the chromosome BTA27. Moreover, these genomic regions overlapped with various previously reported quantitative trait loci (QTL) for exterior, health, meat and carcass, milk, production, and reproduction traits. Enrichment analyzes identified 71 significant gene ontology terms. These findings indicated that hoof health and body conformation traits are highly polygenic and influenced by a wide range of biological processes.

Keywords: Dairy cattle, disease resistance, hoof disease, measures

INTRODUÇÃO GERAL

A indústria leiteira possui grande importância na segurança alimentar mundial. Segundo a FAO (2022), a produção mundial de leite em 2022 estava prevista em cerca de 930 milhões de toneladas e o comércio mundial de produtos lácteos estava previsto em 85 milhões de toneladas. Essa grande produção é consequência do aumento do rebanho bovino em todo o mundo por muitas décadas seguidas. Além disso, nos Estados Unidos a produção média anual de leite por vaca dobrou nos últimos 40 anos e hoje é aproximadamente seis vezes maior que 100 anos atrás (USDA NASS, 2023). Porém, a vida útil produtiva média é de aproximadamente 3 a 4 anos em países com vacas leiteiras de alta produção, sendo muito menor do que a expectativa de vida natural do gado leiteiro (DE VRIES & MARCONDES, 2020). Apesar de a capacidade secretora da glândula mamária atualmente parece não estar comprometida, um número significativo de distúrbios de saúde e desempenho reprodutivo reduzido relacionados à alta produção de leite são observados (GROSS, 2023), os quais contribuem para um descarte precoce desses animais.

A raça Holandesa (Holstein-Friesian) é um *Bos taurus taurus* altamente especializado na produção de leite e amplamente utilizada no mundo, sendo conhecida por ser a maior produtora de leite em volume (AUGUSTO, 2023). Ela é muito popular internacionalmente e possui uma ampla utilização nos programas de melhoramento genético, principalmente nos países da América do Norte e na Europa. É tida como uma das principais raças utilizadas para cruzamentos absorventes ou na formação de raças compostas (ARAUJO e FIUZA, 2023).

Dentre os problemas sanitários que afligem os bovinos e, conseqüentemente, seu bem-estar, estão as lesões nos cascos, que causam a claudicação e diminuem a produção leiteira, podendo atingir a prevalência de 70% do rebanho (CHAPINAL et al., 2013). Estudos sobre a herdabilidade de características relacionadas com a saúde dos cascos identificaram em sua maioria baixos valores como para dermatite digital (0,08), dermatite interdigital (0,05), hiperplasia interdigital (0,07), erosão do talão (0,08), úlcera de sola (0,05), hemorragia de sola (0,03), úlcera de pinça (0,04) e doença da linha branca (0,04) (MALCHIODI et al., 2020). Sabe-se também que essas características estão geneticamente relacionadas, com estimativas de correlações genéticas variando de -0,19 (doença da linha branca x dermatite digital) a 0,44 (dermatite digital x dermatite

interdigital) (MALCHIODI et al., 2020). As estimativas de herdabilidade supracitadas indicam que essas características possuem herança complexa e a utilização delas como critério de seleção em programas de melhoramento genético tende a gerar ganhos apenas no longo prazo.

A utilização da informação genotípica tem elevado a acurácia de predição dos valores genéticos dos animais, permitindo identificar, precocemente, potenciais reprodutores e matrizes (FERRAZ et al., 2012). Assim, esta tese foi elaborada em dois capítulos, onde o primeiro é dedicado aos estudos de associação genômica ampla com fenótipos que envolvam características de saúde do casco em bovinos da raça Holandesa da América do Norte e no segundo capítulo tem-se os estudos de associação envolvendo características de conformação em bovinos da raça Holandesa da América do Norte. Em ambos os capítulos são avaliadas a genômica funcional dos potenciais genes candidatos encontrados.

REVISÃO DE LITERATURA GERAL

SAÚDE CASCO

A claudicação é um dos grandes problemas para a indústria leiteira, pois a dificuldade de locomoção interfere no bem-estar do animal e também gera uma redução do retorno financeiro ao produtor. Ao estudar a prevalência da claudicação em algumas províncias do Canadá, Jewellet al. (2019) encontraram animais que apresentavam variados escores de locomoção, indo de animais normais a animais que mancavam e tinham muita dificuldade ao andar.

Vários estudos têm tentado relacionar a claudicação com a saúde dos cascos (CARTWRIGHTET al., 2017; RING et al., 2018; RICHARDSONET al., 2018; MALCHIODI et al., 2020; BUTTYET al., 2021). Ring et al. (2018) identificaram que a saúde do casco possuía uma correlação genética com a claudicação (0,48) e que características de saúde do casco possuíam estimativas de herdabilidade entre 0,005 e 0,27. Segundo Malchiodi et al. (2020), as enfermidades mais prevalentes que podem ser utilizadas para correlacionar a saúde do casco com a claudicação são: dermatite digital,

dermatite interdigital, hiperplasia interdigital, erosão do talão, úlcera de sola, hemorragia de sola, úlcera de pinça e a doença da linha branca.

A dermatite digital representa a lesão do casco mais prevalente no Canadá, com quase 20% das vacas afetadas. Cartwright et al. (2017) identificaram a presença de anticorpos em animais com a dermatite digital e maiores níveis de anticorpos levaram a menores lesões nos cascos das vacas. Ao implementar uma avaliação genômica para dermatite digital em rebanhos no Canadá, Malchiodi et al. (2018) observaram que as correlações entre o valor genético estimado para resistência à dermatite digital e para características ligadas a produção foram todas favoráveis.

O ICAR é um Comitê internacional que tem a missão de promover o desenvolvimento e incrementar os registros de desempenho, bem como de avaliação genética dos animais de produção. Ele elaborou um atlas para ser uma ferramenta para os clínicos e casqueadores e apresenta as diretrizes para o registro das doenças importantes que afetam a saúde podal dos bovinos (EGGER-DANNER et al., 2020).

CONFORMAÇÃO

As características de conformação têm sido de grande interesse para a indústria de laticínios há décadas e, desde a introdução da avaliação técnica no final da década de 1960 e dos sistemas de avaliação linear no início da década de 1980, mais de 2 milhões de avaliações foram acumuladas no Canadá. (MIGLIOR et al. 2017). A classificação das vacas é uma prática de longa data que ajuda os produtores a tomarem decisões de acasalamento e abate. Esta classificação concentra-se na seleção de animais mais saudáveis, mais produtivos e mais férteis para maior expectativa de vida em grupo com base em características de conformação (ALCANTARA et al., 2022).

As medidas corporais são usadas para avaliar os escores de condição corporal e o peso corporal, além de determinar o melhor fenótipo para animais mais saudáveis, mais produtivos e mais longevos. A determinação de medidas corporais precisas pode, portanto, ajudar em muitas decisões de manejo, como o status reprodutivo e alimentar de um rebanho ou o ganho de peso diário. No entanto, a maioria das medidas corporais são subjetivas, exigem muito trabalho e treinamento. Segundo Martins et al. (2020), a avaliação do escore de condição corporal requer treinamento prévio e o nível de

treinamento é subjetivo, como para a avaliação de características do tipo leiteiro, e a pesagem dos animais exige muito trabalho e tempo, exigindo movimentação do rebanho.

Um estudo conduzido por (Oliveira Junior et al., 2021) buscou estimar os parâmetros genéticos para características avaliadas rotineiramente em vacas primíparas da raça Holandesa no Canadá. Eles trabalharam com características de conformação e obtiveram estimativas de herdabilidade como segue: qualidade óssea (QO) de 27%, ângulo do pé (ANG) de 8%, profundidade de talão (PT) de 8%, vista traseira das pernas traseiras (VTPT) de 11%, vista lateral das pernas traseiras (VLPT) de 21%, escore de condição corporal (ECC) de 23%, profundidade corporal (PC) de 31%, largura de peito (LP) de 20%, capacidade leiteira (CL) de 19%, altura frontal (AF) de 24%, estatura (ES) de 47%. Além disso, também calcularam a correlação genética entre essas características, tendo observado as maiores para ANG x PT (0.83 ± 0.01), ECC x LP (0.72 ± 0.01) e ECC x CL (-0.71 ± 0.01), além de moderada correlação entre VLPT com ANG (-0.35 ± 0.01) e com PT (-0.34 ± 0.01). A correlação com outros grupos de características merece destaque. A CL tem moderada correlação com a produção de leite em 305 dias ($0,54 \pm 0,01$), com a produção de proteína em 305 dias ($0,52 \pm 0,01$) e com a produção de gordura em 305 dias ($0,45 \pm 0,01$). O tamanho do bezerro foi correlacionado com ES (0.52 ± 0.01) e com LP (0.37 ± 0.01). E merecem destaque as correlações com características de pés e pernas: ANG e úlcera da pinça (0.42 ± 0.06), VTPT e dermatite interdigital (-0.31 ± 0.02) e PT teve correlação de -0.28 ± 0.03 com hiperplasia interdigital, úlcera da sola e dermatite interdigital.

GWAS

A relação entre polimorfismos genéticos e diferenças fenotípicas observadas entre indivíduos é de interesse biológico fundamental. Atualmente, uma ferramenta poderosa para auxiliar nessa análise de associação é o Estudo de Associação Genômica Ampla (GWAS). Segundo Sahana et al. (2023), os objetivos de um GWAS são detectar associações significativas entre variantes genéticas e os fenótipos para a característica estudada, estimando os efeitos de cada variante para, em seguida, analisar com mais detalhes as melhores variantes candidatas. O método mais clássico testa cada variante individualmente usando modelo linear misto, enquanto considera a estrutura da

população para evitar associações falso-positivas. Esta abordagem tem uma lacuna importante: todas as variantes no desequilíbrio de ligação (LD) com uma variante causal têm um efeito estatístico que também pode ser significativo, o que implica então um trabalho adicional para selecionar apenas as melhores variantes candidatas (Sahana et al., 2023).

Ao realizar GWAS com características de saúde do casco (qualidade óssea, profundidade do talão, vista lateral da perna traseira e vista traseira da perna traseira) em vacas da raça Holandesa na China, Abdalla et al. (2021) identificaram vários genes candidatos próximo de SNPs significativos, incluindo *ADIPOR2*, *INPP4A*, *DNMT3A*, *ALDH1A2*, *PCDH7*, *XKR4* e *CADPS*. Análises com ferramentas de bioinformática identificaram 34 termos ontológicos genéticos e duas vias de sinalização significativamente enriquecidas relacionadas à qualidade biológica, metabolismo e processos de desenvolvimento.

Barden et al. (2022) identificaram uma janela genômica de 0,65 Mb no BTA3 explicando 0,41, 0,50, 0,38 e 0,49% da variância genética para suscetibilidade à hemorragia da sola, gravidade da hemorragia da sola, suscetibilidade à doença da linha branca e gravidade da doença da linha branca na raça Holandesa, respectivamente. Outra janela no BTA18 explicou 0,66, 0,41 e 0,70% da variância genética para suscetibilidade à hemorragia da sola, suscetibilidade à hemorragia da sola e gravidade da hemorragia da sola, respectivamente. Também foi identificado genes que estão ligados ao sistema imunológico e às respostas inflamatórias, ao metabolismo lipídico, às atividades de íons cálcio e à excitabilidade neuronal.

Butty et al. (2021) identificaram CNV associados com características de saúde de casco (dermatite digital, dermatite interdigital, erosão do talão, úlcera da sola, lesão na linha branca, hemorragia da sola e hiperplasia interdigital) usando dEBV como pseudofenótipos na raça Holandesa. Além disso, identificaram diversos genes candidatos nas regiões associadas a essas características, incluindo *SCART1*, *NRXN2*, *KIF26A*, *GPHN*, e *OR7A17*.

IMPUTAÇÃO

A utilização de painéis de alta densidade pode representar um elevado custo em programas de melhoramento, por isso é possível utilizar a técnica da imputação para

contornar esse empecilho. A imputação permite que as informações genótípicas presentes em um painel de baixa densidade sejam inferidas para um painel de alta densidade, a partir da utilização de animais de referência que estejam genotipados na densidade pretendida (LI et al., 2009; SERVIN & STEPHENS, 2007).

A imputação auxilia a redução dos custos dos programas de melhoramento (GORJANC et al., 2017), pois permite a exploração de conjuntos de dados de referência de sequência do genoma completo, preenchendo os valores ausentes após o processo de genotipagem e controle de qualidade, além de combinar dados de diferentes plataformas (RAMLI et al., 2013; VERMA et al., 2014). Ou seja, com imputação os programas de melhoramento podem reduzir custos aos indivíduos com painéis de baixa densidade e posteriormente imputá-los para painéis de densidades maiores (LI et al., 2009).

Segundo Druet et al. (2014) uma boa estratégia que representaria um bom custo-benefício seria o sequenciamento de animais que tenham contribuído com uma maior parte da genética da população que será estudada. Esses animais poderiam ser somados a outros aleatoriamente, e então, eles serviriam como o genótipo referência de outros animais que serão imputados.

Basicamente existem 3 diferentes métodos de imputação: os baseados em família, os baseados em população e a combinação dos dois. Segundo (HAYES et al., 2012), a metodologia baseada em família leva em consideração a segregação mendeliana, ou seja, a informação de pedigree é importante, pois ele é mais preciso para animais que possuem os pais genotipados. Enquanto os baseados em população exploram o uso do desequilíbrio de ligação (LD) entre marcadores, sem utilizar o conhecimento do relacionamento de informações populacionais, sendo mais indicado para o uso em animais menos relacionados ou animais sem parentes genotipados.

Ao analisar o efeito da densidade dos SNPs em bovinos, Khatkar et al. (2012) reportaram que a precisão da imputação aumenta com o número de SNPs no conjunto de testes e a taxa média de erro alélico diminui de 2,80% para 0,76%, entre os painéis de 3K e 35K quando metade dos animais foram colocados no grupo de referência. Também foi relatado que quanto menor é a densidade do painel, melhor é a estratégia de usar marcadores espaçados uniformemente para reduzir a taxa de erro alélico. Quanto maior a quantidade de animais no grupo de referência, menor é a taxa média de erro alélico

identificada. A taxa média de erro alélico diminui com o aumento do relacionamento entre os animais imputados e os animais de referência.

Chud et al. (2015) realizaram a imputação de bovinos de corte compostos em painéis de diferentes densidades (3K, 6K, 9K, 20K, 50K, 80K e 75K) para o painel Illumina Bovine HD (777K). Como principais resultados, reportaram melhores precisões de imputação quando usaram painéis de pelo menos 50K, ambos os sexos e animais mais velhos estavam presentes na população de referência. O software FIMPUTE apresentou melhor precisão e menor tempo de execução, especialmente em painéis de menor densidade (3K, 6K, 9K e 20K), quando comparado com o BEAGLE. Vários fatores influenciam os resultados da imputação, desde as metodologias assumidas pelos softwares até a estrutura das populações de referência e alvo. Contudo, tem se mostrado promissor a utilização da imputação, principalmente de densidades de 50K pra HD ou WGS (principalmente utilizando etapas intermediárias).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdalla, I. M., Lu, X., Nazar, M., Arbab, A. A. I., Xu, T., Yousif, M. H., Mao, Y., & Yang, Z. (2021). Genome-wide association study identifies candidate genes associated with feet and leg conformation traits in chinese holstein cattle. *Animals*, 11(8). <https://doi.org/10.3390/ani11082259>
- Alcantara, L. M., Baes, C. F., Junior, G. A. de O., & Schenkel, F. S. (2022). Conformation traits of Holstein cows and their association with a Canadian economic selection index. *Canadian Journal of Animal Science*, 102(3), 490–500. <https://doi.org/10.1139/cjas-2022-0013>
- Araújo, Flávia Ferreira; Fiuza, Isabela Cristina da Silva. Raça de Gado–Holandês. revista de trabalhos acadêmicos–universo belo horizonte, v. 1, n. 8, 2023.
- Augusto, Bruna Sala Importância da raça holandesa na pecuária leiteira: revisão bibliográfica. Universidade Estadual Paulista (Unesp), 2023. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/244692>>.
- Barden, M., Li, B., Griffiths, B. E., Anagnostopoulos, A., Bedford, C., Psifidi, A., Banos, G., & Oikonomou, G. (2022). Genetic parameters and genome-wide association study of digital cushion thickness in Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 105(10), 8237–8256. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22035>
- Butty, A. M., Chud, T. C. S., Cardoso, D. F., Lopes, L. S. F., Miglior, F., Schenkel, F. S., Cánovas, A., Häfliger, I. M., Drögemüller, C., Stothard, P., Malchiodi, F., & Baes, C. F. (2021). Genome-wide association study between copy number variants and hoof health traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 104(7), 8050–8061. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19879>

- Buttyet al., 2021. Genome-wide association study between copy number variants and hoof health traits in Holstein dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, S0022-0302(21)00545-2. Advance online publication. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19879>
- Cartwright et al., 2017. Prevalence of digital dermatitis in Canadian dairy cattle classified as high, average, or low antibody-and cell-mediated immune responders. *Journal of Dairy Science* 100(10):8409-8413.
- Chapinal, N., Koeck, A., Sewalem, A., Kelton, D. F., Mason, S., Cramer, G., & Miglior, F. (2013). Genetic parameters for hoof lesions and their relationship with feet and leg traits in Canadian Holstein cows. *Journal of Dairy Science*, 96(4), 2596–2604. <https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2012-6071>
- Chud, T. C. S., Ventura, R. V., Schenkel, F. S., Carvalheiro, R., Buzanskas, M. E., Rosa, J. O., Mudadu, M. de A., da Silva, M. V. G. B., Mokry, F. B., Marcondes, C. R., Regitano, L. C. A., & Munari, D. P. (2015). Strategies for genotype imputation in composite beef cattle. *BMC Genetics*, 16(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0251-7>
- De Vries, A., & Marcondes, M. I. (2020). Review: Overview of factors affecting productive lifespan of dairy cows. *Animal*, 14, s155–s164. <https://doi.org/10.1017/S1751731119003264>
- Druet, T., Macleod, I. M., & Hayes, B. J. (2014). Toward genomic prediction from whole-genome sequence data: impact of sequencing design on genotype imputation and accuracy of predictions. *Heredity*, 112(1), 39–47. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.13>
- Egger-Danner, C., Nielsen, P., Fiedler, A., Müller, K., Fjeldaas, T., Döpfer, D., Daniel, V., Bergsten, C., Cramer, G., Christen, A.-M., Stock, K. F., Thomas, G., Holzhauer, M., Steiner, A., Clarke, J., Capión, N., Charfeddine, N., Pryce, J.E., Oakes, E., Burgstaller, J., Heringstad, B., Ødegård, C. and J. Kofler
http://www.icar.org/Documents/ICAR_Claw_Health_Atlas.pdf
- FAO. 2022. Dairy Market Review: Emerging trends and outlook 2022. Rome
- Ferraz, José Bento Sterman; Eler, Joanir Pereira; Rezende, Fernanda Marcondes. Seleção genômica aplicada ao melhoramento animal: desafios atuais e expectativas futuras do criador. Anais do IX Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal, 2012.
- Gorjanc, G., Battagin, M., Dumasy, J.-F., Antolin, R., Gaynor, R. C., & Hickey, J. M. (2017). Prospects for Cost-Effective Genomic Selection via Accurate Within-Family Imputation. *Crop Science*, 57(1), 216–228. <https://doi.org/10.2135/cropsci2016.06.0526>
- Gross, J. J. (2023). Dairy cow physiology and production limits. *Animal Frontiers*, 13(3), 44–50. <https://doi.org/10.1093/af/vfad014>
- Hayes, B. J., Bowman, P. J., Daetwyler, H. D., Kijas, J. W., & van der Werf, J. H. J. (2012). Accuracy of genotype imputation in sheep breeds. *Animal Genetics*, 43(1), 72–80. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2011.02208.x>
- Jewell et al., 2019. Prevalence of lameness and associated risk factors on dairy farms in the Maritime Provinces of Canada. *Journal of Dairy Science* 102(4):3392-3405.
- Khatkar, M. S., Moser, G., Hayes, B. J., & Raadsma, H. W. (2012). Strategies and utility of imputed SNP genotypes for genomic analysis in dairy cattle. *BMC Genomics*, 13(1), 538. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-538>
- Li, Y., Willer, C., Sanna, S., & Abecasis, G. (2009). Genotype Imputation. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 10(1), 387–406. <https://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164242>
- Malchiodi et al., 2018. Implementation of genomic evaluation for digital dermatitis in Canada. *Interbull Bulletin*, 53.

- Malchiodi, F., Jamrozik, J., Christen, A. M., Fleming, A., Kistemaker, G. J., Richardson, C., Daniel, V., Kelton, D. F., Schenkel, F. S., & Miglior, F. (2020). Symposium review: Multiple-trait single-step genomic evaluation for hoof health. In *Journal of Dairy Science* (Vol. 103, Issue 6, pp. 5346–5353). Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.3168/jds.2019-17755>
- Martins, B. M., Mendes, A. L. C., Silva, L. F., Moreira, T. R., Costa, J. H. C., Rotta, P. P., Chizzotti, M. L., & Marcondes, M. I. (2020). Estimating body weight, body condition score, and type traits in dairy cows using three dimensional cameras and manual body measurements. *Livestock Science*, 236, 104054.
<https://doi.org/10.1016/j.livsci.2020.104054>
- Miglior, F., Fleming, U.M.A., Malchiodi, F., Brito, L.F., Martin, P. e Baes, C.F. 2017. Uma revisão de 100 anos: identificação e seleção genética de características economicamente importantes em bovinos leiteiros. *J. Sci laticínios*. 100 (12): 10251 – 10271.
<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12968>
- Oliveira Junior, G. A., Schenkel, F. S., Alcantara, L., Houlahan, K., Lynch, C., & Baes, C. F. (2021). Estimated genetic parameters for all genetically evaluated traits in Canadian Holsteins. *Journal of Dairy Science*, 104(8), 9002–9015.
<https://doi.org/10.3168/jds.2021-20227>
- Ramli, M. N. N., Yahaya, A. S., Ramli, N. A., Yusof, N. F. F. M., & Abdullah, M. M. A. (2013). Roles of imputation methods for filling the missing values: a review. *Advances in Environmental Biology*, 7, 3861+.
<https://link.gale.com/apps/doc/A440550349/AONE?u=anon~187650c0&sid=googleScholar&xid=44a275ef>
- Richardson et al., 2018. Determining the economic values and relative index weights for hoof lesions in the Canadian dairy industry. Research Report to GEB.
https://www.cdn.ca/Articles/GEBAPR2018/Determining%20the%20economic%20value%20and%20relative%20index%20weights%20for%20hoof%20lesions%20in%20the%20Canadian%20dairy%20industry%20_%20GEB%20Ver.pdf
- Ring et al., 2018. Genetic selection for hoof health traits and cow mobility scores can accelerate the rate of genetic gain in producer-scored lameness in Dairy cows. *Journal of Dairy Science* 101(11):10034-10047.
- Sahana, G., Cai, Z., Sanchez, M. P., Bouwman, A. C., & Boichard, D. (2023). Invited review: Good practices in genome-wide association studies to identify candidate sequence variants in dairy cattle. *Journal of Dairy Science*, 106(8), 5218–5241.
<https://doi.org/10.3168/jds.2022-22694>
- Servin, B., & Stephens, M. (2007). Imputation-Based Analysis of Association Studies: Candidate Regions and Quantitative Traits. *PLoS Genetics*, 3(7), e114.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030114>
- USDA National Agricultural Statistics Service. 2023. NASS - Quick Stats. Washington, DC: USDA National Agricultural Statistics Service. (Accessed August 10, 2023).
<https://quickstats.nass.usda.gov/>.
- Verma, S. S., de Andrade, M., Tromp, G., Kuivaniemi, H., Pugh, E., Namjou-Khales, B., Mukherjee, S., Jarvik, G. P., Kottyan, L. C., Burt, A., Bradford, Y., Armstrong, G. D., Derr, K., Crawford, D. C., Haines, J. L., Li, R., Crosslin, D., & Ritchie, M. D. (2014). Imputation and quality control steps for combining multiple genome-wide datasets. *Frontiers in Genetics*, 5. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00370>

CAPÍTULO 1

Associação genômica ampla e análises genômicas funcionais para várias características de saúde do casco em bovinos da raça Holandesa da América do Norte

RESUMO

As doenças dos cascos são um importante problema econômico e de bem-estar na indústria mundial de produção de leite, que pode ser minimizado por meio de melhores práticas de manejo e por seleção. Os processos seletivos para a melhoria genética da saúde do casco podem se beneficiar de uma compreensão profunda do histórico genético e da base biológica dos indicadores de saúde do casco. Portanto, os objetivos primários deste estudo foram realizar estudos de associação genômica ampla, usando dados de marcadores genéticos de alta densidade imputados de gado Holandês norte-americano, para oito características relacionadas a saúde do casco: dermatite digital, úlcera de sola, hemorragia de sola, doença da linha branca, erosão de talão, dermatite interdigital, hiperplasia interdigital e úlcera de pinça e um índice de saúde do casco. Os valores genéticos estimados de-regredidos (dEBVs) de aproximadamente 25.580 animais da raça Holandesa foram usados como pseudofenótipos para as análises de associação. O controle de qualidade genômica, faseamento de genótipos e imputação de genótipos foram realizados usando os softwares PLINK, Eagle e Minimac4, respectivamente. As análises genômicas funcionais foram realizadas utilizando o pacote GALLO R e a plataforma DAVID. Vinte e dois, 34, 14, 22, 28, 33, 24, 43 e 15 marcadores significativos foram identificados para dermatite digital, erosão de talão, dermatite interdigital, hiperplasia interdigital, hemorragia na sola, úlcera na sola, úlcera de pinça, doença na linha branca doença e o índice de saúde do casco, respectivamente. Marcadores significativos foram localizados em todos os autossomos, exceto BTA10, BTA12, BTA20, BTA26, BTA27 e BTA28. Além disso, as regiões genômicas identificadas se sobrepõem a vários loci de características quantitativas (QTL) previamente relatados para características de exterior, de saúde, carne e carcaça, leite, produção e reprodução. As análises de enriquecimento identificaram 44 termos de ontologia genética significativos. Essas regiões genômicas enriquecidas abrigam vários potenciais genes candidatos previamente associados ao desenvolvimento ósseo, metabolismo e doenças infecciosas e imunológicas. Esses achados indicam que as características de saúde dos cascos são altamente poligênicas e influenciadas por uma ampla gama de processos biológicos.

Palavras-chave: Gado leiteiro, dermatite digital, resistência a doenças, doença dos cascos

ABSTRACT

Hoof diseases is a major welfare and economic issue in the worldwide dairy cattle production industry, which can be minimized through improved management and breeding practices. Optimal genetic improvement of hoof health could benefit from a deep understanding of the genetic background and biological underpinning of indicators of hoof health. Therefore, the primary objectives of this study were to perform genome-wide association studies, using imputed high-density genetic markers data from North American Holstein cattle, for eight hoof-related traits: digital dermatitis, sole ulcer, sole hemorrhage, white line lesion, heel horn erosion, interdigital dermatitis, interdigital hyperplasia, and toe ulcer, and a hoof health index. De-regressed estimated breeding values (dEBVs) from approximately 25,580 Holstein animals were used as pseudo-phenotypes for the association analyses. The genomic quality control, genotype phasing, and genotype imputation were performed using the PLINK, Eagle, and Minimac4 software, respectively. The functional genomic analyses were performed using the GALLO R package and the DAVID platform. Twenty-two, 34, 14, 22, 28, 33, 24, 43, and 15 significant markers were identified for digital dermatitis, heel horn erosion, interdigital dermatitis, interdigital hyperplasia, sole hemorrhage, sole ulcer, toe ulcer, white line lesion disease, and hoof health index, respectively. The significant markers were located across all autosomes, except BTA10, BTA12, BTA20, BTA26, BTA27, and BTA28. Moreover, the genomic regions overlap various previously reported quantitative trait loci (QTL) for exterior, health, meat and carcass, milk, production, and reproduction traits. The enrichment analyses identified 44 significant gene ontology terms. These enriched genomic regions harbor various candidate genes previously associated with bone development, metabolism, and infectious and immunological diseases. These findings indicated that hoof health traits are highly polygenic and influenced by a wide range of biological processes.

Keywords: Dairy cattle, digital dermatitis, disease resistance, hoof disease

INTRODUÇÃO

As doenças dos cascos representam um grande problema de sustentabilidade na pecuária leiteira mundial, resultando em impacto econômico significativo devido à redução da produção de leite, desempenho reprodutivo e longevidade das vacas afetadas (BOOTH et al., 2004; CHARFEDDINE e PÉREZ-CABAL, 2017; KRPÁLKOVÁ et al., 2019; OEHM et al., 2019), bem como preocupações com o bem-estar (ALVERGNAS et al., 2019; BROWNE et al., 2022; MCGETTIGAN et al., 2022). Além disso, as doenças dos cascos estão associadas a outras doenças em bovinos. Por exemplo, Lai et al. (2021a) relataram uma correlação genética positiva entre dermatite digital (**DD**) e mastite (0,49), DD e febre do leite (0,49) e entre úlcera de sola (**US**) e metrite (0,70). As doenças dos cascos mais prevalentes no gado holandês canadense são DD (13,3%), US (6,4%), hemorragia da sola (**HS**; 5,0%), doença da linha branca (**DLB**; 3,8%), erosão de talão (**ET**; 3,7%), dermatite interdigital (**DI**; 2,6%), hiperplasia interdigital (**HI**; 2,0%) e úlcera da pinça (**UP**; 1,0%) (LACTANET, 2022). Entre essas doenças, DD, DI e ET são consideradas doenças infecciosas, enquanto HD, DLB, HI, US e UP são consideradas doenças não infecciosas (EGGER-DANNER et al., 2020).

Práticas de manejo adequadas podem reduzir a prevalência de doenças dos cascos em rebanhos leiteiros (MESKINI et al., 2023). Trabalhos anteriores indicaram que as características relacionadas à saúde do casco são hereditárias, com estimativas de herdabilidade variando de 0,01 a 0,14 (HERINGSTAD et al., 2018; MALCHIODI et al., 2017, 2020; OLIVEIRA-JUNIOR et al., 2021). Considerando a baixa herdabilidade dessas características, a seleção genômica pode contribuir para acelerar o progresso genético para características de saúde do casco, dando maior ênfase aos marcadores moleculares associados a características relacionadas ao casco nos modelos estatísticos ao predizer os valores genéticos genômicos (**GEBV**) (PAUSCH ET AL., 2013; TRIBOUT ET AL., 2020).

A identificação de variantes genéticas associadas a características de saúde do casco é de grande interesse para a indústria de laticínios. Nesse contexto, Butty et al. (2021) relataram variação no número de cópias (**CNV**) em 14 regiões genômicas associadas a pelo menos uma característica relacionada ao casco ao estudar DD, DI, ET, US, DLB, HS e HI em gado holandês canadense. Lai et al. (2021b) realizaram um estudo de associação genômica ampla (**GWAS**) para US e DLB em gado holandês dos EUA e

identificaram quatro regiões genômicas (em BTA8, BTA17, BTA27 e BTA28) e vários potenciais genes candidatos associados à cicatrização de feridas, lesões cutâneas, crescimento e mineralização dos ossos, tecido adiposo e queratinização. Vários genes, como *FSIP2*, *CLCN1*, *ADGRV1*, *DOP1A*, *THBD* e *RHOBTL1*, também foram associados a DD, HI e US em bovinos holandeses sob estresse térmico (SÖLZER et al., 2022). Li et al. (2023) realizaram análises de enriquecimento funcional para lesões de talão, incluindo HS, US e DLB, em gado Holandês e encontraram genes relacionados a funções do sistema imunológico, respostas inflamatórias, metabolismo lipídico, atividades de íons de cálcio e excitabilidade neuronal. Todos esses estudos foram realizados com painéis de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) de média densidade (MD; cerca de 50K marcadores SNP). A imputação precisa do genótipo de MD para painéis de alta densidade (HD) pode ser alcançada em gado leiteiro (VANRADEN et al., 2017; THAKKAR et al., 2021; DADOUSIS et al., 2022) e considerando que a alta densidade de marcadores pode produzir mais precisos resultados de GWAS, o objetivo principal deste estudo foi entender a funcionalidade de oito características relacionadas ao casco (DD, US, HS, DLB, ET, DI, HI e UP) e um índice de saúde do casco (ISC) em gado holandês norte-americano usando genótipos de SNP imputados para HD.

MATERIAL E MÉTODOS

Declaração de ética

O presente estudo foi conduzido usando informações fenotípicas, genealógicas e genômicas existentes fornecidas pela Lactanet Canada (www.lactanet.ca; Guelph, ON, Canadá). Portanto, nenhum experimento com animais foi realizado e a aprovação do comitê de ética no uso de animais não foi necessária.

Animais e fenótipos

O conjunto de dados usado neste estudo foi fornecido pela Lactanet (Guelph, ON, Canadá). Entre 10.361 e 16.389 bovinos da raça Holandesa norte-americana com valores genéticos estimados desregredidos (dEBVs) para DD, ET, ISC, DI, HI, HS, US, UP e DLB foram incluídos neste estudo (Tabela 1). Detalhes adicionais sobre as definições de

características e coleta de dados são fornecidos por Malchiodi et al. (2020). Todas as características consideradas foram tratadas como binárias (1 = não afetado ou 2 = afetado), exceto o ISC que é um índice calculado como: $ISC = 0,34(DD) + 0,09(DI) + 0,14(ET) + 0,20(US) + 0,10(UP) + 0,08(DLB) + 0,03(HS) + 0,02(HI)$. Os dEBVs foram calculados de acordo com VanRaden et al. (2009) e apenas dEBVs com confiabilidade superior a 0,50 foram mantidos para análises posteriores. Conforme mostrado na Tabela 1, os dEBVs usados têm confiabilidades semelhantes.

Tabela 1. Estatísticas descritivas dos pseudo-fenótipos usados para as análises de associação genômica de características de saúde do casco no gado Holandês canadense.

Característica	N	dEBVs				Confiabilidade	
		Média	Min.	Max.	DP	Média	CV
Dermatite digital	15.241	98,50	82,08	113,97	5,27	75,31	14,36
Erosão de talão	10.125	100,06	87,88	112,09	4,46	71,85	6,49
Índice de saúde do casco	15.022	99,89	85,28	113,65	4,97	76,7	14,61
Dermatite interdigital	15.329	99,83	85,35	113,79	5,16	77,68	15,59
Hiperplasia interdigital	14.003	99,14	83,88	113,46	5,2	77,46	14,97
Hemorragia da sola	10.149	99,86	87,88	112,07	4,41	71,35	8,59
Úlcera de sola	10.054	100,19	87,7	112,4	4,63	71,44	6,32
Úlcera da pinça	10.036	99,91	87,7	112,23	4,59	68,93	7,17
Doença da linha branca	10.163	100,37	86,74	114,13	4,83	69,85	7,46

N: tamanho da amostra; Min: Valor Mínimo; Max: Valor Máximo; CV: coeficiente de variação

Fonte: Elaboração Própria.

Imputação genotípica e controle de qualidade

A imputação de genótipos foi realizada inicialmente de um painel MD SNP contendo 44.315 SNPs para um painel HD SNP contendo 311.725 SNPs. Um total de 25.580 animais (11.182 fêmeas e 14.398 machos) tinham dados de MD, enquanto a população de referência HD continha 2.507 animais da raça Holandesa norte-americana (562 fêmeas e 1.945 machos). Antes da imputação do genótipo, os SNPs do painel MD SNP que não estavam presentes no painel HD foram excluídos. Além disso, um controle de qualidade (CQ) foi realizado usando o software PLINK 1.9 (PURCELL et al., 2007) para excluir SNPs: 1) com call rate $< 0,95$; 2) com desvio extremo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 10^{-8}$), como indicação de erros de genotipagem; 3) localizados em cromossomos não autossômicos; e 4) com posição desconhecida com base na montagem do genoma bovino ARS-UCD1.2. Após CQ, 41.612 e 296.456 SNPs permaneceram nos painéis MD e HD, respectivamente. A etapa de faseamento do genótipo foi realizada

usando o software Eagle 2.4.1 (LOH et al., 2016), enquanto a imputação do genótipo foi feita pelo software Minimac4 (DAS et al., 2016). Após a imputação do genótipo, um CQ adicional foi realizado para excluir indivíduos ou genótipos com taxa de chamada $< 0,90$, SNPs com alelos de menor frequência (**MAF**) $< 0,01$, bem como SNPs com afastamento extremo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 10^{-8}$). Finalmente, o número de SNPs que permaneceu para as análises GWAS foi de 282.434 para DD, 280.898 para ET, 282.827 para ISC, 282.829 para DI, 282.492 para HI, 280.959 para HS, 280.844 para US, 280.854 para UP e 280.947 para WL.

Análises de associação genômica ampla

Um modelo linear misto (MLM) foi usado para estimar os efeitos SNP usando o pacote GCTA (YANG et al., 2011). O modelo univariado pode ser descrito da seguinte forma: $\mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}$, onde \mathbf{y} é o vetor de dEBVs para cada característica; $\boldsymbol{\mu}$ é a média geral; $\boldsymbol{\beta}$ é o efeito fixo do SNP sendo testado para associação estatística com cada característica, \mathbf{a} é um vetor de efeitos poligênicos aleatórios [$\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_a^2)$], onde \mathbf{G} é a matriz de relacionamento baseada na genômica (GRM; VANRADEN, 2008) e σ_a^2 é a variância genética aditiva; \mathbf{X} e \mathbf{Z} são matrizes de incidência dos efeitos em $\boldsymbol{\beta}$ e \mathbf{a} , respectivamente; e \mathbf{e} é um vetor de resíduos [$\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2)$], onde \mathbf{I} é uma matriz identidade e σ_e^2 é a variância residual. Ao usar dEBVs (com diferentes confiabilidades) como fenótipo em GWAS, recomenda-se levar em consideração as variâncias residuais diferenciais (JIANG et al., 2019). No entanto, houve pequena variabilidade nas confiabilidades dEBV entre os indivíduos incluídos neste estudo (Tabela 1).

Análises de associação baseadas em modelos lineares mistos foram realizadas usando o software GCTA, excluindo o cromossomo que abriga o candidato SNP sendo testado antes de calcular o GRM, que é um método conhecido como MLM-LOCO (YANG et al., 2014). Este método é computacionalmente menos eficiente, mas mais poderoso em comparação com a análise MLM, incluindo o cromossomo do SNP candidato (YANG et al., 2014). Portanto, um total de 29 GRMs foram alternativamente construídos por amostragem aleatória de 50.000 SNP de todos os cromossomos (após CQ) para evitar supercorreção da estrutura da população. Após as análises GWAS, todos os SNPs foram classificados com base em seus p-valores e agrupados de acordo com seus valores de desequilíbrio de ligação (LD) (r^2 limiar de 0,9), que foi sugerido como um

método preferível em comparação com a estratégia tradicional de agrupamento LD (PRIVÉ et al., 2018). O fator de inflação genômica (λ) foi calculado como $\lambda = \text{mediana}(\chi^2)/0.456$ (BACANU et al., 2000), para o qual um intervalo de confiança de 95% do valor λ foi posteriormente derivado.

Correção de testes múltiplos

Como um grande número de marcadores foi testado, a correção de Bonferroni tradicional seria altamente conservadora, pois nem todos os testes são independentes devido ao LD entre os marcadores (JOHNSON et al., 2010). Assim, para evitar resultados falso-negativos excessivos, aplicamos uma correção de Bonferroni modificada usando o número de segmentos cromossômicos independentes (**Me**) no nível do genoma (LI et al., 2015) em vez do número total de testes. O **Me** é uma função do tamanho efetivo da população (**Ne**) e do comprimento do genoma (**L**) em Morgans, que pode ser calculado como $Me = (2 \times Ne \times L) / \log(Ne \times L)$ (GODDARD et al., 2011). Com base nos relatórios atuais da literatura sobre espécies de mamíferos e na falta de valores de conversão mais precisos para bovinos, um cM foi considerado equivalente a um Mbp (WANG et al., 2016), e o valor de **Ne** usado foi 66, pois é o valor de **Ne** mais conservador relatado para a mesma população de gado Holandês (MAKANJUOLA et al., 2020). O nível médio de LD na população estudada com base em $|D'|$ e r^2 para marcadores separados por 40-60 kb foi de 0,72 e 0,20, respectivamente (BOHMANOVA et al., 2010). Um efeito SNP foi considerado estatisticamente significativo se seu $-\log_{10}$ (P-valor) fosse maior do que o limiar de todo o genoma, que foi calculado dividindo 0,05 por **Me**. O valor de **Me** e o correspondente limiar de significância utilizado foram 2.044,73 e 4,61, respectivamente.

Análises genômicas funcionais

As coordenadas SNP foram baseadas na montagem ARS-UCD1.2 do genoma bovino de referência disponível no acesso GenBank (GCA_002263795.2). O pacote GALLO R (FONSECA et al., 2020) foi usado para detectar genes posicionais e locos de características quantitativas (**QTL**) localizados 100 Kb a montante ou a jusante dos SNPs significativos. O banco de dados QTL utilizado foi o Animal QTLdbRelease 49 (HU et al., 2019). Posteriormente, análises de enriquecimento funcional foram realizadas para o

grupo de genes encontrados para cada característica, usando a plataforma DAVID (HUANG et al., 2009). Testes múltiplos foram contabilizados com base na razão de falsas descoberta (**FDR**) de 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Análises de associação

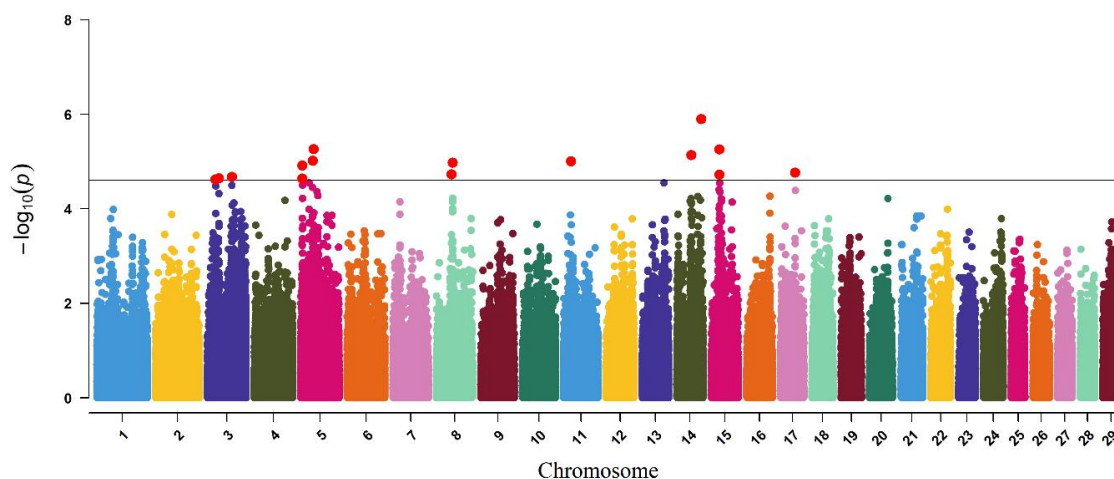
Após CQ (realizado antes das análises GWAS) e agrupamento baseado em LD, o número restante de SNPs informativos (e animais) foi: 234.244 (15.241) para DD, 234.739 (15.022) para ISC, 230.710 (10.125) para ET, 234.981 (15.329) para DI, 234.000 (14.003) para HI, 230.729 (10.149) para HS, 230.548 (10.054) para US, 230.617 (10.036) para UP e 230.732 (10.163) para DLB. O limiar de Bonferroni modificado para a significância do genoma foi de $2,45 \times 10^{-5}$. As Figuras 1 a 4 apresentam os gráficos de Manhattan para todas as características. Os valores de λ variaram de 1,07 a 1,10 e os gráficos Q-Q para todas as características são mostrados no Apêndice I, indicando que a estratificação populacional potencial foi devidamente contabilizada.

A lista de SNPs significativos e potenciais genes candidatos encontrados para cada característica são mostrados nas Tabelas 2, 3, 5 e 6. Informações detalhadas sobre o GWAS, incluindo p-valores, efeitos SNP, MAF, QTL e potenciais genes candidatos encontrados em um intervalo de 100 Kb upstream e downstream dos SNPs significativos são fornecidos no Apêndice II. O número de SNPs significativos p-valor $< 2,45 \times 10^{-5}$ foi 15 para ISC, 22 para DD, 34 para ET, 14 para DI, 22 para HI, 28 para HS, 33 para US, 24 para UP e 43 para DLB. Não houve SNPs significativos localizados em BTA10, BTA12, BTA20, BTA26, BTA27 e BTA28 para nenhuma das características avaliadas, enquanto BTA14 apresentou SNPs significativos para todas as características. O SNP rs110059642 (BTA5) foi o único associado a mais de uma característica (DD e HI) e sete genes estão localizados próximos a este SNP. Além disso, vinte e oito genes foram associados a duas outras características, cinco com DD e ET, quatro com DD e DI, 14 com HI e HS e cinco com US e DLB (Apêndice II). Nove desses genes estão localizados no BTA3, sete no BTA5, cinco no BTA13 e 14 no BTA19.

Vários QTL foram previamente relatados como localizados nas mesmas regiões genômicas identificadas para Índice de Saúde do Casco, doenças infecciosas e não

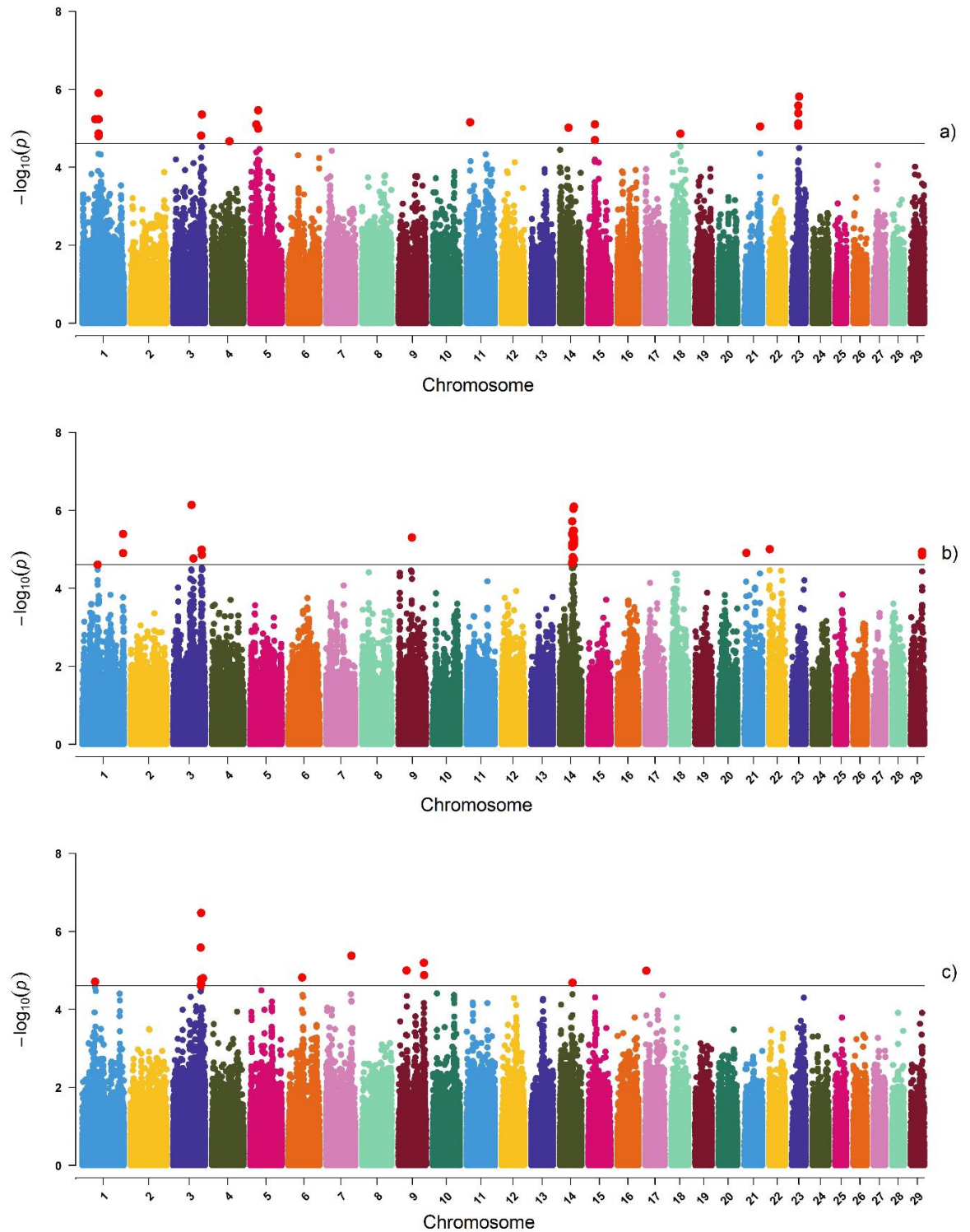
infecciosas e podem ser classificados em diferentes grupos de QTL (Exterior, Saúde, Carne e Carcaça, Leite, Produção e Reprodução) (Apêndice II)

Figura 1. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para o índice de saúde do casco usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



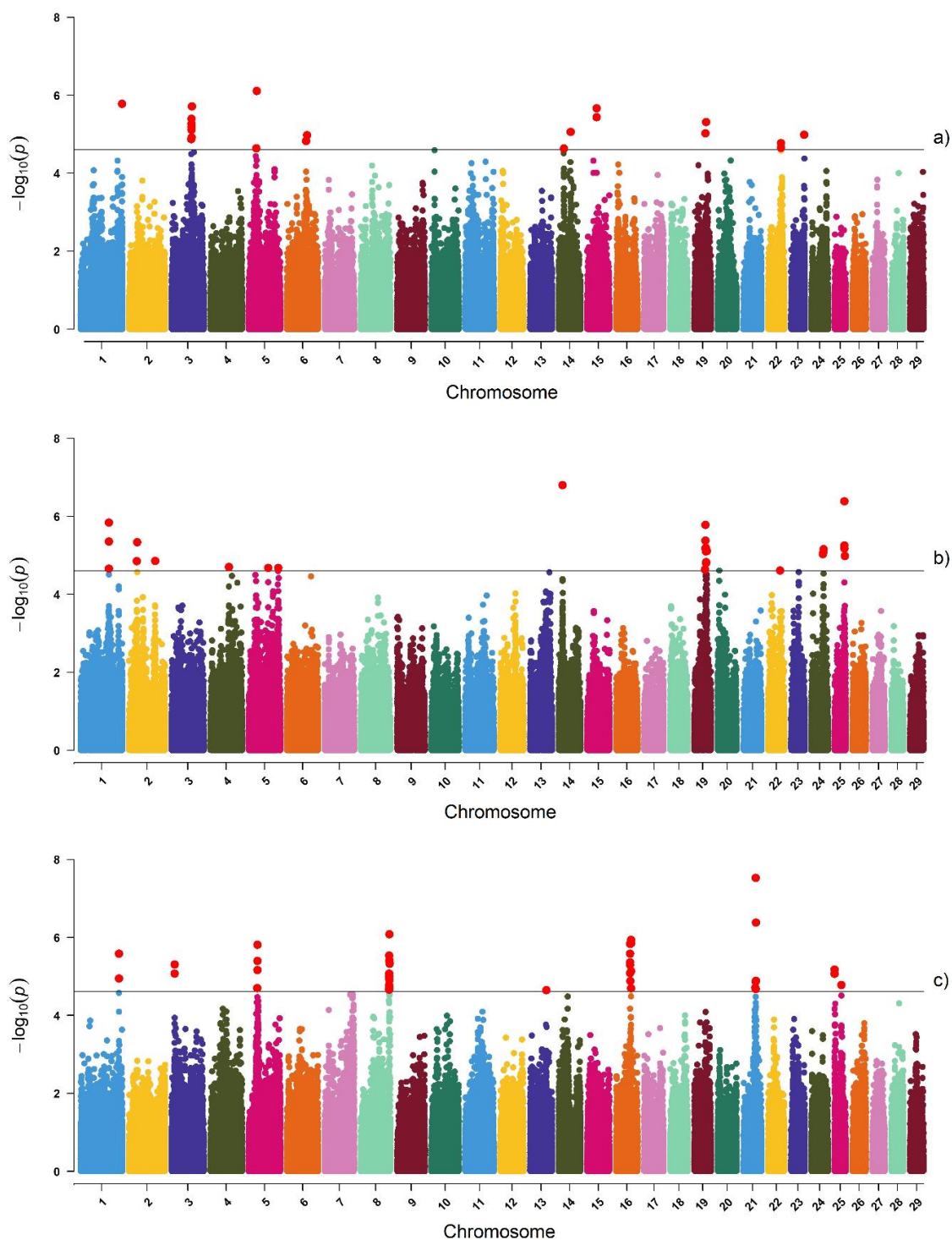
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 2. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para dermatite digital (a), erosão do talão (b) e dermatite interdigital (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



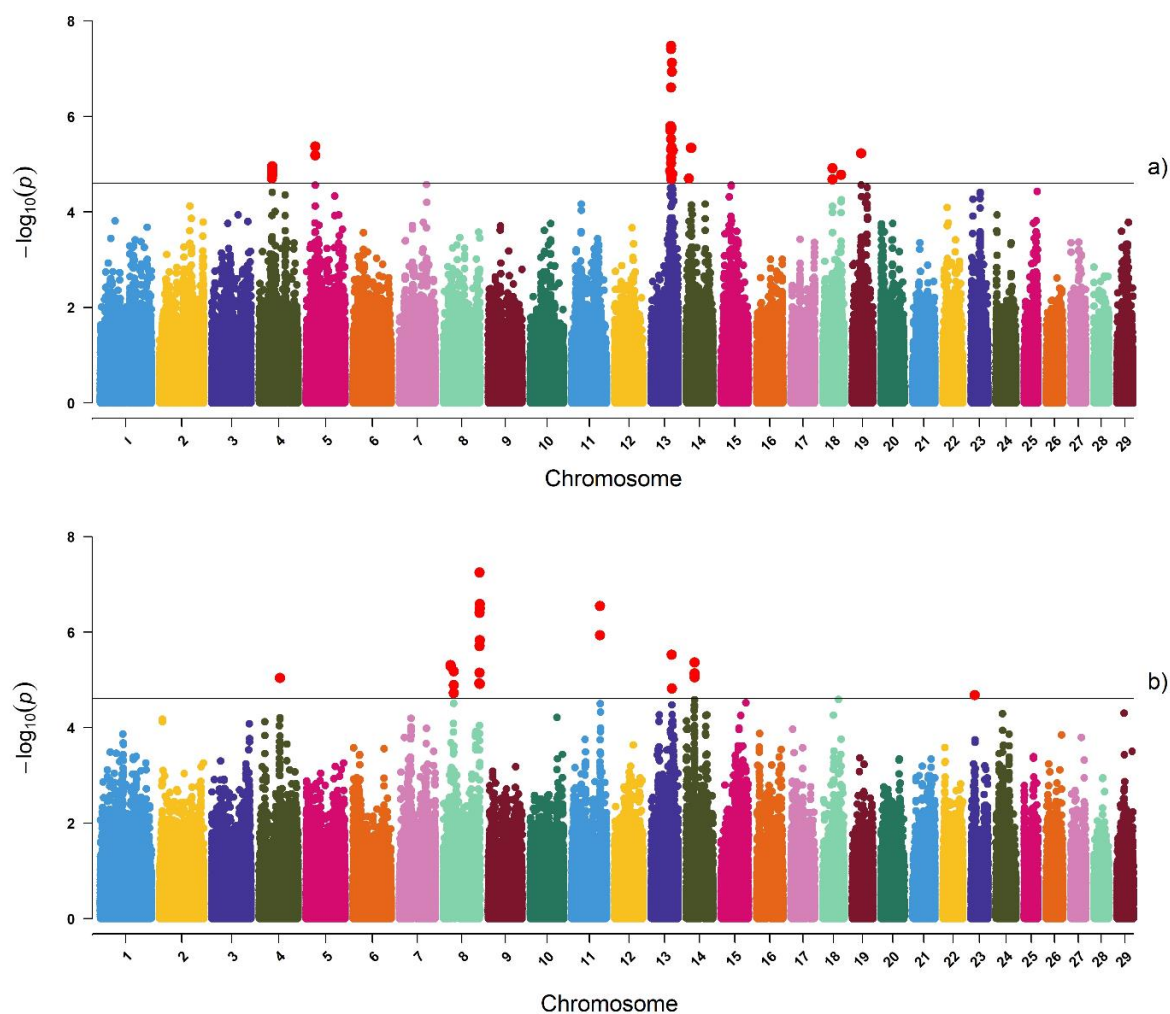
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 3. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para hiperplasia interdigital (a), hemorragia de sola (b) e doença da linha branca (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 4. Gráfico de Manhattan da análise de associação do genoma para úlcera de sola (a) e úlcera da pinça (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



Fonte: Elaboração Própria.

Índice de saúde do casco

O GWAS para ISC encontrou 15 SNPs significativos distribuídos nos cromossomos BTA3, BTA5, BTA8, BTA11, BTA14, BTA15 e BTA17 (Apêndice II). O SNP mais significativo (rs3423383926) para ISC foi encontrado em BTA14:76.259.291 pb. Onze potenciais genes candidatos com funções biológicas conhecidas (Tabela 2) foram encontrados próximos aos SNPs significativos, mas nenhum gene foi encontrado próximo aos SNPs significativos localizados em BTA11, BTA15 e BTA17. As análises

de enriquecimento funcional não identificaram nenhum termo de ontologia genética significativo para ISC.

O ISC é uma combinação linear ponderada de características de saúde do casco, usado como um índice de seleção para melhorar geneticamente a saúde do casco no gado Holandês canadense. Onze potenciais genes candidatos foram encontrados abrigando ou próximos aos sete cromossomos associados a esse índice. O gene *NTNG1* (Netrin G1) localizado no BTA3 codifica um membro da família de proteínas Netrin. As netrinas desempenham papéis fundamentais na organogênese e na morfogênese do tecido, incluindo o direcionamento da migração celular, interações célula-célula e adesão célula-ECM, processos que são importantes no reparo de feridas (IORIO et al., 2015). Um SNP (rs135185485; BTA3: 36.106.918 pb) localizado próximo a esse gene se sobrepõe a um QTL relatado anteriormente (BTA3:36.159.478-36.159.482) para a espessura da almofada digital (STAMBUK et al., 2020). O gene *SLC2A13* (Solute Carrier Family 2 Member 13) localizado no BTA5 é expresso na camada basal da epiderme e codifica transportadores de mioinositol, que influencia a osmorregulação dos queratinócitos epidérmicos primários (FOSTER et al., 2020). Os genes *GLIPR1* (GLI Pathogenesis Related 1) em BTA5 e *CPNE3* (Copine 3) em BTA14 estão associados a importantes vias relacionadas à saúde, como “Sistema Imunológico”, “Sistema Imunológico Inato” e “Desgranulação de Neutrófilos”. O gene *KLF9* (KLF Transcription Factor 9), localizado em BTA8, regula positivamente o *TRIM33* para inibir a proliferação anormal de fibroblastos, migração e inflamação (HUANG et al., 2022). Os fibroblastos desempenham um papel fundamental na síntese de novo tecido conjuntivo e na sua contração para promover a cicatrização de feridas (SHEPHARD et al., 2004). O gene *WWP1* (WW Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase 1) também pode estar envolvido na imunidade inata (ZHI e CHEN, 2012), e o sistema ubiquitina proteassoma é um fator regulatório chave na proliferação, diferenciação e secreção de colágeno de fibroblastos da pele (SHEN et al., 2021).

Vários QTL (Apêndice II) foram localizados nas regiões genômicas ao redor dos SNPs significativamente associados ao traço ISC. A profundidade do talão é um tipo de QTL externo que foi associado a uma incidência muito maior do que a média de lesões quando a profundidade era extremamente rasa em vacas holandesas canadenses (CHAPINAL et al., 2013). Outros tipos de QTL foram relacionados à saúde

("suscetibilidade à tuberculose bovina", "mastite clínica", "carga de nematoides gastrointestinais", "nível de imunoglobulina G", "contagem de células somáticas" e "resistência a carrapatos"), carne e carcaça ("quantidade de tecido conjuntivo") e produção ("ganho médio diário", "altura corporal", "peso corporal", "ingestão de matéria seca", "taxa de conversão alimentar", "duração da vida produtiva" e "ingestão residual de ração"). O fato de as regiões genômicas associadas às doenças dos cascos também terem sido relacionadas a outras características relevantes indica a complexidade biológica dos mecanismos envolvidos na resistência às doenças dos cascos.

Tabela 2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao índice de saúde do casco e os genes posicionais correspondentes identificados.

Cromossomo	SNP	Localização (bp)	MAF	Efeito	P-valor	Genes
BTA3	rs136526185	25.857.646	0,243	0,419	$2,40 \times 10^{-05}$	<i>MAN1A2</i>
	rs135185485	36.106.918	0,479	-0,360	$2,25 \times 10^{-05}$	<i>NTNG1</i>
BTA5	rs133985262	5.101.492	0,452	0,328	$2,10 \times 10^{-05}$	<i>GLIPR1</i> , <i>KRR1</i>
	rs135930384	37.509.965	0,413	0,430	$2,28 \times 10^{-05}$	<i>SNORA62</i>
BTA8	rs137570103	40.978.630	0,219	-0,493	$9,60 \times 10^{-06}$	<i>SLC2A13</i>
	rs134623665	46.514.143	0,22	0,462	$5,43 \times 10^{-06}$	<i>SMC5</i> , <i>KLF9</i>
BTA14	rs3423383926	76.259.291	0,014	-1,286	$1,26 \times 10^{-06}$	<i>CPNE3</i> , <i>RMDN1</i> , <i>WWP1</i>

BTA – autossomo do *Bos taurus*; MAF: alelo de menor frequência

Fonte: Elaboração Própria.

As características de saúde podem ajudar a explicar a relação desses QTL com as doenças dos cascos. A suscetibilidade à tuberculose bovina pode estar associada à eficiência dos sistemas imune inato e adaptativo na defesa do hospedeiro contra tuberculose e micobactérias (KOUL et al., 2004; RAMAN et al., 2010). Além disso, vacas com claudicação têm maior incidência de mastite em comparação com vacas saudáveis (SOUZA et al., 2006). Foi relatado anteriormente que a prevalência de parasitas gastrointestinais em burros estava associada à claudicação (AYELE et al., 2006) e o nível de IgG no plasma de vacas leiteiras com altos níveis de claudicação aumentou significativamente, indicando que a imunidade humoral é ativada pelo estressor da claudicação (SUN et al., 2015). Krpalkova et al. (2019) relataram que a prevalência de doença do casco detectada no primeiro mês da primeira e segunda lactações foi associada

a um aumento de 58.000 e 45.000 células/ml de contagem de células somáticas em vacas leiteiras, respectivamente. Várias regiões genômicas identificadas neste estudo foram previamente associadas à resistência a carrapatos em bovinos (Apêndice II). Os carrapatos estão entre os mais relevantes vetores de doenças que afetam os rebanhos e a seleção para resistência pode ser uma ferramenta complementar para auxiliar no controle parasitário em bovinos Nelore (PASSAFARO et al., 2015).

A quantidade de tecido conjuntivo é um QTL que também foi localizado em algumas regiões genômicas (BTA8 e BTA14) associado ao índice de saúde do casco identificado neste estudo e pertence ao tipo de classe de QTL de Carne e Carcaça (Apêndice II). O tecido conjuntivo é essencial para o crescimento e desenvolvimento normais, mas muitas doenças têm sido associadas há muito tempo com a quebra da matriz colagenosa do osso, cartilagem e tecidos relacionados em humanos (REYNOLDS et al., 1994). No que diz respeito à característica QTL de produção, Schöpke et al. (2013) relataram que novilhas entre 50 e 99 dias em lactação tiveram as maiores frequências de laminite e aumento do estresse biomecânico causado por diferentes fatores (peso, classe social, tempo em pé), o que foi uma causa presumida do aumento da suscetibilidade a doenças dos cascos em vacas holandesas.

Este trabalho encontrou regiões de QTL previamente associadas ao peso corporal ao desmame em bovinos de corte (KIM et al., 2003; MCCLURE et al., 2010). O alto peso corporal pode aumentar a probabilidade de as vacas adquirirem doenças nos cascos (PÉREZ-CABAL e CHARFEDDINE, 2016). Em uma pesquisa para identificar as razões para distúrbios do casco em gado leiteiro mestiço, Kumar et al. (2019) relataram que peso corporal superior a 410 kg, jarretes feridos e animais com cascos anormais foram grupos de risco significativos para distúrbios do casco com maior incidência (43,0%, 51,7% e 32,6%, respectivamente). Assim, o peso corporal pode influenciar a incidência de doenças dos cascos, pois as vacas têm uma capacidade limitada de mudar o peso da frente para trás, e é uma importante medida de acompanhamento para os produtores. (NEVEUX et al., 2006).

Doenças infecciosas

Alguns SNPs foram associados a doenças infecciosas dos cascos, com 22, 34 e 14 SNPs associados a DD, ET e DI, respectivamente (Apêndice II). Esses SNPs estão

localizados em BTA1, BTA3, BTA4, BTA5, BTA6, BTA7, BTA9, BTA11, BTA14, BTA15, BTA17, BTA18, BTA21, BTA22, BTA23 e BTA29. Os SNPs mais significativos para DD, ET e DI foram rs3423092961 (BTA1:61.741.423 pb), rs42827399 (BTA3:69.154.162 pb) e rs42308602 (BTA3:105.507.597 pb), respectivamente. As regiões genômicas ao redor dos SNPs significativos para essas doenças infecciosas dos cascos abrigam 52 potenciais genes candidatos para DD, 25 para ET e 25 para DI (Tabela 3). Oito termos significativos de Ontologia Genética (**OG**) foram identificados para DD (Tabela 4), mas nenhum termo significativo foi encontrado para DI e ET. Quatro vias KEGG foram significativas para DD e todas elas contêm quatro genes em comum, enquanto dois genes são específicos da via.

Dermatite digital, DI e ET são três doenças infecciosas relacionadas aos cascos (KNAPPE-POINDECKER et al., 2013). A DD é transmitida via ambiente por um agente infeccioso que pode infectar células queratinizadas nas camadas epidérmicas, resultando na produção de uma toxina queratolítica, que estimula a proliferação e hiperplasia epidérmica (BIEMANS, 2018; BAY et al., 2023). A DD tem alta prevalência (13,3%) em bovinos da raça Holandesa Canadense (Lactanet, 2022). ET e DI são geralmente mais frequentes em rebanhos em *free-stall* com ambientes úmidos e sem higiene (KNAPPE-POINDECKER et al., 2013). O presente estudo identificou vários SNPs associados a essas características (Tabela 3), incluindo picos nítidos do gráfico de Manhattan (Figura 2) localizados em BTA3 (103,7 – 113,1 Mb) para todas as três características, em BTA14 (46,1 – 54,5 Mb) para ET, e em BTA23 (24,04 – 27,4 Mb) para DD.

Vários SNPs localizados em BTA3 (105,4 – 108,4 Mb), que foram associados com DD, se sobrepõem com QTL relatado anteriormente para mastite clínica em bovinos leiteiros (LUND et al., 2008; SAHANA et al., 2008; SODELAND et al., 2011). Este é um resultado interessante, pois DD e mastite são moderadamente correlacionados geneticamente (0,49; LAI et al., 2021a). Esta região genômica também contém outro SNP (rs136841499; 108,4 Mb) associado ao ET, enquanto seis SNPs associados ao DI estão localizados entre 103,7 e 113,1 Mb no BTA3 (Apêndice II). Portanto, há uma necessidade de

Tabela 3. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à dermatite digital (DD), erosão do talão (ET) e dermatite interdigital (DI) e os genes posicionais correspondentes identificados para cada característica.

Trait	Chr.	SNP	Localização (bp)	MAF	Efeito	P-valor	Genes
DD	BTA3	rs110469750	105.416.679	0,162	-0,565	1,53 x 10 ⁻⁰⁵	<i>bta-mir-30c, CITED4, KCNQ4, NFYC</i>
	BTA3	rs134482817	108.418.529	0,346	0,415	4,43 x 10 ⁻⁰⁶	<i>GNL2, DNALII, SNIP1, MEAF6, ZC3H12A</i>
	BTA4	rs110772395	66.459.980	0,457	-0,40	2,13 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SCRN1, WIPF3</i>
	BTA5	rs110059642	30.490.039	0,470	0,462	3,46 x 10 ⁻⁰⁶	<i>DNAJC22, C1QL4, TROAP, PRPH, LOC100141266, TUBA1C</i>
	BTA11	rs133164915	13.424.522	0,470	-0,40	7,00 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PAIP2B, NAGK, TEX261, ANKRD53, ATP6V1B1, VAX2</i>
	BTA15	rs42292090	25.697.256	0,286	-0,422	1,99 x 10 ⁻⁰⁵	<i>CADM1</i>
	BTA18	rs41867436	35.495.635	0,320	-0,432	1,38 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PSKH1, PSMB10, LCAT, SLC12A4, DPEP3, DPEP2, DDX28, DUS2, NFATC3</i>
	BTA23	rs43560906	24.049.990	0,399	0,473	7,53 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PKHD1</i>
	BTA23	rs42026986	24.479.417	0,479	0,485	2,64 x 10 ⁻⁰⁶	<i>bta-mir-206</i>
	BTA23	rs135621404	24.679.900	0,361	0,495	8,66 x 10 ⁻⁰⁶	<i>IL17A, IL17F, MCM3</i>
ET	BTA23	rs110882211	27.410.296	0,377	0,512	1,52 x 10 ⁻⁰⁶	<i>TNXB, CYP21, LOC107131209, C4A, STK19, DXO, SKIV2L, NELFE, CFB, C2, ZBTB12, EHMT2, SLC44A4, NEU1</i>
	BTA1	rs132952405	58.819.228	0,314	-0,414	2,45 x 10 ⁻⁰⁵	<i>CCDC191, QTRT2, DRD3, U6</i>
	BTA3	rs42827399	69.154.162	0,258	-0,420	7,23 x 10 ⁻⁰⁷	<i>MSH4, RABGGTB, ACADM</i>
	BTA3	rs136841499	107.217.851	0,300	-0,367	1,02 x 10 ⁻⁰⁵	<i>RRAGC, GNL2, DNALII, SNIP1, MEAF6, ZC3H12A</i>
	BTA14	rs132724908	46.115.111	0,269	-0,403	4,05 x 10 ⁻⁰⁶	<i>SAMD12, EXT1</i>
	BTA14	rs132966793	47.030.567	0,307	0,376	8,60 x 10 ⁻⁰⁶	<i>SLC30A8</i>
	BTA14	rs133592705;	47.444.470;	0,409;	-0,353	2,10 x 10 ⁻⁰⁵ ,	<i>AARD, RAD21, UTP23</i>
		rs109143990	47.470.072	0,314	-0,386	7,17 x 10 ⁻⁰⁶	
	BTA14	rs42377719	48.575.519	0,398	0,350	1,59 x 10 ⁻⁰⁵	<i>TRPS1</i>
	BTA14	rs43146429	51.532.004	0,082	0,704	9,11 x 10 ⁻⁰⁷	<i>CSMD3</i>
	BTA14	rs135454249	53.513.628	0,094	0,592	3,31 x 10 ⁻⁰⁶	<i>U6</i>
	BTA14	rs110635364	54.501.345	0,115	-0,533	5,38 x 10 ⁻⁰⁶	<i>KCNV1, 5S_rRNA</i>

	BTA21	rs42264063	8.645.052	0,163	0,431	1,24 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ARRDC4</i>
	BTA29	rs42187737	42.718.801	0,108	0,511	1,42 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SLC22A11</i>
DI	BTA3	rs43680962	103.758.367	0,463	0,363	2,42 x 10 ⁻⁰⁵	<i>CCDC30, PPCS, ZMYND12, RIMKLA</i>
	BTA3	rs3423161005	103.786.184	0,323	0,444	2,60 x 10 ⁻⁰⁶	<i>FOXJ3</i>
	BTA3	rs42308602	105.507.597	0,439	0,480	3,33 x 10 ⁻⁰⁷	<i>KCNQ4, NFYC, RIMS3, bta-mir-30c</i>
	BTA3	rs3423160488	105.622.346	0,399	0,387	2,19 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SMAP2</i>
	BTA3	rs110523893	106.231.687	0,216	0,506	1,68 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MFSD2A, MYCL, TRIT1, BMP8B, PPIE, U6</i>
	BTA3	rs110151709	113.151.909	0,147	-0,502	1,58 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SAG, DGKD, USP40</i>
	BTA9	rs41570350	96.184.998	0,380	0,489	6,32 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PNLDC1, MAS1, IGF2R</i>
	BTA9	rs134732921	96.647.092	0,475	-0,431	1,32 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SLC22A3, PLG, MAP3K4</i>
	BTA14	rs133041303	47.800.762	0,259	0,474	2,06 x 10 ⁻⁰⁵	<i>U6</i>
	BTA17	rs41832599	4.109.301	0,360	-0,428	1,02 x 10 ⁻⁰⁵	<i>TMEM131L</i>

BTA – autossomo do *Bos taurus*; MAF: alelo de menor frequência

Fonte: Elaboração Própria.

investigar mais essa região genômica por meio de uma triagem mais refinada usando dados de sequência do genoma completo. Alguns genes dessa região do BTA3 foram previamente associados a doenças causadas por bactérias. Por exemplo, *ZC3H12A* (zinc finger CCCH-type containing 12A) foi associado a mastite em gado leiteiro (SHARIFI et al., 2018; UMESH et al., 2022) e dois SNPs próximos (ou seja, rs134482817 e rs137184511) se sobrepõem com um QTL relatado anteriormente para ET (Apêndice II). Os genes *CITED4* (Cbp/p300 interacting transactivator with Glu/Asp rich carboxy-terminal domain 4) e *NFYC* (nuclear transcription factor Y subunit gamma) foram encontrados próximos a variantes associadas ao status de infecção de *Mycobacterium avium subspecies paratuberculosis* em gado Holandês (SETTLES et al., 2009). Variantes no gene *CITED4* também foram associadas à contagem de monócitos em humanos (SAKAUE et al., 2021). O *RIMS3* (Regulating synaptic membrane exocytosis 3) também está associado à adaptação hospedeiro-patógeno ao *Mycobacterium tuberculosis* (PHELAN et al., 2023). Os genes *MFSD2A*, *MYCL*, *TRIT1* e *PPIE* foram encontrados próximos a um SNP (rs110237486) associado à prevalência de mastite em gado Black Pied alemão de duplo propósito (MEIER et al., 2020), e *PPIE* (Peptidylprolyl Isomerase E) codifica um membro da família das PPIases, que estão associadas à regulação das funções de imunidade inata e adaptativa (NATH e ISAKOV, 2015).

Outra importante região genômica (BTA3: 24,05 –27,41 Mb) foi associada à DD (Tabela 3). Essa região abriga genes do Complexo Principal de Histocompatibilidade (**MHC**), conhecido como Antígeno Leucocitário Bovino (**BoLA**; TAKESHIMA e AIDA, 2006) e está relacionado à regulação imunológica contra doenças infecciosas. Os SNPs localizados nesta região da BTA23 foram previamente associados à viabilidade da vaca holandesa e doenças infecciosas em bovinos (FREEBERN et al., 2020). *IL17A* (Interleucina 17A) e *IL17F* (Interleucina 17A) são membros da família IL-17 e influenciam a defesa do hospedeiro, tráfego celular, modulação imune e reparo tecidual, com funções importantes na indução de defesas imunes inatas (GE et al., 2020). A ativação da via de sinalização pró-inflamatória da IL-17 pode influenciar a progressão da DD em gado Holandês Friesian (VERMEERSCH et al., 2022). Além disso, a *IL17A* tem sido associada à tuberculose bovina (WATERS et al., 2016) e à contagem de células somáticas em bovinos da raça Holandesa Chinesa e Sanhe da Mongólia Interior (USMAN et al., 2017). SNPs localizados nos genes *IL17A* e *IL17F* também foram associados à

produção de leite na raça Holandesa Chinesa (GHULAM-MOHYUDDIN et al., 2022), indicando potencial QTL pleiotrópico nesta região. Os genes *C2* e *C4A* foram previamente associados à resposta inflamatória (ALPER et al., 2003; KORWIN-KOSSAKOWSKA et al., 2022) e o *C4A* foi associado à expressão gênica de mecanismos inflamatórios no parênquima da glândula mamária de vacas leiteiras (KORWIN - KOSSAKOWSKA et al., 2022). O gene *CFB* está associada à mastite em bovinos (SHARIFI et al., 2018) e doença respiratória bovina em bovinos mestiços comerciais (SCOTT et al., 2021).

Duas vias (“cascatas de complemento e coagulação” e “infecção por *Staphylococcus aureus*”) foram significativamente enriquecidas para DD. “Cascatas de complemento e coagulação” é um sistema de proteínas plasmáticas que é ativado pela infecção por patógenos (MARKIEWSKI et al., 2008). As três principais consequências dessa ativação do complemento são: 1) opsonização de patógenos; 2) recrutamento de células inflamatórias e imunocompetentes; e 3) morte direta de patógenos (BAJIC et al., 2015). *Staphylococcus aureus* é um patógeno que frequentemente causa infecções de pele e tecidos moles. Sua virulência é consequência da supressão das respostas imunes inata e adaptativa (DEDENT et al., 2013). A estafiloquinase, secretada por *S. aureus*, promove o estabelecimento de infecções cutâneas em humanos e aumenta a penetração bacteriana através das barreiras cutâneas por meio da ativação do plasminogênio (KWIECINSKI et al., 2013). Portanto, o processo biológico significativo para DD (“imunidade inata” e “via do complemento”) pode influenciar a suscetibilidade da vaca a problemas de saúde do casco.

Vinte e dois SNPs localizados entre 46,1 e 54,5 Mb em BTA14 foram associados com ET. Esta importante região genômica se sobrepõe a SNPs previamente relatados localizados em uma região entre 48,1 e 49,9 Mb que foram associados a infecção do *Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis* em gado Holandês (MALLIKARJUNAPPA et al., 2018). Além disso, outros potenciais genes candidatos foram encontrados nesta região genômica. Por exemplo, *TRPS1* (Transcriptional Repressor GATA Binding 1) é um gene regulador chave que influencia a regeneração de feridas (MASCHARAK et al., 2022). *EXT1* (Exostosin Glycosyltransferase 1) está relacionado ao fator de crescimento de fibroblastos, que pode mediar vários processos, incluindo a cicatrização de feridas (LIU et al., 2021). *EXT1* foi encontrado como um gene candidato para malformação de

pés e pernas em bovinos Nelore (SILVA et al., 2022). O *RAD21* (RAD21 Cohesin Complex Component) participa da senescência celular em fibroblastos dérmicos e sua expressão foi associada à capacidade proliferativa de fibroblastos na derme (OKUNO et al., 2022). *SAMD12* (sterile alpha motif domain containing 12) está envolvido na via de sinalização da proteína tirosina quinase do receptor transmembrana, que tem funções de resposta imune, incluindo resistência à mastite em bovinos da raça Holandesa (WAGNER et al., 2021). *CSMD3* (CUB e Sushi Multiple Domains 3) é um gene candidato para tamanho corporal em bovinos (AN et al., 2019; GHOREISHIFAR et al., 2020). Isso é relevante, pois um estudo anterior relatou associação entre peso corporal e distúrbios dos cascos em vacas holandesas espanholas (PÉREZ-CABAL e CHARFEDDINE, 2016).

O gene *PLG* (Plasminogênio) localizado no BTA9 contém marcadores significativos associados à DI. *PLG* codifica uma serina protease ativa plasmina, o principal mediador enzimático da fibrinólise que desempenha um papel fundamental na dissolução de proteínas-chave envolvidas na imunidade e reparo tecidual (SEILLIER et al., 2022). Vários QTL foram encontrados exclusivamente para doenças infecciosas dos cascos (Apêndice II). QTL para DD e ET também foram encontrados por Croué et al. (2019) apoiando a associação das regiões QTL encontradas no estudo atual com as doenças infecciosas dos cascos. Outras características de saúde foram previamente associadas a SNPs localizados nas regiões genômicas identificadas neste estudo, incluindo "Resposta imune mediada por anticorpos", "Suscetibilidade ao vírus da leucemia bovina", "Encefalopatia espongiforme bovina", "Volume final de hemácias compactadas", "Suscetibilidade geral à doença", "Volume inicial de glóbulos vermelhos", "Nível de interleucina-4", "Concentração média de hemoglobina corpuscular" e "Número de glóbulos brancos" (Arquivo complementar 2; <https://figshare.com/s/8fb6aba738fdc041cd05>). Foi relatada a possibilidade de transmissão do vírus da leucemia bovina através de equipamentos do casqueador (KUCZEWSKI et al., 2022). Finalmente, os QTLs encontrados nas regiões genômicas destacadas no presente estudo também estão associadas a doenças que afetam a resposta imune (WALDVOGEL et al., 2000) e alterações hematológicas decorrentes de infecções (BENGALY et al., 2002).

Tabela 4. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupos de genes identificados para dermatite digital em bovinos da raça Holandesa Canadense.

Banco de dados original	Termo	Genes	FDR
KEGG_PATHWAY	Complement and coagulation cascades	<i>C4A, C2, LOC107131209, CFB, LOC781663</i>	1,90x10 ⁻⁰²
KEGG_PATHWAY	<i>Staphylococcus aureus</i> infection	<i>C4A, C2, LOC107131209, CFB, LOC781663</i>	1,90x10 ⁻⁰²
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Innate immunity	<i>C4A, C2, LOC107131209, IL17A, CFB</i>	1,90x10 ⁻⁰²
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Complement pathway	<i>C4A, C2, LOC107131209</i>	1,90x10 ⁻⁰²
KEGG_PATHWAY	Alcoholic liver disease	<i>C4A, C2, IL17A, LOC107131209, LOC781663</i>	4,70x10 ⁻⁰²
KEGG_PATHWAY	Pertussis	<i>C4A, C2, LOC107131209, LOC781663</i>	4,70x10 ⁻⁰²
UP_KW_DOMAIN	Signal	<i>DDX28, PKHD1, A0A3Q1N4X0_BOVIN, CADM1, C1QL4, C2, LOC107131209, C4A, CFB, DPEP2, DPEP3, IL17A, IL17F, LCAT, NEU1, TNXB</i>	4,20x10 ⁻⁰²
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Hydrolase	<i>DDX28, C2, CFB, DXO, DPEP2, MCM3, NEU1, PSMB10, TUBA1C, ZC3H12A</i>	4,20x10 ⁻⁰²

KEGG_PATHWAY: (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) é uma coleção de bancos de dados que lidam com genomas, vias biológicas, doenças, drogas e substâncias químicas; UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS: (UniprotKB Keywords) Palavras-chave atribuídas a proteínas porque estão envolvidas em um determinado processo biológico; UP_KW_DOMAIN: (UniprotKB Keywords) Palavras-chave atribuídas ao domínio de proteínas; UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION: (UniprotKB Keywords) Palavras-chave atribuídas a proteínas devido à sua função molecular particular. FDR: razão de falsas descobertas

Fonte: Elaboração Própria.

Doenças não infecciosas

Vinte e dois, 28, 33, 24 e 43 SNPs foram significativamente associados a HI, HS, US, UP e DLB (Apêndice II). Esses SNPs estão localizados em BTA1, BTA2, BTA3, BTA4, BTA5, BTA6, BTA8, BTA11, BTA13, BTA14, BTA15, BTA18, BTA19, BTA22, BTA23, BTA24 e BTA25. Os SNPs mais significativos para HI, HS, US, UP e DLB foram os seguintes: rs110059642 (BTA5:30.490.039 pb), rs133310420

(BTA14:14.517.929 pb), rs43406546 (BTA13:61.576.570 pb), rs3423092 867 (BTA8:111.524.854 pb) e rs3423092868 (BTA21:47.577.713 pb). Os cromossomos que abrigam doenças não infecciosas apresentaram 33, 85, 96, 23 e 50 potenciais genes candidatos associados a HI, HS, US, UP e DLB, respectivamente (Tabelas 5 e 6). O SNP rs109185030 (BTA14:19.923.818 pb) identificado para HI foi relatado anteriormente por Sölzer et al. (2022) e está localizado próximo ao gene *PPDPFL* (Pancreatic Progenitor Cell Differentiation and Proliferation Factor Like), que tem sido associado à fertilidade feminina em bovinos (MOHAMMADI et al., 2020; OLIVEIRA-JÚNIOR et al., 2019). Além disso, o SNP rs109265528 (BTA13:58.741.419 pb) está próximo ao gene *CTCFL* (CCCTC-Binding Factor Like) que foi previamente relatado como associado a US (SÖLZER et al., 2022) e fertilidade masculina (HAN e PEÑAGARICANO, 2016 ; CHEN et al., 2021).

Trinta e cinco termos significativos de GO foram associados a características não infecciosas de saúde do casco (Tabelas 7 e 8), incluindo 12 para HS, seis para US e 17 para DLB. Nenhum termo GO foi enriquecido para UP e HI. Dois grupos de genes foram enriquecidos para os termos GO para HS (Tabela 7). O primeiro contém 13 genes relacionados à queratina e o segundo grupo contém três genes encontrados em oito termos GO (Tabela 7), incluindo o processo biológico cascata JAK-STAT envolvido na via de sinalização do hormônio do crescimento. Seis termos GO e cinco genes foram considerados significativos para úlcera de sola (Tabela 7). Cinco genes foram associados a termos GO significativos para DLB (Tabela 8) e são importantes para dois processos biológicos e componentes celulares.

Cinco doenças não infecciosas dos cascos (HS, US, UP, DH e DLB) foram incluídas neste estudo. A cápsula do casco é formada por tecido epidérmico cornificado conhecido como corno, que é descrito em ordem decrescente de dureza, como parede, sola, talão e linha branca. O corno é produzido pelos queratinócitos da epiderme pelo processo especializado conhecido como queratinização (HOBLET e WEISS, 2001). Para HS, 13 genes da família da queratina (*LOC100295015*, *LOC618495*, *LOC100294937*, *LOC788284*, *LOC787225*, *KRTAP1-1*, *KRTAP3-3*, *LOC540285*, *KRTAP3-1*, *LOC618938*, *KRT40*, *KRT23* e *KRT39*) foram encontrados próximos o SNP (rs29021711; BTA19: 41,17 MB). Esta família de genes foi enriquecida por dois componentes celulares significativos ("Filamento de queratina" e "Queratina") e uma função molecular

Tabela 5. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à hiperplasia interdigital (HI), hemorragia da sola (HS) e doença da linha branca (DLB), e os genes posicionais correspondentes identificados para cada traço.

Trait	Chr	SNP	Localização (bp)	MAF	Efeito	P-valor	Gene
HI	BTA1	rs43752749	156.605.854	0,400	0.410	$1,67 \times 10^{-06}$	<i>KCNH8</i>
	BTA3	rs42229132	74.290.762	0,472	-0.400	$1,35 \times 10^{-05}$	<i>PTGER3</i>
	BTA3	rs137453584	75.118.146	0,302	-0.464	$4,01 \times 10^{-06}$	<i>LRRC7</i>
	BTA5	rs134637644	29.517.071	0,430	-0.442	$2,30 \times 10^{-05}$	<i>LARP4, FAM186A</i>
	BTA5	rs110059642			0.537	$7,82 \times 10^{-07}$	<i>DNAJC22, C1QL4, TROAP, PRPH,</i>
			30.490.039	0,470			<i>LOC100141266, TUBA1C</i>
	BTA6	rs43469698	72.486.258	0,256	0.497	$1,49 \times 10^{-05}$	<i>POLR2B</i>
	BTA14	rs134834189	19.872.674	0,172	-0,474	$2,34 \times 10^{-05}$	<i>CLXN, SNAI2, PPDPFL</i>
		rs109185030	19.923.818	0,170	-0,474	$2,34 \times 10^{-05}$	
	BTA14	rs41729907	45.283.009	0,224	-0,601	$8,71 \times 10^{-06}$	<i>TNFRSF11B</i>
	BTA15	rs41762520	36.237.453	0,436	-0,430	$2,16 \times 10^{-06}$	<i>SOX6</i>
	BTA19	rs137336235	42.499.048	0,290	-0,468	$9,46 \times 10^{-06}$	<i>STAT5A, STAT3, CAVIN1, ATP6V0A1</i>
	BTA19	rs137013516				$4,87 \times 10^{-06}$	<i>RDM1, LYZL6, RPRML, GOSR2,</i>
			45.260.060	0,405	-0,425		<i>WNT9B</i>
	BTA22	rs135958722				$1,68 \times 10^{-05}$	<i>DCPIA, TKT, PRKCD, RFT1,</i>
HS			47.788.970	0,338	-0,416		<i>SFMBT1</i>
	BTA23	rs3423484689	50.286.822	0,420	-0,447	$1,03 \times 10^{-05}$	<i>PXDC1, SLC22A23</i>
	BTA1	rs43263479	107.060.820	0,403	-0,380	$4,46 \times 10^{-06}$	<i>bta-mir-15b, bta-mir-16b, KPNA4,</i>
							<i>SCARNA7, TRIM59, SMC4, IFT80</i>
	BTA1	rs136406107	107.259.941	0,470	0,339	$2,21 \times 10^{-05}$	<i>C1H3orf80</i>
	BTA1	BOVINEHD0100030625	107.405.038	0,443	0,384	$1,45 \times 10^{-06}$	<i>LOC511229, IL12A</i>
	BTA4	rs110116504	70.569.760	0,392	-0,391	$2,00 \times 10^{-05}$	<i>NPVF</i>
	BTA5	rs132903239	73.767.718	0,341	0,412	$2,12 \times 10^{-5}$	<i>RASD2, MB, LOC616957</i>
	BTA5	rs136384957	111.982.189	0,265	0,421	$2,12 \times 10^{-05}$	<i>MCHR1, SNORA75, SLC25A17, U6</i>

		rs29021711	41.179.898	0,454	-0,330	2,32 x 10 ⁻⁰⁵	<i>KRT23, KRT39, KRT40, KRTAP3-3, LOC100294937, KRTAP3-1, LOC540285, LOC618495, KRTAP1-1, LOC788284, LOC787225, LOC100295015</i>
BTA19							
BTA19		rs3423466061	42.441.917	0,490	-0,366	1,65 x 10 ⁻⁰⁶	<i>STAT5B, STAT5A, STAT3, CAVIN1, ATP6V0A1, NAGLU</i>
		rs136150264	42.524.370	0,409	-0,351		
BTA19		rs208052147	42.656.214	0,377	-0,353	4,23 x 10 ⁻⁰⁶	<i>HSD17B1, COASY, MLX, PSMC3IP, RETREG3, TUBG1, TUBG2, PLEKHH3, CCR10, CNTNAP1, EZH1</i>
BTA19		rs110562505	44.399.011	0,090	0,594	6,62 x 10 ⁻⁰⁶	<i>CCDC43, DBF4B, ADAM11, GJC1</i>
		rs41915629	44.433.254	0,090	0,592		
BTA19		rs109506665				7,34 x 10 ⁻⁰⁶ , 7,94 x 10 ⁻⁰⁶	<i>EFTUD2, CCDC103, FAM187A, GFAP, KIF18B, C1QL1, DCAKD, NMT1, PLCD3</i>
			44.687.636	0,105	0,546		
BTA19		rs41922604	45.237.730	0,116	0,479	6,45 x 10 ⁻⁰⁶	<i>RDM1, LYZL6, RPRML, GOSR2, WNT9B</i>
BTA19		rs41922552	45.349.588	0,202	0,407	1,585 x 10 ⁻⁰⁵	<i>WNT3, NSF</i>
BTA22		rs29016268	44.248.276	0,339	-0,382	1,50 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ARHGEF3</i>
BTA24		rs133036426	43.581.540	0,454	0,375	2,45 x 10 ⁻⁰⁵	<i>FAM210A, RNMT, MC5R, MC2R</i>
BTA24		rs133695331	45.169.311	0,418	0,353	9,41 x 10 ⁻⁰⁶	
BTA24		rs109699268	46.162.454	0,292	-0,396	8,42 x 10 ⁻⁰⁶	<i>RNF165, LOXHD1</i>
BTA25		rs42075838	37.411.428	0,490	-0,373	7,04 x 10 ⁻⁰⁶	<i>TRRAP, TMEM130, NPTX2</i>
BTA25		rs110737393	37.586.325	0,441	0,351	4,12 x 10 ⁻⁰⁷	
BTA25		rs135797510	39.077.371	0,140	0,418	6,74 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SLC29A4, WIPI2, MMD2, RADIL, PAPOLB</i>
DLB	BTA1	rs42421633	145.423.595	0,361	0,486	2,61 x 10 ⁻⁰⁶	<i>5S_rRNA, PCBP3</i>
	BTA3	rs133230168	11.118.671	0,401	-0,427	8,49 x 10 ⁻⁰⁶	<i>SPTA1, OR10Z1, OR10X1, OR10X1D, OR10X1C</i>

BTA3	rs110909706	11.230.799	0,481	-0,445	4,93 x 10 ⁻⁰⁶	<i>OR6P1, OR6Y1, OR10R3, OR10K1</i>
BTA5	rs109119430	33.814.251	0,360	0,534	1,56 x 10 ⁻⁰⁶	<i>SLC38A2</i>
BTA8	rs41591759	108.648.399	0,410	-0,365	1,25 x 10 ⁻⁰⁵	<i>BRINP1</i>
BTA8	rs134913818	107.888.774	0,287	-0,357	1,70 x 10 ⁻⁰⁵	<i>5S_rRNA</i>
BTA13	rs41700752	62.137.479	0,411	0,372	2,28 x 10 ⁻⁰⁵	<i>COMMD7, DNMT3B, MAPRE1, EFCAB8</i>
BTA16	BOVINEHD1600015916	55.803.782	0,383	0,455	2,02 x 10 ⁻⁰⁵	<i>GPR52</i>
BTA21	rs109718824	45.506.899	0,484	0,382	1,96 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PRORP, PSMA6, U6</i>
BTA21	rs42918279	47.260.394	0,410	0,423	2,12 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SLC25A21</i>
BTA21	rs133819443	48.040.788	0,346	-0,468	1,31 x 10 ⁻⁰⁵	<i>TTC6</i>
BTA21	rs41643781	48.482.014	0,274	-0,594	4,19 x 10 ⁻⁰⁷	<i>CLEC14A</i>
BTA25	rs41257233	231.298	0,130	0,516	8,57 x 10 ⁻⁰⁶	<i>RHBDF1, MPG, NPRL3, HBA, HBA1, HBQ1, HBM, HBZ, LUC7L, FAM234A, RGS11, ARHGDIG, AXIN1</i>
BTA25	rs136435786	481.855	0,172	0,460	6,73 x 10 ⁻⁰⁶	<i>NME4, DECR2, RAB11FIP3, CAPN15, PRR35, NHLRC4, PIGQ, RAB40C, WFIKK1, METTL26, MCRIP2, RHOT2, RHBDL1</i>
BTA25	rs134365711	25.579.598	0,186	0,535	1,67 x 10 ⁻⁰⁵	<i>XPO6</i>

BTA – autossomo do *Bos taurus*; MAF: alelo de menor frequência

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados a úlcera de sola (US) e úlcera da pinça (UP) e os genes posicionais correspondentes identificados para cada característica.

Trait	Chr.	Variant	Localização (bp)	MAF	Efeito	P-valor	Genes
US	BTA4	rs110858645	40.454.370	0,353	-0,412	$1,65 \times 10^{-05}$	<i>LOC518526, CD36</i>
	BTA4	rs137157728	40.456.319	0,434	-0,390	$1,10 \times 10^{-05}$	<i>GNAT3</i>
	BTA4	rs43384692	39.526.997	0,413	-0,392	$1,97 \times 10^{-05}$	<i>U6</i>
	BTA5	rs109080959; rs110368895	27.900.978	0,184	0,472	$6,50 \times 10^{-06}$;	<i>SMIM41, ATG101, NR4A1, TAMALIN,</i>
			27.965.168	0,190	-0,471	$4,27 \times 10^{-06}$	<i>ACVR1B, ACVRL1, ANKRD33, FIGNL2, SCN8A</i>
	BTA13	rs109265528	58.741.419	0,273	0,381	$1,37 \times 10^{-05}$	<i>PCK1, CTCFL, RBM38, RAE1, SPO11</i>
	BTA13	rs111023864	60.331.281	0,353	-0,473	$1,95 \times 10^{-06}$;	<i>ANGPT4, FAM110A, SLC52A3, SCRT2,</i>
		rs136459797	60.376.862	0,313	0,508	$1,59 \times 10^{-06}$	<i>SRXN1, TCF15</i>
	BTA13	rs133090941	61.513.329	0,274	0,614	$3,88 \times 10^{-08}$;	<i>TTLL9, PDRG1, XKR7, CCM2L, HCK,</i>
		rs132702901	61.525.980	0,301	-0,458	$7,28 \times 10^{-06}$	<i>TM9SF4</i>
	BTA13	rs109434648; rs135638111	61.686.658	0,314	0,503	$1,62 \times 10^{-06}$;	<i>PLAGL2, POFUT</i>
			61.712.826	0,327	0,438	$1,62 \times 10^{-05}$;	<i>1, KIF3B, ASXL1, NOL4L</i>
	BTA13	rs109849274	61.787.008	0,473	-0,412	$2,99 \times 10^{-06}$	<i>COMMD7</i>
	BTA13	rs41707268	62.042.234	0,307	-0,548	$2,48 \times 10^{-07}$	<i>DNMT3B, MAPRE1, EFCAB8</i>
	BTA13	rs41700764	62.146.317	0,454	-0,392	$4,89 \times 10^{-06}$	<i>BPIFB6, BPIFB3, BPIFB4, BPIFA2A,</i>
		rs110484302	62.435.827	0,152	0,497	$2,05 \times 10^{-05}$;	<i>LOC112441508</i>
	BTA13	rs110481287	62.445.790	0,278	0,530	$1,80 \times 10^{-06}$	<i>ITCH, DYNLRB1, MAP1LC3A, PIGU,</i>
	BTA13	rs109859513	63.941.775	0,480	0,367	$4,46 \times 10^{-06}$	<i>TP53INP2</i>
							<i>EDEM2, PROCR, MMP24, EIF6, FAM83C,</i>
	BTA13	rs110256558	64.505.651	0,234	0,586	$7,49 \times 10^{-08}$	<i>UQCC1</i>
	BTA13	rs137129366	65.106.036	0,248	0,435	$1,60 \times 10^{-05}$	<i>5S_rRNA, PHF20, SCAND1, CNBD2</i>
	BTA13	rs41566230	67.031.814	0,332	0,412	$5,15 \times 10^{-06}$	<i>U6, TGM2, KIAA1755</i>
	BTA14	rs109730339	8.243.576	0,484	-0,402	$1,99 \times 10^{-05}$	<i>CCN4, TG, SLA</i>
	BTA14	rs41841264	15.767.643	0,180	0,50	$4,57 \times 10^{-06}$	<i>TMEM65, FER1L6</i>
	BTA18	rs134543315	29.675.982	0,119	0,528	$2,09 \times 10^{-05}$	<i>CDH8</i>

BTA18		rs108984194	56.106.285	0,050	-0,747	1,67 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PRRG2, PRR12, RRAS, SCAF1, IRF3, BCL2L12, PRMT1, ADM5, CPT1C, TSKS, AP2A1, FUZ, MED25, PTOV1</i>
		rs110502730	27.838.415	0,431	0,381	5,91 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ALOXE3, HES7, PER1, VAMP2, U8, U6, TMEM107, BORCS6, AURKB, CTC1, PFAS, RANGRF, SLC25A35, ARHGEF15</i>
UP	BTA8	rs41588268	22.183.217	0,251	-0,535	4,89 x 10 ⁻⁰⁶	<i>CDKN2B, CDKN2A, MTAP</i>
	BTA8	rs109900656	31.423.383	0,498	0,459	1,29 x 10 ⁻⁰⁵	<i>LURAP1L</i>
	BTA8	rs43544402	31.646.305	0,462	0,427	1,89 x 10 ⁻⁰⁵	<i>TYRP1</i>
	BTA8	rs109708445	110.694.958	0,454	-0,294	1,18 x 10 ⁻⁰⁵	<i>RAB14, GSN, STOM</i>
	BTA8	ARS-BFGL-NGS-11454	112.052.712	0,270	-0,389	2,58 x 10 ⁻⁰⁷	<i>MYT1L, PXDN</i>
	BTA8	rs3423093234	112.262.700	0,358	-0,330	1,48 x 10 ⁻⁰⁶	<i>TPO, SNTG2</i>
	BTA11	rs109000445	86.950.801	0,420	-0,448	2,84 x 10 ⁻⁰⁷	<i>PDIA6, ATP6V1C2, NOL10</i>
	BTA13	rs41705775	63.424.678	0,074	-0,795	2,95 x 10 ⁻⁰⁶	<i>RALY, EIF2S2</i>
	BTA13	rs109140327	64.192.070	0,129	-0,607	1,51 x 10 ⁻⁰⁵	<i>NCOA6, GGT7, ACSS2, GSS, MYH7B</i>
	BTA23	rs133432683	11.919.538	0,351	0,486	2,07 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ZFAND3</i>

BTA – autossomo do *Bos taurus*; MAF: alelo de menor frequência

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 7. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para úlcera de sola (US) e hemorragia de sola (HS) em bovinos da raça Holandesa Canadense.

Característica	Banco de dados original	Termo	Genes	FDR
HS	GOTERM_CC_DIRECT	Keratin filament	<i>LOC100295015, LOC618495, LOC100294937, LOC788284, LOC787225, KRTAP1-1, KRTAP3-3, LOC540285, KRTAP3-1, LOC618938</i>	$3,80 \times 10^{-10}$
HS	UP_KW_CELLULAR_COMPONENT	Keratin	<i>LOC100295015, LOC618495, LOC788284, LOC787225, KRTAP1-1, KRTAP3-3, KRT40, LOC540285, KRTAP3-1, LOC618938</i>	$5,90 \times 10^{-09}$
HS	INTERPRO	High sulphur keratin-associated protein	<i>LOC100295015, LOC618495, LOC788284, LOC787225, KRTAP1-1, LOC540285, LOC618938</i>	$1,50 \times 10^{-06}$
HS	GOTERM_MF_DIRECT	Structural molecule activity	<i>LOC100294937, KRTAP3-3, KRT40, A0A3Q1M8Y7_BOVIN, KRT23, KRTAP3-1, KRT39</i>	$4,40 \times 10^{-04}$
HS	GOTERM_BP_DIRECT	JAK-STAT cascade involved in growth hormone signaling pathway	<i>STAT3, STAT5A, STAT5B</i>	$2,60 \times 10^{-02}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, core	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, DNA-binding, subdomain	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, protein interaction	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, all-alpha	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, DNA-binding	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	INTERPRO	STAT transcription factor, coiled coil	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$6,00 \times 10^{-03}$
HS	SMART	SM00964	<i>STAT5A, STAT5B, STAT3</i>	$1,60 \times 10^{-02}$
US	INTERPRO	Bactericidal permeability-increasing protein, alpha/beta domain	<i>BPIFA2A, BPIFB6, LOC112441508, BPIFB4, BPIFB3</i>	$7,50 \times 10^{-05}$

US	INTERPRO	Lipid-binding serum glycoprotein, N-terminal	<i>BPIFA2A, BPIFB6, LOC112441508, BPIFB4, BPIFB3</i>	$7,50 \times 10^{-05}$
US	UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:BPI1	<i>BPIFA2A, LOC112441508, BPIFB4, BPIFB3</i>	$7,30 \times 10^{-03}$
US	SMART	BPI2	<i>BPIFB6, BPIFB4, BPIFB3</i>	$2,20 \times 10^{-02}$
US	UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:BPI2	<i>BPIFB6, BPIFB4, BPIFB3</i>	$3,80 \times 10^{-02}$
US	INTERPRO	Lipid-binding serum glycoprotein, C-terminal	<i>BPIFB6, BPIFB4, BPIFB3</i>	$4,40 \times 10^{-02}$

GOTERM_CC_DIRECT: GO TERM Componente Celular; UP_KW: UniprotKB Keywords; INTERPRO: Classificação de famílias de proteínas; GOTERM_MF_DIRECT: GO TERM Função molecular; GOTERM_BP_DIRECT: GO TERM Processo Biológico; SMART: ferramenta de pesquisa de arquitetura modular simples; UP_SEQ_FEATURE: UniprotKB : recursos de sequência.

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 8. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupos de genes identificados para a doença da linha branca em bovinos da raça Holandesa Canadense.

Banco de dados original	Termo	Genes	FDR
INTERPRO	Haemoglobin, alpha	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,70 \times 10^{-08}$
GOTERM_CC_DIRECT	Haptoglobin-hemoglobin complex	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$6,70 \times 10^{-07}$
GOTERM_CC_DIRECT	Hemoglobin complex	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$6,70 \times 10^{-07}$
UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN: GLOBIN	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,70 \times 10^{-06}$
GOTERM_MF_DIRECT	Organic acid binding	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,70 \times 10^{-06}$
UP_SEQ_FEATURE	BINDING: distal binding residue	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,90 \times 10^{-06}$
INTERPRO	Globin	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,50 \times 10^{-06}$
INTERPRO	Globin-like	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,50 \times 10^{-06}$
INTERPRO	Globin, structural domain	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,50 \times 10^{-06}$
UP_SEQ_FEATURE	BINDING: proximal binding residue	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,90 \times 10^{-06}$
GOTERM_MF_DIRECT	Oxygen transporter activity	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$2,80 \times 10^{-06}$
GOTERM_MF_DIRECT	Oxygen binding	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$3,80 \times 10^{-06}$
GOTERM_BP_DIRECT	hydrogen peroxide catabolic process	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$3,90 \times 10^{-05}$
GOTERM_BP_DIRECT	Cellular oxidant detoxification	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$2,90 \times 10^{-04}$
INTERPRO	Haemoglobin, pi	<i>HBQ1, HBA1, HBA</i>	$3,70 \times 10^{-04}$
UP_KW_LIGAND	Heme	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$5,30 \times 10^{-03}$
GOTERM_MF_DIRECT	Heme binding	<i>HBZ, HBM, HBQ1, HBA1, HBA</i>	$1,20 \times 10^{-02}$

INTERPRO: Classificação de famílias de proteínas; GOTERM_CC_DIRECT: GO TERM Componente Celular; UP_SEQ_FEATURE: UniprotKB recursos de sequência, GOTERM_MF_DIRECT: GO TERM Função molecular; GOTERM_BP_DIRECT: GO TERM Processo Biológico; UP_KW:UniprotKB Keywords.

Fonte: Elaboração Própria.

("Atividade da molécula estrutural") (Tabela 7). As queratinas são as proteínas estruturais características da epiderme altamente cornificada da pele, penas e casco (TOMLINSON et al., 2004). A queratina é responsável pela formação de proteínas fibrosas ricas em cisteína, que são os principais constituintes dos cornos, unhas, pelos, epiderme e penas (PATRUCCO et al., 2019). Os genes da família da queratina regulam vários distúrbios clínicos humanos, incluindo ictiose epidermolítica, ictiose epidermolítica superficial, epidermólise bolhosa simples, ceratodermia palmoplantar e nevo branco esponjoso (HO et al., 2022). Em bovinos, os genes da família da queratina foram sugeridos como genes candidatos para suscetibilidade e resiliência à paratuberculose (ALONSO-HEARN et al., 2022), e uma mutação no gene da queratina bovina-5 (*KRT5*) foi encontrada como a variação causal para epidermólise bolhosa simples (FORD et al., 2005), uma condição apresentada como perda de pele e mucosa das áreas de contato e inflamação em touros mestiços Friesian-Jersey. Em um estudo anterior, Lai et al. (2021a) relataram genes relacionados à queratinização como genes candidatos para várias lesões de cascos em bovinos da raça Holandesa.

Outro grupo de genes (*STAT5A*, *STAT5B* e *STAT3*) localizados perto do SNP em BTA19 (rs3423466061; 42,4 Mb) são potenciais genes candidatos para HS e HI. A família de proteínas STAT (transdutores de sinal e ativadores de transcrição) contém fatores de transcrição que são especificamente ativados para regular a transcrição de genes quando as células encontram citocinas e fatores de crescimento (BANERJEE e RESAT, 2016). As proteínas STAT regulam as respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro (KISSELEVA et al., 2002). *STAT3* é um regulador transcricional chave de genes associados à imunidade inata e cicatrização de feridas (HUGHES et al., 2012), e um estudo anterior relatou uma interação entre *STAT3* e queratina-17 para aumentar a proliferação de queratinócitos em humanos (YANG et al., 2018). Uma variante em *STAT5A* foi associada aos ensaios bioquímicos séricos de IL-6 em bovinos da raça Holandesa (USMAN et al., 2014), uma citocina que atua nas respostas imunes inata e adaptativa e é um importante biomarcador inflamatório. Outra variante (rs134993207; BTA19:43,038,655) no gene *STAT5* foi associada à mastite em bovinos da raça Holandesa Nórdica (CAI et al., 2018). O processo biológico cascata JAK-STAT envolvido na via de sinalização do hormônio do crescimento foi associado aos genes *STAT5A*, *STAT5B* e *STAT3* (Tabela 7). Em pesquisa realizada por Brown et al. (2004),

foi detectada melhora clínica nas patologias do casco de vacas Holandesas quando utilizada a regulação da secreção do hormônio do crescimento, através do gene *GHRH* (Growth hormon-releasing hormon). Também foi encontrada a associação do hormônio do crescimento com algumas características em carpinos Raini Cashmere (GOOKI et al., 2018), como altura do dedo do casco da mão, altura do dedo do casco do pé e altura do calcanhar do casco do pé.

Quatro genes (*BPIFA2A*, *BPIFB3*, *BPIFB4*, *BPIFB6*) da superfamília BPI-fold (BPIF) localizados perto do mesmo SNP (rs110484302, BTA13:62,4 Mb) foram associados com US. A superfamília BPIF tem sido associada a vias importantes relacionadas à saúde, como peptídeos antimicrobianos, sistema imunológico e sistema imunológico inato em humanos (THEPRUNGSIRIKUL et al., 2021). Três outros potenciais genes candidatos foram encontrados associados com US. A *POFUT1* (Proteína O-Fucosiltransferase 1), localizada no BTA13 (61,69 – 61,74 Mb), influencia a sinalização de *notch* em mamíferos (STAHL et al., 2008), na qual a ativação ou inibição da sinalização de *notch* pode alterar as funções das células endoteliais vasculares, queratinócitos e fibroblastos em um modelo de cicatrização de feridas (CHIGURUPATI et al., 2007). O SNP rs109265528 (BTA13:58,741,419) também foi associado a um QTL relatado anteriormente para US em gado Holandês (Apêndice II). O *CD36* (Molécula CD36), localizado no BTA4 (40,38 – 40,42 Mb), é uma glicoproteína multifuncional que atua como receptor para uma ampla gama de ligantes com funções importantes na sinalização TLR2/CD36-p38 MAPK e pode melhorar a defesa contra infecções bacterianas (LI e outros, 2013). *ALOXE3* (Arachidonate Lipoxygenase 3) é um membro da família das lipoxigenases, que são enzimas chave na biossíntese de uma variedade de oxilipinas altamente ativas. As oxilipinas regulam a modulação da proliferação e/ou diferenciação epitelial e estão envolvidas na inflamação, cicatrização de feridas, doenças inflamatórias da pele e na manutenção da barreira de permeabilidade da pele (KRIEG e FÜRSTENBERGER, 2014).

As análises de enriquecimento não encontraram termos GO significativos para UP, mas as análises de anotação funcional identificaram potenciais genes candidatos para essa característica. Três regiões genômicas localizadas em BTA8 (Tabela 6) foram associadas com UP. O primeiro deles (22,0 – 22,1Mb) se sobrepõe aos genes *CDKN2A* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2A) e *CDKN2B* (Cyclin Dependent Kinase Inhibitor

2B), que são proteínas de ponto de verificação para a parada do ciclo celular (WIESNER et al., 2010). Um acúmulo de proteína *CDKN2A* em queratinócitos é observado na pele de idade normal, bem como em distúrbios neoplásicos e inflamatórios da pele (HASHIMOTO-HACHIYA et al., 2019). A segunda região de BTA8 (31,4 a 31,6 Mbp) abriga o gene *TYRP1* (Tyrosinase Related Protein 1), que está relacionado com a biossíntese de melanina (ZHANG et al., 2022) e os níveis de melanina podem influenciar a cicatrização de feridas (ROWLEDGE et al., 2016). A terceira região (BTA8: 110,6 – 112,6 Mb) abriga o gene *PXDN* (Peroxidasin), que participa de vias relacionadas ao colágeno, incluindo “Montagem de fibrilas de colágeno e outras estruturas multiméricas”, “Formação de colágeno”, “Crosslinking de fibrilas de colágeno”, e “Organização da matriz extracelular”. O colágeno desempenha um papel crítico na regulação das fases de cicatrização de feridas em sua conformação fibrilar nativa ou como componentes solúveis no meio da ferida (MATHEW-STEINER et al., 2021).

Cinco genes (*HBZ*, *HBM*, *HBQ1*, *HBA1*, *HBA*) tiveram termos GO significativos para DLB (Tabela 7). Esses genes estão associados a dois processos biológicos (“catabólico do peróxido de hidrogênio” e “desintoxicação oxidante celular”) e a dois componentes celulares, incluindo o “complexo haptoglobina-hemoglobina” e o “complexo da hemoglobina”. A hemoglobina tem a função de transportar oxigênio no plasma sanguíneo, mas uma ingestão inadequada de minerais pode afetar a síntese de hemoglobina e o aumento dos efeitos tóxicos dos metabólitos de oxigênio (NRC, 2001). A ingestão inadequada de minerais está associada à malformação de queratinas em bovinos, contribuindo para distúrbios dos cascos (TOMLINSON et al., 2004). Pacientes humanos com diabetes mellitus e distúrbios do pé apresentaram níveis elevados de hemoglobina (LI et al., 2021). O gene *AXINI* (Axin 1), localizado no BTA25, codifica um componente do complexo de destruição da β -catenina, que contribui para a proteção contra diversas patogêneses humanas. Além disso, a degradação e o sequestro plasmático da Axina-1 aumentam a capacidade de invasão bacteriana e as respostas inflamatórias (JIN et al., 2017). A β -catenina está envolvida na proteção da epiderme contra estresses mecânicos (RAY et al., 2013). *DNMT3B* (DNA Metiltransferase 3 Beta) codifica uma enzima metiltransferase primária que catalisa a metilação do DNA para estabelecer destinos celulares durante o desenvolvimento e desempenha papéis importantes em vários tecidos adultos, incluindo a epiderme (RINALDI et al., 2016). Além disso, os genes

DNMT regulam a metilação do DNA em células inflamatórias, queratinócitos e fibroblastos com consequentes efeitos na cicatrização de feridas (PASTAR et al., 2021). O *PSMA6* (Proteasome 20S Subunit Alpha 6) está envolvido nas vias do sistema imunológico adaptativo (CHIAO et al., 2021). Ele codifica uma proteína envolvida no processamento do antígeno de classe I do complexo principal de histocompatibilidade, e sua interrupção gera autoantígenos ou outros antígenos pró-inflamatórios para apresentação às células T CD8+ patogênicas (SUKHOV et al., 2016). Este gene está localizado próximo a um QTL previamente associado a HS em gado Holandês (Apêndice II). *SLC38A2* (Solute Carrier Family 38 Member 2) codifica uma proteína transmembrana de aminoácidos, e os aminoácidos influenciam a integridade estrutural dos cascos em bovinos (LANGOVA et al., 2020). *BRINP1* (BMP/Retinóico Induzível Neural Específico 1) inibe a proliferação celular, medeia a morte celular e regula a expressão de componentes da via do plasminogênio. A expressão de *BRINP1* caiu com o aumento da concentração de ureia em vacas Holandesas-Frísia (CHENG et al., 2015), e altas concentrações de ureia no sangue podem danificar as lamelas sensíveis e cório no casco (LANGOVA et al., 2020). Vários QTL foram encontrados exclusivamente para doenças não infecciosas do casco (Apêndice II) para o tipo exterior ("HI", "HS", "US", "Escore de condição corporal", e "Qualidade óssea"). Além deles, foram encontrados QTL para sanidade ("Proliferação celular induzida por ConA"), carne e carcaça ("Percentual de osso" e "Peso de osso") e produção ("Tamanho do corpo"). A concanavalina A (ConA) é um mitógeno independente de antígeno e funciona como um indutor de um sinal, levando as células T à proliferação policlonal (ANDO et al., 2014), sendo uma importante via de resposta imunológica. Fiore et al. (2019) identificaram que a osteólise que acomete o osso podal está associada a lesões nos cascos. Além disso, vacas selecionadas para tamanho corporal maior foram mais frequentemente encontradas com problemas nas pernas e nos pés do gado Holandês (HANSEN et al., 1999).

Apenas um único marcador foi o mesmo entre doenças infecciosas e não infecciosas (rs110059642; BTA5:30.490.039), que foi associado com DD e HI e está localizado próximo a sete genes (Tabelas 3 e 5). Entre esses genes, *CIQL4* e *TUBA1C* (Tabela 4) mostraram significância para os termos GO para a doença infecciosa. Esses resultados demonstram que as características estudadas são altamente poligênicas e influenciadas por uma ampla gama de mecanismos biológicos e processos de seleção.

CONCLUSÕES

As análises de associação do genoma identificaram SNPs significativamente associados a doenças infecciosas e não infecciosas dos cascos e ao índice de saúde dos cascos na maioria dos cromossomos. O SNP rs110059642 (BTA5: 30.490.039) foi associado a DD e HI, enquanto 28 genes foram associados a dois pares de características. As regiões ao redor dos SNPs significativos se sobrepuseram a vários QTL relatados anteriormente para características externas, de saúde, carne e carcaça, leite, produção e reprodução. Um total de 235 SNPs significativos em todo o genoma e 44 termos de ontologia gênica e vias biológicas foram enriquecidos. Muitos potenciais genes candidatos envolvidos em vias biológicas associadas ao desenvolvimento ósseo, metabolismo e doenças infecciosas e imunológicas foram identificados. Esses achados indicam que as características de saúde dos cascos são altamente poligênicas e influenciadas por uma ampla gama de processos biológicos. Novos estudos com outras populações independentes e com dados de sequência do genoma inteiro são necessários para validar os potenciais genes candidatos identificados, especialmente aqueles nas regiões de marcadores sobrepostos (localizados em BTA3, BTA5, BTA13, BTA14 e BTA19) e com mais de um gene associados às características estudadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso-Hearn, M., Badia-Bringué, G., & Canive, M. (2022). Genome-wide association studies for the identification of cattle susceptible and resilient to paratuberculosis. *Front Vet Sci*, 9, 935133. <https://doi.org/10.3389/fvets.2022.935133>
- Alper, C. A., Xu, J., Cosmopoulos, K., Dolinski, B., Stein, R., Uko, G., Larsen, C. E., Dubey, D. P., Densen, P., Truedsson, L., Sturfelt, G., & Sjöholm, A. G. (2003). Immunoglobulin deficiencies and susceptibility to infection among homozygotes and heterozygotes for C2 deficiency. *J Clin Immunol*, 23(4), 297–305. <https://doi.org/10.1023/A:1024540917593>
- Alvergnas, M., Strabel, T., Rzewuska, K., & Sell-Kubiak, E. (2019). Claw disorders in dairy cattle: Effects on production, welfare and farm economics with possible prevention methods. *Livest Sci*, 222, 54–64. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2019.02.011>

- An, B., Xia, J., Chang, T., Wang, X., Xu, L., Zhang, L., Gao, X., Chen, Y., Li, J., & Gao, H. (2019). Genome-wide association study reveals candidate genes associated with body measurement traits in Chinese Wagyu beef cattle. *Anim Genet*, 50(4), 386–390. <https://doi.org/10.1111/age.12805>
- Ando, Y., C. Yasuoka, T. Mishima, T. Ikematsu, T. Uede, T. Matsunaga, and M. Inobe. 2014. Concanavalin A-mediated T cell proliferation is regulated by herpes virus entry mediator costimulatory molecule. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 50:313–320. doi:10.1007/s11626-013-9705-2.
- Ayele, G., G. Feseha, E. Bojia, and A. Joe. 2006. Prevalence of gastro-intestinal parasites of donkeys in Dugda Bora District, Ethiopia. *Livest. Res. Rural Dev.* 18.
- Bacanu, S. A., Devlin, B., & Roeder, K. (2000). The Power of Genomic Control. *Am J Hum Genet*, 66(6), 1933–1944. <https://doi.org/10.1086/302929>
- Bajic, G., Degn, S. E., Thiel, S., & Andersen, G. R. (2015). Complement activation, regulation, and molecular basis for complement-related diseases. *EMBO J*, 34(22), 2735–2757. <https://doi.org/10.15252/emboj.201591881>
- Banerjee, K., & Resat, H. (2016). Constitutive activation of STAT3 in breast cancer cells: A review. *Int J Cancer*, 138(11), 2570–2578. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/ijc.29923>
- Bay, V., Gillespie, A., Ganda, E., Evans, N. J., Carter, S. D., Lenzi, L., Lucaci, A., Haldenby, S., Barden, M., Griffiths, B. E., Sánchez-Molano, E., Bicalho, R., Banos, G., Darby, A., & Oikonomou, G. (2023). The bovine foot skin microbiota is associated with host genotype and the development of infectious digital dermatitis lesions. *Microbiome*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/s40168-022-01440-7>
- Bengaly, Z., I. Sidibe, R. Ganaba, M. Desquesnes, H. Boly, and L. Sawadogo. 2002. Comparative pathogenicity of three genetically distinct types of *Trypanosoma congolense* in cattle: clinical observations and haematological changes. *Vet Parasitol* 108:1–19. [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(02\)00164-4](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(02)00164-4).
- Biemans, F. (2018). Transmission of digital dermatitis in dairy cattle: population dynamics and host quantitative genetics. PHD, Wageningen University, Wageningen. <https://doi.org/10.18174/443357>

- Bohmanova, J., Sargolzaei, M., & Schenkel, F. S. (2010). Characteristics of linkage disequilibrium in North American Holsteins. *BMC Genomics*, 11(1), 421. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-421>
- Booth, C. J., Warnick, L. D., Gröhn, Y. T., Maizon, D. O., Guard, C. L., & Janssen, D. (2004). Effect of Lameness on Culling in Dairy Cows. *J Dairy Sci*, 87(12), 4115–4122. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(04\)73554-7](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73554-7)
- Brown, P. A., Davis, W. C., & Draghia-Akli, R. (2004). Immune-enhancing effects of growth hormone-releasing hormone delivered by plasmid injection and electroporation. *Mol Ther*, 10(4), 644–651. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2004.06.1015>
- Browne, N., Hudson, C. D., Crossley, R. E., Sugrue, K., Huxley, J. N., & Conneely, M. (2022). Hoof lesions in partly housed pasture-based dairy cows. *J Dairy Sci*, 105(11), 9038–9053. <https://doi.org/10.3168/JDS.2022-22010>
- Butty, A. M., Chud, T. C. S., Cardoso, D. F., Lopes, L. S. F., Miglior, F., Schenkel, F. S., Cánovas, A., Häfliger, I. M., Drögemüller, C., Stothard, P., Malchiodi, F., & Baes, C. F. (2021). Genome-wide association study between copy number variants and hoof health traits in Holstein dairy cattle. *J Dairy Sci*, 104(7), 8050–8061. <https://doi.org/10.3168/JDS.2020-19879>
- Cai, Z., Guldbrandtsen, B., Lund, M. S., & Sahana, G. (2018). Prioritizing candidate genes post-GWAS using multiple sources of data for mastitis resistance in dairy cattle. *BMC Genomics*, 19(1), 656. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-5050-x>
- Chapinal, N., A. Koeck, A. Sewalem, D.F. Kelton, S. Mason, G. Cramer, and F. Miglior. 2013. Genetic parameters for hoof lesions and their relationship with feet and leg traits in Canadian Holstein cows. *J Dairy Sci*, 96:2596–2604. doi:10.3168/jds.2012-6071.
- Charfeddine, N., & Pérez-Cabal, M. A. (2017). Effect of claw disorders on milk production, fertility, and longevity, and their economic impact in Spanish Holstein cows. *J Dairy Sci*, 100(1), 653–665. <https://doi.org/10.3168/JDS.2016-11434>
- Chen, Z., Brito, L. F., Luo, H., Shi, R., Chang, Y., Liu, L., Guo, G., & Wang, Y. (2021). Genetic and genomic analyses of service sire effect on female reproductive traits in Holstein cattle. *Front Genet*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.713575>

- Cheng, Z., Oguejiofor, C. F., Swangchan-Uthai, T., Carr, S., & Wathes, D. C. (2015). Relationships between Circulating Urea Concentrations and Endometrial Function in Postpartum Dairy Cows. *Animals (Basel)*, 5(3), 748–773. <https://doi.org/10.3390/ani5030382>
- Chiao, C. C., Liu, Y. H., Phan, N. N., Ton, N. T. A., Ta, H. D. K., Anuraga, G., Xuan, D. T. M., Fitriani, F., Hermanto, E. M. P., Athoillah, M., Andriani, V., Ajiningrum, P. S., Wu, Y. F., Lee, K. H., Chuang, J. Y., Wang, C. Y., & Kao, T. J. (2021). Prognostic and genomic analysis of proteasome 20s subunit alpha (PSMA) family members in breast cancer. *Diagnostics*, 11(12). <https://doi.org/10.3390/diagnostics11122220>
- Chigurupati, S., Arumugam, T. V., Son, T. G., Lathia, J. D., Jameel, S., Mughal, M. R., Tang, S. C., Jo, D. G., Camandola, S., Giunta, M., Rakova, I., McDonnell, N., Miele, L., Mattson, M. P., & Poosala, S. (2007). Involvement of notch signaling in wound healing. *PloS one*, 2(11), e1167. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001167>
- Croué, I., A. Michenet, H. Leclerc, and V. Ducrocq. 2019. Genomic analysis of claw lesions in Holstein cows: Opportunities for genomic selection, quantitative trait locus detection, and gene identification. *J Dairy Sci* 102:6306–6318. doi:10.3168/jds.2018-15979.
- Dadousis, C., Ablondi, M., Cipolat-Gotet, C., van Kaam, J. T., Marusi, M., Cassandro, M., Sabbioni, A., & Summer, A. (2022). Genomic inbreeding coefficients using imputed genotypes: Assessing different estimators in Holstein-Friesian dairy cows. *J Dairy Sci*, 105(7), 5926–5945. <https://doi.org/10.3168/JDS.2021-21125>
- Das, S., Forer, L., Schönherr, S., Sidore, C., Locke, A. E., Kwong, A., Vrieze, S. I., Chew, E. Y., Levy, S., McGue, M., Schlessinger, D., Stambolian, D., Loh, P. R., Iacono, W. G., Swaroop, A., Scott, L. J., Cucca, F., Kronenberg, F., Boehnke, M., ... Fuchsberger, C. (2016). Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet*, 48(10), 1284–1287. <https://doi.org/10.1038/ng.3656>
- DeDent, A., Kim, H. K., Missiakas, D., & Schneewind, O. (2012). Exploring *Staphylococcus aureus* pathways to disease for vaccine development. *Semin Immunopathol*, 34(2), 317–333. <https://doi.org/10.1007/s00281-011-0299-z>

- Egger-Danner, C., Nielsen, P., Fiedler, A., Müller, K., Fjeldaas, T., Döpfer, D., Daniel, V., Bergsten, C., Cramer, G., Christen, A.-M., Stock, K. F., Thomas, G., Holzhauer, M., Steiner, A., Clarke, J., Capion, N., Charfeddine, N., Pryce, J. E., Oakes, E., ... J. Kofler. (2020). ICAR clawhealth atlas (pp. 1–45). http://www.icar.org/Documents/ICAR_Claw_Health_Atlas.pdf
- Fiore, E., L. Perillo, G. Marchesini, G. Piccione, E. Giudice, A. Zumbo, L. Armato, G. Fabbri, and M. Ganesella. 2019. Effect of Parity on Claw Horn Lesions in Holstein Dairy Cows: Clinical and Radiological Study. *Ann. Anim. Sci.* 19:147–158. doi:10.2478/aoas-2018-0050.
- Fonseca, P. A. S., Suárez-Vega, A., Marras, G., & Cánovas, Á. (2020). GALLO: An R package for genomic annotation and integration of multiple data sources in livestock for positional candidate loci. *GigaScience*, 9(12). <https://doi.org/10.1093/gigascience/giaa149>
- Foster, A. R., El Chami, C., O'Neill, C. A., & Watson, R. E. B. (2020). Osmolyte transporter expression is reduced in photoaged human skin: Implications for skin hydration in aging. *Aging Cell*, 19(1), e13058. <https://doi.org/10.1111/accel.13058>
- Freebern, E., Santos, D. J. A., Fang, L., Jiang, J., Parker Gaddis, K. L., Liu, G. E., VanRaden, P. M., Maltecca, C., Cole, J. B., & Ma, L. (2020). GWAS and fine-mapping of livability and six disease traits in Holstein cattle. *BMC Genomics*, 21(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-6461-z>
- Ford, C. A., Stanfield, A. M., Spelman, R. J., Smits, B., Ankersmidt-Udy, A. E., Cottier, K., Holloway, H., Walden, A., Al-Wahb, M., Bohm, E., Snell, R. G., & Sutherland, G. T. (2005). A mutation in bovine keratin 5 causing epidermolysis bullosa simplex, transmitted by a mosaic sire. *J Invest Dermatol*, 124(6), 1170–1176. <https://doi.org/10.1111/j.0022-202X.2005.23610.x>
- Ge, Y., Huang, M., & Yao, Y. M. (2020). Biology of Interleukin-17 and Its Pathophysiological Significance in Sepsis. In *Front Immunol* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01558>.
- Ghoreishifar, S.M., Eriksson, S., Johansson, A.M. et al. Signatures of selection reveal candidate genes involved in economic traits and cold acclimation in five Swedish cattle breeds. *Genet SelEvol* 52, 52 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00571-5>

- Ghulam-Mohyuddin, S., Liang, Y., Ni, W., Adam IdrissArbab, A., Zhang, H., Li, M., Yang, Z., Karrow, N. A., & Mao, Y. (2022). Polymorphisms of the IL-17A Gene Influence Milk Production Traits and Somatic Cell Score in Chinese Holstein Cows. *Bioengineering*, 9(9), 448. <https://doi.org/10.3390/bioengineering9090448>
- Goddard, M. E., Hayes, B. J., & Meuwissen, T. H. E. (2011). Using the genomic relationship matrix to predict the accuracy of genomic selection. *J Anim Breed Genet*, 128(6), 409–421. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0388.2011.00964.x>
- Gooki, F. G., Mohammadabadi, M., Fozi, M. A., & Soflaei, M. (2018). Association of Biometric Traits with Growth Hormone Gene Diversity in Raini Cashmere Goats. *Walailak J Sci Technol*, 16(7), 499–508. <https://doi.org/10.48048/wjst.2019.3791>
- Han, Y., & Peñagaricano, F. (2016). Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC Genet*, 17(1), 143. <https://doi.org/10.1186/s12863-016-0454-6>
- Hansen, L.B., J.B. Cole, G.D. Marx, and A.J. Seykora. 1999. Productive life and reasons for disposal of Holstein cows selected for large versus small body size. *J Dairy Sci*, 82:795–801. doi:10.3168/jds.S0022-0302(99)75298-7.
- Hashimoto-Hachiya, A., Tsuji, G., Furue, M. (2019). Antioxidants cinnamaldehyde and Galactomyces fermentation filtrate downregulate senescence marker CDKN2A/p16INK4A via NRF2 activation in keratinocytes. *J Dermatol Sci*, 96(1), 53–56. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2019.09.002>
- Heringstad, B., Egger-Danner, C., Charfeddine, N., Pryce, J. E., Stock, K. F., Kofler, J., Sogstad, A. M., Holzhauer, M., Fiedler, A., Müller, K., Nielsen, P., Thomas, G., Gengler, N., de Jong, G., Ødegård, C., Malchiodi, F., Miglior, F., Alsaad, M., & Cole, J. B. (2018). Invited review: Genetics and claw health: Opportunities to enhance claw health by genetic selection. *J Dairy Sci*, 101(6), 4801–4821. <https://doi.org/10.3168/JDS.2017-13531>
- Ho, M., Thompson, B., Fisk, J. N., Nebert, D. W., Bruford, E. A., Vasiliou, V., Bunick, C. G. (2022). Update of the keratin gene family: evolution, tissue-specific expression patterns, and relevance to clinical disorders. *Hum Genomics*, 16(1), 1. <https://doi.org/10.1186/s40246-021-00374-9>

- Hoblet, K. H., Weiss, W. (2001). Metabolic hoof horn disease. Claw horn disruption. *Vet Clin North Am Food Anim Pract*, 17(1), 111–vii. [https://doi.org/10.1016/s0749-0720\(15\)30057-8](https://doi.org/10.1016/s0749-0720(15)30057-8)
- Hu, Z. L., Park, C. A., & Reecy, J. M. (2019). Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Res*, 47(D1), D701–D710. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1084>
- Huang, D., Tao, L., & Du, X. (2022). KLF9 positively regulates TRIM33 to inhibit abnormal synovial fibroblast proliferation, migration as well as inflammation in rheumatoid arthritis. *Immun Inflamm Dis*, 10(11), e696. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/iid3.696>
- Huang, D.W., B.T. Sherman, and R.A. Lempicki. 2009. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc*, 4:44–57. doi:10.1038/nprot.2008.211.
- Hughes, K., Wickenden, J. A., Allen, J. E., & Watson, C. J. (2012). Conditional deletion of Stat3 in mammary epithelium impairs the acute phase response and modulates immune cell numbers during post-lactational regression. *J Pathol*, 227(1), 106–117. <https://doi.org/10.1002/path.3961>
- Iorio, V., Troughton, L. D., Hamill, K. J. (2015). Laminins: Roles and Utility in Wound Repair. *Adv Wound Care*, 4(4), 250–263. <https://doi.org/10.1089/wound.2014.0533>
- Jiang, L., Zheng, Z., Qi, T., Kemper, K. E., Wray, N. R., Visscher, P. M., & Yang, J. (2019). A resource-efficient tool for mixed model association analysis of large-scale data. *Nat Genet*, 51(12), 1749–1755. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0530-8>
- Jin, D., Zhang, Y. G., Wu, S., Lu, R., Lin, Z., Zheng, Y., Chen, H., Cs-Szabo, G., & Sun, J. (2017). Vitamin D receptor is a novel transcriptional regulator for Axin1. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 165(Pt B), 430–437. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2016.09.002>
- Johnson, R. C., Nelson, G. W., Troyer, J. L., Lautenberger, J. A., Kessing, B. D., Winkler, C. A., & O'Brien, S. J. (2010). Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). *BMC Genomics*, 11(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-724>

- Kim, J.-J., Farnir, F., Savell, J., & Taylor, J. F. (2003). Detection of quantitative trait loci for growth and beef carcass fatness traits in a cross between *Bos taurus* (Angus) and *Bos indicus* (Brahman) cattle. *J Anim Sci*, 81(8), 1933–1942. <https://doi.org/10.2527/2003.8181933x>
- Kisseleva, T., Bhattacharya, S., Braunstein, J., & Schindler, C. W. (2002). Signaling through the JAK/STAT pathway, recent advances and future challenges. *Gene*, 285(1), 1–24. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00398-0](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00398-0)
- Knappe-Poindecker, M., Gilhuus, M., Jensen, T. K., Klitgaard, K., Larssen, R. B., & Fjeldaas, T. (2013). Interdigital dermatitis, heel horn erosion, and digital dermatitis in 14 Norwegian dairy herds. *J Dairy Sci*, 96(12), 7617–7629. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6717>
- Korwin-Kossakowska, A., Ropka-Molik, K., Ząbek, T., Szmatola, T., Lewczuk, D., Kościuczuk, E., Marczak, S., & Bagnicka, E. (2022). Gene expression adjustment of inflammatory mechanisms in dairy cow mammary gland parenchyma during host defense against staphylococci. *Ann. Anim. Sci*, 22(3), 903–913. <https://doi.org/doi:10.2478/aoas-2022-0001>
- Koul, A., T. Herget, B. Klebl, and A. Ullrich. 2004. Interplay between mycobacteria and host signalling pathways. *Nat Rev Microbiol*, 2:189–202. [doi:10.1038/nrmicro840](https://doi.org/10.1038/nrmicro840).
- Krieg, P., Fürstenberger, G. (2014). The role of lipxygenases in epidermis. *Biochim Biophys Acta*, 1841(3), 390–400. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2013.08.005>
- Krpáľková, L., Cabrera, V. E., Zavadilová, L., & Štípková, M. (2019). The importance of hoof health in dairy production. *Czech J Anim Sci*, 64(3), 107–117. <https://doi.org/10.17221/27/2018-CJAS>
- Kuczewski, A., C. Adams, B. Lashewicz, and F. van der Meer. 2022. Alberta dairy farmers' and veterinarians' opinion about bovine leukemia virus control measures. *Prev Vet Med*, 200:105590. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2022.105590>.
- Kumar, R., M. A. Kataktalware, S. Senani, M. Sivaram, G. Letha Devi, S. Jeyakumar, and K.P. Ramesha. 2019. Risk Factors Associated With the Incidence of Hoof

- Disorders in Crossbred Dairy Cattle under Field Conditions. *Int J Curr Microbiol Appl Sci* 8:2284–2292. doi:10.20546/ijcmas.2019.803.272.
- Kwiecinski, J., Jacobsson, G., Karlsson, M., Zhu, X., Wang, W., Bremell, T., Josefsson, E., & Jin, T. (2013). Staphylokinase promotes the establishment of *Staphylococcus aureus* skin infections while decreasing disease severity. *J Infect Dis*, 208(6), 990–999. <https://doi.org/10.1093/infdis/jit288>
- Lactanet (2022). Increased Data and Accuracy of Hoof Health Evaluations. *October 2022 Open Industry Session* - https://lactanet.ca/wp-content/uploads/2022/10/2_Increased-Data-and-Accuracy-of-Hoof-Health-Evaluation-Gerrit.pdf
- Lai, E., Danner, A. L., Famula, T. R., & Oberbauer, A. M. (2021a). Genome-Wide Association Studies Reveal Susceptibility Loci for Noninfectious Claw Lesions in Holstein Dairy Cattle. *Front Genet*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.657375>
- Lai, E., Danner, A. L., Famula, T. R., & Oberbauer, A. M. (2021b). Pleiotropic Loci Associated With Foot Disorders and Common Periparturient Diseases in Holstein Cattle. *Front Genet*, 12. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.742934>
- Langova, L., Novotna, I., Nemcova, P., Machacek, M., Havlicek, Z., Zemanova, M., & Chrast, V. (2020). Impact of Nutrients on the Hoof Health in Cattle. *Animals (Basel)*, 10(10), 1824. <https://doi.org/10.3390/ani10101824>
- Li, X., Buitenhuis, A. J., Lund, M. S., Li, C., Sun, D., Zhang, Q., Poulsen, N. A., & Su, G. (2015). Joint genome-wide association study for milk fatty acid traits in Chinese and Danish Holstein populations. *J Dairy Sci*, 98(11), 8152–8163. <https://doi.org/10.3168/JDS.2015-9383>
- Li, D., Lei, H., Li, Z., Li, H., Wang, Y., & Lai, Y. (2013). A novel lipopeptide from skin commensal activates TLR2/CD36-p38 MAPK signaling to increase antibacterial defense against bacterial infection. *PloS one*, 8(3), e58288. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058288>
- Li, M., Yuan, T., Li, S., & Sun, Q. (2021). Nomogram analysis of the influencing factors of diabetic foot in patients with diabetes mellitus. *Hormones (Athens, Greece)*, 20(2), 333–338. <https://doi.org/10.1007/s42000-020-00263-1>

- Li, B., Barden, M., Kapsona, V. et al. Single-step genome-wide association analyses of claw horn lesions in Holstein cattle using linear and threshold models. *Genet Sel Evol* 55, 16 (2023). <https://doi.org/10.1186/s12711-023-00784-4>
- Liu, Y., Liu, Y., Deng, J., Li, W., Nie, X. (2021). Fibroblast Growth Factor in Diabetic Foot Ulcer: Progress and Therapeutic Prospects. *Front Endocrinol*, 12, 744868. <https://doi.org/10.3389/fendo.2021.744868>
- Loh, PR., Danecek, P., Palamara, P. et al. Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. *Nat Genet* 48, 1443–1448 (2016). <https://doi.org/10.1038/ng.3679>
- Lund, M. S., Guldbrandtsen, B., Buitenhuis, A. J., Thomsen, B., & Bendixen, C. (2008). Detection of Quantitative Trait Loci in Danish Holstein Cattle Affecting Clinical Mastitis, Somatic Cell Score, Udder Conformation Traits, and Assessment of Associated Effects on Milk Yield. *J Dairy Sci*, 91(10), 4028–4036. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0290>
- Makanjuola, B. O., Miglior, F., Abdalla, E. A., Maltecca, C., Schenkel, F. S., & Baes, C. F. (2020). Effect of genomic selection on rate of inbreeding and coancestry and effective population size of Holstein and Jersey cattle populations. *J Dairy Sci*, 103(6), 5183–5199. <https://doi.org/10.3168/JDS.2019-18013>
- Malchiodi, F., Jamrozik, J., Christen, A. M., Fleming, A., Kistemaker, G. J., Richardson, C., Daniel, V., Kelton, D. F., Schenkel, F. S., and Miglior, F. (2020). Symposium review: Multiple-trait single-step genomic evaluation for hoof health. In *J Dairy Sci* (Vol. 103, Issue 6, pp. 5346–5353). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17755>
- Malchiodi, F., Koeck, A., Mason, S., Christen, A. M., Kelton, D. F., Schenkel, F. S., and Miglior, F. (2017). Genetic parameters for hoof health traits estimated with linear and threshold models using alternative cohorts. *J Dairy Sci*, 100(4), 2828–2836. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11558>
- Mallikarjunappa, S., Sargolzaei, M., Brito, L. F., Meade, K. G., Karrow, N. A., & Pant, S. D. (2018). Short communication: Uncovering quantitative trait loci associated with resistance to *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* infection in Holstein cattle using a high-density single nucleotide polymorphism panel. *J Dairy Sci*, 101(8), 7280–7286. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-14388>

- Markiewski, M. M., DeAngelis, R. A., & Lambris, J. D. (2008). Complexity of complement activation in sepsis. *J Cell Mol Med*, 12(6a), 2245–2254. <https://doi.org/https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2008.00504.x>
- Mascharak, S., Talbott, H. E., Januszyk, M., Griffin, M., Chen, K., Davitt, M. F., Demeter, J., Henn, D., Bonham, C. A., Foster, D. S., Mooney, N., Cheng, R., Jackson, P. K., Wan, D. C., Gurtner, G. C., & Longaker, M. T. (2022). Multi-omic analysis reveals divergent molecular events in scarring and regenerative wound healing. *Cell Stem Cell*, 29(2), 315–327.e6. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2021.12.011>
- Mathew-Steiner, S. S., Roy, S., & Sen, C. K. (2021). Collagen in Wound Healing. *Bioengineering* (Basel, Switzerland), 8(5), 63. <https://doi.org/10.3390/bioengineering8050063>
- McClure, M. C., Morsci, N. S., Schnabel, R. D., Kim, J. W., Yao, P., Rolf, M. M., McKay, S. D., Gregg, S. J., Chapple, R. H., Northcutt, S. L., & Taylor, J. F. (2010). A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Anim Genet*, 41(6), 597–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02063.x>
- McGettigan, C. E., McGee, M., O’Riordan, E. G., Kelly, A. K., & Earley, B. (2022). Effect of concrete slats versus rubber-covered slats on the performance, behaviour, hoof health, cleanliness of finishing beef steers and performance, cleanliness and hoof health of weanling cattle. *Livest Sci*, 266, 105106. <https://doi.org/10.1016/J.LIVSCI.2022.105106>
- Meier, S., Arends, D., Korkuć, P., Neumann, G. B., & Brockmann, G. A. (2020). A genome-wide association study for clinical mastitis in the dual-purpose German Black Pied cattle breed. *J Dairy Sci*, 103(11), 10289–10298. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18209>
- Meskini, Z., Dahou, A., Radja, D. S., Yerou, H., & Homrani, A. (2023). Survey of Herd Management on Conventional Dairy Farms in North Algeria. *Selcuk J. Agri. Food Sci*. <https://doi.org/10.15316/SJAIFS.2023.011>
- Mohammadi, A., Alijani, S., Rafat, S. A., & Abdollahi-Arpanahi, R. (2020). Genome-Wide Association Study and Pathway Analysis for Female Fertility Traits in

- Iranian Holstein Cattle. *Ann. Anim. Sci*, 20(3), 825–851.
<https://doi.org/10.2478/aoas-2020-0031>
- Nath, P. R., & Isakov, N. (2015). Insights into peptidyl-prolyl cis-trans isomerase structure and function in immunocytes. *Immunol Lett*, 163(1), 120–131.
<https://doi.org/10.1016/j.imlet.2014.11.002>
- Neveux, S., D.M. Weary, J. Rushen, M.A.G. von Keyserlingk, and A.M. de Passillé. 2006. Hoof Discomfort Changes How Dairy Cattle Distribute Their Body Weight. *J Dairy Sci*, 89:2503–2509. doi:10.3168/jds.S0022-0302(06)72325-6.
- NRC, 2001. National Research Council Nutrient Requirements of Dairy Cattle (7th rev. ed.), Natl. Acad. Sci., Washington, DC (2001) 65–67.
- Oehm, A. W., Knubben-Schweizer, G., Rieger, A., Stoll, A., & Hartnack, S. (2019). A systematic review and meta-analyses of risk factors associated with lameness in dairy cows. In *BMC Vet Res* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd.
<https://doi.org/10.1186/s12917-019-2095-2>
- Okuno, R., Inoue, Y., Hasebe, Y., Igarashi, T., Kawagishi-Hotta, M., Yamada, T., & Hasegawa, S. (2022). Genome-wide association studies in Japanese women identified genetic loci associated with wrinkles and sagging. *Exp Dermatol*, 31(9), 1411–1420. <https://doi.org/10.1111/exd.14612>
- Oliveira Júnior, G. A., Santos, D. J. A., Cesar, A. S. M., Boison, S. A., Ventura, R. V., Perez, B. C., Garcia, J. F., Ferraz, J. B. S., & Garrick, D. J. (2019). Fine mapping of genomic regions associated with female fertility in Nellore beef cattle based on sequence variants from segregating sires. *J Anim Sci Biotechnol*, 10(1), 97.
<https://doi.org/10.1186/s40104-019-0403-0>
- Oliveira Junior, G. A., Schenkel, F. S., Alcantara, L., Houlahan, K., Lynch, C., & Baes, C. F. (2021). Estimated genetic parameters for all genetically evaluated traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci*, 104(8), 9002–9015.
<https://doi.org/10.3168/jds.2021-20227>
- Passafaro, T.L., J.P.B. Carrera, L.L. dos Santos, F.S.S. Raidan, D.C.C. dos Santos, E.P. Cardoso, R.C. Leite, and F.L.B. Toral. 2015. Genetic analysis of resistance to ticks, gastrointestinal nematodes and *Eimeria* spp. in Nellore cattle. *Vet Parasitol* 210:224–234. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.03.017>.

- Pastar, I., Marjanovic, J., Stone, R. C., Chen, V., Burgess, J. L., Mervis, J. S., & Tomic-Canic, M. (2021). Epigenetic regulation of cellular functions in wound healing. *Exp Dermatol*, 30(8), 1073–1089. <https://doi.org/10.1111/exd.14325>
- Patrucco, A., Visai, L., Fassina, L., Magenes, G., & Tonin, C. (2019). Chapter 12 - Keratin-based matrices from wool fibers and human hair. In V. Grumezescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Mat Biomed Eng* (pp. 375–403). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816872-1.00013-3>
- Pausch, H., Aigner, B., Emmerling, R., Edel, C., Götz, K. U., & Fries, R. (2013). Imputation of high-density genotypes in the Fleckvieh cattle population. *Genet Sel Evol.*, 45(1). <https://doi.org/10.1186/1297-9686-45-3>
- Pérez-Cabal, M. A., & Charfeddine, N. (2016). Short communication: Association of foot and leg conformation and body weight with claw disorders in Spanish Holstein cows. *J Dairy Sci*, 99(11), 9104–9108. <https://doi.org/10.3168/jds.2016-11331>
- Phelan, J., Gomez-Gonzalez, P. J., Andreu, N., Omae, Y., Toyo-Oka, L., Yanai, H., Miyahara, R., Nedsuwan, S., de Sessions, P. F., Campino, S., Sallah, N., Parkhill, J., Smittipat, N., Palittapongarnpim, P., Mushiroda, T., Kubo, M., Tokunaga, K., Mahasirimongkol, S., Hibberd, M. L., & Clark, T. G. (2023). Genome-wide host-pathogen analyses reveal genetic interaction points in tuberculosis disease. *Nat Commun*, 14(1), 549. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36282-w>
- Privé, F., Aschard, H., Ziyatdinov, A., & Blum, M. G. B. (2018). Efficient analysis of large-scale genome-wide data with two R packages: Bigstatsr and bigsnpr. *Bioinformatics*, 34(16), 2781–2787. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty185>
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007) PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet*, 81(3), 559–575. <https://doi.org/10.1086/519795>
- Raman, K., A.G. Bhat, and N. Chandra. 2010. A systems perspective of host–pathogen interactions: predicting disease outcome in tuberculosis. *Mol Biosyst* 6:516–530. doi:10.1039/B912129C.

- Ray, S., Foote, H. P., & Lechler, T. (2013). beta-Catenin protects the epidermis from mechanical stresses. *J Cell Biol*, 202(1), 45–52. <https://doi.org/10.1083/jcb.201212140>
- Reynolds, J.J., R.M. Hembry, and M.C. Meikle. 1994. Connective Tissue Degradation in Health and Periodontal Disease and the Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Natural Inhibitors. *Adv Dent Res*, 8:312–319. doi:10.1177/08959374940080022701.
- Rinaldi, L., Datta, D., Serrat, J., Morey, L., Solanas, G., Avgustinova, A., Blanco, E., Pons, J. I., Matallanas, D., Von Kriegsheim, A., Di Croce, L., & Benitah, S. A. (2016). Dnmt3a and Dnmt3b Associate with Enhancers to Regulate Human Epidermal Stem Cell Homeostasis. *Cell Stem Cell*, 19(4), 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.06.020>
- Rowledge, A., Frescos, N., Miller, C., Perry, E., McGuinness, W. (2016) The diabetic foot ulcer periwound: a comparison of visual assessment and a skin diagnostic device. *Wounds*, 24:3, 160-168.
- Sahana, G., Lund, M. S., Andersson-Eklund, L., Hastings, N., Fernandez, A., Iso-Touru, T., Thomsen, B., Viitala, S., Srensen, P., Williams, J. L., & Vilkki, J. (2008). Fine-mapping QTL for mastitis resistance on BTA9 in three Nordic red cattle breeds. *Anim Genet*, 39(4), 354–362. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2008.01729.x>
- Sakaue, S., Kanai, M., Tanigawa, Y., Karjalainen, J., Kurki, M., Koshihara, S., Narita, A., Konuma, T., Yamamoto, K., Akiyama, M., Ishigaki, K., Suzuki, A., Suzuki, K., Obara, W., Yamaji, K., Takahashi, K., Asai, S., Takahashi, Y., Suzuki, T., Shinozaki, N., ... Okada, Y. (2021). A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes. *Nat Genet*, 53(10), 1415–1424. <https://doi.org/10.1038/s41588-021-00931-x>
- Schöpke, K., S. Weidling, R. Pijl, and H.H. Swalve. 2013. Relationships between bovine hoof disorders, body condition traits, and test-day yields. *J Dairy Sci*, 96:679–689. doi:10.3168/jds.2012-5728.
- Scott, M. A., Woolums, A. R., Swiderski, C. E., Perkins, A. D., Nanduri, B., Smith, D. R., Karisch, B. B., Epperson, W. B., & Blanton, J. R., Jr (2021). Multipopulational transcriptome analysis of post-weaned beef cattle at arrival further validates

- candidate biomarkers for predicting clinical bovine respiratory disease. *Sci Rep*, 11(1), 23877. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-03355-z>
- Seillier, C., Hélie, P., Petit, G., Vivien, D., Clemente, D., Le Mauff, B., Docagne, F., & Toutirais, O. (2022). Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response. *Cell Immunol*, 371, 104451. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451>
- Settles, M., Zanella, R., McKay, S. D., Schnabel, R. D., Taylor, J. F., Whitlock, R., Schukken, Y., Van Kessel, J. S., Smith, J. M., & Neibergs, H. (2009). A whole genome association analysis identifies loci associated with *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis infection status in US holstein cattle. *Anim Genet*, 40(5), 655–662. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2009.01896.x>
- Sharifi, S., Pakdel, A., Ebrahimi, M., Reecy, J. M., FazeliFarsani, S., & Ebrahimie, E. (2018). Integration of machine learning and meta-analysis identifies the transcriptomic bio-signature of mastitis disease in cattle. *PloS one*, 13(2), e0191227. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191227>
- Shen, W., Zhang, Z., Ma, J. et al. The Ubiquitin Proteasome System and Skin Fibrosis. *Mol Diagn Ther*, 25, 29–40 (2021). <https://doi.org/10.1007/s40291-020-00509-z>
- Shephard, P., Martin, G., Smola-Hess, S., Brunner, G., Krieg, T., & Smola, H. (2004). Myofibroblast differentiation is induced in keratinocyte-fibroblast co-cultures and is antagonistically regulated by endogenous transforming growth factor-beta and interleukin-1. *Am J Pathol*, 164(6), 2055–2066. [https://doi.org/10.1016/s0002-9440\(10\)63764-9](https://doi.org/10.1016/s0002-9440(10)63764-9)
- Silva, T.L., Gondro, C., Fonseca, P.A.S., da-Silva, D.A., Vargas, G., Neves, H.H.R., Carvalho-Filho, I., Teixeira, C.S., Albuquerque, L.G., Carvalheiro, R. (2022). Genetic mechanisms underlying feet and legs malformation in Nellore cattle: prioritization of GWAS results. Proceedings of 12th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production (WCGALP) 1598-1601. DOI: 10.3920/978-90-8686-940-4_383
- Sodeland, M., Kent, M. P., Olsen, H. G., Opsal, M. A., Svendsen, M., Sehested, E., Hayes, B. J., & Lien, S. (2011). Quantitative trait loci for clinical mastitis on chromosomes 2, 6, 14 and 20 in Norwegian Red cattle. *Anim Genet*, 42(5), 457–465. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02165.x>

- Sölzer, N., May, K., Yin, T., & König, S. (2022). Genomic analyses of claw disorders in Holstein cows: Genetic parameters, trait associations, and genome-wide associations considering interactions of SNP and heat stress. *J Dairy Sci.* <https://doi.org/10.3168/jds.2022-22087>
- Souza, R.C., P.M. Ferreira, L.R. Molina, A.U. Carvalho, and E.J. Facury Filho. 2006. Economic losses caused by sequels of lameness in free-stall-housed dairy cows. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* 58. doi:10.1590/S0102-09352006000600002.
- Stahl, M., Uemura, K., Ge, C., Shi, S., Tashima, Y., & Stanley, P. (2008). Roles of Pofut1 and O-fucose in mammalian Notch signaling. *J Biol Chem* 283(20), 13638–13651. <https://doi.org/10.1074/jbc.M802027200>
- Stambuk, C. R., Staiger, E. A., Heins, B. J., & Huson, H. J. (2020). Exploring physiological and genetic variation of digital cushion thickness in Holstein and Jersey cows and bulls. *J Dairy Sci* ,103(10), 9177–9194. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-18290>
- Sukhov, A., Adamopoulos, I.E.&Maverakis, E. Interactions of the Immune System with Skin and Bone Tissue in Psoriatic Arthritis: A Comprehensive Review. *Clinic Rev Allerg Immunol* 51, 87–99 (2016). <https://doi.org/10.1007/s12016-016-8529-8>
- Sun, D., C. Li, C. Gu, J. Chen, Y. Qu, X. Wang, J. Gao, S. Wei, J. Wang, R. Wu, and D. Guo. 2015. Analysis of Mineral Elements, Metabolism, and Inflammation Indexes in the Plasma of Dairy Cows Suffering from Different Degrees of Lameness. *Biol Trace Elem Res*, 168:372–379. doi:10.1007/s12011-015-0380-x.
- Takeshima, S.N., Aida, Y. (2006). Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. *Anim Sci J*, 77:2, 138-150
- Thakkar, R. S., Nayee, N. G., & Vataliya, P. H. (2021). Evaluation of INDUSCHIP-1 and selected low-density SNP panel for imputation to higher density in Gir dairy cattle of Gujarat. *Indian J Anim Sci*, 92(6), 751–756. <https://doi.org/10.56093/ijans.v92i6.108935>
- Theprungsirikul, J., Skopelja-Gardner, S., & Rigby, W. F. C. (2021). Killing three birds with one BPI: Bactericidal, opsonic, and anti-inflammatory functions. *J Transl Autoimmun*, 4, 100105. <https://doi.org/10.1016/j.jtauto.2021.100105>
- Tomlinson, D. J., Mülling, C. H., & Fakler, T. M. (2004). Invited Review: Formation of Keratins in the Bovine Claw: Roles of Hormones, Minerals, and Vitamins in

- Functional Claw Integrity. *J Dairy Sci*, 87(4), 797–809. [https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302\(04\)73223-3](https://doi.org/10.3168/JDS.S0022-0302(04)73223-3)
- Tribout, T., Croiseau, P., Lefebvre, R., Barbat, A., Boussaha, M., Fritz, S., Boichard, D., Hoze, C., & Sanchez, M. P. (2020). Confirmed effects of candidate variants for milk production, udder health, and udder morphology in dairy cattle. *Genet Sel Evol* 52(1). <https://doi.org/10.1186/s12711-020-00575-1>
- Umesh, A., Guttula, P. K., & Gupta, M. K. (2022). Prediction of potential molecular markers of bovine mastitis by meta-analysis of differentially expressed genes using combined p value and robust rank aggregation. *Trop Anim Health Prod*, 54(5), 269. <https://doi.org/10.1007/s11250-022-03258-9>
- Usman, T., Wang, Y., Liu, C., He, Y., Wang, X., Dong, Y., Wu, H., Liu, A., & Yu, Y. (2017). Novel SNPs in IL-17F and IL-17A genes associated with somatic cell count in Chinese Holstein and Inner-Mongolia Sanhe cattle. *J Anim Sci Biotechnol*, 8, 5. <https://doi.org/10.1186/s40104-016-0137-1>
- Usman, T., Yu, Y., Liu, C., Wang, X., Zhang, Q., & Wang, Y. (2014). Genetic effects of single nucleotide polymorphisms in JAK2 and STAT5A genes on susceptibility of Chinese Holsteins to mastitis. *Mol Biol Rep*, 41(12), 8293–8301. <https://doi.org/10.1007/s11033-014-3730-4>
- VanRaden, P. M. (2008). Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci*, 91(11), 4414–4423. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0980>
- VanRaden, P.M., C.P. Van Tassell, G.R. Wiggans, T.S. Sonstegard, R.D. Schnabel, J.F. Taylor, and F.S. Schenkel. 2009. Invited Review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J Dairy Sci* 92:16–24. doi:10.3168/jds.2008-1514.
- VanRaden PM, Tooker ME, O'Connell JR, Cole JB, Bickhart DM. Selecting sequence variants to improve genomic predictions for dairy cattle. *Genet Sel Evol*. 2017 Mar 7;49(1):32. doi: 10.1186/s12711-017-0307-4.
- Vermeersch, A. S., Geldhof, P., Ducatelle, R., Gansemans, Y., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D., & Opsomer, G. (2022). Continuous activation of the IL-17F driven inflammatory pathway in acute and chronic digital dermatitis lesions in dairy cattle. *Sci Rep*, 12(1), 14070. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-17111-4>

- Wagner, P., Yin, T., Brügemann, K., Engel, P., Weimann, C., Schlez, K., & König, S. (2021). Genome-Wide Associations for Microscopic Differential Somatic Cell Count and Specific Mastitis Pathogens in Holstein Cows in Compost-Bedded Pack and Cubicle Farming Systems. *Animals (Basel)*, 11(6), 1839. <https://doi.org/10.3390/ani11061839>
- Waldvogel, A.S., B.M. Hediger-Weithaler, R. Eicher, A. Zakher, D.S. Zarlenga, L.C. Gasbarre, and V.T. Heussler. 2000. Interferon- γ and Interleukin-4 mRNA expression by peripheral blood mononuclear cells from pregnant and non-pregnant cattle seropositive for bovine viral diarrhea virus. *Vet Immunol Immunopathol*, 77:201–212. [https://doi.org/10.1016/S0165-2427\(00\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0165-2427(00)00240-3).
- Wang, Z., Shen, B., Jiang, J., Li, J., & Ma, L. (2016). Effect of sex, age and genetics on crossover interference in cattle. *Sci Rep*, 6. <https://doi.org/10.1038/srep37698>
- Waters, W. R., Maggioli, M. F., Palmer, M. V., Thacker, T. C., McGill, J. L., Vordermeier, H. M., Berney-Meyer, L., Jacobs, W. R., Jr, & Larsen, M. H. (2015). Interleukin-17A as a Biomarker for Bovine Tuberculosis. *Clin Vaccine Immunol*, 23(2), 168–180. <https://doi.org/10.1128/CVI.00637-15>
- Wiesner, T., Obenauf, A. C., Cota, C., Fried, I., Speicher, M. R., & Cerroni, L. (2010). Alterations of the Cell-Cycle Inhibitors p27KIP1 and p16INK4a Are Frequent in Blastic Plasmacytoid Dendritic Cell Neoplasms. *J Invest Dermatol*, 130(4), 1152–1157. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/jid.2009.369>
- Yang, J., Lee, S. H., Goddard, M. E., & Visscher, P. M. (2011). GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet*, 88(1), 76–82. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2010.11.011>
- Yang, J., Zaitlen, N. A., Goddard, M. E., Visscher, P. M., & Price, A. L. (2014). Advantages and pitfalls in the application of mixed-model association methods. In *Nat Genet* (Vol. 46, Issue 2, pp. 100–106). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ng.2876>
- Yang, L., Jin, L., Ke, Y., Fan, X., Zhang, T., Zhang, C., Bian, H., & Wang, G. (2018). E3 Ligase Trim21 Ubiquitylates and Stabilizes Keratin 17 to Induce STAT3 Activation in Psoriasis. *J Invest Dermatol*, 138(12), 2568–2577. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2018.05.016>

- Zhang, Z., Shen, W., Liu, W., &Lyu, L. (2022). Role of miRNAs in melanin metabolism: Implications in melanin-related diseases. *J Cosmet Dermatol*, 21(10), 4146–4159. <https://doi.org/10.1111/jocd.14762>
- Zhi, X., Chen, C. WWP1: a versatile ubiquitin E3 ligase in signaling and diseases. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 1425–1434 (2012). <https://doi.org/10.1007/s00018-011-0871-7>

CAPÍTULO 2

Associação genômica ampla e análises genômicas funcionais para
características de conformação corporal em bovinos da raça Holandesa da
América do Norte

Resumo

As medidas de conformação corporal impactam diretamente na longevidade, fertilidade, saúde e funcionalidade de vacas leiteiras. Os principais objetivos deste estudo foram realizar estudos de associação genômica ampla, usando painéis de alta densidade imputados, para treze características de conformação corporal: escore de condição corporal (ECC), profundidade corporal (PC), qualidade óssea (QO), largura de peito (LP), capacidade leiteira (CL), ângulo do pé (ANG), visão das pernas dianteiras (VPD), profundidade do talão (PT), altura frontal (AF), locomoção (LOC), visão traseira das pernas traseiras (VTPT), visão lateral das pernas traseiras (VLPT) e estatura (ST) e um índice composto de pontuação de pés e pernas (IPP). Valores genéticos estimados de-regredidos (dEBVs) de 39.135 animais da raça Holandesa foram usados como pseudofenótipos para as análises de associação. O controle de qualidade de genótipos, faseamento de genótipos e imputação de genótipos foram realizados usando os softwares PLINK, Eagle e Minimac4, respectivamente. Um modelo linear misto foi usado para estimar os efeitos SNP no pacote GCTA. As análises genômicas funcionais foram realizadas utilizando o pacote GALLO R e a plataforma DAVID. Um total de 20 SNPs significativos foram encontrados para ECC, 60 para PC, 13 para QO, 17 para LP, 27 para CL, 13 para IPP, 8 para ANG, 7 para VPD, 19 para PT, 4 para AF, 10 para LOC, 13 para VTPT, 15 para VLPT e 7 para ST. Os marcadores significativos foram localizados em todo o genoma, exceto nos cromossomos BTA24, BTA27 e BTA29. Além disso, essas regiões genômicas se sobrepõem a vários loci de características quantitativas (QTL) previamente relatados para características de exterior, de saúde, carne e carcaça, leite, produção e reprodução. As análises de enriquecimento identificaram 27 termos de ontologia genética significativos. Essas regiões genômicas enriquecidas abrigam vários potenciais genes candidatos previamente associados ao desenvolvimento ósseo, metabolismo e doenças infecciosas e imunológicas.

Palavras-chave: Gado leiteiro, medidas, conformação, índice

Abstract

Body conformation measures directly impact longevity, fertility, health, and workability in dairy cows. The main objectives of this study were to perform genome-wide association studies, using imputed high-density genetic markers data, for thirteen body conformation traits: body condition score (ECC), body depth (PC), bone quality (QO), chest width (LP), dairy capacity (CL), foot angle (ANG), Front Legs View (VPD), heel depth (PT), Height at front end (AF), locomotion (LOC), rear legs rear view (VTPT), rear legs side view (VLPT) and stature (ES) and a composite feet and leg score (IPP) index. De-regressed estimated breeding values (dEBVs) from 39,135 Holstein animals were used as pseudo-phenotypes for the association analyses. The molecular marker quality control, genotype phasing, and genotype imputation were performed using the PLINK, Eagle, and Minimac4 software, respectively. A mixed linear model was used to estimate SNP effects in the GCTA package. The functional genomic analyses were performed using the GALLO R package and the DAVID platform. A total of 20 significant SNPs were found for ECC, 60 for PC, 13 for QO, 17 for LP, 27 for CL, 13 for IPP, 8 for ANG, 7 for VPD, 19 for PT, 4 for AF, 10 for LOC, 13 for VTPT, 15 for VLPT, and 7 for ES. The significant markers were located across the whole genome, except on the chromosomes BTA24, BTA27, and BTA29. Moreover, these genomic regions overlapped with various previously reported quantitative trait loci (QTL) for exterior, health, meat and carcass, milk, production, and reproduction traits. The enrichment analyses identified 27 significant gene ontology terms. These enriched genomic regions harbor various candidate genes previously associated with bone development, metabolism, and infectious and immunological diseases.

Keywords: Dairy cattle, measurements, conformation, index

Introdução

As medidas de conformação corporal são características economicamente importantes e estão associadas à longevidade, fertilidade, saúde e funcionalidade de bovinos leiteiros (MIGLIOR et al., 2017). O sistema de classificação canadense compreende 30 características lineares de tipos e características defeituosas que são combinadas para calcular pontuações em diferentes seções, como: Sistema Mamário, Pés e Pernas, Força Leiteira, Garupa, Pé e Mobilidade. Além disso, uma pontuação geral de conformação é calculada com base na importância de cada seção (HOLSTEIN CANADA, 2017; ALCANTARA et al., 2022). As características de conformação corporal em gado Holandês são tem um componente genético, com estimativas de herdabilidade variando de 0,05 a 0,46 (LACTANET, 2021).

As tecnologias genômicas podem otimizar as estratégias de melhoramento para ampliar o progresso genético no gado leiteiro (FLEMING et al., 2018), e muitos estudos de associação genômica ampla (**GWAS**) foram relatados para conformação corporal em gado Holandês. Usando ~4800 touros Holandês, Abo-Ismael et al. (2017) identificaram 607 SNPs associados a 14 características de conformação corporal, incluindo angulosidade (**ANG**), profundidade corporal (**PC**), qualidade óssea (**QO**), largura do peito (**LP**) e estatura (**ES**). Os genes *SLC4A4*, *ENSBTAG00000037537*, *CTU1*, *ARRDC3*, *ENSBTAG00000037537* e *CCND2* foram localizados próximos aos SNPs mais significativos para essas características. Schmidtman et al. (2023) identificaram em gado Holandês Alemão, seis SNPs (ARS-BFGL-NGS-82008, ARS-BFGL-NGS-48254, ARS-BFGL-NGS-118182, BTB-00133212, ARS-BFGL-NGS-17376 e BTA-68275 -nor-rs) simultaneamente significantes para LP e escore de condição corporal (**ECC**). No entanto, Schmidtman et al. (2023) não realizaram análises funcionais das regiões genômicas encontradas. Čitek et al. (2022) analisaram 25 características, incluindo ANG, ECC, PC, QO, ângulo do casco (**ANG**), LP, locomoção (**LOC**), visão traseira das pernas traseiras (**VTPT**), visão lateral das pernas traseiras (**VLPT**), ES e escore composto de pés e pernas (**IPP**) e encontrou dois genes candidatos (*CAMK2D*, *RANBP17*) para PC e ANG, em animais da raça Holandesa. Na raça Holandesa Chinesa foram encontrados 105 genes dentro de 200 kb up/downstream dos SNPs significativos para profundidade do talão (**PT**), QO, VTPT e VLPT (ABDALLA et al., 2021). Além disso, outro estudo com a raça Holandesa Chinesa relatou 59 SNPs genômicos significativos associados a 26 das 29

características de conformação analisadas, e encontrou o gene *SCEL* associado à altura frontal (**AF**) (WU et al., 2013).

Em muitos estudos anteriores de associação genômica ampla (GWAS) para características de conformação em gado Holandês, painéis SNP de densidade média (**MD**) foram usados. Abo-Ismael et al. (2017) foi o único estudo a relatar a análise de associação usando um painel SNP de alta densidade (**HD**). A imputação de genótipo de MD para HD pode melhorar as análises GWAS e fornecer evidências mais fortes para uma relação causal entre fenótipo e SNP (ABO-ISMAIL et al., 2017; VANRADEN et al., 2017). Além disso, algumas características de conformação, como visão frontal das pernas (**VPD**), não foram analisadas em análises GWAS anteriores na raça Holandesa, apesar de sua importância para a seleção de conformação. Assim, este estudo teve como objetivo principal entender a funcionalidade de 14 características de conformação corporal divididas em 4 grupos: índice composto de pontuação para Pés e Pernas (IPP), casco (ANG e PT), força leiteira (CL, ECC, PC, LP, AF e ES) escore de mobilidade (QO, LOC, VPD, VTPT e VLPT) em gado Holandês canadense usando painel HD imputado.

Material e Métodos

Declaração de ética

Informações fenotípicas, de pedigree e genômicas foram fornecidas pela Lactanet (www.lactanet.ca; Guelph, ON). Portanto, nenhum experimento com animais foi realizado e a aprovação do comitê de ética de uso animal não foi necessária.

Animais e fenótipos

O banco de dados usado neste estudo foi fornecido pela Lactanet (Guelph, ON, Canadá). Entre 33.614 e 38.927 bovinos da raça Holandesa norte-americana com valores genéticos estimados (**EBVs**) para ECC, PC, QO, LP, CL, IPP, ANG, VPD, HD, AF, LOC, VTPT, VLPT e ES foram incluídos no estudo (Tabela 1). Os EBVs foram de-regredidos (dEBVs) de acordo com VanRaden et al. (2009) e apenas dEBVs com confiabilidade superior a 0,30 foram mantidos para análises posteriores. Treze características (ECC, PC, QO, LP, CL, ANG, VPD, HD, AF, LOC, VTPT, VLPT e ES) foram medidas

individualmente usando escores de 1 a 9 , enquanto o índice composto de pontuação para Pés e Pernas foi calculado como segue: $IPP = 0.09(ANG) + 0.22(PT) + 0.10(QO) + 0.14(VTPT) + 0.31(VLPT) + 0.14(\text{Inserção de Ancas})$. Detalhes adicionais sobre as definições de cada característica são fornecidos no site da Canadian Dairy Network (<https://www.cdn.ca/articles.php>).

Tabela 1. Estatísticas descritivas dos pseudo-fenótipos usados para as análises de associação genômica ampla de características de saúde do casco no gado Holandês canadense.

Características	Tamanho da amostra	dEBV				Confiabilidade	
		Média	Mínimo	Máximo	DP	Média	DP
Escore de condição corporal (ECC)	38.927	99,69	80,42	113,44	3,73	0,52	0,12
Profundidade corporal (PC)	38.744	0,84	-15,09	17,07	4,97	0,55	0,1
Qualidade óssea (QO)	37.996	2,12	-18,38	33,66	4,36	0,55	0,13
Largura do peito (LP)	37.844	1,28	-12,53	15,31	4,28	0,55	0,16
Capacidade leiteira (CL)	38.782	0,16	-18,72	20,09	5,8	0,48	0,08
Índice composto de pontuação para Pés e Pernas (IPP)	37.771	1,82	-13,82	17,64	5,78	0,57	0,19
Ângulo do pé (ANG)	36.136	20,41	-121,01	202,26	39,7	0,53	0,19
Visão da perna dianteira (VPD)	36.018	29,57	-126,81	241,57	48,02	0,47	0,17
Profundidade do talão (PT)	35.469	1,10	-20,35	27,87	4,48	0,47	0,16
Altura frontal (AF)	35.2	2,42	-15,23	18,09	4,65	0,47	0,03
Locomoção (LOC)	35.056	3,22	-5,08	11,14	3.098	0,38	0,15
Vista traseira da perna traseira (VTPT)	33.614	20,24	-136,6	234,53	40,22	0,53	0,2
Vista lateral da perna traseira (VLPT)	35.191	29,02	-126,12	237,32	47,62	0,56	0,14
Estatura (ES)	35.15	31,53	-144,46	247,63	54,12	0,65	0,07

DP: Desvio Padrão

Fonte: Elaboração Própria.

Imputação Genotípica e Controle de Qualidade

A imputação de genótipos foi realizada a partir de um painel MD contendo 44.315 SNPs para um painel HD contendo 311.725 SNPs. Um total de 39.135 animais (24.721 fêmeas e 14.414 machos) tinham dados de MD, enquanto a população de referência HD continha 2.507 animais (562 fêmeas e 1.945 machos) da raça Holandesa norte-americana. Antes da imputação do genótipo, foram excluídos os SNPs do painel MD que não estavam presentes no painel HD. Além disso, um controle de qualidade (QC) foi realizado usando o software PLINK 1.9 (Purcell et al., 2007) para excluir SNPs: 1) com *call rate* < 0,95; 2) com desvio extremo do equilíbrio de Hardy-Weinberg, como indicação de erros de genotipagem ($p < 10^{-8}$); 3) localizados em cromossomos não autossômicos; e 4) com posição desconhecida baseada na montagem ARS-UCD1.2. Após o QC, 40.442 e 294.671 SNPs permaneceram nos painéis MD e HD, respectivamente. O faseamento do genótipo foi realizado no software Eagle 2.4.1 (LOH et al., 2016), enquanto a imputação dos genótipos foi feita pelo software Minimac4 (DAS et al., 2016). Após a imputação, um QC adicional foi realizado para excluir indivíduos ou genótipos com *call rate* < 0,90, SNPs com alelos de menor frequência (MAF) < 0,01, bem como SNPs com afastamento extremo do equilíbrio de Hardy-Weinberg ($p < 10^{-8}$). Finalmente, o número de SNPs que restaram para as análises GWAS foi de 285.326 para ANG; 285.667 para ECC; 286.602 para PC; 284.436 para QO; 286.411 para LP; 286.135 para IPP; 284.745 para ANG; 285.402 para VPD; 284.289 para HD; 286.055 para AF; 286.473 para LOC; 284.611 para VTPT; 287.048 para VLPT e 286.933 para ES.

Análises de associação genômica ampla

Um modelo linear misto foi usado para estimar os efeitos SNP no pacote GCTA (YANG et al., 2011). O modelo univariado pode ser descrito da seguinte forma: $\mathbf{y} = \boldsymbol{\mu} + \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{e}$, onde \mathbf{y} é o vetor de dEBVs para cada característica; $\boldsymbol{\mu}$ é a média geral; $\boldsymbol{\beta}$ é o efeito fixo do SNP sendo testado para associação com cada característica, \mathbf{a} é um vetor de efeitos poligênicos aleatórios [$\mathbf{a} \sim N(0, \mathbf{G}\sigma_a^2)$], onde \mathbf{G} é a matriz de relacionamento genômico (GRM; VANRADEN, 2008) e σ_a^2 é a variância genética aditiva; \mathbf{X} e \mathbf{Z} são matrizes de incidência dos efeitos em $\boldsymbol{\beta}$ e \mathbf{a} , respectivamente; e \mathbf{e} é um vetor de resíduos [$\mathbf{e} \sim N(0, \mathbf{I}\sigma_e^2)$], onde \mathbf{I} é uma matriz identidade e σ_e^2 é a variância residual.

Na análise de associação, os SNPs do cromossomo no qual o SNP candidato está localizado foram excluídos do cálculo do GRM (MLM-LOCO), método que é mais poderoso em comparação à análise MLM com os SNPs que estão no mesmo cromossomo do SNP candidato (YANG et al., 2014). Portanto, um total de 29 GRMs foram construídas por amostragem aleatória de 50.000 SNPs (após QC) para evitar supercorreção da estrutura da população. Após as análises GWAS, todos os SNPs foram classificados com base em seus p-valores e agrupados (*clumping*) de acordo com seu padrão de desequilíbrio de ligação (**LD**) ($r^2 > 0,9$), que foi sugerido como um método preferível em comparação com a estratégia tradicional de agrupamento (*pruning*) LD (PRIVÉ et al., 2018). O fator de inflação genômica (λ) foi calculado como $\lambda = \text{mediana}(\chi^2)/0,456$ (BACANU et al., 2000) para o qual o intervalo de confiança de 95% do valor λ foi derivado posteriormente.

Correção de testes múltiplos

Como muitos marcadores foram testados, a correção de Bonferroni tradicional seria altamente conservadora, pois nem todos os testes são independentes devido ao LD entre os marcadores (JOHNSON et al., 2010). Assim, para evitar resultados falso-negativos excessivos, aplicamos uma correção de Bonferroni modificada usando o número de segmentos cromossômicos independentes (**Me**) no nível do genoma (LI et al., 2015) em vez do número total de marcadores testados. O Me é calculado em função do tamanho efetivo da população (**Ne**) e do comprimento do genoma (**L**) em Morgans, como segue: $Me = (2 \times Ne \times L) / \log(Ne \times L)$ (GODDARD et al., 2011). Um cM foi considerado equivalente a um Mbp (WANG et al., 2016) e o Ne utilizado foi 66, por ser o valor mais conservador relatado para a mesma população de gado Holandês (MAKANJUOLA et al., 2020). Um efeito de SNP foi estatisticamente significativo quando seu $-\log_{10}$ (P-valor) foi superior ao limiar genômico, que foi calculado dividindo 0,05 por Me. O valor de Me e o correspondente limiar de significância utilizados foram 2.044,73 e 4,61, respectivamente.

Análises genômicas funcionais

A localização dos SNPs foram obtidas usando o genoma referência ARS-UCD1.2, disponível no GenBank (GCA_002263795.2). O pacote GALLO R (FONSECA et al.,

2020) foi usado para detectar genes posicionais e locos de características quantitativas (**QTL**) localizados em um raio de 100 Kb dos SNPs significativos. O banco de dados de QTL utilizado foi o Animal QTLdb Release 49 (HU et al., 2019). Posteriormente, foram realizadas análises de enriquecimento funcional para o grupo de genes encontrados, para cada característica, utilizando a plataforma DAVID (HUANG et al., 2009). Na análise de enriquecimento funcional, uma razão de falsas descobertas (**FDR**) de 0,05 foi usada como correção de teste múltiplo.

Resultados e Discussão

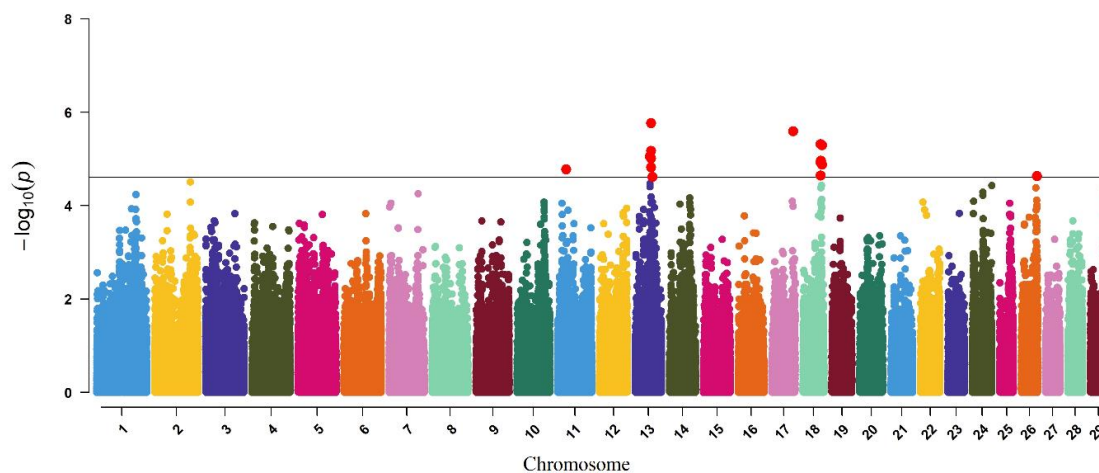
Análises de associação

Após QC (realizado antes das análises GWAS) e agrupamento baseado em LD, o número de SNPs informativos (e animais) foi de 241.290 (23.269) para ANG; 241.552 (22.966) para ECC; 242.222 (22.471) para PC; 240.263 (23.512) para QO; 242.163 (22.706) para LP; 242.419 (22.284) para IPP; 240.781 (20.014) para ANG; 239.533 (20.890) para VPD; 240.140 (23.266) para HD; 242.264 (15.269) para AF; 241.443 (24.893) para LOC; 240.305 (20.168) para VTPT; 242.747 (20.762) para VLPT e 242.512 (20.387) para ES. O limiar genômico de significância foi de $2,45 \times 10^{-5}$. As Figuras 1 a 6 apresentam os gráficos de Manhattan para todas as características. Os valores de λ variaram de 1,01 a 1,05 e os gráficos Q-Q para todas as características são mostrados no Apêndice III.

A lista de SNPs significativos e potenciais genes candidatos encontrados para cada característica são apresentados nas Tabelas 2, 4, 6 a 10. Informações detalhadas sobre o GWAS, incluindo p-valores, efeitos SNP, MAF, QTL e potenciais genes candidatos encontrados em um intervalo de 100 Kb upstream e downstream dos SNPs significativos são fornecidos no Apêndice IV. Um total de 20 SNPs significativos ($p < 2,45 \times 10^{-5}$) foram encontrados para ECC, 60 para PC, 13 para QO, 17 para LP, 27 para CL, 13 para IPP, 8 para ANG, 7 para VPD, 19 para PT, 4 para AF, 10 para LOC, 13 para VTPT, 15 para VLPT e 7 para ST. Não houve SNP significativo em BTA24, BTA27 e BTA29 para nenhuma das características de conformação corporal, enquanto o BTA20 teve o maior número de SNPs significativos (64). BTA9 e BTA11 tiveram o maior número (6) de

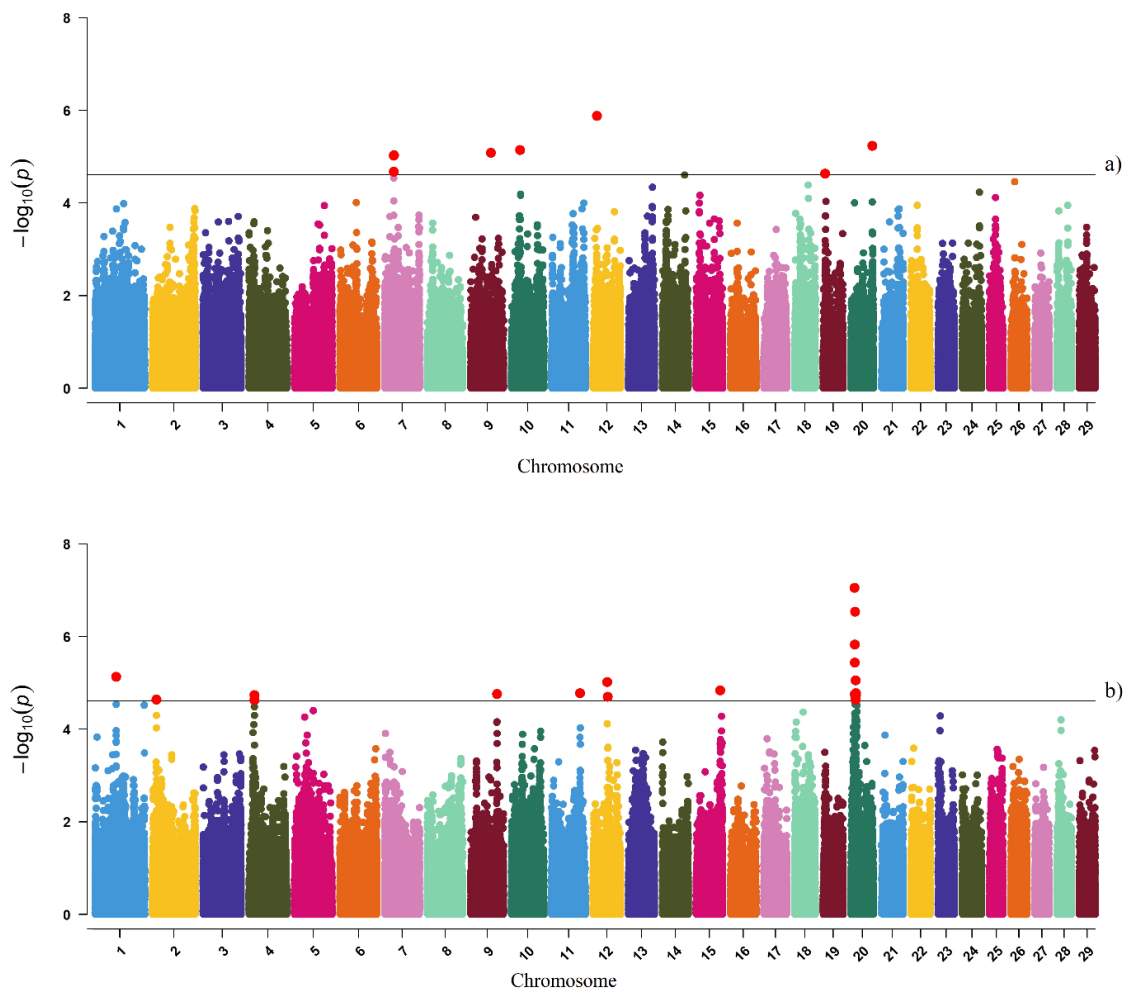
características com SNPs significativos. O SNP rs137570291 (BTA11) foi o único associado à mais de uma característica (PC e LOC).

Figura 1. Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para o índice composto de pontuação para Pés e Pernas usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



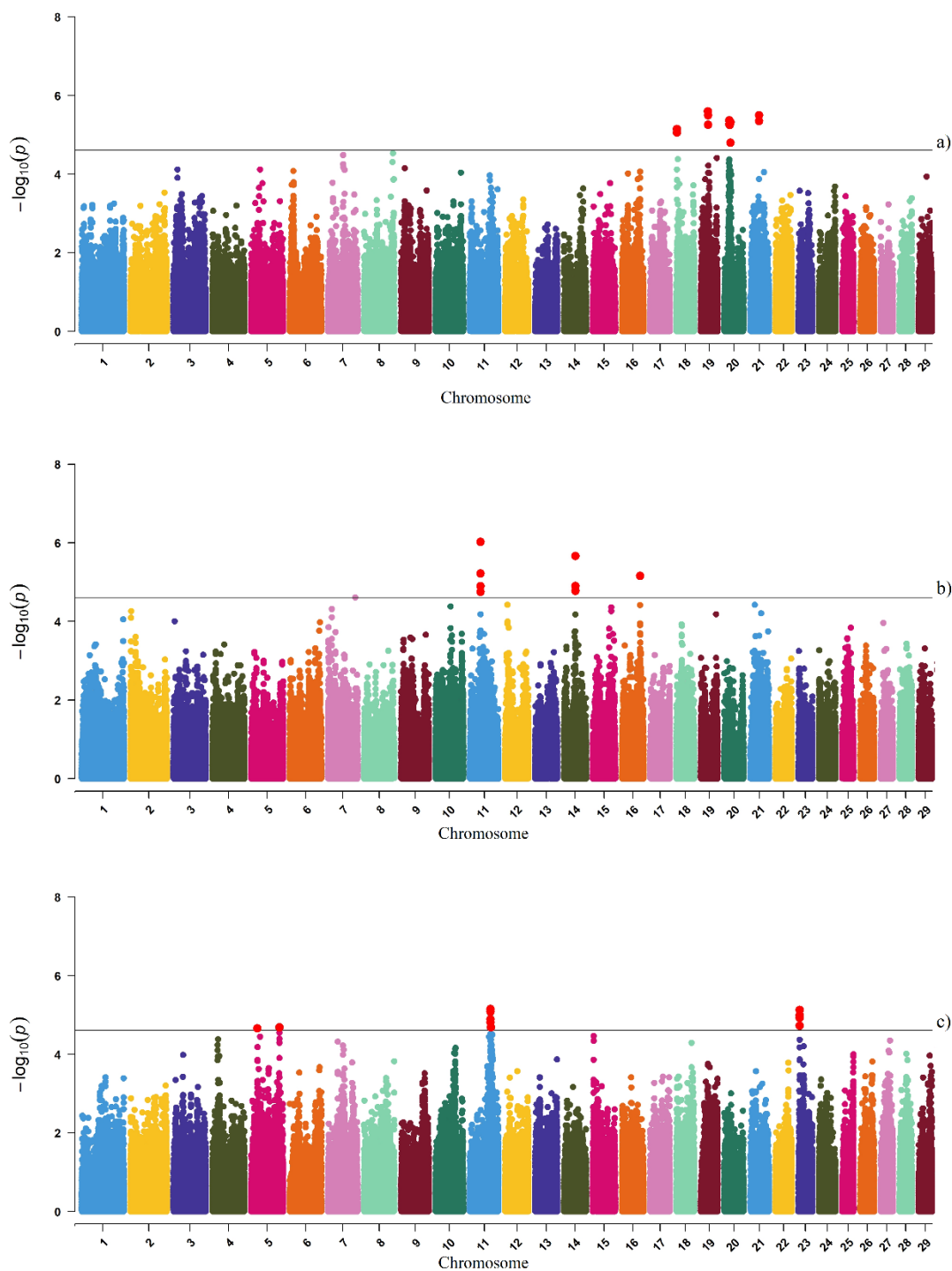
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 2 Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para ângulo do pé (a) e profundidade do talão (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



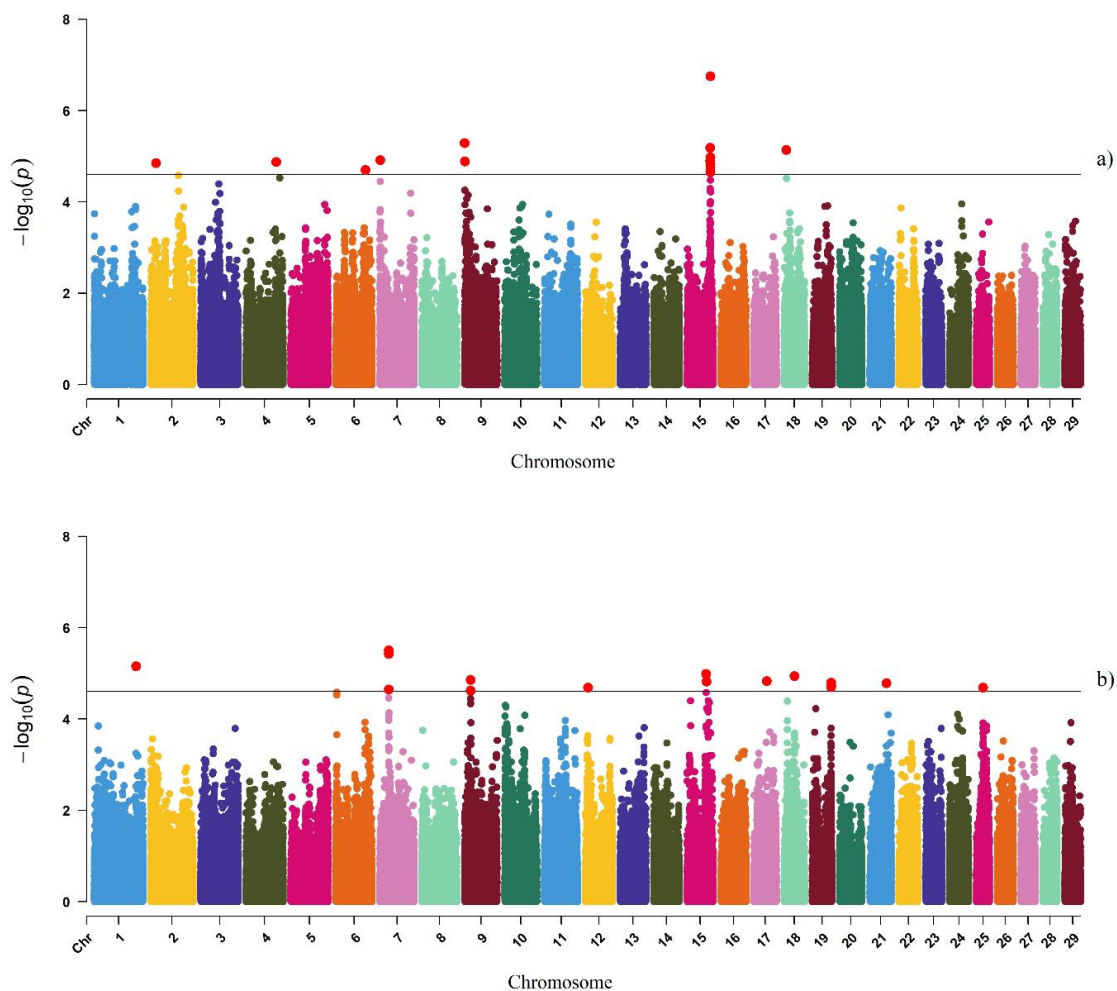
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 3 Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para qualidade óssea (a), visão da perna dianteira (b) e locomoção (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



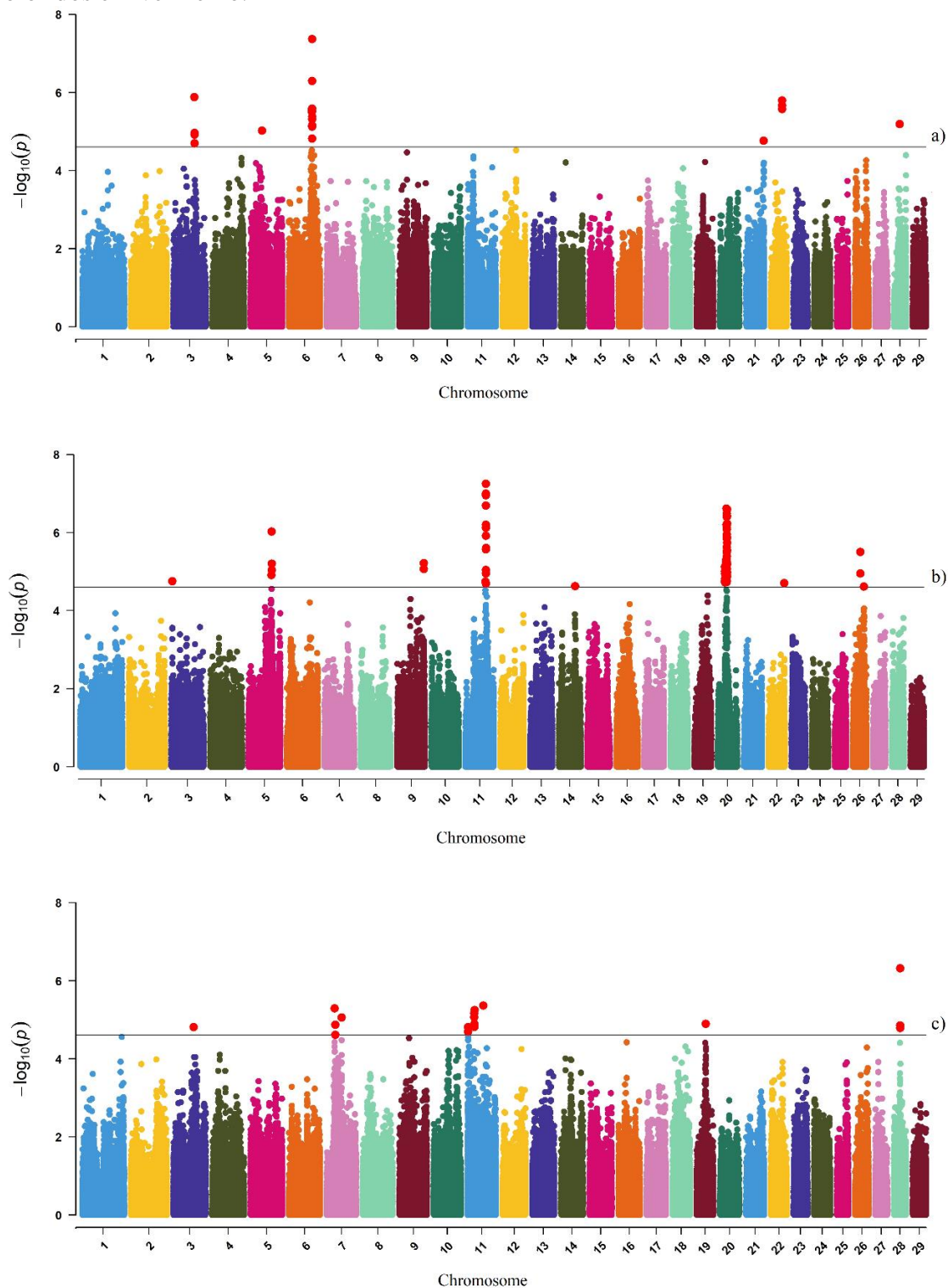
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 4 Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para vista traseira da perna traseira (a) e vista lateral da perna traseira (b) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



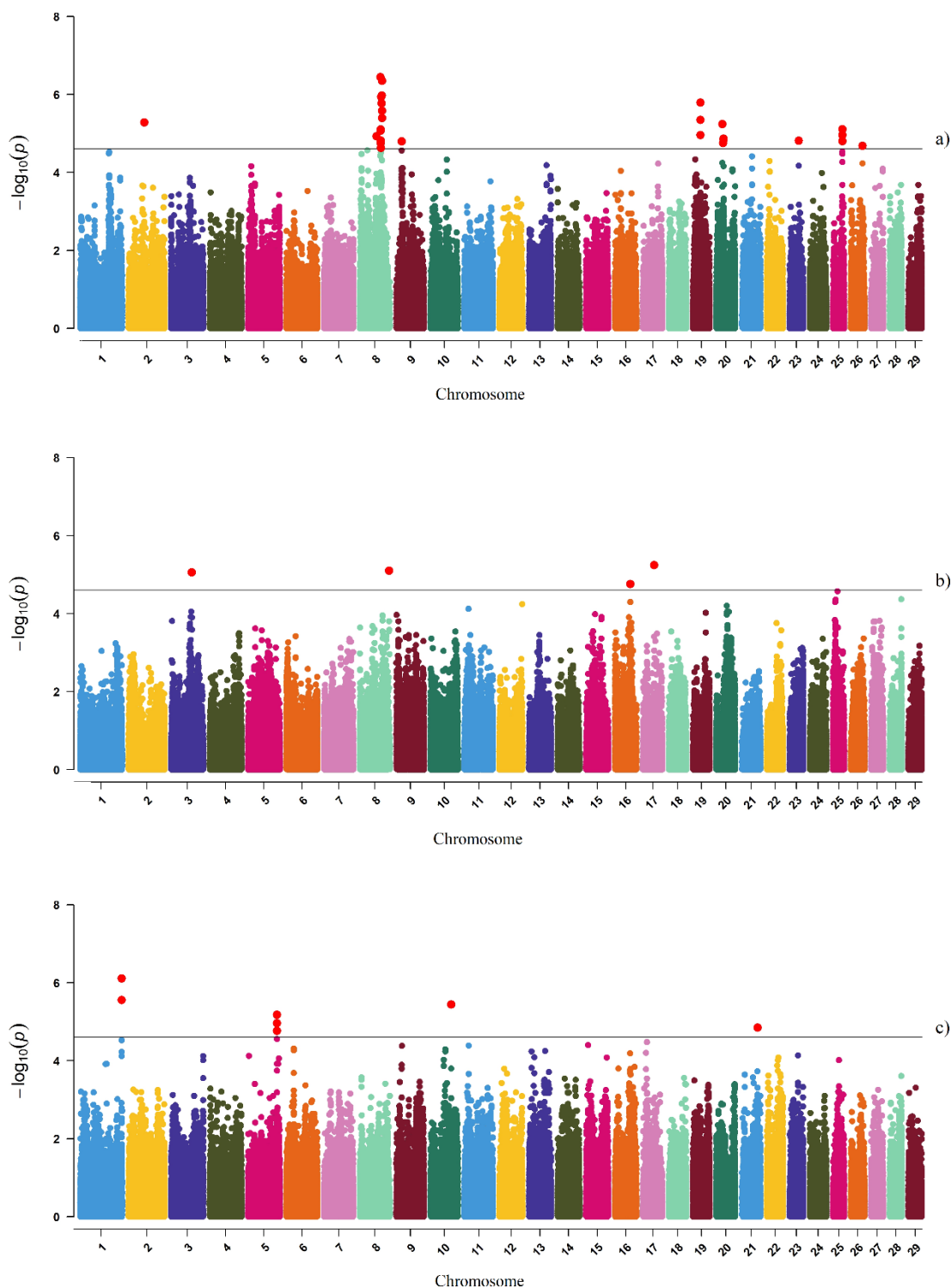
Fonte: Elaboração Própria.

Figura 5 Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para escore de condição corporal (a), profundidade corporal (b) e largura do peito (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



Fonte: Elaboração Própria.

Figura 6 Gráfico de Manhattan da análise de associação genômica ampla para capacidade leiteira (a), altura frontal (b) e estatura (c) usando genótipos imputados de painéis de alta densidade em gado Holandês canadense. Os SNPs estatisticamente significativos após uma correção de Bonferroni em todo o genoma são coloridos em vermelho.



Fonte: Elaboração Própria.

Índice composto de pontuação para Pés e Pernas (IPP)

Treze SNPs foram associados com IPP e estão distribuídos nos cromossomos BTA11, BTA13, BTA17, BTA18 e BTA26 (Tabela 2). O SNP com menor p-valor (rs41661000) para IPP foi encontrado na posição BTA13:50.453.781 pb. Cinquenta e dois potenciais genes candidatos com funções biológicas conhecidas (Tabela 2) foram encontrados próximos aos SNPs significativos, mas nenhum gene foi encontrado próximo aos SNPs significativos no BTA26. Além disso, QTLs para IPP, ANG, VLPT, ES, deslocamento de abomaso, peso corporal, taxa de conversão alimentar, ingestão alimentar residual e profundidade do úbere foram previamente relatados nas mesmas regiões genômicas dos SNPs associados com IPP. A análise de enriquecimento encontrou três GO termos significativos (“Glicosiltransferase, família 11”, “atividade galactosídeo 2-alfa-L-fucosiltransferase” e “atividade alfa-(1,2)-fucosiltransferase”) para IPP (Tabela 3) e três genes (“*SEC1*-alfa-2-fucosiltransferase Sec1”, “*FUT1*-fucosiltransferase 1” e “*FUT2*-fucosiltransferase 2”) estão nesses termos.

IPP é uma combinação linear ponderada de características de conformação dos pés e pernas, usada como um índice de seleção para melhorar geneticamente essas características em bovinos da raça Holandesa no Canadá. Cinquenta e dois potenciais genes candidatos foram encontrados abrigando ou próximos aos 13 SNPs associados a esse índice e alguns são importantes candidatos para IPP. O gene *DIP2C* regula a metilação do DNA e a transição epitelial-mesenquimal em células humanas (LARSSON et al., 2017) e foi identificado como um candidato para úlceras de sola, doença da linha branca e lesões não infecciosas em cascos em bovinos leiteiros da raça Holandesa (LAI et al., 2021). Além disso, o gene *BIRC7* está associado à diferenciação osteogênica de células humanas (LIU et al., 2017), enquanto o gene *COL20A1* está associado à formação de colágeno em humanos (RAJASEKARAN et al., 2023). Liu et al. (2021) mostraram que *YTHDF1* está relacionado à osteoporose e sua expressão aumenta em células-tronco mesenquimais da medula óssea humana durante a diferenciação osteogênica. Além disso, camundongos que tiveram o *YTHDF1* silenciado apresentaram diminuição da massa óssea in vivo.

Tabela 2. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao índice composto de pontuação para Pés e Pernas e os genes posicionais correspondentes identificados.

Chr	SNP	Location (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
BTA11	rs136174419	26. 592.724	0,070,	0,659	$1,667 \times 10^{-05}$	<i>PPM1B</i>
	rs41661000,	50.453.781	0,496,	0,471,	$1,713 \times 10^{-06}$,	
BTA13	rs109648982,	50.448.257	0,418,	0,439,	$1,514 \times 10^{-05}$,	<i>ENSBTAG000000007199</i>
	rs134704848	50.459.617	0,303	0,451	$9,787 \times 10^{-06}$	
	rs42280937	50.502.256	0,378	0,445	$6,672 \times 10^{-06}$	<i>ENSBTAG000000007199, HAO1</i>
	rs136408519	46.861.675	0,456	-0,485	$8,835 \times 10^{-06}$	<i>DIP2C, ZMYND11</i>
						<i>CHRNA4, COL20A1, ARFGAP1,</i>
	rs109244187	54.357.411	0,137	0,639	$2,423 \times 10^{-05}$	<i>ENSBTAG000000051598, BIRC7, YTHDF1,</i>
						<i>BHLHE23, SLC17A9</i>
BTA17	rs41849069	67.138.540	0,218	-0,539	$2,543 \times 10^{-06}$	<i>MN1</i>
						<i>SPHK2, DBP, CA11, NTN5, SEC1, FUT2,</i>
BTA18	rs134739530	55.365.713	0,072	-0,638	$4,845 \times 10^{-06}$	<i>MAMSTR, RASIP1, IZUMO1, FUT1, FGF21,</i>
						<i>BCAT2, HSD17B14, PLEKHA4</i>
	rs133544315	59.727.750	0,124	-0,574	$5,095 \times 10^{-06}$	-
	rs110774115	56.589.786	0,148	0,520	$1,085 \times 10^{-05}$	<i>KCNC3, NAPSA, ENSBTAG000000048283,</i>
						<i>NR1H2, POLD1, SPIB, MYBPC2, GARIN5A,</i>
						<i>EMC10, JOSD2, LRRC4B</i>
						<i>BCAT2, HSD17B14, PLEKHA4, PPP1R15A,</i>
	rs134119868	55.513.275	0,033	-0,772	$2,257 \times 10^{-05}$	<i>TULP2, NUCB1, DHDH, BAX, FTL, GYS1,</i>
						<i>RUVBL2, LHB, ENSBTAG000000052788,</i>
						<i>NTF4, ENSBTAG000000048800</i>
BTA 26	rs3423553517	49.970.179	0,157	0,473	$2,331 \times 10^{-05}$	-

BTA – Autossomo do *Bos taurus*

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 3. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para escore de condição corporal (ECC), qualidade óssea (QO), índice composto de pontuação para Pés e Pernas (IPP) e vista lateral da perna traseira (VLPT) em gado Holandês canadense.

Característica	Banco d dados Original	Termo	Genes	FDR
ECC	GOTERM_MF_DIRECT	Aryl sulfotransferase activity	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1</i>	$4,0 \times 10^{-3}$
ECC	GOTERM_BP_DIRECT	sulfation	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1</i>	$5,2 \times 10^{-2}$
ECC	GOTERM_MF_DIRECT	sulfotransferase activity	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1</i>	$2,9 \times 10^{-2}$
ECC	INTERPRO	Sulfotransferase domain	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1</i>	$4,8 \times 10^{-2}$
ECC	UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:Sulfotransfer_1	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1</i>	$3,6 \times 10^{-2}$
QO	UP_KW_DOMAIN	Transmembrane helix	<i>CTDNEP1, ELOVL7, CHRNBI, CLDN7, EFNB3, IL31RA, IL6ST, NLGN2, SLC2A4, SPEM1, TMEM102, TMEM256, TMEM88, TMEM95</i>	$4,2 \times 10^{-2}$
IPP	INTERPRO	Glycosyl transferase, family 11	<i>SEC1, FUT1, FUT2</i>	$1,2 \times 10^{-3}$
IPP	GOTERM_MF_DIRECT	Galactoside 2-alpha-L-fucosyltransferase activity	<i>SEC1, FUT1, FUT2</i>	$2,4 \times 10^{-3}$
IPP	GOTERM_MF_DIRECT	Alpha-(1,2)-fucosyltransferase activity	<i>SEC1, FUT1, FUT2</i>	$2,4 \times 10^{-3}$
VLPT	INTERPRO	ABC transporter A, ABCA	<i>ENSBTAG00000049286, ABCA10, ABCA5, ABCA6</i>	$2,9 \times 10^{-6}$
VLPT	INTERPRO	ABC transporter-like	<i>ABCA10, ABCA5, ABCA6</i>	$1,4 \times 10^{-2}$
VLPT	GOTERM_MF_DIRECT	ATP binding	<i>ABCA10, ABCA5, ABCA6, MAP2K6, PRKCB, RYK</i>	$3,5 \times 10^{-2}$
VLPT	UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:ABC transporter	<i>ABCA10, ABCA5, ABCA6</i>	$1,6 \times 10^{-2}$

Fonte: Elaboração Própria.

O gene *MN1* (MN1 Proto-Oncogene, Transcriptional Regulator), localizado no BTA17, tem sido implicado no desenvolvimento craniofacial em camundongos e humanos (BRECKPOT et al., 2016; HOEBEL et al., 2017). No BTA18 foram encontrados os genes *FGF21* (Fibroblast Growth Factor 21), *PPP1R15A* (Protein Phosphatase 1 Regulatory Subunit 15A), *BAX* (BCL2 Associated X, Apoptosis Regulator), e *EMC10* (ER Membrane Protein Complex Subunit 10). Wei et al. (2012) identificaram o gene *FGF21* como um regulador negativo fisiologicamente e farmacologicamente significativo para massa óssea. Os genes *PPP1R15A* e *BAX* foram associados ao desenvolvimento ósseo em camundongos e humanos (DING et al.; ZAMAN et al., 2012), enquanto Wang et al. (2022) identificaram que os níveis séricos de *EMC10* estão correlacionados com o índice de massa corporal (IMC) e a resistência à insulina em humanos, além de ser um potencial biomarcador de adiposidade em camundongos e humanos.

Vários QTLs (Apêndice IV) estavam nas regiões genômicas ao redor dos SNPs significativamente associados à IPP. Cole et al. (2011) identificaram os SNPs rs134739530 (BTA3:55.365.713 bp) e rs134119868 (BTA3:55.513.275 bp) associados a QTLs para IPP, ANG, VLPT, ES e profundidade do úbere nas mesmas regiões onde encontramos SNP associado à IPP. Além disso, QTL para variáveis como peso corporal, taxa de conversão alimentar e consumo de ração residual foram encontrados nessas regiões genômicas. Ressalta-se também que Pérez-Cabal e Charfeddine (2016) identificaram associação entre o alto peso corporal e a alta probabilidade de distúrbios na conformação dos pés e pernas em vacas da raça Holandesa na Espanha.

Características de pontuação composta dos cascos (ANG e PT)

Foram identificados 27 SNPs associados com ANG e PT (Apêndice IV), os quais foram localizados nos cromossomos BTA1, BTA2, BTA4, BTA7, BTA9, BTA10, BTA11, BTA12, BTA15, BTA19 e BTA20. Os SNPs mais significativos para ANG e PT foram rs133014265 (BTA12:12.322.089 pb) e rs41936372 (BTA20: 11.927.432 pb), respectivamente. As regiões genômicas ao redor desses SNPs abrigam 18 potenciais genes candidatos para ANG e 22 para PT (Tabela 4). Vários QTL foram relatados anteriormente nas mesmas regiões genômicas, incluindo QTL para ANG, PC, ANG, PT, IPP, VLPT, ES, altura corporal, peso corporal, porcentagem óssea, peso da carcaça,

escore de conformação, forma leiteira, imunoglobulina nível g, comprimento do teto e posicionamento do teto (Apêndice IV).

Quatorze GO termos significativos foram identificados para ANG, mas nenhum foi significativo para PT. A Tabela 5 descreve os 11 genes que envolvidos com os GO termos encontrados, incluindo Kegg Pathway, InterPro, funções moleculares, processos biológicos e componentes celulares relacionados ao receptor olfativo, transdução sensorial e membrana celular.

Alguns genes candidatos foram identificados para ANG e PT. Thinesswary et al. (2018) relataram que o aumento da expressão do *RSAD2* (Radical S-Adenosyl Methionine Domain Containing 2) está correlacionado com a redução da replicação viral do Cocksackievirus A16 (CV-A16), enterovírus que causa doenças nas mãos, pés e boca em humanos. O *DGKH* (Diacylglycerol Kinase Eta), localizado no BTA12, é um gene candidato para regular o crescimento de bovinos Yunling e Leiqiong por meio da regulação da secreção de hormônios relacionados ao crescimento (LU et al., 2020) e, também, foi associado com a densidade óssea em humanos (O'SEAGHDHA et al., 2013). O gene *LRP4* (LDL Receptor Related Protein 4), localizado no BTA15, foi associado à sindactilia congênita em bovinos da raça Holandesa (DRÖGEMÜLLER et al., 2007). Esta é uma anormalidade autossômica recessiva caracterizada pela fusão dos dígitos funcionais (DUCHESNE et al., 2006).

Alguns QTLs para as características Carne e Carcaça (porcentagem de ossos e peso da carcaça), Leite (rendimento de leite), Produção (peso corporal) e Reprodução (taxa de concepção) foram encontrados (Apêndice IV) nas mesmas regiões associadas com ANG e PT. Esses QTLs podem ser influenciados por lesões nas regiões dos pés que levam à redução da produção de leite, falta de ganho de peso, baixa fertilidade e, frequentemente, descarte de animais (GARVEY, 2022). Cole et al. (2011) identificaram um SNP (rs41628909, BTA1:67.619.208 bp) associado a um QTL para ANG, em que nesse estudo foi identificado para PT. Já Boichard et al. (2003) identificaram um SNP (rs137103653, BTA7:28.218.213 bp) associado a PT em que nesse estudo foi identificado para ANG. Segundo Pérez-Cabal e Charfeddine (2016), uma pontuação alta para ANG significa que as vacas têm um ângulo de casco inclinado, o que requer menos casqueamento. No entanto, o ângulo do casco extremamente inclinado pode interferir no efeito de amortecimento adequado na banda coronária e pode colocar tensão indevida na

junção entre a parede e a sola da garra. Além disso, PT é a profundidade do calcanhar na garra externa e, quando sua medida é extremamente rasa, há uma incidência muito maior do que a média de lesões no talão (CHAPINAL et al., 2013).

Tabela 4. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao ângulo do pé (ANG) e profundidade do talão (PT) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Cromosomo	SNP	Localização (bp)	MAF	Efeito	P-valor	Genes
ANG	BTA7	rs41628990	29.802.791	0,172	5.859	$9,366 \times 10^{-06}$	<i>ENSBTAG00000046696</i>
ANG	BTA7	rs42650571	28.300.663	0,291	4.825	$9,435 \times 10^{-06}$	-
ANG	BTA7	rs137103653	28.218.213	0,242	-5.012	$2,117 \times 10^{-05}$	-
ANG	BTA9	rs136724399	64.526.199	0,032	-12.006	$8,232 \times 10^{-06}$	-
ANG	BTA10	rs110339743	27.310.922	0,043	8.401	$7,164 \times 10^{-06}$	<i>OR4N4, OR4N2, OR4K6, OR4K3, OR4K2, OR4K5, OR4K1, OR4K14, OR4K15, OR4Q2, ENSBTAG00000039370</i>
ANG	BTA12	rs133014265	12.322.089	0,063	-7.737	$1,310 \times 10^{-06}$	<i>ENSBTAG00000053271, DGKH, AKAP11</i>
ANG	BTA19	rs110348847	6.401.911	0,405	-4.259	$2,316 \times 10^{-05}$	<i>PCTP, ENSBTAG00000053407, ENSBTAG00000039563</i>
ANG	BTA20	rs110955019	68.453.470	0,401	4.687	$5,855 \times 10^{-06}$	-
PT	BTA1	rs41628909	67.619.208	0,335	0,691	$7,418 \times 10^{-06}$	<i>SEC22A, ADCY5</i>
PT	BTA2	rs110383851	12.107.533	0,088	0,903	$2,311 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA4	rs135171504	17.221.951	0,276	-0,645	$1,830 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA4	rs137817399	17.239.280	0,345	-0,598	$2,374 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA9	rs109591644	83.309.979	0,120	0,852	$1,737 \times 10^{-05}$	<i>SHPRH, GRM1</i>
PT	BTA11	rs110533337	90.106.355	0,227	0,641	$1,661 \times 10^{-05}$	<i>RSAD2, CMPK2</i>
PT	BTA12	rs134493843	44.476.396	0,272	0,679	$9,653 \times 10^{-06}$	<i>KLHL1</i>
PT	BTA12	rs43700792	47.035.822	0,364	0,614	$2,005 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA15	rs41781867	76.895.774	0,325	0,631	$1,455 \times 10^{-05}$	<i>LRP4, CSTPP1</i>
PT	BTA20	rs41936372	11.927.432	0,469	-0,714	$8,917 \times 10^{-08}$	-
PT	BTA20	rs133321805	13.449.726	0,214	0,827	$2,917 \times 10^{-07}$	<i>SREK1, ERBIN</i>
PT	BTA20	rs42243798	12.754.394	0,453	0,682	$1,481 \times 10^{-06}$	<i>ENSBTAG00000049964</i>
PT	BTA20	rs132869581	12.784.933	0,327	-0,717	$3,677 \times 10^{-06}$	<i>ENSBTAG00000049964</i>
PT	BTA20	rs137824537	14.872.927	0,187	0,764	$8,825 \times 10^{-06}$	<i>SHISAL2B, RGS7BP</i>
PT	BTA20	rs134796181	15.811.787	0,244	0,692	$1,670 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA20	rs110681916	12.095.813	0,413	-0,603	$1,765 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA20	rs41658458	16.083.771	0,284	0,653	$1,880 \times 10^{-05}$	-
PT	BTA20	rs109719590	13.994.440	0,179	-0,753	$2,058 \times 10^{-05}$	<i>SGTB, TRAPPC13, ENSBTAG00000047828, TRIM23, PPWD1, CENPK, ADAMTS6</i>
PT	BTA20	rs135322173	14.842.827	0,220	0,681	$2,342 \times 10^{-05}$	<i>SREK1IP1, SHISAL2B, RGS7BP</i>

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 5. Termos significativos na análise de anotação funcional para grupo de genes identificados para ângulo do pé (ANG) em bovinos da raça Holandesa canadense.

Banco d dados Original	Termo	Genes	FDR
INTERPRO	Olfactory receptor	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$1,4 \times 10^{-8}$
GOTERM_MF_DIRECT	Olfactory receptor activity	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$6,9 \times 10^{-8}$
GOTERM_MF_DIRECT	G-protein coupled receptor activity	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$2,1 \times 10^{-7}$
KEGG_PATHWAY	Olfactory transduction	OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$7,4 \times 10^{-7}$
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Olfaction	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4Q2	$1,8 \times 10^{-6}$
UP_KW_BIOLOGICAL_PROCESS	Sensory transduction	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4Q2	$1,8 \times 10^{-6}$
UP_SEQ_FEATURE	DOMAIN:G_PROTEIN_RECEP_F1_2	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$2,4 \times 10^{-4}$
INTERPRO	G protein-coupled receptor, rhodopsin-like	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$1,0 \times 10^{-4}$
INTERPRO	GPCR, rhodopsin-like, 7TM	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$1,0 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC_DIRECT	Plasma membrane	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, AKAP11, OR4Q2	$2,0 \times 10^{-4}$
UP_KW_CELLULAR_COMPONENT	Cell membrane	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4Q2	$5,3 \times 10^{-4}$
GOTERM_CC_DIRECT	Integral component of membrane	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$2,1 \times 10^{-3}$
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Transducer	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$4,7 \times 10^{-3}$
UP_KW_MOLECULAR_FUNCTION	Receptor	ENSBTAG00000039370, OR4K1, OR4K15, OR4K14, OR4K2, OR4K3, OR4K5, OR4K6, OR4N2, OR4N4, OR4Q2	$6,7 \times 10^{-3}$

Fonte: Elaboração Própria.

Onze dos quatorze GO termos podem estar relacionados a transdutores ou receptores olfativos. O olfato é um sistema sensorial antigo que permite a um organismo detectar produtos químicos em seu ambiente e o primeiro passo na transdução de odores é mediado pela ligação de odores a receptores olfativos (GAILLARD et al., 2004). Os bovinos usam o olfato para complementar suas informações visuais, organização social do grupo, reconhecer animais individualmente e ajudar a criar um vínculo entre a mãe e sua cria (PADODARA e JACOB, 2014). Além disso, a comunicação olfativa entre os animais e a reprodução é baseada principalmente nos feromônios liberados, além do fato de que na busca por comida, o odor pode condicionar o apetite do animal. Esses fatores podem ser melhor aproveitados por animais com boa saúde dos cascos.

Características que compõem o escore de mobilidade (QO, VPD, LOC, VTPT e VLPT)

Descobriu-se 58 SNPs significativamente associados as características do escore de mobilidade (Apêndice IV). Apenas no BTA3, BTA8, BTA10, BTA13, BTA22, BTA24, BTA26, BTA27, BTA28 e BTA29 não foram encontrados SNPs significativos. Os SNPs mais significativos para QO, VPD, LOC, VTPT e VLPT foram os seguintes: rs136174626 (BTA19: 27.056.493 pb), rs136468307 (BTA11: 39.657.165 pb), rs137570291 (BTA11: 76.829.758 pb), rs4 1781092 (BTA15:75.567.845 pb) e rs3423241779 (BTA7:28.761.924 pb). Essas regiões genômicas abrigam 45, 4, 9, 16 e 16 potenciais genes candidatos associados a QO, VPD, LOC, VTPT e VLPT, respectivamente (Tabelas 6 e 7). Além disso, essas regiões abrigam QTL previamente associados a várias características, como ANG, PC, QO, IPP, ANG, PT, VTPT, VLPT, ES, peso corporal, profundidade do tórax, pontuação de conformação, forma láctea, nível de imunoglobulina g e comprimento do teto. (Arquivo Suplementar2).

Cole et al. (2011) identificaram um SNP (rs132818385, BTA20:18.725.426 bp) associado a regiões de QTLs para VTPT, IPP, ANG e ES, em que nesse estudo foi identificado para QO, um SNP (rs109011936, BTA11:78.444.403 bp) para VTPT, em que nesse trabalho foi associado a LOC, um SNP (rs109828867, BTA18:7.150.509 bp) para VTPT e VLPT, em que nesse trabalho foi associado a VTPT e um SNP (rs41627857, BTA12:8.747.286 bp) para VLPT, em que nesse trabalho também foi associado a VLPT. O QO é avaliado pelo nivelamento e limpeza do osso nas regiões da perna, jarrete e coxa (ONYIRO e BROTHERSTONE, 2008). De acordo com Atkins e Shannon (2002), uma

alta pontuação de QO reflete a qualidade óssea extremamente plana com limpeza em toda a extensão e tendões bem definidos, sendo uma indicação de condicionamento físico e boa circulação nas pernas sem inchaço excessivo nas articulações. VLPT é uma avaliação do grau de curvatura do jarrete quando visto de lado e pernas extremamente curvadas foram associadas a uma incidência maior que a média de erosão de talão (CHAPINAL et al., 2013). O VTPT avalia a retidão das patas traseiras quando vistas por trás e é medido pelo grau de desvio interno dos jarretes e o grau correspondente ao qual os dedos apontam para fora (ATKINS e SHANNON, 2002). Não foram identificados previamente na literatura estudos de GWAS para VPD, sendo os resultados apresentados nesse trabalho (Apêndice IV) como pioneiros para essa característica.

Cinco termos GO foram identificados nas análises de enriquecimento com as características do escore de mobilidade, incluindo um para QO e 4 para VLPT. Nenhum termo GO foi enriquecido para VPD, LOC e VTPT. A Tabela 3 descreve os 14 genes enriquecidos para o termo “Transmembrane helix” encontrado para QO. Enquanto sete genes ("*ABCA10*- ATP binding cassette subfamily A member 10", "*ABCA5*- ATP binding cassette subfamily A member 5", "*ABCA6*- ATP binding cassette subfamily A member 6", "*MAP2K6*- mitogen-activated protein kinase kinase 6 ", "*PRKCB*-protein kinase C beta", "*RYK*- receptor like tyrosine kinase" e "*ENSBTAG00000049286*") foram enriquecidos para o 4 termos identificados para VLPT ("ABC transportador A, ABCA"; "ABC transporter-like"; "ATP binding" , e "DOMAIN:ABC transporter") (Tabela 3).

Dentre os 90 genes identificados, destacam-se como candidatos os genes *RYK* (Receiver Like Tyrosine Kinase), *EXOC4* (Exocyst Complex Component 4), *FGF23* (Fibroblast Growth Factor 23), *STMN2* (Stathmin 2) e *MAP2K6* (Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 6), localizados em BTA1, BTA4, BTA5, BTA14 e BTA19, respectivamente. O *RYK* foi associado ao encurtamento de ossos longos nos membros de camundongos (ANDRE et al., 2012), enquanto o *FGF23* foi associado a hipocalcemia subclínica em vacas leiteiras e à síntese de 1,25-diidroxivitamina D (SIMIC e BABITT, 2021; MA et al., 2022). O *STMN2* foi associado à atrofia muscular e comprometimento do comportamento motor em camundongos (SAN JUAN et al., 2022) e é um gene candidato para a Encefalopatia Espongiforme Bovina clássica (THOMSON et al., 2012). O *EXOC4* foi identificado como um gene candidato para a qualidade da carne em bovinos Simental (BORDBAR et al., 2019) e para características de temperamento em bovinos

Brahman (RUIZ-DE-LA-CRUZ et al., 2023). O gene *MAP2K6* foi associado à termogênese adaptativa em bovinos (RYU et al., 2012). Essas associações podem indicar fatores que afetam a mobilidade dos bovinos, pois estão relacionados ao desenvolvimento muscular, ósseo, neural e comportamental.

Tabela 6. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à qualidade óssea (QO), visão da perna dianteira (VPD) e locomoção (LOC) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Chr	SNP	Localização (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
QO	BTA18	rs109766155	1.498.235	0,204	-0,700	7,133 x 10 ⁻⁰⁶	<i>VAC14, MTSS2, ENSBTAG00000050915, IL34, SF3B3</i>
QO	BTA18	rs136556784	1.470.422	0,208	-0,692	8,702 x 10 ⁻⁰⁶	<i>VAC14, MTSS2, ENSBTAG00000050915, IL34</i>
QO							<i>CTDNEP1, ELP5, CLDN7, SLC2A4, YBX2, EIF5A, GPS2, NEURL4, ENSBTAG00000045892, KCTD11, TMEM95, TNK1, PLSCR3, TMEM256, NLGN2, SPEM1, SPEM2, TMEM102, ENSBTAG00000050569, CHRNA1, ZBTB4, POLR2A</i>
	BTA19	rs136174626	27.056.493	0,219	-0,925	2,530 x 10 ⁻⁰⁶	<i>TP53, WRAP53, EFNB3, DNAH2, KDM6B, TMEM88, NAA38, CYB5D1, CHD3</i>
QO	BTA19	rs110845473	27.484.633	0,215	-0,898	5,533 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ELOVL7, ENSBTAG00000049955, DEPDC1B</i>
QO	BTA20	HAPMAP50241-BTA-115966	18.571.733	0,145	-0,868	4,235 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ELOVL7, DEPDC1B</i>
QO	BTA20	rs41613300	18.626.250	0,145	-0,868	4,235 x 10 ⁻⁰⁶	<i>IL6ST, IL31RA, DDX4</i>
QO	BTA20	rs110877560	23.265.588	0,275	-0,718	4,725 x 10 ⁻⁰⁶	<i>IL6ST, IL31RA, DDX4</i>
QO	BTA20	rs108968345	23.282.550	0,303	-0,697	4,916 x 10 ⁻⁰⁶	<i>DEPDC1B</i>
QO	BTA20	rs132818385	18.725.426	0,357	-0,678	5,355 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PDE4D</i>
QO	BTA20	rs110558195	20.142.479	0,159	0,832	5,468 x 10 ⁻⁰⁶	<i>IL6ST, IL31RA, DDX4</i>
QO	BTA20	rs109445617	23.266.165	0,186	-0,746	1,589 x 10 ⁻⁰⁵	<i>IL6ST, IL31RA, DDX4</i>
QO	BTA20	rs29011426	23.312.762	0,186	-0,746	1,589 x 10 ⁻⁰⁵	<i>IL6ST, IL31RA, DDX4</i>
QO	BTA21	ARS-BFGL-NGS-35280	33.069.961	0,169	-0,852	3,170 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG00000024311, ODF3L1</i>
VPD	BTA11	rs136468307	39.657.165	0,079	-12325	9,448 x 10 ⁻⁰⁷	-
VPD	BTA11	rs133253380	40.113.682	0,127	-6870	6,001 x 10 ⁻⁰⁶	-
VPD	BTA11	rs109196408	39.491.318	0,083	-10081	1,755 x 10 ⁻⁰⁵	-

VPD	BTA14	rs134079793	42.586.262	0,222	-4609	2,167 x 10 ⁻⁰⁶	-
VPD	BTA14	rs109291207	42.898.907	0,457	-4089	1,256 x 10 ⁻⁰⁵	<i>HEY1, STMN2, ENSBTAG00000032812</i>
VPD	BTA14	rs110192073	42.975.630	0,460	-4035	1,678 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG00000032812, HEY1</i>
VPD	BTA16	rs109182378	67.865.555	0,446	4034	6,886 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PLA2G4A</i>
LOC	BTA5	rs41654529	105.743.393	0,085	-0,721	2,066 x 10 ⁻⁰⁵	<i>FGF6, FGF23, TIGAR, CCND2,</i>
LOC	BTA5	rs109678909	22.971.796	0,308	-0,449	2,158 x 10 ⁻⁰⁵	-
LOC	BTA11	rs137570291	76.829.758	0,493	0,512	6,991 x 10 ⁻⁰⁶	-
LOC	BTA11	rs41612857	76.863.768	0,490	-0,515	7,239 x 10 ⁻⁰⁶	-
LOC	BTA11	rs110778731	76.836.424	0,476	-0,511	8,128 x 10 ⁻⁰⁶	-
LOC	BTA11	rs29019720	76.779.895	0,374	-0,468	8,276 x 10 ⁻⁰⁶	-
LOC	BTA11	rs136286714	76.930.841	0,479	-0,500	1,289 x 10 ⁻⁰⁵	-
LOC	BTA11	rs109011936	78.444.403	0,384	0,560	2,048 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG00000049117, PUM2</i>
LOC	BTA23	rs136696041	5.075.497	0,158	0,562	7,355 x 10 ⁻⁰⁶	<i>HMGCLL1, GFRAL, HCRTR2</i>
LOC	BTA23	rs109057916	5.081.980	0,177	0,521	1,009 x 10 ⁻⁰⁵	<i>HMGCLL1, GFRAL, HCRTR2</i>

BTA – Bos taurus autosome

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 7. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à vista traseira da perna traseira (VTPT) e à vista lateral da perna traseira (VLPT) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Chr	SNP	Localização (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
VTPT	BTA2	BOVINEHD0200004707	16.529.717	0,102	-7.930	1,419 x 10 ⁻⁰⁵	-
VTPT	BTA4	rs134960239	97.420.163	0,033	14.864	1,331 x 10 ⁻⁰⁵	<i>EXOC4</i>
VTPT	BTA6	rs109648337	96.284.651	0,317	5.268	1,986 x 10 ⁻⁰⁵	<i>RASGEF1B</i> , <i>ENSBTAG00000052070</i>
VTPT	BTA7	rs41658116	1.114.190	0,473	4.838	1,217 x 10 ⁻⁰⁵	<i>RASGEF1C</i> , <i>RNF130</i>
VTPT	BTA9	rs3423094135	64.186	0,297	-5.379	5,159 x 10 ⁻⁰⁶	-
VTPT	BTA9	rs43744542	414.987	0,223	-5.678	1,297 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PTP4A1</i>
VTPT	BTA15	rs41781092	75.567.845	0,285	-6.427	1,767 x 10 ⁻⁰⁷	<i>ENSBTAG00000054083</i>
VTPT	BTA15	rs42912957	75.357.973	0,079	9.559	6,492 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PRDM11</i> , <i>SYT13</i>
VTPT	BTA15	rs110279884	76.060.265	0,441	5.235	1,058 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PHF21A</i>
VTPT	BTA15	rs110287097	75.439.705	0,157	6.926	1,262 x 10 ⁻⁰⁵	-
VTPT	BTA15	rs109713642	75.887.663	0,500	-5.076	1,538 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MAPK8IP1</i> , <i>C15H11orf94</i> , <i>PEX16</i> , <i>LARGE2</i> , <i>PHF21A</i> , <i>SLC35C1</i> , <i>CRY2</i>
VTPT	BTA15	rs109435828	76.007.949	0,496	4.967	2,227 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MAPK8IP1</i> , <i>C15H11orf94</i> , <i>PEX16</i> , <i>LARGE2</i> , <i>PHF21A</i> , <i>CRY2</i>
VTPT	BTA18	rs109828867	7.150.509	0,013	17.809	7,323 x 10 ⁻⁰⁶	-
VLPT	BTA1	rs43270148	135.158.833	0,017	12.253	7,018 x 10 ⁻⁰⁶	<i>RYK</i>
VLPT	BTA7	rs3423241779	28.761.924	0,171	4.058	3,132 x 10 ⁻⁰⁶	-
VLPT	BTA7	rs132945415	28.662.752	0,825	-4.050	3,219 x 10 ⁻⁰⁶	-
VLPT	BTA7	rs3423227599	28.744.865	0,151	3.835	2,267 x 10 ⁻⁰⁵	-
VLPT	BTA9	rs136977277	19.418.690	0,254	-3.646	1,394 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SH3BGRL2</i>
VLPT	BTA9	rs29013705	19.421.211	0,229	-3.643	2,393 x 10 ⁻⁰⁵	<i>SH3BGRL2</i>
VLPT	BTA12	rs41627857	8.747.286	0,363	-3.267	2,049 x 10 ⁻⁰⁵	-

VLPT	BTA15	rs136483399	61.666.789	0,258	3.552	1,029 x 10 ⁻⁰⁵	<i>DCDC1</i>
VLPT	BTA15	rs42625101	63.705.526	0,052	6.150	1,512 x 10 ⁻⁰⁵	<i>QSER1, DEPDC7, TCP11L1,</i>
							<i>CSTF3</i>
VLPT	BTA17	rs110240722	42.379.700	0,050	9.195	1,478 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PDGFC</i>
VLPT	BTA18	rs136114993	33.182.132	0,191	-4.135	1,148 x 10 ⁻⁰⁵	-
VLPT	BTA19	rs134677011	61.146.690	0,479	3.235	1,597 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MAP2K6</i>
VLPT	BTA19	rs3423448968	61.353.943	0,445	3.267	1,990 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ABCA5,</i>
							<i>ENSBTAG00000049286,</i>
							<i>ABCA10, ABCA6</i>
VLPT	BTA21	rs110016525	54.528.550	0,271	3.505	1,645 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG00000052854</i>
VLPT	BTA25	rs42684377	21.882.759	0,29	4.062	2,051 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PRKCB, CACNG3</i>

BTA – Bos taurus autosome

Fonte: Elaboração Própria.

Características de força leiteira (ECC, PC, LP, CL, AF e ES)

Um total de 135 SNPs foram encontrados associados com características relacionadas a força leiteira (Apêndice IV), os quais estão localizados em vários cromossomos, mas no BTA3, BTA4, BTA12, BTA13, BTA15, BTA18, BTA24, BTA27 e BTA29 não foram encontrados qualquer efeito significativo. Os SNPs mais significativos para ECC, PC, LP, CL, AF e ES foram rs110434046 (BTA6: 87.184.768 pb), rs108938667 (BTA11:76.875.084 pb), rs42139508 (BTA28: 23.422.787 pb), rs435712 86 (BTA8:78.118.013 pb), rs137254844 (BTA17:42.276.117 pb) e BOVINEHD0100039562 (BTA1:156.730.566 pb), respectivamente. As regiões genômicas ao redor dos SNPs significativos abrigam 24 potenciais genes candidatos para ECC, 37 para PC, 27 para LP, 31 para CL, 9 para AF e 20 para ES (Tabela 8, 9 e 10).

Vários QTL foram relatados anteriormente nas mesmas regiões genômicas, incluindo QTL para ECC, PC, LP, CL, ANG, PT, VTPT, VLPT, ES, ganho médio diário, altura corporal, tamanho corporal, peso corporal, porcentagem óssea, tamanho do bezerro, forma leiteira, ingestão de matéria seca, índice de fertilidade, nível de imunoglobulina g, hiperplasia interdigital, persistência da lactação e úlcera de sola. Lee et al. (2021) identificaram um SNP (rs110310151, BTA6:86.996.470 bp) que foi associado a uma região de QTL para ECC, igual ao nosso estudo (Apêndice IV). O ECC é uma ferramenta para avaliar as reservas de gordura das vacas leiteiras e vem sendo um fator importante no manejo do gado leiteiro (ROCHE et al., 2009; MARTINS et al., 2020). A PC está associada ao índice econômico (ALCANTARA et al., 2022), longevidade (ZAVADILOVÁ e ŠTÍPKOVÁ, 2012), eficiência alimentar (MANAFIAZAR et al., 2016) e fertilidade (JAGUSIAK et al., 2014). Ashwell et al. (2005) também identificaram o SNP (rs29013890, BTA20:34.800.041) associado a uma região de QTL para PC (Apêndice IV). An et al. (2020) identificaram um SNP (rs42848657, BTA11:24.408.850) associado a perímetro torácico, enquanto esse trabalho o associou a LP. A LP é medida diagonalmente atrás como a distância entre o topo das patas dianteiras e a largura das costelas e do ombro e sua correlação positiva com o tamanho do bezerro ($0,37 \pm 0,01$) (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2021). Ashwell et al. (2005) identificaram o SNP (rs137532092, BTA20:27.329.790 bp) associado a uma região de QTL para o índice composto de capacidade leiteira, enquanto nesse trabalho ele foi associado a característica de CL (Apêndice IV). A classificação de CL é iniciada

observando o ângulo das nervuras (direção das nervuras). É preferível que as costelas sejam espaçadas e apontem na direção do úbere para que a vaca seja considerada de alta CL (ICAR, 2015). Oliveira Júnior et al. (2021) encontraram correlação negativa entre ES e idade no primeiro serviço ($-0,45 \pm 0,01$) e positiva com ($0,52 \pm 0,01$) tamanho do bezerra. Cole et al. (2011) identificaram um SNP (rs43345563, BTA3:77.599.781 bp) associado a PC e ES, que nesse trabalho foi associado a AF (Apêndice IV). Também identificamos SNPs para ES que foram identificados associadas a QTL para o índice composto de capacidade leiteira (rs110111160, BTA21:60.066.050 bp) (KOLBEHDARI et al., 2008), PC (BOVINEHD0100039562, BTA1:156730566 bp) (MCCLURE et al., 2010) e profundidade de peito (rs136729009, BTA5:109.344.409 bp) (Boichard et al., 2003).

Cinco termos GO (“aryl sulfotransferase activity”, “sulfotransferase activity”, “sulfation”, “Sulfotransferase domain” e “DOMAIN:Sulfotransfer_1”), que contêm três genes em comum: *SULT1B1* (Sulfotransferase Family 1B Member 1), *SULT1D1* (Sulfotransferase Family 1D Membro 1) e *SULT1E1* (Sulfotransferase Família 1E Membro 1) foram identificados para ECC (Tabela 3), mas nenhum termo significativo foi encontrado para as outras características do grupo força leiteira.

Alguns potenciais genes candidatos estão localizados no BTA5 (*ABCC9* - ATP Binding Cassette Subfamily C Member 9; *LGALS1* - Galectin 1), BTA6 (*GC* - GC Vitamin D Binding Protein; *CSNIS1* - Casein Alpha S1), BTA11 (*MRPS5* - Mitochondrial Ribosomal Protein S5) e BTA20 (*GHR* - Growth Hormone Receptor; *OXCT1* - 3-Oxoacid CoA-Transferase 1; *RPL37* - Ribosomal Protein L37), pois foram associados a características leiteiras em estudos anteriores. *ABCC9* foi associado com profundidade do úbere e características de inserção do úbere anterior (TRIBOUT et al., 2020) e *GHR* com peso ao nascer do bezerro (HARTATI et al., 2019). O *ABCC9* também foi associado à fertilidade de vacas leiteiras, sendo um dos responsáveis pela retomada do ciclo reprodutivo após o parto (NAYERI et al., 2016). *MRPS5* é um gene candidato para o primeiro intervalo de anestro pós-parto em bovinos Nelore e Brahman (MELO et al., 2019). *ABCC9*, *GHR* e *OXCT1* foram associados ao rendimento de gordura e síntese de ácidos graxos do leite em bovinos da raça Holandesa (LI et al., 2014; JIANG et al., 2019). *CSNIS1* e *RPL37* foram associados ao teor de proteína no leite em bovinos German Black Pied (KORKUĆ et al., 2023) e Ayrshire e Jersey (OLIVEIRA et al., 2019).

Os genes *LGALS1* e *GC* foram associados a conferir mecanismos de tolerância imunológica materno-conceptual (CHANEY et al., 2022) e resistência à mastite clínica (LEE et al., 2021) em bovinos leiteiros.

Tabela 8. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados ao escore de condição corporal (ECC) e largura do peito (LP) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Chr	SNP	Localização (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
ECC	BTA3	rs110919821	78.508.362	0,082	-1.661	1,318 x 10 ⁻⁰⁶	<i>MIER1, DNAI4, ENSBTAG00000049696, INSL5, DYNLT5, SGIP1</i>
ECC	BTA3	rs3423155914	79.371.143	0,061	-1.889	1,090 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PDE4B, MGC137454</i>
ECC	BTA3	rs110146466	79.405.288	0,063	-1.883	1,195 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PDE4B, MGC137454</i>
ECC	BTA3	rs42318770	79.398.869	0,058	1.970	2,000 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PDE4B, MGC137454</i>
ECC	BTA5	rs43440584	42.830.228	0,377	0,798	9,539 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PTPRB, PTPRR</i>
ECC	BTA6	rs110434046	87.184.768	0,410	-0,987	4,262 x 10 ⁻⁰⁸	<i>NPFFR2</i>
ECC	BTA6	rs109452259	87.068.809	0,470	-0,895	5,100 x 10 ⁻⁰⁷	<i>GC, ENSBTAG00000049290</i>
ECC	BTA6	rs134055603	87.097.860	0,470	-0,895	5,100 x 10 ⁻⁰⁷	<i>GC</i>
ECC	BTA6	rs110310151	86.996.470	0,484	-0,826	2,604 x 10 ⁻⁰⁶	<i>GC, ENSBTAG00000049290</i>
ECC	BTA6	rs110694875	87.405.290	0,491	-0,842	2,996 x 10 ⁻⁰⁶	<i>NPFFR2, ADAMTS3</i>
ECC	BTA6	rs135052123	85.312.679	0,305	-0,881	3,010 x 10 ⁻⁰⁶	<i>SULT1B1, SULT1D1, SULT1E1, CSN1S1</i>
ECC	BTA6	rs110352004	87.213.962	0,488	-0,810	4,223 x 10 ⁻⁰⁶	<i>NPFFR2</i>
ECC	BTA6	rs109547247	87.000.075	0,484	-0,774	6,977 x 10 ⁻⁰⁶	<i>GC, ENSBTAG00000049290</i>
ECC	BTA6	rs109420430	87.409.266	0,441	-0,820	7,494 x 10 ⁻⁰⁶	<i>NPFFR2, ADAMTS3</i>
ECC	BTA6	rs42766480	87.156.735	0,426	-0,812	1,510 x 10 ⁻⁰⁵	<i>NPFFR2</i>
ECC	BTA21	rs109750686	67.469.826	0,225	0,866	1,720 x 10 ⁻⁰⁵	<i>RCOR1, ENSBTAG00000046633, TRAF3</i>
ECC	BTA22	rs134857381	42.618.135	0,016	2.578	1,595 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG00000020373, FAM3D</i>
ECC	BTA22	rs133236828	42.482.809	0,016	2.553	2,176 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG00000020373</i>
ECC	BTA22	rs109833935	42.628.033	0,015	2.541	2,654 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG00000020373, FAM3D, FAM107A</i>
ECC	BTA28	rs133217149	21.988.457	-1.213	0,085	6,482 x 10 ⁻⁰⁶	-
LP	BTA3	rs41616993	75.767.267	0,325	0,564	1,545 x 10 ⁻⁰⁵	-
LP	BTA7	rs3423241949	29.402.654	0,173	0,793	5,060 x 10 ⁻⁰⁶	-
LP	BTA7	rs41256154	32.035.639	0,170	0,641	1,345 x 10 ⁻⁰⁵	<i>FTMT</i>
LP	BTA7	rs133650669	32.232.465	0,271	0,582	2,426 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG00000054810, ENSBTAG00000003086</i>

LP	BTA7	rs42284427	56.306.169	0,369	-0,760	8,735 x 10 ⁻⁰⁶	-
LP	BTA11	rs43615003	2.006.676	0,096	0,830	1,541 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG00000034657, MRPS5, ZNF514,</i> <i>ENSBTAG00000048358, PROM2, KCNIP3</i>
LP	BTA11	rs110125096	2.124.396	0,096	0,8168	2,012 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PROM2, KCNIP3, FAHD2A, GPAT2</i>
LP	BTA11	rs42848657	24.408.850	0,038	1.257	6,833 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PKDCC</i>
LP	BTA11	rs109414585	25.163.431	0,032	1.382	8,637 x 10 ⁻⁰⁶	<i>MTA3, OXER1, HAAO</i>
LP	BTA11	rs137112475	25.540.060	0,033	1.294	1,514 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ZFP36L2, THADA</i>
LP	BTA11	rs43671061	25.616.082	0,039	-1.280	1,283 x 10 ⁻⁰⁵	<i>THADA</i>
LP	BTA11	rs29018553	26.317.389	0,032	1.410	5,618 x 10 ⁻⁰⁶	-
LP	BTA11	rs42948529	59.551.844	0,294	-0,655	4,306 x 10 ⁻⁰⁶	-
LP	BTA19	rs41911826	34.164.616	0,350	0,567	1,275 x 10 ⁻⁰⁵	<i>B9DI, EPN2, GRAP, SLC5A10, FAM83G,</i> <i>RNF112, MFAP4, MAPK7</i>
LP	BTA28	rs136922313	23.410.406	0,182	0,648	1,403 x 10 ⁻⁰⁵	<i>CTNNA3, LRRTM3</i>
LP	BTA28	rs42139508	23.422.787	0,375	0,586	4,802 x 10 ⁻⁰⁷	<i>CTNNA3, LRRTM3</i>
LP	BTA28	rs137289883	23.730.009	0,315	0,509	1,634 x 10 ⁻⁰⁵	-

BTA – *Bos taurus* autosome

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 9. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à profundidade corporal (PC) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Chr	Variant	Localização (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
PC	BTA3	rs109285537	3.248.489	0,173	-0,678	$1,767 \times 10^{-05}$	<i>TMCO1, ALDH9A1, MGST3</i>
PC	BTA5	rs135033432	86.668.039	0,132	1.040	$1,233 \times 10^{-05}$	<i>SOX5</i>
PC	BTA5	rs135250417	87.757.852	0,408	0,588	$9,405 \times 10^{-07}$	<i>C2CD5</i>
PC	BTA5	rs109795387	88.379.767	0,464	-0,540	$6,275 \times 10^{-06}$	<i>ABCC9, KCNJ8</i>
PC	BTA5	rs136530412	88.687.403	0,460	-0,545	$9,266 \times 10^{-06}$	<i>GYS2, SPX, GOLT1B, RECQL, PYROXD1</i>
PC	BTA9	rs133168118	100.204.200	0,076	-0,868	$6,116 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA9	rs136337205	100.567.862	0,133	0,729	$8,558 \times 10^{-06}$	<i>PDE10A</i>
PC	BTA11	rs109018444	75.301.517	0,335	0,592	$1,825 \times 10^{-05}$	<i>ATAD2B, KLHL29</i>
PC	BTA11	rs133999160	76.738.472	0,421	-0,568	$2,027 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA11	rs137570291	76.829.758	0,492	0,621	$9,135 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA11	rs108938667	76.875.084	0,486	-0,789	$5,640 \times 10^{-08}$	-
PC	BTA11	rs136262208	76.910.156	0,156	-0,748	$2,006 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA11	rs110632976	76.915.355	0,493	-0,717	$6,301 \times 10^{-07}$	-
PC	BTA11	rs3423322590	77.740.182	0,412	-0,635	$2,467 \times 10^{-06}$	<i>TDRD15</i>
PC	BTA14	rs134380044	61.489.677	0,202	-0,640	$2,347 \times 10^{-05}$	<i>ATP6V1C1, AZIN1</i>
PC	BTA20	rs110622993	26.819.224	0,097	-0,799	$1,888 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs109281540	26.918.633	0,074	-1.088	$1,155 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs41601571	26.929.602	0,162	-1.103	$1,013 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs108943316	27.015.667	0,158	0,974	$1,553 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs110731830	27.035.603	0,111	-1.011	$7,378 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs109101658	27.067.049	0,159	-0,771	$9,783 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs135547893	27.091.598	0,104	0,968	$7,668 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs135634336	27.116.615	0,106	-1.057	$7,531 \times 10^{-06}$	-

PC	BTA20	rs41944921	33.748.963	0,213	0,709	$8,778 \times 10^{-06}$	<i>RPL37, PRKAA1, TTC33, PTGER4</i>
PC	BTA20	rs132687807	33.796.269	0,127	-1.057	$7,468 \times 10^{-07}$	<i>PRKAA1, TTC33, PTGER4</i>
PC	BTA20	rs137330216	33.886.801	0,149	0,771	$5,606 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs135463978	34.147.545	0,183	-0,703	$1,310 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs110120167	34.163.269	0,179	-0,847	$8,216 \times 10^{-07}$	-
PC	BTA20	rs134098007	34.187.922	0,129	-0,767	$2,552 \times 10^{-07}$	-
PC	BTA20	rs41939690	34.224.609	0,152	-0,668	$3,856 \times 10^{-07}$	-
PC	BTA20	rs3423475152	34.256.033	0,130	-0,675	$1,350 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs41640156	34.460.986	0,181	-0,769	$6,572 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA20	rs43762676	34.507.773	0,189	0,645	$1,040 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA20	rs29013890	34.800.041	0,138	-0,768	$2,887 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA22	rs110475161	58.788.655	0,154	0,644	$1,971 \times 10^{-05}$	<i>IQSEC1</i>
PC	BTA26	rs137381370	28.713.815	0,041	1.775	$3,155 \times 10^{-06}$	-
PC	BTA26	rs137837731	28.776.880	0,038	1.824	$1,112 \times 10^{-05}$	-
PC	BTA26	rs137141124	42.096.145	0,457	-0,559	$2,428 \times 10^{-05}$	<i>TACC2, BTBD16</i>

BTA – *Bos taurus* autosome

Fonte: Elaboração Própria.

Tabela 10. Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) associados à capacidade leiteira (CL), altura frontal (AF) e estatura (ES) e os genes posicionais correspondentes identificados.

Trait	Chr	Variant	Localização (bp)	MAF	Effect	P-valor	Genes
CL	BTA2	rs42530075	59.249.406	0,011	-2.276	5,248 x 10 ⁻⁰⁶	<i>HNMT</i>
CL	BTA2	rs42530109	59.353.958	0,012	2.276	5,248 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG000000039437</i>
CL	BTA8	rs43559726	62.766.388	0,17	-0,871	1,180 x 10 ⁻⁰⁵	<i>TDRD7, TMOD1, TSTD2, NCBP1</i>
CL	BTA8	rs43571286	78.118.013	0,137	1.140	3,566 x 10 ⁻⁰⁷	<i>NTRK2</i>
CL	BTA8	rs41590554	78.350.218	0,171	0,918	1,770 x 10 ⁻⁰⁵	<i>NTRK2</i>
CL	BTA8	rs134395443	78.566.341	0,17	0,998	7,943 x 10 ⁻⁰⁶	-
CL	BTA8	rs109853697	78.583.825	0,212	0,887	1,516 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG000000050767</i>
CL	BTA8	rs110135009	78.585.174	0,498	-0,708	1,596 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG000000050767</i>
CL	BTA8	rs42710122	78.587.452	0,258	0,841	8,545 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG000000050767</i>
CL	BTA8	rs42360833	79.729.695	0,258	0,783	2,344 x 10 ⁻⁰⁵	-
CL	BTA8	rs134625094	80.674.372	0,127	1.172	1,164 x 10 ⁻⁰⁶	<i>DAPK1</i>
CL	BTA8	rs43734710	82.161.159	0,144	1.079	1,675 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PTCH1</i>
CL	BTA8	rs137341434	82.787.089	0,129	1.149	1,065 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ERCC6L2, ENSBTAG000000053599</i>
CL	BTA8	rs43568478	83.673.324	0,151	-1.039	4,041 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG000000009764</i>
CL	BTA8	rs43568461	83.687.485	0,185	-0,901	2,623 x 10 ⁻⁰⁶	<i>ENSBTAG000000009764</i>
CL	BTA8	rs110495184	83.707.862	0,126	1.237	4,450 x 10 ⁻⁰⁷	<i>ENSBTAG000000009764, ZNF484</i>
CL	BTA9	rs110091464	20.235.961	0,214	-0,860	1,595 x 10 ⁻⁰⁵	-
CL	BTA19	rs137606216	28.575.558	0,212	0,905	1,612 x 10 ⁻⁰⁶	<i>NTN1, STX8</i>
CL	BTA19	rs110053512	28.598.941	0,266	0,773	1,099 x 10 ⁻⁰⁵	<i>NTN1, STX8</i>
CL	BTA20	rs137289069	23.431.592	0,242	-0,812	5,788 x 10 ⁻⁰⁶	<i>IL31RA, DDX4, SLC38A9</i>
CL	BTA20	rs110475392	26.060.070	0,324	-0,754	1,756 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MOCS2, ITGA2, ITGA1</i>
CL	BTA20	rs111000237	27.202.535	0,241	-0,799	1,456 x 10 ⁻⁰⁵	-
CL	BTA20	rs137532092	27.329.790	0,281	0,780	1,358 x 10 ⁻⁰⁵	-
CL	BTA23	rs137079734	34.479.993	0,193	-0,850	1,539 x 10 ⁻⁰⁵	<i>ENSBTAG000000038430</i>
CL	BTA25	rs42067830	35.354.001	0,171	0,795	7,849 x 10 ⁻⁰⁶	<i>COL26A1, IFT22, FIS1</i>

CL	BTA25	rs42066764	35.399.705	0,243	-0,718	1,574 x 10 ⁻⁰⁵	<i>COL26A1, IFT22, FIS1, CLDN15, ZNHIT1, PLOD3</i>
CL	BTA26	rs135535498	44.187.259	0,493	0,624	2,094 x 10 ⁻⁰⁵	<i>LHPP, FAM53B</i>
AF	BTA3	rs43345563	77.599.781	0,281	-2.114	8,686 x 10 ⁻⁰⁶	<i>GNG12, GADD45A</i>
AF	BTA8	rs43581101	110.185.962	0,034	-5.065	7,883 x 10 ⁻⁰⁶	<i>MEGF9, FBXW2, B3GALT9, PSMD5, CUTAL, PHF19</i>
AF	BTA16	rs42464469	57.526.937	0,324	1.720	1,744 x 10 ⁻⁰⁵	-
AF	BTA17	rs137254844	42.276.117	0,025	-4.772	5,667 x 10 ⁻⁰⁶	<i>PDGFC</i>
ES	BTA1	BOVINEHD 0100039562	156.730.566	0,048	10.368	7,770 x 10 ⁻⁰⁷	<i>KCNH8</i>
ES	BTA1	rs42948748	156.744.423	0,035	-10.847	2,789 x 10 ⁻⁰⁶	<i>KCNH8</i>
ES	BTA5	rs136729009	109.344.409	0,160	-5.695	1,711 x 10 ⁻⁰⁵	<i>MICAL3, PEX26, TUBA8, CDC42EP1, LGALS2</i>
ES	BTA5	rs133183974	109.392.964	0,043	-12.514	1,095 x 10 ⁻⁰⁵	<i>PEX26, TUBA8, CDC42EP1, LGALS2, GGA1, SH3BP1</i>
ES	BTA5	rs110365530	109.615.284	0,086	6.906	6,646 x 10 ⁻⁰⁶	<i>LGALS1, NOL12, TRIOBP, ENSBTAG00000048772, GCAT, GALR3, ANKRD54, EIF3L, MICALL1</i>
ES	BTA10	rs109396576	77.708.611	0,058	8.819	3,597 x 10 ⁻⁰⁶	<i>FUT8</i>
ES	BTA21	rs110111160	60.066.050	0,224	-4.869	1,412 x 10 ⁻⁰⁵	<i>DICER1, CLMN</i>

BTA – *Bos taurus* autosome

Fonte: Elaboração Própria.

Conclusões

As análises de associação genômica ampla identificaram SNPs significativamente associados a características de conformação corporal em quase todos os BTAs. As regiões ao redor ($\pm 100\text{kb}$) dos SNPs significativos se sobrepõem com vários locos de características quantitativas (QTL) previamente relatados para exterior, saúde, carne e carcaça, produção de leite e características reprodutivas. Um total de 233 SNPs significativos ao nível genômico, 27 termos de ontologia gênica e vias biológicas foram enriquecidos, 256 QTLs e 310 potenciais genes candidatos foram encontrados. Esses genes estão envolvidos em vias biológicas associadas ao desenvolvimento ósseo, metabolismo, doenças, reprodução e produção de leite. Esses resultados contribuem para melhorar a compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes à expressão fenotípica de características de conformação corporal, o que pode ser útil para melhorar a avaliação genômica em bovinos da raça Holandesa.

Referências Bibliográficas

- Abdalla, I.M., X. Lu, M. Nazar, A.A.I. Arbab, T. Xu, M.H. Yousif, Y. Mao, and Z. Yang. 2021. Genome-wide association study identifies candidate genes associated with feet and leg conformation traits in chinese holstein cattle. *Animals* 11. doi:10.3390/ani11082259.
- Abo-Ismael, M.K., L.F. Brito, S.P. Miller, M. Sargolzaei, D.A. Grossi, S.S. Moore, G. Plastow, P. Stothard, S. Nayeri, and F.S. Schenkel. 2017. Genome-wide association studies and genomic prediction of breeding values for calving performance and body conformation traits in Holstein cattle. *Genetics Selection Evolution* 49:82. doi:10.1186/s12711-017-0356-8.
- Alcantara, L.M., C.F. Baes, G.A. de O. Junior, and F.S. Schenkel. 2022. Conformation traits of Holstein cows and their association with a Canadian economic selection index. *Can J Anim Sci* 102:490–500. doi:10.1139/cjas-2022-0013.
- An, B., Xu, L., Xia, J., Wang, X., Miao, J., Chang, T., Song, M., Ni, J., Xu, L., Zhang, L., Li, J., & Gao, H. (2020). Multiple association analysis of loci and candidate genes that regulate body size at three growth stages in Simmental beef cattle. *BMC Genetics*, 21(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12863-020-0837-6>

- Andre, P., Q. Wang, N. Wang, B. Gao, A. Schilit, M.M. Halford, S.A. Stacker, X. Zhang, and Y. Yang. 2012. The Wnt Coreceptor Ryk Regulates Wnt/Planar Cell Polarity by Modulating the Degradation of the Core Planar Cell Polarity Component Vangl2. *Journal of Biological Chemistry* 287:44518–44525. doi:10.1074/jbc.M112.414441.
- Atkins, G., and J. Shannon. 2002. Minimizing Lameness through Genetic Selection Take Home Messages.
- Ashwell, M. S., Heyen, D. W., Weller, J. I., Ron, M., Sonstegard, T. S., Van Tassell, C. P., & Lewin, H. A. (2005). Detection of Quantitative Trait Loci Influencing Conformation Traits and Calving Ease in Holstein-Friesian Cattle. *Journal of Dairy Science*, 88(11), 4111–4119. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(05\)73095-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(05)73095-2)
- Bacanu, S.A., B. Devlin, and K. Roeder. 2000. The Power of Genomic Control. *The American Journal of Human Genetics* 66:1933–1944. doi:10.1086/302929.
- Boichard, D., Grohs, C., Bourgeois, F., Cerqueira, F., Faugeras, R., Neau, A., Rupp, R., Amigues, Y., Boscher, M. Y., & Levéziel, H. (2003). Detection of genes influencing economic traits in three French dairy cattle breeds. *Genetics Selection Evolution*, 35(1), 77. <https://doi.org/10.1186/1297-9686-35-1-77>
- Bordbar, F., J. Jensen, B. Zhu, Z. Wang, L. Xu, T. Chang, L. Xu, M. Du, L. Zhang, H. Gao, L. Xu, and J. Li. 2019. Identification of muscle-specific candidate genes in Simmental beef cattle using imputed next generation sequencing. *PLoS One* 14:e0223671-.
- Breckpot, J., B.-M. Anderlid, Y. Alanay, M. Blyth, A. Brahimi, B. Duban-Bedu, O. Gozé, H. Firth, M.C. Yakicier, G. Hens, M. Rayyan, E. Legius, J.R. Vermeesch, and K. Devriendt. 2016. Chromosome 22q12.1 microdeletions: confirmation of the MN1 gene as a candidate gene for cleft palate. *European Journal of Human Genetics* 24:51–58. doi:10.1038/ejhg.2015.65.
- Cha, E., J.A. Hertl, D. Bar, and Y.T. Gröhn. 2010. The cost of different types of lameness in dairy cows calculated by dynamic programming. *Prev Vet Med* 97:1–8. doi:10.1016/j.prevetmed.2010.07.011.
- Chaney, H.L., L.F. Grose, J.M. LaBarbara, A.W. Sirk, A.M. Blancke, J.M. Sánchez, C. Passaro, P. Lonergan, and D.J. Mathew. 2022. Galectin-1 induces gene and

protein expression related to maternal-conceptus immune tolerance in bovine endometrium. *Biol Reprod* 106:487–502. doi:10.1093/biolre/ioab215.

- Chapinal, N., A. Koeck, A. Sewalem, D.F. Kelton, S. Mason, G. Cramer, and F. Miglior. 2013. Genetic parameters for hoof lesions and their relationship with feet and leg traits in Canadian Holstein cows. *J Dairy Sci* 96:2596–2604. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2012-6071.
- Čítek, J., M. Brzáková, J. Bauer, L. Tichý, Z. Sztankóová, L. Vostrý, and Y. Steyn. 2022. Genome-Wide Association Study for Body Conformation Traits and Fitness in Czech Holsteins. *Animals* 12. doi:10.3390/ani12243522.
- Cole, J.B., G.R. Wiggans, L. Ma, T.S. Sonstegard, T.J. Lawlor, B.A. Crooker, C.P. Van Tassell, J. Yang, S. Wang, L.K. Matukumalli, and Y. Da. 2011. Genome-wide association analysis of thirty one production, health, reproduction and body conformation traits in contemporary U.S. Holstein cows. *BMC Genomics* 12:408. doi:10.1186/1471-2164-12-408.
- Das, S., L. Forer, S. Schönherr, C. Sidore, A.E. Locke, A. Kwong, S.I. Vrieze, E.Y. Chew, S. Levy, M. McGue, D. Schlessinger, D. Stambolian, P.R. Loh, W.G. Iacono, A. Swaroop, L.J. Scott, F. Cucca, F. Kronenberg, M. Boehnke, G.R. Abecasis, and C. Fuchsberger. 2016. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet* 48:1284–1287. doi:10.1038/ng.3656.
- Ding, Z., Y. Chen, Y. Zhen, Y. Wang, W. Deng, J. Zheng, Q. Yang, Z. Chen, H. Jiang, and X. Li. Suppression of RANKL-induced osteoclast differentiation to alleviate osteoporosis by targeting PPP1R15A.
- Drögemüller, C., T. Leeb, B. Harlizius, I. Tammen, O. Distl, M. Höltershinken, A. Gentile, A. Duchesne, and A. Eggen. 2007. Congenital syndactyly in cattle: four novel mutations in the low density lipoprotein receptor-related protein 4 gene (LRP4). *BMC Genet* 8:5. doi:10.1186/1471-2156-8-5.
- Duchesne, A., M. Gautier, S. Chadi, C. Grohs, S. Floriot, Y. Gallard, G. Caste, A. Ducos, and A. Eggen. 2006. Identification of a doublet missense substitution in the bovine LRP4 gene as a candidate causal mutation for syndactyly in Holstein cattle. *Genomics* 88:610–621. doi:https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.05.007.
- Fleming, A., E.A. Abdalla, C. Maltecca, and C.F. Baes. 2018. Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for

- genetic progress in dairy cattle. *Arch Anim Breed* 61:43–57. doi:10.5194/aab-61-43-2018.
- Fonseca, P.A.S., A. Suárez-Vega, G. Marras, and Á. Cánovas. 2020. GALLO: An R package for genomic annotation and integration of multiple data sources in livestock for positional candidate loci. *Gigascience* 9. doi:10.1093/gigascience/giaa149.
- Gaillard, I., S. Rouquier, and D. Giorgi. 2004. Olfactory receptors. *Cell Mol Life Sci* 61:456–469. doi:10.1007/s00018-003-3273-7.
- Garvey, M. 2022. Lameness in Dairy Cow Herds: Disease Aetiology, Prevention and Management. *Dairy* 3:199–210. doi:10.3390/dairy3010016.
- Goddard, M.E., B.J. Hayes, and T.H.E. Meuwissen. 2011. Using the genomic relationship matrix to predict the accuracy of genomic selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics* 128:409–421. doi:10.1111/j.1439-0388.2011.00964.x.
- Gutiérrez-Reinoso, M.A., P.M. Aponte, and M. García-Herreros. 2023. Genomic and Phenotypic Udder Evaluation for Dairy Cattle Selection: A Review. *Animals* 13. doi:10.3390/ani13101588.
- Hartati, H., B. Soewandi, A. Hapsari, S. Anwar, and D. Pamungkas. 2019. Identification of GH|MspI and GHR|AluI Gene Polymorphism and its Association with Calf Birth Weight of Grati-PO Cattle. *Jurnal Ilmu Ternak dan Veteriner* 24:49. doi:10.14334/jitv.v24i2.1939.
- Hoebel, A.K., D. Drichel, M. Van De Vorst, A.C. Böhmer, S. Sivalingam, N. Ishorst, J. Klamt, L. Götz, M. Alblas, A. Maaser, K. Keppler, A.M. Zink, M.J. Dixon, J. Dixon, A. Hemprich, T. Kruse, I. Graf, A. Dunsche, G. Schmidt, N. Daratsianos, S. Nowak, K.A. Aldhorae, M.M. Nöthen, M. Knapp, H. Thiele, C. Gilissen, H. Reutter, A. Hoischen, E. Mangold, and K.U. Ludwig. 2017. Candidate Genes for Nonsyndromic Cleft Palate Detected by Exome Sequencing. *J Dent Res* 96:1314–1321. doi:10.1177/0022034517722761.
- Holstein Canada. 2017. Classification Traits Breakdown. Accessed June 1, 2023. https://www.holstein.ca/Public/en/Services/Classification/All-Breeds_Classification.

- Holstein Canada. 2021. Function Conformation Traits Breakdown. Accessed June 1, 2023. https://www.holstein.ca/Public/en/Services/Classification/Breakdown_of_Traits.
- Hu, Z.L., C.A. Park, and J.M. Reecy. 2019. Building a livestock genetic and genomic information knowledgebase through integrative developments of Animal QTLdb and CorrDB. *Nucleic Acids Res* 47:D701–D710. doi:10.1093/nar/gky1084.
- Huang, D.W., B.T. Sherman, X. Zheng, J. Yang, T. Imamichi, R. Stephens, and R.A. Lempicki. 2009. Extracting biological meaning from large gene lists with DAVID. *Curr Protoc Bioinformatics*. doi:10.1002/0471250953.bi1311s27.
- ICAR. 2015. Assessing Linear Conformation Traits Drawings and Descriptions.
- Jagusiak, W., E. Ptak, A. Żarnecki, and A. Satoła. 2014. The relationship between fertility and intermediate optimum type traits in Polish Holstein-Friesian cows. *J Anim Feed Sci* 23:23–28. doi:10.22358/jafs/65712/2014.
- Jiang, J., L. Ma, D. Prakapenka, P.M. VanRaden, J.B. Cole, and Y. Da. 2019. A Large-Scale Genome-Wide Association Study in U.S. Holstein Cattle. *Front Genet* 10. doi:10.3389/fgene.2019.00412.
- Johnson, R.C., G.W. Nelson, J.L. Troyer, J.A. Lautenberger, B.D. Kessing, C.A. Winkler, and S.J. O'Brien. 2010. Accounting for multiple comparisons in a genome-wide association study (GWAS). *BMC Genomics* 11. doi:10.1186/1471-2164-11-724.
- Kolbehdari, D., Wang, Z., Grant, J. R., Murdoch, B., Prasad, A., Xiu, Z., Marques, E., Stothard, P., & Moore, S. S. (2008). A Whole-Genome Scan to Map Quantitative Trait Loci for Conformation and Functional Traits in Canadian Holstein Bulls. *Journal of Dairy Science*, 91(7), 2844–2856. <https://doi.org/10.3168/jds.2007-0585>
- Korkuć, P., G.B. Neumann, D. Hesse, D. Arends, M. Reißmann, S. Rahmatalla, K. May, M.J. Wolf, S. König, and G.A. Brockmann. 2023. Whole-Genome Sequencing Data Reveal New Loci Affecting Milk Production in German Black Pied Cattle (DSN). *Genes (Basel)* 14:581. doi:10.3390/genes14030581.
- Lactanet. 2021. Heritability Estimates Used for Genetic Evaluation in Canada. Accessed June 1, 2023. <https://lactanet.ca/en/heritability-estimates-used-for-genetic-evaluation-in-canada/>.

- Lai, E., A.L. Danner, T.R. Famula, and A.M. Oberbauer. 2021. Genome-Wide Association Studies Reveal Susceptibility Loci for Noninfectious Claw Lesions in Holstein Dairy Cattle. *Front Genet* 12. doi:10.3389/fgene.2021.657375.
- Larsson, C., M.A. Ali, T. Pandzic, A.M. Lindroth, L. He, and T. Sjöblom. 2017. Loss of DIP2C in RKO cells stimulates changes in DNA methylation and epithelial-mesenchymal transition. *BMC Cancer* 17:487. doi:10.1186/s12885-017-3472-5.
- Lee, Y.-L., H. Takeda, G. Costa Monteiro Moreira, L. Karim, E. Mullaart, W. Coppieters, R. Appeltant, R.F. Veerkamp, M.A.M. Groenen, M. Georges, M. Bosse, T. Druet, A.C. Bouwman, and C. Charlier. 2021. A 12 kb multi-allelic copy number variation encompassing a GC gene enhancer is associated with mastitis resistance in dairy cattle. *PLoS Genet* 17:e1009331. doi:10.1371/journal.pgen.1009331.
- Li, C., D. Sun, S. Zhang, S. Wang, X. Wu, Q. Zhang, L. Liu, Y. Li, and L. Qiao. 2014. Genome Wide Association Study Identifies 20 Novel Promising Genes Associated with Milk Fatty Acid Traits in Chinese Holstein. *PLoS One* 9:e96186. doi:10.1371/journal.pone.0096186.
- Li, X., A.J. Buitenhuis, M.S. Lund, C. Li, D. Sun, Q. Zhang, N.A. Poulsen, and G. Su. 2015. Joint genome-wide association study for milk fatty acid traits in Chinese and Danish Holstein populations. *J Dairy Sci* 98:8152–8163. doi:10.3168/JDS.2015-9383.
- Liu, J., Y. Li, M. Luo, Z. Yuan, and J. Liu. 2017. MicroRNA-214 inhibits the osteogenic differentiation of human osteoblasts through the direct regulation of baculoviral IAP repeat-containing 7. *Exp Cell Res* 351:157–162. doi:https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2017.01.006.
- Liu, T., X. Zheng, C. Wang, C. Wang, S. Jiang, B. Li, P. Chen, W. Xu, H. Zheng, R. Yang, X. Huang, X. Zhang, and L. Jiang. 2021. The m6A “reader” YTHDF1 promotes osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells through translational control of ZNF839. *Cell Death Dis* 12. doi:10.1038/s41419-021-04312-4.
- Loh, P.-R., P. Danecek, P.F. Palamara, C. Fuchsberger, Y. A Reshef, H. K Finucane, S. Schoenherr, L. Forer, S. McCarthy, G.R. Abecasis, R. Durbin, and A. L Price. 2016. Reference-based phasing using the Haplotype Reference Consortium panel. *Nat Genet* 48:1443–1448. doi:10.1038/ng.3679.

- Lu, X., A.A.I. Arbab, Z. Zhang, Y. Fan, Z. Han, Q. Gao, Y. Sun, and Z. Yang. 2020. Comparative transcriptomic analysis of the pituitary gland between cattle breeds differing in growth: Yunling cattle and leiqiong cattle. *Animals* 10:1–18. doi:10.3390/ani10081271.
- Ma, X., C. Gao, M. Yang, B. Zhang, X. Chuang, and W. Yang. 2022. Characteristics and prediction of subclinical hypocalcemia in dairy cows during the transition period using blood analytes. *Med Weter* 78:31–35. doi:10.21521/mw.6607.
- Makanjuola, B.O., F. Miglior, E.A. Abdalla, C. Maltecca, F.S. Schenkel, and C.F. Baes. 2020. Effect of genomic selection on rate of inbreeding and coancestry and effective population size of Holstein and Jersey cattle populations. *J Dairy Sci* 103:5183–5199. doi:10.3168/JDS.2019-18013.
- Malchiodi, F., J. Jamrozik, A.M. Christen, A. Fleming, G.J. Kistemaker, C. Richardson, V. Daniel, D.F. Kelton, F.S. Schenkel, and F. Miglior. 2020. Symposium review: Multiple-trait single-step genomic evaluation for hoof health. *J Dairy Sci* 103:5346–5353. doi:10.3168/jds.2019-17755.
- Manafiazar, G., L. Goonewardene, F. Miglior, D.H. Crews, J.A. Basarab, E. Okine, and Z. Wang. 2016. Genetic and phenotypic correlations among feed efficiency, production and selected conformation traits in dairy cows. *Animal* 10:381–389. doi:10.1017/S1751731115002281.
- Martins, B.M., A.L.C. Mendes, L.F. Silva, T.R. Moreira, J.H.C. Costa, P.P. Rotta, M.L. Chizzotti, and M.I. Marcondes. 2020. Estimating body weight, body condition score, and type traits in dairy cows using three dimensional cameras and manual body measurements. *Livest Sci* 236:104054. doi:10.1016/j.livsci.2020.104054.
- McClure, M. C., Morsci, N. S., Schnabel, R. D., Kim, J. W., Yao, P., Rolf, M. M., McKay, S. D., Gregg, S. J., Chapple, R. H., Northcutt, S. L., & Taylor, J. F. (2010). A genome scan for quantitative trait loci influencing carcass, post-natal growth and reproductive traits in commercial Angus cattle. *Animal Genetics*, 41(6), 597–607. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.2010.02063.x>
- Melo, T.P., M.R.S. Fortes, G.A. Fernandes Junior, L.G. Albuquerque, and R. Carneiro. 2019. RAPID COMMUNICATION: Multi-breed validation study unraveled genomic regions associated with puberty traits segregating across tropically adapted breeds1. *J Anim Sci* 97:3027–3033. doi:10.1093/jas/skz121.

- Miglior, F., A. Fleming, F. Malchiodi, L.F. Brito, P. Martin, and C.F. Baes. 2017. A 100-Year Review: Identification and genetic selection of economically important traits in dairy cattle. *J Dairy Sci* 100:10251–10271. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2017-12968>.
- Nayeri, S., M. Sargolzaei, M.K. Abo-Ismael, N. May, S.P. Miller, F. Schenkel, S.S. Moore, and P. Stothard. 2016. Genome-wide association for milk production and female fertility traits in Canadian dairy Holstein cattle. *BMC Genet* 17:75. doi:10.1186/s12863-016-0386-1.
- Oliveira, H.R., D.A.L. Lourenco, Y. Masuda, I. Misztal, S. Tsuruta, J. Jamrozik, L.F. Brito, F.F. Silva, J.P. Cant, and F.S. Schenkel. 2019. Single-step genome-wide association for longitudinal traits of Canadian Ayrshire, Holstein, and Jersey dairy cattle. *J Dairy Sci* 102:9995–10011. doi:10.3168/jds.2019-16821.
- Oliveira Junior, G.A., F.S. Schenkel, L. Alcantara, K. Houlihan, C. Lynch, and C.F. Baes. 2021. Estimated genetic parameters for all genetically evaluated traits in Canadian Holsteins. *J Dairy Sci* 104:9002–9015. doi:10.3168/jds.2021-20227.
- Onyiro, O.M., and S. Brotherstone. 2008. Genetic Analysis of Locomotion and Associated Conformation Traits of Holstein-Friesian Dairy Cows Managed in Different Housing Systems. *J Dairy Sci* 91:322–328. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2007-0514>.
- O’Searghda, C.M., H. Wu, Q. Yang, K. Kapur, I. Guessous, A.M. Zuber, A. Köttgen, C. Stoudmann, A. Teumer, Z. Kutalik, M. Mangino, A. Dehghan, W. Zhang, G. Eiriksdottir, G. Li, T. Tanaka, L. Portas, L.M. Lopez, C. Hayward, K. Lohman, K. Matsuda, S. Padmanabhan, D. Firsov, R. Sorice, S. Ulivi, A.C. Brockhaus, M.E. Kleber, A. Mahajan, F.D. Ernst, V. Gudnason, L.J. Launer, A. Mace, E. Boerwinckle, D.E. Arking, C. Tanikawa, Y. Nakamura, M.J. Brown, J.-M. Gaspoz, J.-M. Theler, D.S. Siscovick, B.M. Psaty, S. Bergmann, P. Vollenweider, V. Vitart, A.F. Wright, T. Zemunik, M. Boban, I. Kolcic, P. Navarro, E.M. Brown, K. Estrada, J. Ding, T.B. Harris, S. Bandinelli, D. Hernandez, A.B. Singleton, G. Girotto, D. Ruggiero, A.P. d’Adamo, A. Robino, T. Meitinger, C. Meisinger, G. Davies, J.M. Starr, J.C. Chambers, B.O. Boehm, B.R. Winkelmann, J. Huang, F. Murgia, S.H. Wild, H. Campbell, A.P. Morris, O.H. Franco, A. Hofman, A.G. Uitterlinden, F. Rivadeneira, U. Völker, A. Hannemann, R. Biffar, W. Hoffmann,

- S. Shin, P. Lescuyer, H. Henry, C. Schurmann, T.S. consortium, T.G. consortium, P.B. Munroe, P. Gasparini, N. Pirastu, M. Ciullo, C. Gieger, W. März, L. Lind, T.D. Spector, A. V Smith, I. Rudan, J.F. Wilson, O. Polasek, I.J. Deary, M. Pirastu, L. Ferrucci, Y. Liu, B. Kestenbaum, J.S. Kooner, J.C.M. Witteman, M. Nauck, W.H.L. Kao, H. Wallaschofski, O. Bonny, C.S. Fox, and M. Bochud. 2013. Meta-Analysis of Genome-Wide Association Studies Identifies Six New Loci for Serum Calcium Concentrations. *PLoS Genet* 9:e1003796-.
- Padodara, R., and N. Jacob. 2014. Olfactory Sense in Different Animals.
- Pérez-Cabal, M.A., and N. Charfeddine. 2016. Short communication: Association of foot and leg conformation and body weight with claw disorders in Spanish Holstein cows. *J Dairy Sci* 99:9104–9108. doi:<https://doi.org/10.3168/jds.2016-11331>.
- Privé, F., H. Aschard, A. Ziyatdinov, and M.G.B. Blum. 2018. Efficient analysis of large-scale genome-wide data with two R packages: Bigstatsr and bigsnpr. *Bioinformatics* 34:2781–2787. doi:10.1093/bioinformatics/bty185.
- Purcell, S., B. Neale, K. Todd-Brown, L. Thomas, M.A.R. Ferreira, D. Bender, J. Maller, P. Sklar, P.I.W. De Bakker, M.J. Daly, and P.C. Sham. 2007. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 81:559–575. doi:10.1086/519795.
- Rajasekaran, S., D.C.R. Soundararajan, S.M. Nayagam, C. Tangavel, M. Raveendran, K.S.S.V. Anand, A.P. Shetty, and R.M. Kanna. 2023. Novel Biomarkers of Health and Degeneration in Human Intervertebral Discs: In-depth Proteomic Analysis of Collagen Framework of Fetal, Healthy, Scoliotic, Degenerate, and Herniated Discs. *Asian Spine J* 17:17–29. doi:10.31616/asj.2021.0535.
- Roche, J.R., N.C. Friggens, J.K. Kay, M.W. Fisher, K.J. Stafford, and D.P. Berry. 2009. Invited review: Body condition score and its association with dairy cow productivity, health, and welfare. *J Dairy Sci* 92:5769–5801. doi:10.3168/jds.2009-2431.
- Ruiz-De-La-Cruz, G., A.M. Sifuentes-Rincón, F.A. Paredes-Sánchez, G.M. Parra-Bracamonte, E. Casas, T.H. Welsh, D.G. Riley, G. Perry, and R.D. Randel. 2023. Characterization of intronic SNP located in candidate genes influencing cattle temperament. *Revista Brasileira de Zootecnia* 52. doi:10.37496/rbz5220220057.

- Ryu, J., Y. Kim, C. Kim, J. Kim, and C. Lee. 2012. Association of bovine carcass phenotypes with genes in an adaptive thermogenesis pathway. *Mol Biol Rep* 39:1441–1445. doi:10.1007/s11033-011-0880-5.
- San Juan, I.G., L.A. Nash, K.S. Smith, M.F. Leyton-Jaimes, M. Qian, J.R. Klim, F. Limone, A.B. Dorr, A. Couto, G. Pintacuda, B.J. Joseph, D.E. Whisenant, C. Noble, V. Melnik, D. Potter, A. Holmes, A. Burberry, M. Verhage, and K. Eggan. 2022. Loss of mouse *Stmn2* function causes motor neuropathy. *Neuron* 110:1671–1688.e6. doi:10.1016/j.neuron.2022.02.011.
- Schmidtman, C., D. Segelke, J. Bennewitz, J. Tetens, and G. Thaller. 2023. Genetic analysis of production traits and body size measurements and their relationships with metabolic diseases in German Holstein cattle. *J Dairy Sci* 106:421–438. doi:https://doi.org/10.3168/jds.2022-22363.
- Simic, P., and J.L. Babitt. 2021. Regulation of FGF23: Beyond Bone. *Curr Osteoporos Rep* 19:563–573. doi:10.1007/s11914-021-00703-w.
- Thinesswary, Y., O.K. Chai, P. David, and W.K. Thong. 2018. RSAD2 and AIM2 Modulate Cocksackievirus A16 and Enterovirus A71 Replication in Neuronal Cells in Different Ways That May Be Associated with Their 5' Nontranslated Regions. *J Virol* 92:10.1128/jvi.01914-17. doi:10.1128/jvi.01914-17.
- Thomson, J.M., V. Bowles, J.-W. Choi, U. Basu, Y. Meng, P. Stothard, and S. Moore. 2012. The identification of candidate genes and SNP markers for classical bovine spongiform encephalopathy susceptibility. *Prion* 6:461–469. doi:10.4161/pri.21866.
- Tribout, T., P. Croiseau, R. Lefebvre, A. Barbat, M. Boussaha, S. Fritz, D. Boichard, C. Hoze, and M.-P. Sanchez. 2020. Confirmed effects of candidate variants for milk production, udder health, and udder morphology in dairy cattle. *Genetics Selection Evolution* 52:55. doi:10.1186/s12711-020-00575-1.
- Tschoner, T., Y. Zablotski, and M. Feist. 2021. Retrospective evaluation of claw lesions, inflammatory markers, and outcome after abomasal rolling in cattle with left displacement of the abomasum. *Animals* 11. doi:10.3390/ani11061648.
- VanRaden, P.M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci* 91:4414–4423. doi:10.3168/jds.2007-0980.

- VanRaden, P.M., M.E. Tooker, J.R. O'Connell, J.B. Cole, and D.M. Bickhart. 2017. Selecting sequence variants to improve genomic predictions for dairy cattle. *Genetics Selection Evolution* 49. doi:10.1186/s12711-017-0307-4.
- Wang, X., Y. Li, G. Qiang, K. Wang, J. Dai, M. McCann, M.D. Munoz, V. Gil, Y. Yu, S. Li, Z. Yang, S. Xu, J. Cordoba-Chacon, D.F. De Jesus, B. Sun, K. Chen, Y. Wang, X. Liu, Q. Miao, L. Zhou, R. Hu, Q. Ding, R.N. Kulkarni, D. Gao, M. Blüher, and C.W. Liew. 2022. Secreted EMC10 is upregulated in human obesity and its neutralizing antibody prevents diet-induced obesity in mice. *Nat Commun* 13:7323. doi:10.1038/s41467-022-34259-9.
- Wang, Z., B. Shen, J. Jiang, J. Li, and L. Ma. 2016. Effect of sex, age and genetics on crossover interference in cattle. *Sci Rep* 6. doi:10.1038/srep37698.
- Wei, W., P.A. Dutchak, X. Wang, X. Ding, X. Wang, A.L. Bookout, R. Goetz, M. Mohammadi, R.D. Gerard, P.C. Dechow, D.J. Mangelsdorf, S.A. Kliewer, and Y. Wan. 2012. Fibroblast growth factor 21 promotes bone loss by potentiating the effects of peroxisome proliferator-activated receptor γ . *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:3143–3148. doi:10.1073/pnas.1200797109.
- Whay, H.R., A.E. Waterman, A.J.F. Webster, and J.K. O'Brien. 1998. The influence of lesion type on the duration of hyperalgesia associated with hindlimb lameness in dairy cattle. *The Veterinary Journal* 156:23–29. doi:10.1016/S1090-0233(98)80058-0.
- Wu, X., M. Fang, L. Liu, S. Wang, J. Liu, X. Ding, S. Zhang, Q. Zhang, Y. Zhang, L. Qiao, M.S. Lund, G. Su, and D. Sun. 2013. Genome wide association studies for body conformation traits in the Chinese Holstein cattle population. *BMC Genomics* 14:897. doi:10.1186/1471-2164-14-897.
- Yang, J., S.H. Lee, M.E. Goddard, and P.M. Visscher. 2011. GCTA: A tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet* 88:76–82. doi:10.1016/j.ajhg.2010.11.011.
- Yang, J., N.A. Zaitlen, M.E. Goddard, P.M. Visscher, and A.L. Price. 2014. Advantages and pitfalls in the application of mixed-model association methods. *Nat Genet* 46:100–106. doi:10.1038/ng.2876.

- Zaman, F., D. Chrysis, K. Huntjens, B. Fadeel, and L. Sävendahl. 2012. Ablation of the Pro-Apoptotic Protein Bax Protects Mice from Glucocorticoid-Induced Bone Growth Impairment. *PLoS One* 7:e33168-.
- Zavadilová, L., and M. Štípková. 2012. Genetic correlations between longevity and conformation traits in the Czech Holstein population. *Czech Journal of Animal Science* 57:125–136. doi:10.17221/5566-CJAS.

Considerações Finais e Implicações

Este trabalho identificou numerosas regiões genômicas e potenciais genes candidatos associados a características de saúde do casco e conformação em bovinos da raça Holandesa. Em muitos estudos anteriores de associação genômica ampla (GWAS) para características de conformação em Holandesa, painéis SNP de densidade média (**MD**) foram usados. Abo-Ismael et al. (2017) foi o único estudo a relatar a análise de associação usando um painel SNP de alta densidade (**HD**). A imputação de genótipo de MD para HD pode melhorar as análises GWAS e fornecer evidências mais fortes para uma relação causal entre fenótipo e SNP (ABO-ISMAIL et al., 2017; VANRADEN et al., 2017). Além disso, algumas características de conformação, como visão frontal das pernas (**VPD**), não foram analisadas em análises GWAS anteriores na raça Holandesa. Assim, este estudo tem vias biológicas indicam que os resultados encontrados são biologicamente relevantes. Eles têm sido associados a vias de regulação imune, ativação inflamatória, reparo tecidual e formação de colágeno. Assim, estão diretamente relacionados aos mecanismos de expressão dos sintomas das doenças infecciosas e não infecciosas dos cascos. Os SNPs identificados podem ser adicionados a painéis SNP de baixa densidade para aumentar potencialmente as precisões de previsão genômica. Os próximos passos seriam realizar GWAS com base em genótipos de sequência de genoma inteiro, com foco nas regiões identificadas neste estudo e utilizar abordagens ômicas adicionais, como transcriptômica, para validar o papel dos SNPs e potenciais genes candidatos identificados. Além disso, recomenda-se realizar a validação em populações independentes usando conjuntos de dados maiores para avaliar a consistência dos resultados.

APÊNDICE I

Disponível em: https://figshare.com/articles/figure/AP_NDICE_I_docx/24316768

APÊNDICE II

Disponível em: https://figshare.com/articles/dataset/AP_NDICE_II/24316774

APÊNDICE III

Disponível em: https://figshare.com/articles/figure/AP_NDICE_III/24316783

APÊNDICE IV

Disponível em: https://figshare.com/articles/dataset/AP_NDICE_IV/24316786