



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Márcia Eduarda Geraldo

**Genômica comparativa como ferramenta para estudar a predisposição à displasia do
quadril canina**

Florianópolis

2022

Márcia Eduarda Geraldo

**Genômica comparativa como ferramenta para estudar a predisposição à displasia do
quadril canina**

Trabalho de Conclusão do Curso de Graduação em Ciências Biológicas do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Guilherme de Toledo e Silva.

Coorientador: Me. Guilherme Augusto Maia.

Florianópolis

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Geraldo, Márcia Eduarda

Genômica comparativa como ferramenta para estudar a predisposição à displasia do quadril canina / Márcia Eduarda Geraldo ; orientador, Guilherme Toledo-Silva, coorientador, Guilherme de Augusto Maia, 2022.

49 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Graduação em Ciências Biológicas, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Ciências Biológicas. 2. Medicina Vetrinária. 3. Bioinformática. 4. Sintenia. 5. Cães. I. Toledo-Silva, Guilherme. II. Maia, Guilherme de Augusto. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Ciências Biológicas. IV. Título.

Márcia Eduarda Geraldo

**Genômica comparativa como ferramenta para estudar a predisposição à displasia do
quadril canina**

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do Título de “Licenciado em Ciências Biológicas” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Ciências Biológicas.

Florianópolis, 07 de março de 2022.

Prof.^a Daniela Cristina de Toni, Dra.
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:

Prof. Guilherme de Toledo e Silva, Dr.
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Luisa Damasio Rona Pitaluga, Dra.
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Patrícia Hermes Stoco, Dra.
Avaliadora
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Glauber Wagner, Dr.
Avaliador
Universidade Federal de Santa Catarina

Este trabalho é dedicado aos meus colegas e a minha família, que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer ao meu orientador, Dr. Guilherme de Toledo e Silva, por me apresentar uma área linda de estudo da qual me encanto cada dia mais, e principalmente por todo o apoio e ensinamento que me fez e me faz enxergar o mundo de outra forma. Obrigada por acreditar em mim quando tudo parecia não fazer sentido.

Ao meu coorientador, Me. Guilherme Augusto Maia, por aceitar a coorientação e fazer com que todo esse processo tenha ocorrido de forma leve e cheio de aprendizados. Obrigada também por todos os momentos de risos, distrações e conselhos em nossas reuniões, das quais sempre serão lembradas com carinho.

Obrigada aos meus companheiros e companheiras de laboratório pelos momentos de conversas, troca de experiência e informações, que contribuíram de forma significativa nesse processo de aprendizado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, aos professores, ao corpo administrativo e os demais funcionários por me aceitarem de braços abertos e me ensinarem muito mais do que a biologia prevê.

Ao meu melhor amigo e quase irmão Matheus Marques, que se fez presente desde o primeiro dia nessa etapa da minha vida, me aconselhando, apoiando, escutando e acompanhando minha evolução. Obrigada por ser tão presente e essencial nesses anos.

À Fernanda Caroline Rosa, Rafaela de Oliveira Pádua e Raphaella Josino por todos os momentos compartilhados de felicidades, tristezas, experiências e aventuras das quais passamos juntas. Obrigada por serem amigas incríveis e por fazer presente tanto cuidado e carinho.

Às meninas que me acompanharam desde o início até o fim desse ciclo, Helena Mafra, Roberta Elis Francisco e Sarah Kirchhofer de Oliveira Cabral. Obrigada por tantas histórias, tantos momentos e tanto apoio presente entre a gente. Sem vocês, todo esse processo seria muito mais complicado e menos divertido. Obrigada por tanto amor, cuidado e zelo uma com as outras.

Obrigada aos demais colegas que fizeram parte desse processo, tornando uma experiência inesquecível na minha vida.

Por último e não menos importante, obrigada à minha família por todo apoio, estímulo, suporte e cuidado desde sempre. Sem vocês, eu não seria essa pessoa que me tornei e tampouco chegaria onde cheguei. Para mim, vocês são tudo e mais um pouco.

INCENSO FOSSE MUSICA

Isso de querer
ser exatamente aquilo
que a gente é
ainda vai
nos levar além

Distraídos Venceremos
(Paulo Leminsk, 1987)

RESUMO

O cão doméstico possui um papel importante na sociedade, desempenhando inúmeras atividades além de ser considerado membro importante nas famílias. Foi uma das primeiras espécies a serem domesticadas e alguns registros fósseis indicam uma domesticação com cerca de 30.000 anos antes do presente, ocorrendo de forma natural, inicialmente. Nos últimos séculos novas raças surgiram devido a seleção artificial, buscando características que melhor se adequassem às necessidades e interesses dos criadores. Como consequência, observamos uma ampla variedade de fenótipos, porém, além das características desejadas, foram selecionadas também mutações de susceptibilidade que podem afetar a saúde e bem-estar do animal. Uma doença de grande interesse na medicina veterinária é a displasia do quadril canina. Trata-se de uma doença genética, multifatorial, que causa a má formação da articulação do quadril afetando principalmente os cães de grande porte. Sendo uma doença complexa e de alta incidência, esse estudo buscou comparar as regiões genômicas associadas ao fenótipo afetado da doença, visando uma melhor compreensão dessas regiões e favorecendo abordagens precoces da medicina veterinária. Através do banco de dados públicos NCBI GenBank, obtivemos os dados genômicos das variedades Basenji, Boxer, Dogue Alemão, Labrador Retriever e Pastor Alemão. Os haplótipos foram alinhados e as maiores semelhanças foram obtidas entre as raças Boxer e Dogue Alemão, e entre Boxer e Pastor Alemão, ambos com 99.62% de identidade. A menor semelhança foi entre as raças Basenji e Labrador Retriever, com 99.51% de identidade. Após revisão bibliográfica, identificamos um marcador genético associado ao gene da Fibrilina 2 (FBN2), presente no cromossomo 11, envolvido com a displasia do quadril. Submetemos a região associada ao gene à análise de sintenia, buscando compreender o quão relacionadas essas áreas estão entre as raças estudadas. Obtivemos um total de 87.45% de cobertura entre as regiões. Encontramos também alguns dados de variantes genéticas, sendo uma delas compartilhadas entre Labrador Retriever e Pastor Alemão. A falta de informações sobre esses genomas, apesar da importância da espécie, se tornou um fator limitante para maiores investigações. A análise de alinhamento de haplótipos de cães permitiu um reconhecimento do grau de identidade entre as variedades, permitindo mensurar a semelhança entre elas. A análise de sintenia entre a região associada ao gene FBN2 proporcionou um melhor entendimento nas diferentes raças abordadas e por sua vez, o levantamento de variantes nos permitiu verificar a variabilidade dessa região. Este presente trabalho conclui que a análise genômica comparativa é uma ferramenta interessante para o estudo de predisposição a doenças genéticas, podendo ser aplicada à medicina veterinária buscando aprofundar o conhecimento acerca da displasia do quadril em distintas variedades de cães.

Palavras-chave: Medicina Veterinária. Bioinformática. Sintenia. Cães.

ABSTRACT

The domestic dog has an important role in society, performing numerous activities and being considered an essential member of families. It was one of the first species to be domesticated. Some fossil records indicate domestication around 30,000 years before the present, occurring naturally, initially. In recent centuries, new breeds have been created, seeking to select characteristics that best suit the needs and interests of breeders. Consequently, we observed a wide variety of phenotypes. However, susceptibility mutations that can affect the animal's health and well-being were also selected in addition to the desired characteristics. Canine hip dysplasia is a disease of great interest in veterinary medicine. It is a genetic, multifactorial disease that causes malformation of the hip joint, mainly affecting large dogs. As a complex disease with a high incidence, this study sought to compare the genomic regions associated with the affected phenotype of the disease, aiming at a better understanding of these regions, favoring early approaches to veterinary medicine. We obtained genomic data for the varieties Basenji, Boxer, Great Dane, Labrador Retriever, and Great Dane through the public database NCBI GenBank. The haplotypes were aligned using the MUMmer program (v. 4.0.0) to obtain the identity (%) of the global alignments. More significant similarities were obtained between the Boxer and Great Dane breeds and between Boxer and Great Dane, with 99.62% identity. The slightest similarity was between the Basenji and Labrador Retriever breeds, with 99.51% identity. After a literature review, we identified a genetic marker associated with the Fibrillin 2 gene (FBN2), present on chromosome 11, involved in hip dysplasia. We submitted the region related to the gene to synteny analysis using the Sibelia program (v. 3.0.7) to understand how related these areas are among the studied breeds. We achieved a total of 87.45% coverage across regions. We obtained greater coverage in the Great Dane breed, with 97.89%. In contrast, the lowest coverage was found in the Labrador Retriever breed, with a total of 62.01%. We also found some data on variants, which is shared between Labrador Retrievers and German Shepherds. The lack of information about these data has become a limiting factor for further investigations. The haplotype alignment analysis allows a recognition of the degree of identity between the dog varieties, allowing to identify the similarity between them. The synteny analysis between the region associated with the gene provides a better understanding of the areas in the different breeds addressed. In turn, the survey of variants allows us to verify the variability of this region. Comparative analysis is an interesting tool for studying predisposition to genetic diseases. It can be applied to veterinary medicine to deepen the knowledge about hip dysplasia in different dogs.

Keywords: Veterinary Medicine. Bioinformatics. Synteny. Dogs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Origem geográfica e idade dos registros fósseis.	16
Figura 2 - Eventos de dispersão geográfica dos cães.	17
Figura 3 - Radiografia em vista dorsal do quadril canino.	21
Figura 4 - Diagrama de Venn indicando a sobreposição de SNPs entre as raças.	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Identidade obtidas através do alinhamento global entre as raças.....	30
Tabela 2 - Cobertura obtida através da análise de sintenia.	33
Tabela 3 – Valores de identidade do alinhamento global do cromossomo 11.....	33
Tabela 4 - Dados da contagem de SNPs nas cinco raças de cães estudadas.	34

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

mtDNA	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial (do inglês <i>Mitochondrial deoxyribonucleic acid</i>)
LD	Desequilíbrio de Ligação (do inglês <i>Linkage Disequilibrium</i>)
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único (do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)
DQC	Displasia do quadril canina
FCI	Federação Cinológica Internacional (do francês <i>Fédération Cynologique Internationale</i>)
GWAS	Estudo amplo de associação genômica (do inglês <i>Genome wide association studies</i>)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	HISTÓRICO DOS CÃES.....	15
1.2	DOMESTICAÇÃO	17
1.3	SAÚDE CANINA	19
1.4	DISPLASIA DO QUADRIL CANINA	20
1.5	FERRAMENTAS DA BIOINFORMÁTICA	23
1.6	GENÔMICA COMPARATIVA	24
2	OBJETIVOS	26
2.1	OBJETIVO GERAL.....	26
2.2	OBJETIVO ESPECÍFICO.....	26
3	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1	OBTENÇÃO DE DADOS	27
3.2	ALINHAMENTO GLOBAL.....	27
3.3	ANÁLISE DE SINTENIA	28
3.4	CONTAGEM DE VARIANTES.....	28
3.5	VISUALIZAÇÃO DE DADOS	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1	ALINHAMENTO GLOBAL.....	30
4.2	ANÁLISE DE SINTENIA	32
4.3	CONTAGEM DE VARIANTES.....	34
5	CONCLUSÃO.....	36
6	PERSPECIVAS	37
7	RELATO DE VIVÊNCIA EM PESQUISA	37
8	REFERÊNCIAS.....	37
	ANEXO A – Regiões selecionadas na análise de sintenia *	45

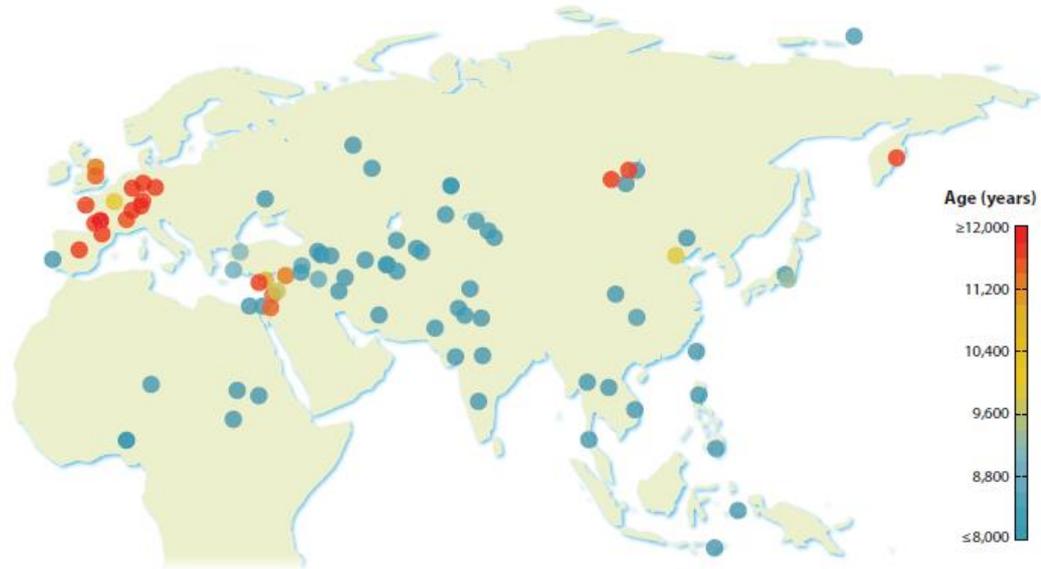
1 INTRODUÇÃO

1.1 HISTÓRICO DOS CÃES

O cão, descrito pela primeira vez por Linnaeus em 1758, de nome científico *Canis lupus familiaris*, é classificado como mamífero da ordem carnívora. São animais placentários que possuem cinco dedos com garras e apresentam também os dentes carniceiros, sendo compostos pelo quarto pré-molar superior e o primeiro molar inferior, que são dentes especializados para a caça. Sua subordem é Caniformia e a família Canidae, que compreende animais como os lobos, raposas, coiote e os cães, cuja história com o ser humano vem de longa data (KARDONG, 2016).

O registro fóssil de cães é muito recente, incerto e deixa dúvidas sobre o momento exato do surgimento da espécie. Acredita-se que os primeiros cães possuíam a morfologia muito semelhante à do lobo-cinzento (*Canis lupus*), o que sugere que cães e lobos-cinzentos possuem o mesmo ancestral em comum, não havendo contribuição de nenhum outro canídeo para a linhagem do cão moderno (OSTRANDER; WAYNE, 2005). Alguns estudos utilizando material genético de canídeos de linhagens antigas, haplótipos e DNA mitocondrial de lobos-cinzentos citam a possibilidade de que a origem dos cães tenha ocorrido no Oriente Médio, Leste Asiático ou ainda, na Europa (VONHOLDT, B. M *et al.*, 2010; DULEBA A. *et al.*, 2013). Vestígios arqueológicos sugerem que a domesticação tenha acontecido dentro de uma janela de tempo que varia entre 15 mil a 12 mil anos atrás e que, apesar de haver dificuldade de encontrar e categorizar os registros, os fósseis classificados como cães estão presentes em quase todos os continentes, como apresentado na Figura 1. Além disso, os eventos de surgimento dos canídeos podem ter ocorrido mais de uma vez, de forma independente (FREEDMAN; WAYNE, 2017; OSTRANDER *et al.*, 2019).

Figura 1- Origem geográfica e idade dos registros fósseis.

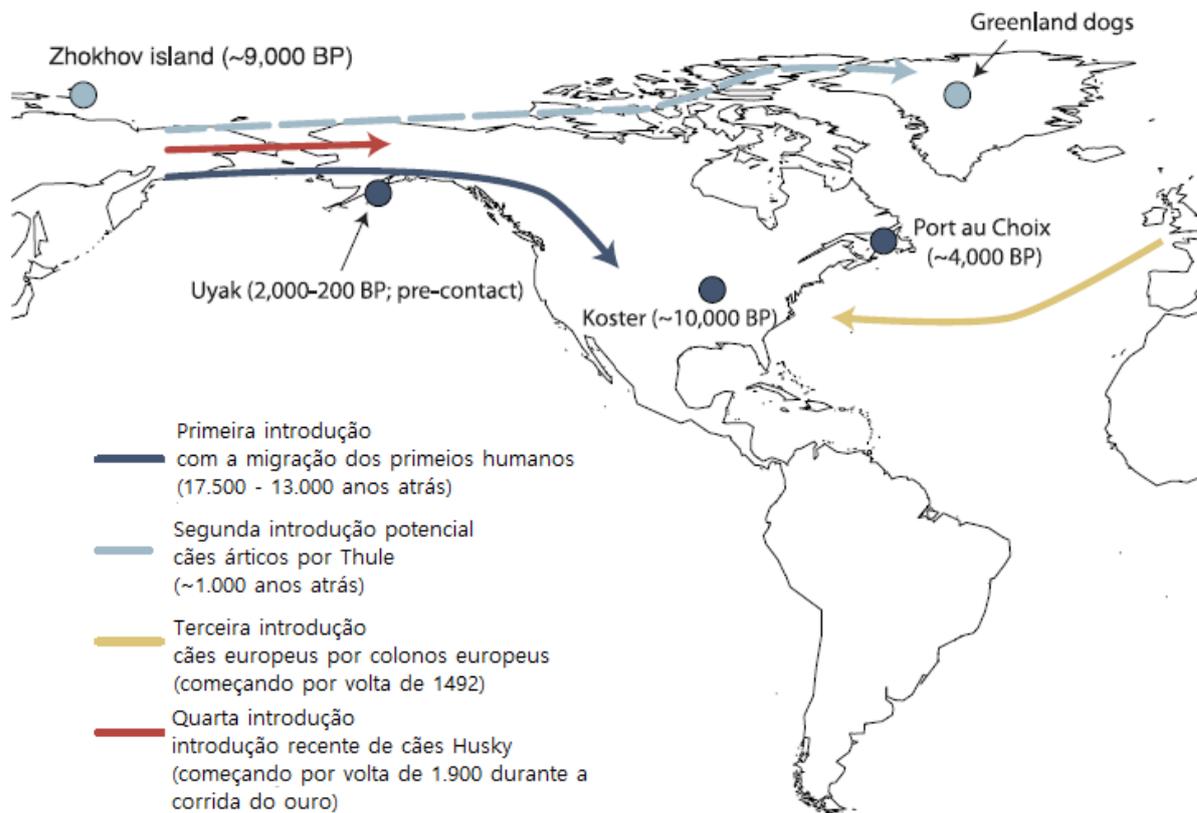


Legenda: Mapa da Eurásia e parte do continente Africano e Oceania indicando a origem geográfica dos cães e a idade estimada dos registros fósseis registrados. Os círculos indicam a idade através das cores utilizadas e o local em que os fósseis foram encontrados. Fonte: Adaptado de FREEDMAN; WAYNE, 2017.

Buscando melhor compreender a história da origem desses animais no continente americano, alguns estudos analisaram sequências mitocondriais de cães da América Latina e concluíram que eles se originaram de diversas raças que já estavam presentes na Eurásia, possuindo a mesma ancestralidade (LEONARD, 2002). A chegada dos cães junto com os humanos na América do Norte, através da Ponte de Bering pode ter contribuído com a extinção da megafauna presente na América (FIEDEL, 2005). Apesar desses dados, alguns autores defendem a hipótese de uma origem através de lobos americanos, enquanto outros, apoiam a ideia de que a origem dos cães americanos tenha ocorrido também através de lobos da Eurásia (LEONARD *et al.*, 2002; PERRI *et al.*, 2018).

Na América, a primeira introdução de cães ocorreu com a migração das pessoas através da Ponte de Bering e esses animais desempenhavam papéis importantes como auxiliares para seus criadores, ajudando na caça, na proteção e também no carregamento de objetos e indivíduos do grupo. Além dessa primeira dispersão, outras ocorreram em decorrência de eventos históricos, como a chegada dos colonizadores europeus no século XV, que acarretou em uma segunda onda de cães que podem ter substituído grande parte da diversidade de cães indígenas que viviam no continente (Figura 2). A terceira onda corresponde ao período da corrida do ouro no Alaska, na qual cães da raça Husky Siberiano foram introduzidos (PERRI *et al.*, 2018; LEATHLOBHAIR *et al.*, 2018).

Figura 2 - Eventos de dispersão geográfica dos cães.



Legenda: Mapa indicando quatro eventos independentes de dispersão de cães para o continente Americano. Cada seta, indicada por distintas cores, corresponde à um evento de migração e os círculos indicam os registros fósseis de cães encontrados. Fonte: Adaptado de LEATHLOBHAIR *et al.*, 2018.

1.2 DOMESTICAÇÃO

Muito se discute também sobre a necessidade humana de companhia e proteção para a própria sobrevivência, a qual pode ter sido a força motriz para o acompanhamento e a cooperação entre cães e humanos, o que impulsionou processos evolutivos em ambas as espécies (POWER, 2012).

Os primeiros registros fósseis foram encontrados em um sítio arqueológico na República Tcheca, datados a cerca de 27 mil anos atrás, dos quais foram identificados três crânios completos de cães do Paleolítico, um crânio de lobo do Pleistoceno e também alguns crânios que não puderam ser classificados. Esses últimos podem ser animais híbridos ou lobos que viviam em cativeiro. Os crânios desses canídeos apresentavam algumas modificações, o que pode ser um indicativo de uma relação muito próxima desses animais com os humanos (GERMONPRÉ; LÁZNIĚKOVÁ-GALETOVÁ; SABLIN, 2012).

Além dos achados da República Tcheca, alguns registros fósseis foram também encontrados na Bélgica, apresentando datação de aproximadamente 31 mil anos atrás. Esses achados se assemelham mais aos canídeos pré-históricos, sendo assim, mais próximos dos cães Paleolíticos, um indicativo que a coexistência de cães e humanos já havia iniciado (GERMONPRÉ, 2009).

Após uma análise de DNA mitocondrial (mtDNA) de raças de cães domésticos da Europa, Ásia, África, da América próximo ao Ártico e de lobos euroasiáticos, foi possível afirmar que os cães modernos possuem uma grande influência genética de lobos do leste asiático (SAVOLAINEN, 2002). Porém, alguns autores defendem a hipótese de que duas populações de lobos, geneticamente distintas, da Eurásia Oriental e Ocidental tenham sido domesticadas de forma independente (FRANTZ, 2016).

Suspeita-se que alguns lobos se aproximaram de acampamentos de humanos com o intuito de se alimentar de restos de comida. Com isso, pode ter se originado um processo de seleção, no qual os lobos que se afastaram de suas populações iniciais, passaram a acompanhar os nômades em suas migrações e se reproduziram dentro de grupos com poucos indivíduos (AVISE; AYALA, 2006; GALIBERT; QUIGNON; HITTE; ANDRÉ, 2011).

Alguns autores apontam o início da domesticação desses animais antes do início da agricultura e que os cães, por serem os primeiros animais domesticados, podem ter servido de exemplo para domesticações posteriores envolvendo outros animais. Outro aspecto importante é de que provavelmente a domesticação não tenha ocorrido de forma intencional por parte dos humanos, o que tenha acarretado em um processo longo de domesticação, de cerca de 15 mil anos (GALIBERT; QUIGNON; HITTE; ANDRÉ, 2011).

Uma análise envolvendo 161 raças atuais apresentou dados de hibridização entre as raças modernas. Essa análise mostra a possível criação de raças com base em características únicas dentro de grupos mais antigos de cães, porém, envolvendo também a mistura de muitas outras que não estariam relacionadas, buscando obter as características desejadas. Outro aspecto trazido foi que possivelmente a origem de muitas características desses animais como pastoreio, melhor desempenho em corridas e também seu tamanho pode ter sido desenvolvido mais de uma vez durante a história dos cães, em locais diversos, de maneira independente (PARKER *et al.*, 2017).

O processo no qual seres humanos selecionam características fenotípicas favoráveis de um organismo, através de múltiplas reproduções seletivas chama-se seleção artificial. Nos últimos séculos, o resultado dessa seleção artificial ficou muito mais evidente, na qual agora é

possível encontrar raças de cães que possuem distintos tamanhos, colorações, formatos de corpo e comportamentos. Essas características são selecionadas por seus criadores, com o intuito de buscar animais cada vez mais semelhantes a seus gostos pessoais ou que se adequem às necessidades das atividades diárias (POWER, 2012; FREEDMAN; WAYNE, 2017; GRIFFITHS; WESSLER; CARROLL; DOEBLEY, 2016; OSTRANDER, *et al.*, 2019; OSTRANDER *et al.*, 2019).

O endocruzamento é outro sistema de acasalamento comum nesses indivíduos e se refere ao acasalamento entre indivíduos aparentados. No endocruzamento os progenitores possuem uma maior chance de possuir genes alelos homozigotos, logo, apresenta maior chance de possuírem genes deletérios, levando ao menor sucesso reprodutivo (GRIFFITHS; WESSLER; CARROLL; DOEBLEY, 2016;). Os cães são animais que possuem altas taxas de endocruzamento e as maiores consequências dessa alta endogamia é o efeito sobre número de ninhada e da sobrevivência dos filhotes (LEROY *et al.*, 2015; BANNASCH *et al.*, 2021).

Além do efeito de seleção de características realizadas pelos humanos, há também a influência do efeito fundador, no qual a participação de poucos cães na reprodução, acarreta em uma variabilidade genética menor dentro da população. Em comparação entre cães e humanos, os cães apresentaram cerca de 27,5% de variação em suas raças, enquanto a variação entre as populações humanas é cerca de 5,4%. Outro aspecto importante é que a variação genética entre algumas raças de cães foi reduzida em decorrência de eventos que levaram à gargalos genéticos (OSTRANDER, 2005).

1.3 SAÚDE CANINA

A forte seleção artificial em decorrência da busca por características que melhor se adequem às preferências humanas, além dos eventos de gargalos genéticos, acarretou em uma diminuição da variabilidade genética dentro das raças de cães. Esta seleção artificial também favoreceu a maior incidência de doenças nesses animais. Muitas dessas doenças surgem de forma indesejada, pois durante o processo de seleção de características de interesse, além dos alelos associados às características desejadas, alguns são também selecionados de forma acidental, graças à sua proximidade aos alelos de interesse. Além disso, essas características fenotípicas são mantidas uma vez que as mutações ficam muitas vezes fixadas em um grupo reprodutivo fechado (ANDRÉ *et al.*, 2017; OSTRANDER, *et al.*, 2019).

O cão doméstico possui um papel importante na sociedade, além de ser considerado um membro importante em muitas famílias. Neste contexto, a medicina veterinária é uma área que está se expandindo para atender uma demanda crescente (CFMV, 2020). Problemas respiratórios, cardíacos, câncer, catarata, epilepsia e a displasia do quadril são algumas das doenças que afetam os cães com muita frequência, sendo muitas delas relacionadas com a raça (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; OSTRANDER, *et al.*, 2019). Os cães possuem um desequilíbrio de ligação (do inglês, *Linkage Disequilibrium* – DL) alto, isso significa que podemos inferir o comportamento de determinados *loci* gênicos com base em outros, através de uma associação que ocorre entre os alelos, de forma não-aleatória (GRIFFITHS; WESSLER; CARROLL; DOEBLEY, 2016; OSTRANDER, *et al.*, 2019). Por possuir um DL alto, é possível realizar estudos de associação genômica com poucos marcadores - cerca de 10.000 polimorfismos de nucleotídeos únicos (do inglês, *Single Nucleotide Polymorphism* - SNPs) seriam necessários para estudos com alelos penetrantes e dominantes, o que não seria possível em humanos, uma vez que estes possuem um DL baixo (LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005). Neste contexto, a genômica comparativa pode ser uma ferramenta interessante no estudo à predisposição de algumas doenças genéticas aplicadas à medicina veterinária.

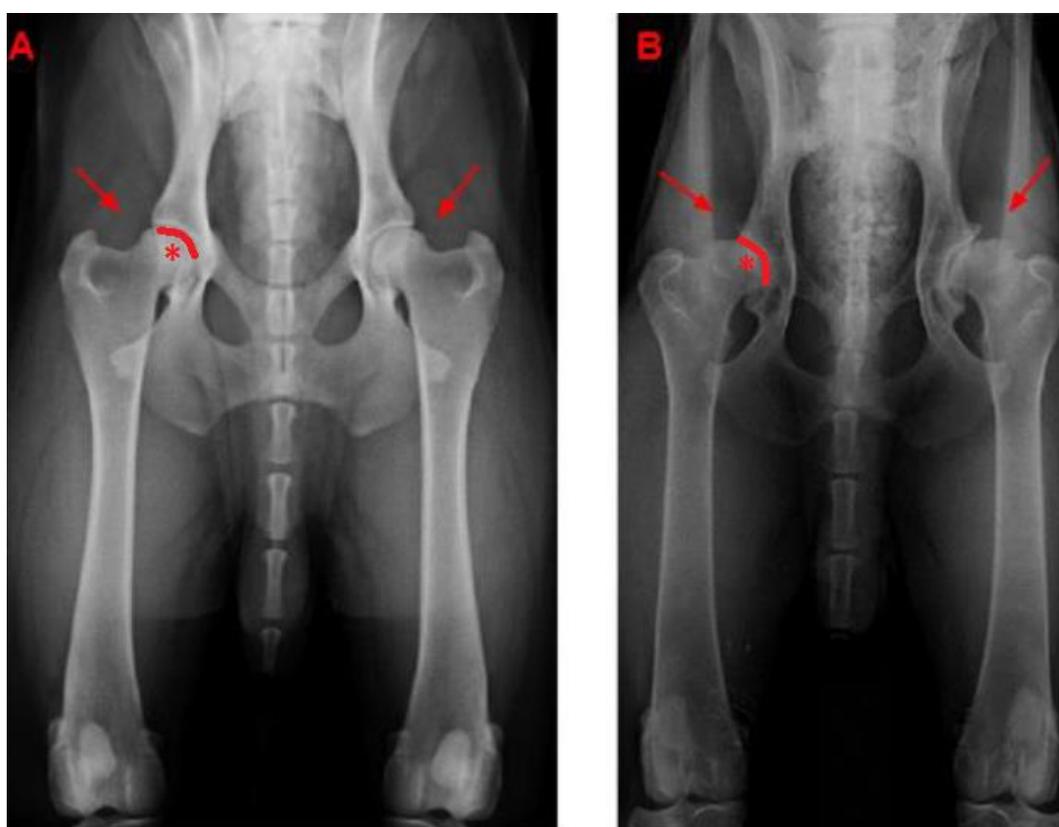
1.4 DISPLASIA DO QUADRIL CANINA

Uma doença de grande incidência em cães é a displasia do quadril canino (DQC). Essa doença afeta principalmente cães de grande porte como os das raças Labrador Retriever, Pastor Alemão e Golden Retriever (COOPMAN *et al.*, 2008). A literatura também discorre sobre a importância de fatores relacionado à localização geográfica, a alimentação e hábitos dos cães, os quais podem influenciar na incidência da doença. Quando comparados cães de raça pura e de raças mistas, a porcentagem de incidência da doença foi de 19,7% e 17,7%, respectivamente (RETTENMAIER *et al.*, 2002).

A DQC é uma patologia genética, multifatorial que causa má formação na articulação do quadril, gerando uma subluxação entre a cabeça femoral e o acetábulo (Figura 3). A principal consequência é um desgaste gradativo na articulação, que leva ao surgimento de doenças secundárias como a osteoartrite, sendo esta uma doença degenerativa da articulação (ZHU *et al.*, 2009; GINJA *et al.*, 2010). O diagnóstico pode ser feito através do histórico, palpando o quadril junto com os sinais clínicos (SMITH, 1998), porém, o diagnóstico definitivo é confirmado através de radiografias da cintura pélvica, assim como da classificação e pontuação do quadril de acordo com o grau da doença. Esses procedimentos muitas vezes são invasivos e

necessitam da utilização de anestesia para obter uma imagem adequada do animal (GUILLIARD, 2014; BUTLER; GAMBINO, 2017). É indicado que o animal possua uma idade mínima de um ano para que seja realizado o diagnóstico. Em casos de raças maiores, o ideal seria um diagnóstico após 18 meses de idade, segundo a *Fédération Cynologique Internationale* (FCI, 2016). No Brasil, é realizada uma avaliação preliminar a partir de 12 meses de idade e a confirmação definitiva ocorre somente após os 24 meses de idade de vida do animal, segundo o Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV, 2020).

Figura 3 - Radiografia em vista dorsal do quadril canino.



Legenda: (A) Quadril normal à esquerda; (B) Quadril displásico severo à direita. Setas em vermelho indicam a articulação coxofemoral, * representa a cabeça do fêmur e a linha curva representa o acetábulo. Em B é possível verificar a subluxação em decorrência da displasia do quadril, onde a cabeça do fêmur encontra-se para fora do acetábulo. Fonte: adaptado de ANDRÉ *et al.*, 2017.

Há também a chance de que ocorram falsos-negativos uma vez que a extensão dos membros pode forçar a entrada da cabeça do fêmur ao acetábulo, fazendo com que o quadril pareça normal (SMITH; BIERY; GREGOR, 1990). Existem algumas classificações atribuídas para o diagnóstico e avaliação das radiografias. Na América do Sul é utilizada a pontuação do FCI para classificação fenotípica da DQC. Na avaliação é levado em conta o ângulo de Norberg, que classifica a frouxidão do quadril considerando o ângulo da cabeça do fêmur em relação ao

acetábulo, a subluxação, os sinais de osteoartrite, assim como a forma e profundidade do acetábulo. Cinco graus são atribuídos, de A até E, sendo grau A considerado como fenótipo normal do quadril e grau E como fenótipo mais afetado da doença (FLÜCKIGER, 2007; GENUÍNO *et al.*, 2015).

Alguns trabalhos vêm buscando apresentar e elucidar algumas questões acerca da genética da DQC. Alguns dos últimos estudos publicados abordaram marcadores genéticos associados à doença em que muitos desses marcadores se tratam de SPNs, ou ainda, possuindo associações com genes da via da Nedilação (MIKKOLA *et al.*, 2019; MIKKOLA *et al.*, 2021). Já, outros trabalhos demonstram a complexidade da genética da doença, com múltiplos *locis* associados a doença, podendo estar relacionado ainda, com as populações de indivíduos (WANG *et al.*, 2021).

Identificar precocemente a doença permite a realização de procedimentos cirúrgicos que buscam reduzir os efeitos negativos na saúde do animal – como a dor – e a diminuição do bem-estar. Além disso, a utilização de anti-inflamatórios pode ser aplicada também como terapia, porém a DQC não possui cura e os cuidados servem apenas para evitar o agravamento do quadro patológico (SÁNCHEZ-MOLANO *et al.*, 2014; MIKKOLA *et al.*, 2019).

Atualmente é possível encontrar alguns estudos buscando encontrar e compreender as bases genéticas da doença. Muitos deles se referem à SNPs que apresentaram associação com a doença, em algumas raças de cães (MIKKOLA *et al.*, 2019). Além das associações de SNPs, um candidato importante é o gene da FBN2 (Fibrilina 2), localizado no cromossomo 11 dos cães. Esse gene está associado à codificação de componente microfibrilar de matriz celular, que está presente na cápsula articular fibrosa e cartilagem articular (FRIEDENBERG *et al.*, 2011).

Buscando reduzir a incidência da doença nos cães, é aplicado uma seleção fenotípica da qual excluem-se os animais afetados pela DQC do grupo reprodutivo. Estudos apontam que utilizar ferramentas genômicas possa oferecer melhores resultados na detecção precoce da doença. Há um aumento na precisão da seleção desses animais por testes genômicos, os quais são capazes também de remover variáveis relacionadas à idade e ao ambiente em que o animal se encontra (HAYES *et al.*, 2009; VERHOEVEN *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2011; SÁNCHEZ-MOLANO *et al.*, 2013). Um exemplo disso é a aplicação de um modelo preditivo para a DQC realizado em cães da raça Labrador Retriever que apresentou uma boa precisão em suas análises. Esse estudo comenta ainda a possibilidade de escolher uma terapia mais individualizada e mais adequada, podendo também realizar um manejo mais individualizado da doença (BARTOLOMÉ *et al.*, 2015).

1.5 FERRAMENTAS DA BIOINFORMÁTICA

A bioinformática é uma área interdisciplinar das Ciências Biológicas que faz uso de ferramentas computacionais para estudar, compreender e resolver questões biológicas, podendo também abranger aplicações na área da saúde, sendo ela humana ou animal (VERLI, 2014).

Os primeiros passos da bioinformática foram dados por Margaret Dayhoff, que foi uma físico-química pioneira em trabalhos na área da bioquímica e que utilizou diversos métodos computacionais para seus trabalhos de doutorado (GAUTHIER *et al.*, 2018). Em 1960 ela começou a trabalhar com Robert S. Ledley, um físico que também buscava utilizar e encontrar recursos da computação, então juntos criaram um programa desenvolvido para determinar a estrutura primária de proteínas (LEDLEY, 1959; GAUTHIER *et al.*, 2018). Na década de 80, alguns cientistas trabalharam em conjunto para clonar e selecionar genomas, buscando tornar esses dados moleculares em dados públicos, disponíveis em repositório de dados, o que possibilitaria novas pesquisas e avanços na área através de sua consulta. Atualmente existe uma grande quantidade de dados disponíveis de organismos-modelos, obtidos dos mais variados estudos. Além disso, foi o Projeto Genoma Humano que revolucionou a genética humana, o qual reuniu dados de sequências e genes associados a diversas doenças. Os dados humanos, agora disponíveis em bancos de dados públicos, auxiliam no desenvolvimento de diversos estudos que buscam elucidar problemas associados à saúde humana e possíveis novas terapias (GRIFFITHS; WESSLER; CARROLL; DOEBLEY, 2016).

Em 1980 já existiam as técnicas básicas que serviriam de base para realizar o sequenciamento do DNA, porém era algo inviável e fora da capacidade da ciência e da tecnologia naquele tempo. Alguns centros de pesquisa e informação avançaram e tornaram capazes a realização de sequenciamento, tal qual a interpretação dos dados obtidos (GAUTHIER *et al.*, 2018).

A geração de sequências biológicas e o armazenamento de dados permitem a realização de diversas análises e estudos distintos, a partir de uma mesma amostra, e um exemplo disso é a utilização das sequências gênicas de um organismo. Esses dados de sequenciamento são geralmente armazenados em bancos de dados e podem ser comparados, através de análises

conhecidas como análises de similaridade que representa o grau de semelhança entre duas sequências (SMITH; WATERMAN, 1981; (ALTSCHUL; GISH; MILLER; MYERS; LIPMAN, 1990). O processo de alinhamento de sequências permite avaliar o quão similar – e o quão diferente – essas amostras analisadas são, fornecendo uma porcentagem que é expressa pelo termo identidade, sendo esse o indicativo de caracteres que correspondem exatamente entre as duas sequências distintas, permitindo ainda obter informações a respeito de relações evolutivas das sequências comparadas (VERLI, 2014; MARÇAIS *et al.*, 2018).

1.6 GENÔMICA COMPARATIVA

Dentro do estudo de genômica, há uma área chamada de genômica comparativa. A genômica é um campo da biologia que tem como objeto de análise o material genético, tais como seus dados de estrutura, dados moleculares, expressão de genes e também interações de proteínas (GIACCO; CATTANO, 2011). Já a genômica comparativa visa comparar sequências genômicas de organismos para compreender melhor diferenças moleculares e evolutivas entre elas (HARDISON, 2003).

Um dos objetos de estudo da genômica comparativa é a análise de sintenia. A análise de sintenia é utilizada para compreender melhor a estrutura dos genomas amostrados, os quais são estudados através de blocos, chamados de blocos sintênicos. Esses blocos fornecem informações de regiões que são conservadas ou não entre as espécies analisadas (MINKIN *et al.*, 2013; LEE *et al.*, 2016). Outro aspecto importante nessa análise é que ela pode também ser utilizada com o intuito de encontrar regiões associadas a determinadas características (MA *et al.*, 2017).

Algumas tecnologias de sequenciamento de amostras biológicas foram aperfeiçoadas através do tempo, o que permite que novas análises e métodos possam ser realizados e desenvolvidos. Um exemplo de tecnologia atual é a análise de variantes genéticas, que é uma ferramenta que permite estudos que visam associar o genótipo e o fenótipo do organismo estudado. Essa análise faz uso dos dados de sequenciamento de DNA para identificar SNPs relacionados aos traços fenotípicos e genotípicos de interesse e podem ser obtidas através de uma análise de associação ampla do genoma (do inglês *Genome wide association studies* – GWAS) (METZKER, 2009; WANG *et al.*, 2009; GUO *et al.*, 2017; ADETUNJI *et al.*, 2019).

Quando observamos na prática o uso dessas ferramentas nas análises biológicas, podemos encontrar estudos que buscam associar os haplótipos de um grupo de cães afetados

com a DQC e animais saudáveis, como controle da comparação. É realizado o sequenciamento do DNA das amostras desses animais, seguidos de análises estatísticas e análises comparativas, encontrando traços associados à doença investigada (GUO *et al.*, 2011; BARTOLOMÉ *et al.*, 2015; SÁNCHEZ-MOLANO *et al.*, 2015; MIKKOLA *et al.*, 2019).

Este contexto evidencia que a análise de genômica comparativa é uma ferramenta interessante para compreender as bases genéticas de diversas doenças que afetam os cães, principalmente se levarmos em conta a grande diversidade de raças caninas que podemos encontrar atualmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar as regiões associadas a DQC, com o auxílio de ferramentas computacionais, visando encontrar diferenças entre as raças estudadas através do uso de dados genômicos.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- Selecionar genomas de distintas raças de *Canis lupus familiaris* presente em bancos de dados públicos;
- Realizar o alinhamento global dos genomas completos;
- Analisar a composição e a disposição dos genes associados a DQC, através de análise de sintenia entre as raças.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As análises desenvolvidas neste trabalho foram realizadas no Laboratório de Genômica (LAGEN) e no Núcleo de Bioinformática e Biologia Computacional (NuBioinfo) do Departamento de Biologia Celular, Embriologia e Genética (BEG), do Centro de Ciências Biológicas (CCB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). A estrutura do laboratório conta também com servidores alocados na Superintendência de Governança Eletrônica e Tecnologia da Informação e Comunicação (SeTIC) da UFSC para desenvolvimento de plataformas computacionais e demais análises de alta performance.

3.1 OBTENÇÃO DE DADOS

Para a realização das análises foram utilizados 38 cromossomos autossômicos e o cromossomo sexual X de *Canis lupus familiaris* das raças Basenji (SAMN10749847), Boxer (SAMN02953603), Dogue alemão (SAMN04851098), Labrador Retriever (SAMN14478636) e Pastor Alemão (SAMN13230619). As sequências de DNA das raças foram obtidas do banco de dados público GenBank (disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), com seus respectivos códigos de acesso. Os arquivos obtidos em formato `.fasta` correspondem às sequências de nucleotídeos de cada cromossomo, os quais estavam separados individualmente. O critério de seleção das raças amostradas levou em consideração apenas a disponibilidade de sequências completas de DNA no banco de dados no período de coleta de dados, que ocorreu até 23 de maio de 2021.

3.2 ALINHAMENTO GLOBAL

Com o intuito de comparar os dados nucleotídicos obtidos de cada raça, foi realizada uma etapa de alinhamento global de genomas através de algoritmos do programa MUMmer v4 (<http://mummer.sourceforge.net/>) (MARÇAIS *et al.*, 2018).

Foram utilizados arquivos que possuíam a sequência de um único cromossomo por vez, tanto na sequência utilizada como referência como na sequência de consulta. Este alinhamento foi feito com o algoritmo `nummer`, o qual foi executado modificando apenas dois parâmetros: utilização de 8 núcleos de processamento (`--threads 8`) e criação de arquivo que contém as informações dos alinhamentos (`--prefix`).

Em seguida, foi realizada uma análise do alinhamento global através do algoritmo `dnadiff`, o qual foi executado no arquivo de saída (`.delta`) do algoritmo `nucmer`. Para a execução do algoritmo `dnadiff`, o único argumento utilizado foi a permissão do uso de arquivos de entrada no formato `.delta` (`-d`). Esta opção tem como resultado alguns arquivos importantes, entre eles o arquivo no formato `.report`, que contém os resultados detalhados dos alinhamentos globais entre as raças estudadas.

3.3 ANÁLISE DE SENTENÇA

Com o intuito de estudar a organização cromossômica das raças, foi realizada uma etapa de análise de sentença de uma região do cromossomo 11. O cromossomo 11, mais especificamente uma região de aproximadamente 1.8 milhões de pares de bases, foi escolhido por conter o gene da Fibrilina 2 (FBN2), o qual é indicado pela literatura como possível marcador molecular/genético da DQC (FRIEDENBERG *et al.* 2011).

O pacote Biopython v.1.79 foi utilizado para reduzir os arquivos `.fasta` relacionados ao cromossomo 11 das raças utilizadas. Além do próprio gene FBN2, foi selecionada também a região próxima do gene, contando 10 genes a jusante do gene de interesse e 10 genes a montante, em cada raça. Em seguida, os arquivos no formato `.fasta` que representam esta região de estudo foram comparados através do programa Sibelia v.3.0.7 (<http://bioinf.spbau.ru/sibelia>) (MINKIN *et al.*, 2013), o qual foi executado alterando apenas um parâmetro para que a análise fosse feita de maneira menos restritiva (`-s loose`), que produz menos blocos com tamanhos mais longos (5 mil pares de bases por bloco).

3.4 CONTAGEM DE VARIANTES

Nesta etapa, foram utilizados dados públicos de SNPs de um cão da raça boxer identificado como Tasha, que se encontram disponíveis no banco de dados do CanFam 2.0 (disponível em: <https://www.broadinstitute.org/disease-research/dog-snp-canfam-20>), para investigar possíveis variações nas sequências nucleotídicas. Utilizamos a região próxima do gene da FBN2 para análise, buscando detalhar a mesma região utilizada na análise de sentença em cada raça. Após selecionada uma região de aproximadamente 4 milhões de pares de bases, analisamos a quantidade de SNPs descritos no banco de dados e comparamos com a quantidade presente em cada uma das raças estudadas.

3.5 VISUALIZAÇÃO DE DADOS

Para uma melhor visualização dos dados de contagem de SNPs, foi utilizado o Diagrama de Venn. O digrama foi desenvolvido através da página web (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) com o intuito de facilitar a interpretação e visualização dos dados.

Por fim, é importante comentar que a validação estatística dos dados avaliados neste trabalho já está inclusa dentro dos próprios programas utilizados nas diferentes etapas analíticas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ALINHAMENTO GLOBAL

De maneira geral, as análises envolvendo o alinhamento global das sequências nucleotídicas das cinco raças de cães estudadas apresentaram uma alta porcentagem de identidade (acima de 99%), o que indica um alto grau de conservação entre as sequências de referência e de consulta analisadas. Na Tabela 1 podemos encontrar os valores obtidos através dos alinhamentos em pares entre as raças. Em detalhe, as sequências mais semelhantes obtiveram 99,62% de identidade e ocorreram entre as raças Boxer e Pastor Alemão, assim como entre Boxer e Dogue Alemão. Por outro lado, o alinhamento que apresentou menor semelhança de sequência foi observado entre as raças Basenji e Labrador Retriever, com 99,51%.

Tabela 1 – Identidade obtidas através do alinhamento global entre as raças.

Raças	Basenji	Boxer	Dogue Alemão	Labrador Retriever	Pastor Alemão
Basenji	-	99,56%	99,55%	99,51%	99,56%
Boxer	99,56%	-	99,62%	99,57%	99,62%
Dogue Alemão	99,55%	99,62%	-	99,55%	99,60%
Labrador Retriever	99,51%	99,57%	99,55%	-	99,56%
Pastor Alemão	99,56%	99,62%	99,60%	99,56%	-

Legenda: Cada linha e coluna representam a identidade compartilhada entre pares de raças caninas, analisada através do alinhamento global de seus respectivos genomas. As porcentagens apresentadas correspondem aos pares de raças analisadas, de acordo com sua similaridade.

Após a revisão do banco de dados iDog (TANG *et al.*, 2018), que reúne dados sobre diversas raças de cães, como comportamento e data de registro de raças, foi possível verificar algumas informações referente às raças utilizadas como objeto de estudo deste trabalho.

A raça Boxer foi reconhecida pela primeira vez no ano de 1904 e o que consideramos atualmente como raça Boxer pode ser rastreado até o final de 1800 na Alemanha (AKC, 2021). Cães desta raça medem cerca de 53 cm a 63 cm e em seu comportamento são considerados leais, inteligentes e afetivos. Por muitos anos, esses animais participaram de diversas atividades como atletas, cães pastores, cão guarda, cão guia e foram também utilizados nas duas guerras mundiais (iDog, 2018).

A raça Dogue Alemão, conhecida muitas vezes como Grande Dinamarquês, foi reconhecida no ano de 1887 e não é compreendido a razão dessa raça alemã ser relacionada à Dinamarca. O que se sabe acerca do histórico desta raça é que alguns nobres alemães utilizavam esses cães inicialmente para a caça e posteriormente para companhia e cuidado da família (AKC, 2021). São animais que possuem cerca de 71 cm a 86 cm de altura, com comportamento sociável, confiável e amigável (iDog, 2018).

Quando buscamos pela raça Pastor Alemão, podemos encontrar seu primeiro registro no ano de 1908 e sua história surge da seleção de características consideradas ideais para desempenhar atividade de pastoreio. Um capitão da cavalaria alemã cruzou cães do Norte e do Centro da Alemanha, desenvolvendo o animal ideal para suas especificidades, o qual atualmente é muito utilizado em atividades auxiliando policiais (A FIELD *et al.*, 2020; AKC, 2021). Os cães desta raça são animais ativos e necessitam realizar atividades que estimulem a mente e o físico, podendo medir em média 55cm a 66cm de altura (A FIELD *et al.*, 2020).

O Labrador Retriever foi reconhecido como raça pela primeira vez no ano de 1917. Esses animais começaram a adquirir maior popularidade após alguns nobres ingleses viajarem para o Canadá e, posteriormente, levando exemplares desses animais para a Inglaterra (AKC, 2021). É considerada uma raça dócil e amigável, com espécimes podendo ter de 54 cm a 62 cm de altura (iDog, 2018).

Por último, a raça Basenji é considerada uma das mais antigas, havendo grandes semelhanças com os primeiros cães domesticados, segundo paleontólogos (LARSON *et al.*, 2012). Esses animais estavam presentes no interior do continente africano e se supõe que viviam próximos ao Rio Nilo e ao Rio Congo. Por viverem afastados, esses cães sofreram poucas alterações por seleção artificial, sendo introduzidos no Ocidente no final do século XIX. Tentativas de reproduzir a raça em solo inglês ocorreram, porém não obtiveram sucesso. Mais tarde a raça foi inserida nos Estados Unidos e a partir daí os cães da raça Basenji se popularizaram no país (LARSON *et al.*, 2012). A raça foi oficialmente reconhecida no ano de 1943 (AKC, 2021). São animais que medem cerca de 40 cm a 43 cm de altura e possuem uma personalidade mais independente, sendo animais inteligentes e mais afetuosos com amigos, enquanto são mais indiferentes com estranhos (iDog, 2018).

A partir dos dados acerca da origem e da história desses animais, é possível relacionar a origem dessas raças com a alta semelhança genética observada na análise comparativa. Os maiores índices de identidade encontrados foram a partir das raças Boxer, Dogue Alemão e Pastor Alemão, que por sua vez possuem registros de origem em um mesmo país, na Alemanha.

Uma possível hipótese seria que o fato dessas raças ocorrerem em uma mesma região pode ter facilitado cruzamentos entre seus ancestrais, conservando um grande grau de semelhança entre elas. Em contrapartida, as raças que apresentaram o menor grau de similaridade de sequências quando comparadas foram a raça Basenji e Labrador Retriever, dessa forma, quando analisamos seus locais de origem vemos que a distância geográfica era um fator limitante para o cruzamento entre seus ancestrais.

As populações de determinadas espécies podem apresentar um isolamento reprodutivo em decorrência da distância geográfica. Geralmente os indivíduos realizam o cruzamento com outros indivíduos geograficamente mais próximos, o que influencia as frequências alélicas e genotípicas das diferentes populações de uma mesma espécie (GRIFFITHS; WESSLER; CARROLL; DOEBLEY, 2016). Algumas forças evolutivas devem também ser levadas em conta se pensarmos em separações de determinados grupos no decorrer da história e do fluxo gênico que pode ocorrer entre as populações mais próximas (SCHLUTER, 2001). Neste caso, podemos citar essa menor semelhança de sequência compartilhada entre o Labrador Retriever e o Basenji que pode ser reflexo da introdução tardia do Basenji no continente Americano, pois o contato entre essas raças é muito recente. Sendo assim, podemos também citar a introdução do Labrador Retriever na Europa, permitindo o cruzamento entre as raças que já estavam presentes no continente como Boxer, Dogue Alemão e Pastor Alemão.

Essa relação entre a localização geográfica e o cruzamento dessas raças pode indicar uma relação com os resultados obtidos, apesar de que outros estudos sejam necessários para confirmar essa hipótese.

4.2 ANÁLISE DE SINTENIA

A análise de sintenia foi utilizada para melhor compreender a região próxima ao gene da FBN2 (Anexo A), no cromossomo 11. Através dessa análise obtivemos um total de 16 blocos sintênicos e 85,55% de cobertura entre as raças. Nesta etapa, a raça Basenji foi utilizada como referência comparativa, o que faz com que apresente 100% de cobertura. Com uma cobertura semelhante, encontramos o Dogue Alemão com 99,76% e Pastor Alemão com 99,75%. A raça Boxer apresentou 73,00% de cobertura e a menor cobertura identificada foi a da raça Labrador Retriever, com 55,10%. Além dos valores de cobertura, a análise de sintenia fornece também como resultado a quantidade de blocos sintênicos gerados, a quantidade de compartilhamento entre esses blocos e a cobertura correspondente em cada raça (Tabela 2). É importante notar a

presença de um bloco de grau 18, ou seja, um bloco compartilhado 18 vezes entre as raças, o que pode indicar uma região conservada entre esses haplótipos.

Tabela 2 - Cobertura obtida através da análise de sintenia.

Grau	Contagem	Total	Basenji*	Boxer	Dogue Alemão	Labrador Retriever	Pastor Alemão
2	3	9,96%	3,92%	3,89%	0,00%	20,87%	21,35%
3	6	27,02%	34,58%	28,17%	42,68%	11,40%	17,70%
4	5	47,01%	60,29%	39,44%	55,69%	20,33%	59,47%
7	1	0,40%	0,59%	0,89%	0,54%	0,00%	0,00%
18	1	1,16%	0,62%	0,60%	0,85%	2,50%	1,22%
Total	16	85,55%	100%	73,00%	99,76%	55,10%	99,75%

Legenda: Tabela que indica o número de blocos sintênicos analisados e a porcentagem de cobertura obtida entre as raças de cães estudadas. A coluna de grau refere-se ao número de blocos de sintenia compartilhados entre as raças. A coluna de contagem mostra quantos blocos de sintenia pertencem ao grau correspondente. A linha total mostra o número total de blocos sintênicos e a cobertura total obtida em cada amostra. * Corresponde a sequência utilizada como referência.

Quando analisamos o alinhamento global do cromossomo 11 de cada raça, podemos verificar que os valores de identidade se comportam de forma semelhante com a sintenia. As raças que apresentaram a região mais conservadas, quando comparadas ao Basenji, possuem também os maiores valores de identidade do alinhamento entre os cromossomos, que é o caso das raças Dogue Alemão, Pastor Alemão e Boxer. Já o Labrador Retriever apresentou a menor identidade com cerca de 99,55% no alinhamento global, o que também coincide com a menor conservação dessa região, quando comparado ao Basenji (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores de identidade do alinhamento global do cromossomo 11.

Raças	Basenji	Boxer	Dogue Alemão	Labrador Retriever	Pastor Alemão
Basenji	-	99.61%	99.59%	99.55%	99.60%
Boxer	99.61%	-	99.64%	99.60%	99.65%
Dogue Alemão	99.59%	99.64%	-	99.58%	99.63%
Labrador Retriever	99.55%	99.60%	99.58%	-	99.59%
Pastor Alemão	99.60%	99.65%	99.63%	99.59%	-

Legenda: Cada linha e coluna representam a identidade compartilhada entre pares de raças caninas, analisada através do alinhamento global de seus respectivos cromossomos. A porcentagem apresenta a similaridade obtida através da análise, ou seja, quão similar são os cromossomos 11 de cada raça estudada.

A partir dos resultados obtidos, é possível afirmar que algumas raças possuem essa região do cromossomo 11 com uma estrutura um pouco mais conservada do que outras

(Apêndice A). O Labrador Retriever, que anteriormente já havia sido a raça com menor semelhança observada através do alinhamento global de sequência quando comparado com o Basenji, apresenta também uma maior diferença da organização estrutural nessa região associada à FBN2. Em contrapartida, as outras raças estudadas apresentaram valores semelhantes de sintenia, com exceção do Boxer. Nesse caso, os resultados da análise de sintenia podem indicar uma conservação maior desta área nas raças Dogue Alemão e Pastor Alemão.

Os resultados observados entre as raças podem indicar uma variabilidade em decorrência da distinta posição de genes ou até uma variabilidade nas regiões espaçadoras intergênicas. Um estudo utilizando haplótipos de 161 raças de cães apresenta clados gerados a partir dessas amostras e correlaciona essa classificação filogenética com a origem geográfica das respectivas raças. O que chama a atenção é a presença do Basenji em um clado único, não compartilhando haplótipos com outras raças, o que pode ser reflexo de uma origem distinta e do resultado de poucos cruzamentos nos últimos 200 anos (LARSON *et al.*, 2012; PARKER *et al.*, 2017), que corrobora sua história de domesticação e registro da raça (AKC, 2021).

4.3 CONTAGEM DE VARIANTES

Utilizamos a mesma região do cromossomo 11, próxima do gene da FBN2, também na contagem de variantes presentes no banco de dados (Tabela 4). Com as contagens, foi possível encontrar um total de 1.463 SNPs presentes na região que, considerando todas as raças, abrange cerca de 2,8 milhões de pares de bases. Foi também contabilizada cada raça específica onde encontramos 728 SNPs para a raça Boxer, cerca de 22 SNPs para a raça Pastor Alemão e 20 SNPs para a raça Labrador Retriever. Posteriormente foi realizado o levantamento de SNPs presente somente na região correspondente ao gene da FBN2, buscando quantificar as variabilidades deste gene. Obtivemos 187 SNPs no Boxer, dois SNPs no Labrador Retriever e apenas um SNP no Pastor Alemão.

Tabela 4 - Dados da contagem de SNPs nas cinco raças de cães estudadas.

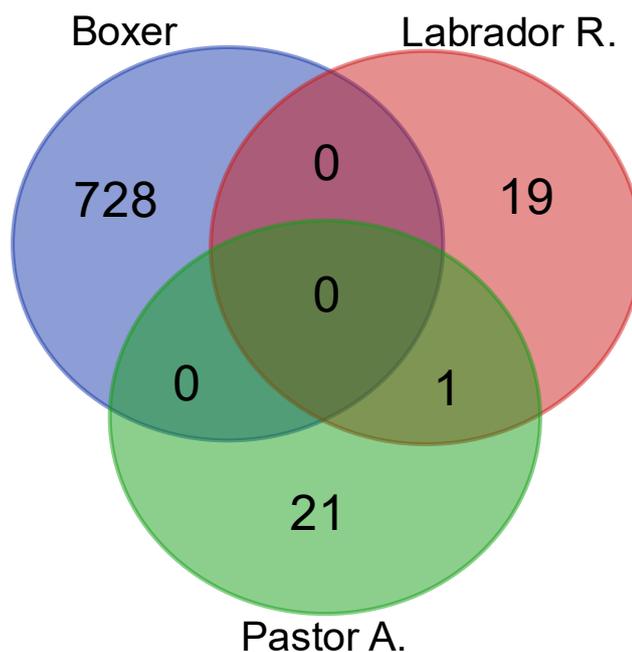
	Basenji *	Boxer	Dogue Alemão *	Labrador Retriever **	Pastor Alemão **
Cromossomo 11 próxima à FBN2	16.031.145 - 17.844.986	15.519.889 - 17.349.499	16.103.337 - 18.077.158	17.461.257 - 19.352.763	16.628.433 - 18.477.888
Quantidade de SNPs	-	728	-	20	22
Gene FBN2	16.618.045 - 16.858.590	16.107.059 - 16.346.938	16.778.944 - 17.018.819	18.048.902 - 18.289.161	17.228.746 - 17.469.482

Quantidade de SNPs	-	187	-	2	1
--------------------	---	-----	---	---	---

Legenda: A primeira coluna indica a região selecionada e a quantidade de SNPs obtidos dentro da região, enquanto as outras colunas correspondem às raças estudadas. *Dados não disponíveis no banco de dados CanFam 2.0. **Não compreendeu a região completa em decorrência da ausência de dados de SNPs.

Nesta etapa, o resultado que chama a atenção é a grande quantidade de registros de SNPs na raça Boxer, podendo indicar: (i) grande variabilidade da região dentro dessa raça; ou (ii) pouca disponibilidade de dados das demais raças analisadas. A partir da contabilização da quantidade de SNPs em cada raça, foi possível encontrar um SNP compartilhado entre as raças Pastor Alemão e Labrador (Figura 4). O SNP encontrado é identificado como BICF2S2295790 e após buscas através de variados bancos de dados, não foi possível encontrar correspondências para a busca.

Figura 4 - Diagrama de Venn indicando a sobreposição de SNPs entre as raças.



Legenda: Diagrama de Venn apresentando a sobreposição de SNPs no cromossomo 11 das 3 raças estudadas. As raças estavam presentes no CanFam 2.0 e suas respectivas quantidades.

Algumas dificuldades foram observadas durante a realização desta etapa, como a ausência de dados de SNPs no cromossomo 11 das raças Basenji e Dogue Alemão, no banco de dados utilizados, não sendo possível a contabilização desses dados para essas raças. Outro problema encontrado com os dados foi que os SNPs do cromossomo 11 no banco de dados não compreende a região inteira considerada para as análises, onde as raças Labrador Retriever e

Pastor Alemão foram afetadas pela ausência de dados nessa etapa de contagem de SNPs. Além da pouca disponibilidade de dados de SNPs é possível também compreender que, sendo uma área recente de estudos, as informações acerca dos dados sobre variantes são escassas e às vezes inexistentes. Além do levantamento da quantidade de SNPs, analisamos quais deles eram compartilhados entre as raças e sua respectiva quantidade. Conforme apresentado na Figura 5, foi possível encontrar somente um SNP compartilhado e esse compartilhamento ocorre entre as raças Pastor Alemão e Labrador Retriever.

5 CONCLUSÃO

Através das análises e dos resultados obtidos, foi possível verificar uma semelhança muito grande entre os haplótipos das raças estudadas, havendo poucas diferenças e sendo possível ainda estabelecer uma relação com a origem geográfica das mesmas. Com isso, podemos verificar as forças evolutivas atuando nessas raças, como o fluxo gênico, que ocorre através do cruzamento de distintas raças. Além de eventos de seleção natural que ocorre nessas raças, podemos também encontrar a atuação da seleção artificial, onde os humanos selecionaram animais para compor um grupo reprodutivo ou também introduziram indivíduos em países distintos de sua origem.

Através da realização deste estudo, foi possível verificar a falta de dados genômicos e genéticos de cães, o que é surpreendente. Os cães são considerados como uma espécie companheira dos humanos há milhares de anos, mas infelizmente os estudos acerca de sua história e de sua composição genética são muito limitados. É possível perceber de forma marcante essa falta de dados durante as análises mais específicas, como na análise de sintenia, que apresentou pouca bibliografia para apoiar maiores discussões sobre o tema e mais ainda quando buscamos estudos de variantes. Na análise de variantes há uma ausência muito grande de dados e principalmente de informações acerca dos dados que já estão presentes em alguns bancos de dados.

É visível a necessidade de maiores estudos acerca da genética dos cães para que, dessa forma, novos avanços e descobertas sejam feitos. Com isto, seria possível aperfeiçoar as ferramentas da medicina veterinária que temos atualmente, buscando sempre a melhora da saúde e bem-estar de nossos companheiros.

6 PERSPECIVAS

O principal motivo que impulsionou a realização deste estudo, foi a busca pela melhor compreensão da estrutura genética e genômica dos cães. Esse estudo servirá como base para investigações futuras que possam ser realizadas a respeito da influência dos fatores genéticos no desenvolvimento da DQC, compreendendo melhor as bases genéticas por trás dessa doença e sua influência nas diversas raças de cães.

Além disso, o estudo pode ser considerado pioneiro no surgimento de uma nova linha de pesquisas no LAGEN e também no Núcleo de Bioinformática da universidade, preparando o caminho para a realização de outras pesquisas na área da genômica canina ou até mesmo da genômica comparativa, servindo como uma nova ferramenta de estudo.

7 RELATO DE VIVÊNCIA EM PESQUISA

Quando paro para analisar minha trajetória no meio científico, vejo que aprendi muitas questões importantes e valiosas que levarei para minha vida. Muitos aprendizados dizem respeito ao método científico, tal qual conhecimentos mais técnicos relacionados à área de genética e bioinformática. Me sinto privilegiada e muito agradecida pelas oportunidades que eu tive dentro da ciência, graças à universidade e aos meus professores e orientadores.

Apesar de planejar com detalhes e cuidado um projeto de pesquisa, devemos estar dispostos a reconhecer as dificuldades e impossibilidades não previstas como a falta de recursos ou dificuldades com os métodos. Mais importante que compreender que muita coisa pode sair do planejado é saber se adaptar e se reinventar. Nesse processo de construção do TCC e do meu conhecimento, sinto que pude trabalhar muito mais as questões relacionadas com minha resolução de problemas, encontrando formas de contornar os imprevistos e impossibilidades.

Muito além das técnicas e conhecimentos adquiridos relacionados ao tema do TCC, reconheci a importância de contribuições entre os outros pesquisadores. Essas contribuições podem ser desde ajuda com algum processo, a opinião e também críticas. Todo esse processo é importante, não somente para mim que estava desenvolvendo o projeto como também para meus parceiros de laboratório, favorecendo o crescimento de uma forma compartilhada.

8 REFERÊNCIAS

A FIELD, Matt; ROSEN, Benjamin D; DUDCHENKO, Olga; CHAN, Eva K F; MINOCHE, Andre e; EDWARDS, Richard J; BARTON, Kirston; LYONS, Ruth J; TUIPULOTU, Daniel Enosi; HAYES, Vanessa M. Canfam_GSD: de novo chromosome-length genome assembly of the german shepherd dog (*Canis lupus familiaris*) using a combination of long reads, optical mapping, and hi-c. **Gigascience**. v. 9, n. 4, p. 0-0, 1 abr. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/gigascience/giaa027>.

ADETUNJI, Modupeore O.; LAMONT, Susan J.; ABASHT, Behnam; SCHMIDT, Carl J.. Variant analysis pipeline for accurate detection of genomic variants from transcriptome sequencing data. **Plos One**.v. 14, n. 9, p. 0-0, 23 set. 2019. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0216838>.

ALTSCHUL, Stephen F.; GISH, Warren; MILLER, Webb; MYERS, Eugene W.; LIPMAN, David J.. Basic local alignment search tool. **Journal Of Molecular Biology**.v. 215, n. 3, p. 403-410, out. 1990. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836\(05\)80360-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-2836(05)80360-2).

ANDRÉ, C.; GUAGUÈRE, E.; CHAUDIEU, G.; GENEVOIS, J. -P.; DEVAUCHELLE, P. The importance of dogs for comparative pathology and genetics: Examples of shared resources and programmes. **Revue Vétérinaire Clinique**, v. 52, n.3-4, p. 55-70, 2017.

AVISE, John C.; AYALA, Francisco J.. **In the Light of Evolution III: Two Centuries of Darwin**. Washington: National Academy Of Sciences, 2006. 414 p. (I). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK219727/>. Acesso em: 14 jul. 2021.

BANNASCH, Danika; FAMULA, Thomas; DONNER, Jonas; ANDERSON, Heidi; HONKANEN, Leena; BATCHER, Kevin; SAFRA, Noa; THOMASY, Sara; REBHUN, Robert. The effect of inbreeding, body size and morphology on health in dog breeds. **Canine Medicine And Genetics**, v. 8, n. 1, dez. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s40575-021-00111-4>.

BARTOLOMÉ, Nerea; SEGARRA, Sergi; ARTIEDA, Marta; FRANCINO, Olga; SÁNCHEZ, Elisenda; SZCZYPIORSKA, Magdalena; CASELLAS, Joaquim; TEJEDOR, Diego; CERDEIRA, Joaquín; MARTÍNEZ, Antonio. A Genetic Predictive Model for Canine Hip Dysplasia: integration of genome wide association study (gwas) and candidate gene approaches. **Plos One**.v. 10, n. 4. 13 abr. 2015. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0122558>.

CBRV (Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária). **Normas do Colégio Brasileiro de Radiologia Veterinária (CBRV) para avaliação da displasia coxofemoral em cães**. Disponível em: <<http://www.abrv.org.br/arquivos/normas-do-colegio.pdf>>. Acesso em: 23 ago. 2021.

CFMV (Conselho Federal de Medicina Veterinária) **Censo**. Disponível em: <<https://www.cfmv.gov.br/censo/transparencia/2017-2020/2020/12/11/>>. Acesso em 23 de ago. 2021.

COOPMAN, F.; VERHOEVEN, G.; SAUNDERS, J.; DUCHUTEAU, L.; VAN-BREE, H. Prevalence of hip dysplasia, elbow dysplasia and humeral head osteochondrosis in dogs breeds in Belgium. **The Veterinary Record**, v. 163, n. 22, p. 654-658, 2008.

CUI, Ya; CUI, Zhe; XU, Jianfeng; HAO, Dapeng; SHI, Jiejun; WANG, Dan; XIAO, Hui; DUAN, Xiaohong; CHEN, Runsheng; LI, Wei. NG-Circos: next-generation circos for data visualization and interpretation. **Nar Genomics And Bioinformatics**.v. 2, n. 3. 1 set. 2020. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nargab/lqaa069>.

DULEBA, Anna; SKONIECZNA, Katarzyna; BOGDANOWICZ, Wiesław; MALYARCHUK, Boris; GRZYBOWSKI, Tomasz. Complete mitochondrial genome database and standardized classification system for *Canis lupus familiaris*. **Forensic Science International: Genetics**.v. 19, p. 123-129, nov. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsigen.2015.06.014>.

FCI (Fédération Cynologique Internationale). FCI Requeriments for Official Hip Dysplasia Screening. **Workshop on Hip Dysplasia**, Copenhagen, DK, 2006. Disponível em: <<http://www.fci.be/en/Hip-and-Elbow-Dysplasia-162.html>>. Acesso em: 12 ago. 2021.

BUTLER, J. Ryan; GAMBINO, Jennifer. Canine Hip Dysplasia. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**.v. 47, n. 4, p. 777-793, jul. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cvsm.2017.02.002>.

FIEDEL, Stuart J. Man's best friend – mammoth's worst enemy? A speculative essay on the role of dogs in Paleoinian colonization and megafaunal extinction. **World Archaeology**.v. 37, n. 1, p. 11-25, mar. 2005. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/0043824042000329540>.

FLÜCKIGER, M. Scoring radiographs for canine hip dysplasia – The big three organizations in the world. **European Journal of Companion Animal Practice**, n. 17, p. 135-140, 2007.

FRANTZ, Laurent A. F.; MULLIN, Victoria E.; PIONNIER-CAPITAN, Maud; LEBRASSEUR, Ophélie; OLLIVIER, Morgane; PERRI, Angela; LINDERHOLM, Anna; MATTIANGELI, Valeria; TEASDALE, Matthew D.; DIMOPOULOS, Evangelos A.. Genomic and archaeological evidence suggest a dual origin of domestic dogs. **Science**.v. 352, n. 6290, p. 1228-1231, 2 jun. 2016. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaf3161>.

FREEDMAN, A. H.; WAYNE, R. K.. Deciphering the Origin of Dogs: from fossils to genomes. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 5, n. 1, p. 281-307, 8 fev. 2017. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-022114-110937>.

FRIEDENBERG, Steven G.; ZHU, Lan; ZHANG, Zhiwu; FOELS, Wendy van Den Berg; SCHWEITZER, Peter A.; WANG, Wei; FISHER, Patricia J.; DYKES, Nathan L.; COREY, Elizabeth; VERNIER-SINGER, Margaret. Evaluation of a fibrillin 2 gene haplotype associated with hip dysplasia and incipient osteoarthritis in dogs. **American Journal Of Veterinary Research**, v. 72, n. 4, p. 530-540, abr. 2011. American Veterinary Medical Association (AVMA). <http://dx.doi.org/10.2460/ajvr.72.4.530>.

GALIBERT, Francis; QUIGNON, Pascale; HITTE, Christophe; ANDRÉ, Catherine. Toward understanding dog evolutionary and domestication history. **Comptes Rendus Biologies**.v. 334, n. 3, p. 190-196, mar. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.011>.

GAUTHIER, Jeff; VINCENT, Antony T; CHARETTE, Steve J; DEROME, Nicolas. A brief history of bioinformatics. **Briefings In Bioinformatics**.v. 20, n. 6, p. 1981-1996, 3 ago. 2018. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/bib/bby063>.

GENUÍNO, P.C.; MIRANDA, F.G.; REZENDE, C.M.F.; TÔRRES, R.C.s.. Parâmetros radiográficos de displasia coxofemoral na raça Rottweiler. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**.v. 67, n. 4, p. 1178-1182, ago. 2015. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-8252>.

GERMONPRÉ, Mietje; LÁZNIČKOVÁ-GALETOVÁ, Martina; SABLIN, Mikhail V.. Palaeolithic dog skulls at the Gravettian Předmostí site, the Czech Republic. **Journal Of Archaeological Science**.v. 39, n. 1, p. 184-202, jan. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2011.09.022>.

GERMONPRÉ, Mietje; SABLIN, Mikhail V.; STEVENS, Rhiannon E.; HEDGES, Robert E.M.; HOFREITER, Michael; STILLER, Mathias; DESPRÉS, Viviane R.. Fossil dogs and wolves from Palaeolithic sites in Belgium, the Ukraine and Russia: osteometry, ancient dna and stable isotopes. **Journal Of Archaeological Science**.v. 36, n. 2, p. 473-490, fev. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jas.2008.09.033>.

GIACCO L. D., CATTANO C. Introduction to Genomics. In: Espina V., Liotta L. (eds) Molecular Profiling. **Methods in Molecular Biology** (Methods and Protocols), Humana Press. vol 823 p. 79-88. 21 out 2011. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-216-2_6.

GINJA, M.M.D.; SILVESTRE, A.M.; GONZALO-ORDEN, J.M.; FERREIRA, A.J.A.. Diagnosis, genetic control and preventive management of canine hip dysplasia: a review. **The Veterinary Journal**.v. 184, n. 3, p. 269-276, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.04.009>.

GRIFFITHS, Anthony J. F.; WESSLER, Susan R.; CARROLL, Sean B.; DOEBLEY, John. **Introdução à genética**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 2036 p.

GUILLIARD, Mike. The PennHIP method of predicting canine hip dysplasia. **In Practice**.v. 36, n. 2, p. 66-74, fev. 2014. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1136/inp.f7486>.

GUO, G.; ZHOU, Z.; WANG, Y.; ZHAO, K.; ZHU, L.; LUST, G.; HUNTER, L.; FRIEDENBERG, S.; LI, J.; ZHANG, Y.. Canine hip dysplasia is predictable by genotyping. **Osteoarthritis And Cartilage**.v. 19, n. 4, p. 420-429, abr. 2011. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2010.12.011>.

GUO, Yan; ZHAO, Shilin; SHENG, Quanhu; SAMUELS, David C; SHYR, Yu. The discrepancy among single nucleotide variants detected by DNA and RNA high throughput sequencing data. **Bmc Genomics**.v. 18, n. 6, out. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-017-4022-x>.

HARDISON, Ross C. Comparative Genomics. **Plos Biology**.v. 1, n. 2. 17 nov. 2003. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pbio.0000058>.

HAYES, B.J.; BOWMAN, P.J.; CHAMBERLAIN, A.J.; GODDARD, M.e.. Invited review: genomic selection in dairy cattle. **Journal Of Dairy Science**.v. 92, n. 2, p. 433-443, fev. 2009. American Dairy Science Association. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2008-1646>.

KARDONG, Kenneth V. **Vertebrados: anatomia comparada, função e evolução**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, 2016. 1172 p.

LARSON, G.; KARLSSON, E. K.; PERRI, A.; WEBSTER, M. T.; HO, S. Y. W.; PETERS, J.; STAHL, P. W.; PIPER, P. J.; LINGAAS, F.; FREDHOLM, M.. Rethinking dog domestication by integrating genetics, archeology, and biogeography. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**. v. 109, n. 23, p. 8878-8883, 21 maio 2012. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1203005109>.

LEATHLOBHAIR, Máire Ní; PERRI, Angela R.; IRVING-PEASE, Evan K.; WITT, Kelsey E.; LINDERHOLM, Anna; HAILE, James; LEBRASSEUR, Ophelie; AMEEN, Carly; BLICK, Jeffrey; BOYKO, Adam R.. The evolutionary history of dogs in the Americas. **Science**.v. 361, n. 6397, p. 81-85, 5 jul. 2018. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aao4776>.

LEDLEY, R. S.. Digital Electronic Computers in Biomedical Science: computers make solutions to complex biomedical problems feasible, but obstacles curb widespread use. **Science**.v. 130, n. 3384, p. 1225-1234, 6 nov. 1959. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.130.3384.1225>.

LEE, Jongin *et al.* Synteny Portal: a web-based application portal for synteny block analysis. **Nucleic Acids Research**.v. 44, n. 1, p. 35-40, 6 maio 2016. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkw310>.

LEROY, Grégoire; PHOCAS, Florence; HEDAN, Benoit; VERRIER, Etienne; ROGNON, Xavier. Inbreeding impact on litter size and survival in selected canine breeds. **The Veterinary Journal**, v. 203, n. 1, p. 74-78, jan. 2015. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2014.11.008>.

LEONARD, J. A.. Ancient DNA Evidence for Old World Origin of New World Dogs. **Science**.v. 298, n. 5598, p. 1613-1616, 22 nov. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1076980>.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; KARLSSON, E. K.; JAFFE, D. B.; KAMAL, M.I; CLAMP, M.; CHANG, J. L.; KULBOKAS, E. J.. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803-819, dez. 2005. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature04338>

MA, Yu; COYNE, Clarice J; A GRUSAK, Michael; MAZOUREK, Michael; CHENG, Peng; MAIN, Dorrie; MCGEE, Rebecca J. Genome-wide SNP identification, linkage map construction and QTL mapping for seed mineral concentrations and contents in pea (*Pisum sativum* L.). **Bmc Plant Biology**.v. 17, n. 1. 13 fev. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12870-016-0956-4>.

MARÇAIS, Guillaume; DELCHER, Arthur L.; PHILLIPPY, Adam M.; COSTON, Rachel; SALZBERG, Steven L.; ZIMIN, Aleksey. MUMmer4: a fast and versatile genome alignment system. **Plos Computational Biology**.v. 14, n. 1. 26 jan. 2018. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005944>.

METZKER, Michael L.. Sequencing technologies — the next generation. **Nature Reviews Genetics**.v. 11, n. 1, p. 31-46, 8 dez. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2626>.

MIKKOLA, L.; HOLOPAINEN, S.; PESSA-MORIKAWA, T.; LAPPALAINEN, A. K.; HYTÖNEN, Marjo K.; LOHI, H.; IIVANAINEN, Antti. Genetic dissection of canine hip dysplasia phenotypes and osteoarthritis reveals three novel loci. **Bmc Genomics**, v. 20, n. 1, dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-019-6422-6>

MIKKOLA, Lea; KYÖSTILÄ, Kaisa; DONNER, Jonas; LAPPALAINEN, Anu K.; HYTÖNEN, Marjo K.; LOHI, Hannes; IIVANAINEN, Antti. An across-breed validation study of 46 genetic markers in canine hip dysplasia. **Bmc Genomics**, v. 22, n. 1, 21 jan. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-021-07375-x>.

MINKIN, Ilya; PATEL, Anand; KOLMOGOROV, Mikhail; VYAHHI, Nikolay; PHAM, Son. Sibelia: a scalable and comprehensive synteny block generation tool for closely related microbial genomes. **Lecture Notes In Computer Science**.p. 215-229, 2013. Springer Berlin Heidelberg. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-40453-5_17.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_006593.4?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_049271.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_051815.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_049232.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

NG, Pauline C.; KIRKNESS, Ewen F.. Whole Genome Sequencing. **Methods In Molecular Biology**.p. 215-226, 2010. Humana Press. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-60327-367-1_12

OSTRANDER, E. A.; DREGER, D. L.; EVANS, J. M.. Canine Cancer Genomics: lessons for canine and human health. **Annual Review Of Animal Biosciences**, v. 7, n. 1, p. 449-472, 15 fev. 2019. Annual Reviews. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-animal-030117-014523>.

OSTRANDER, E. A.. The canine genome. **Genome Research**, v. 15, n. 12, p. 1706-1716, 1 dez. 2005. Cold Spring Harbor Laboratory. <http://dx.doi.org/10.1101/gr.3736605>.

OSTRANDER, E. A.; WAYNE, R. K.; FREEDMAN, A. H.; DAVIS, B. W.. Demographic history, selection and functional diversity of the canine genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 18, n. 12, p. 705-720, 25 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.67>.

PARKER, Heidi G.; DREGER, Dayna L.; RIMBAULT, Maud; DAVIS, Brian W.; MULLEN, Alexandra B.; CARPINTERO-RAMIREZ, Gretchen; OSTRANDER, Elaine A.. Genomic Analyses Reveal the Influence of Geographic Origin, Migration, and Hybridization on Modern Dog Breed Development. **Cell Reports**.v. 19, n. 4, p. 697-708, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2017.03.079>.

PERRI, Angela; WIDGA, Chris; LAWLER, Dennis; MARTIN, Terrance; LOEBEL, Thomas; FARNSWORTH, Kenneth; KOHN, Luci; BUENGER, Brent. NEW EVIDENCE OF THE EARLIEST DOMESTIC DOGS IN THE AMERICAS. **American Antiquity**.v. 84, n. 1, p. 68-87, 26 dez. 2018. Cambridge University Press (CUP). <http://dx.doi.org/10.1017/aaq.2018.74>

RETTENMAIER, J. L.; KELLER, G. G.; LATTIMER, J. C.; CORLEY, E. A.; ELLERSIECK, M. R. Prevalence of canine hip dysplasia in a veterinary teaching hospital population. *Veterinary Radiology & Ultrasound*, v. 43, n. 4, p. 313 – 318, 2002.

SÁNCHEZ-MOLANO, E.; WOOLLIAMS, J.A.; BLOTT, S.C.; WIENER, P.. Assessing the impact of genomic selection against hip dysplasia in the Labrador Retriever dog. **Journal Of Animal Breeding And Genetics**.v. 131, n. 2, p. 134-145, 18 out. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/jbg.12056>

SÁNCHEZ-MOLANO, E.; A WOOLLIAMS, J.; PONG-WONG, R.; CLEMENTS, D. N; BLOTT, S. C; WIENER, P.. Quantitative trait loci mapping for canine hip dysplasia and its related traits in UK Labrador Retrievers. **Bmc Genomics**, v. 15, n. 1, 2014. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-833>.

SÁNCHEZ-MOLANO, Enrique; PONG-WONG, Ricardo; CLEMENTS, Dylan N.; BLOTT, Sarah C.; WIENER, Pamela; WOOLLIAMS, John A.. Genomic prediction of traits related to canine hip dysplasia. **Frontiers In Genetics**.v. 6. 13 mar. 2015. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00097>.

SAVOLAINEN, P.. Genetic Evidence for an East Asian Origin of Domestic Dogs. **Science**.v. 298, n. 5598, p. 1610-1613, 22 nov. 2002. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.1073906>.

SCHLUTER, Dolph. Ecology and the origin of species. **Elsevier**. v. 16, n. 7, p. 372-380, 1 jul. 2001. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016953470102198X?via%3Dihub>. Acesso em: 09 jan. 2022.

SMITH, G. K. Canine hip dysplasia: pathogenesis, diagnosis and genetic control. **Veterinary Quarterly**, v. 20, n. 1, 1998.

SMITH, T.F.; WATERMAN, M.s.. Identification of common molecular subsequences. **Journal Of Molecular Biology**.v. 147, n. 1, p. 195-197, mar. 1981. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836\(81\)90087-5](http://dx.doi.org/10.1016/0022-2836(81)90087-5)

VERHOEVEN, Geert E. C.; COOPMAN, Frank; DUCHATEAU, Luc; BOSMANS, Tim; VAN RYSSEN, Bernadette; VAN BREE, Henri. INTEROBSERVER AGREEMENT ON THE ASSESSABILITY OF STANDARD VENTRODORSAL HIP-EXTENDED RADIOGRAPHS AND ITS EFFECT ON AGREEMENT IN THE DIAGNOSIS OF CANINE HIP DYSPLASIA

AND ON ROUTINE FCI SCORING. **Veterinary Radiology & Ultrasound**.v. 50, n. 3, p. 259-263, maio 2009. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1740-8261.2009.01530.x>.

VERLI, Hugo. **Bioinformática: da Biologia à Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular - Sbbq, 2014. 282 p.

VONHOLDT, Bridgett M.; POLLINGER, John P.; LOHMUELLER, Kirk E.; HAN, Eunjung; PARKER, Heidi G.; QUIGNON, Pascale; DEGENHARDT, Jeremiah D.; BOYKO, Adam R.; EARL, Dent A.; AUTON, Adam. Genome-wide SNP and haplotype analyses reveal a rich history underlying dog domestication. **Nature**.v. 464, n. 7290, p. 898-902, 17 mar. 2010. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nature08837>.

WAJID, B.; SERPEDIN, E. Review of General Algorithmic Features for Genome Assemblers for Next Generation Sequencers. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, v. 10, n. 2, p.58-73, abr. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.gpb.2012.05.006>.

WANG, Shizhi; STRANDBERG, Erling; ARVELIUS, Per; CLEMENTS, Dylan N.; WIENER, Pamela; FRIEDRICH, Juliane. Genome-wide association studies for canine hip dysplasia in single and multiple populations – implications and potential novel risk loci. **Bmc Genomics**, v. 22, n. 1, 2 set. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1186/s12864-021-07945-z>.

WANG, Zhong; GERSTEIN, Mark; SNYDER, Michael. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. **Nature Reviews Genetics**.v. 10, n. 1, p. 57-63, jan. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg2484>.

ZHU, L.; ZHANG, Z.; FRIEDENBERG, S.; JUNG, S. W.; PHAVAPHUTANON, J.; VERNIER-SINGER, M.; COREY, E.; MATEESCU, R.; DYKES, N.; SANDLER, J.; ACLAND, G.; LUST, G.; TODHUNTER, R. The long (and winding) road to gene Discovery of canine hip dysplasia. **The Veterinary Journal**, n. 181, p. 97-110, 2009.

ANEXO A – Regiões selecionadas na análise de sintenia *

Raça: BOXER

INÍCIO	PARADA	SÍMBOLO DO GENE
15519889	15543346	CTXN3
15585674	15802362	CCDC192
15779066	15789427	LOC111098012
15815470	15823823	LOC119873880
15823858	15868921	LOC111098011
15873574	15876046	LOC119874032
15939385	16051806	SLC12A2
15957731	16043939	LOC119873881
16026162	16029169	LOC111098013
16054039	16059627	LOC111097970
16107059	16346938	FBN2
16627813	16643074	LOC119881498
16695506	16764832	SLC27A6
16766375	16807166	LOC102157337
16807451	16825469	ISOC1
16843972	17038982	LOC111098014
17072306	17300168	ADAMTS19
17093620	17093726	LOC119874124
17283065	17292586	LOC119873882
17305450	17332029	MINAR2
17327695	17349499	LOC106559469

Fonte: NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_006593.4?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

Raça: GREAT DANE

INÍCIO	PARADA	SÍMBOLO DO GENE
16102337	16102801	LOC100684948
16184380	16207830	CTXN3
16250159	16466623	CCDC192
16479763	16488072	LOC119873880
16488110	16533311	LOC111098011
16537963	16540434	LOC119874032
16604869	16717534	SLC12A2
16623234	16709658	LOC119873881
16691856	16694873	LOC111098013
16719766	16725640	LOC111097970
16778944	17018819	FBN2
17368838	17438043	SLC27A6
17439375	17480251	LOC102157337
17480530	17498517	ISOC1
17518614	17718340	LOC111098014
17747255	17980124	ADAMTS19
17768867	17768973	LOC119874124
17963010	17972541	LOC119873882
17985402	18012018	MINAR2
18007654	18029468	LOC106559469
18052071	18077158	LOC111098015

Fonte: NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_049271.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

<

Raça: LABRADOR RETRIEVER

INÍCIO	PARADA	SÍMBOLO DO GENE
17461257	17484706	CTXN3
17527221	17744013	CCDC192
17720672	17731073	LOC111098012
17757098	17765450	LOC119873880
17765485	17810821	LOC111098011
17815473	17817944	LOC119874032
17881289	17994035	SLC12A2
17899648	17986156	LOC119873881
17968366	17971383	LOC111098013
17996268	18001908	LOC111097970
18048902	18289161	FBN2
18648822	18718353	SLC27A6
18719690	18760671	LOC102157337
18760942	18778889	ISOC1
18798741	18998380	LOC111098014
19039211	19255681	ADAMTS19
19048891	19048997	LOC119874124
19238553	19248096	LOC119873882
19260965	19287961	MINAR2
19283226	19305060	LOC106559469
19327686	19352763	LOC111098015

Fonte: NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_051815.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

Raça: PASTOR ALEMÃO

INÍCIO	PARADA	SÍMBOLO DO GENE
16628433	16651892	CTXN3
16700581	16917273	CCDC192
16893998	16904333	LOC111098012
16930371	16938726	LOC119873880
16938761	16983871	LOC111098011
16988520	16990992	LOC119874032
17054476	17167223	SLC12A2
17072885	17159341	LOC119873881
17141535	17144552	LOC111098013
17169456	17175106	LOC111097970
17228746	17469482	FBN2
17752468	17767741	LOC119876764
17820174	17889446	SLC27A6
17890787	17931641	LOC102157337
17931905	17950287	ISOC1
17970410	18166170	LOC111098014
18199198	18428137	ADAMTS19
18220829	18220935	LOC119874124
18411006	18420554	LOC119873882
18433417	18460805	MINAR2
18456075	18477888	LOC106559469

Fonte: NCBI (National Center for Biotechnology Information). Disponível em: <
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_049232.1?report=graph. Acesso em: 09 ago. 2021.

*A raça Basenji não apresentou dados detalhados da região selecionada, sendo utilizada uma região aproximada dos genes de acordo com dados do NCBI.