

## **IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES PRESENTES NO CROMOSSOMO 14 COM CARACTERÍSTICAS FUNCIONAIS E DE CONFORMAÇÃO NO HOLSTEIN CANADENSE**

ELISA FERREIRA MARQUES<sup>1</sup>, LUIZ FERNANDO AARÃO MARQUES<sup>2</sup> STEPHEN MOORE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Beefbooster Inc., Calgary, Alberta, T1Y5E4 emarques@ualberta.ca; <sup>2</sup>Centro de Ciências Agrárias da UFES, lfernando@cca.ufes.br; <sup>3</sup>University of Alberta, Edmonton, Alberta, T6E2C8.

### **Resumo**

O objetivo desse estudo foi de identificar marcadores genéticos em associação com características funcionais e de conformação, utilizando um painel de alta densidade do cromossomo 14 do bovino. Foram calculados desequilíbrio de ligação e heterozigosidade para identificar 139 marcadores para uma análise de loci de características quantitativas (QTL) utilizando 280 touros. Sete das nove características resultaram em QTL com significância: facilidade de parto, fertilidade das filhas, escore de células somáticas, velocidade de ordenha, permanência no rebanho, pés e pernas e sistema mamário. O efeito de substituição dos alelos identificou 35 marcadores genéticos, sendo que alguns estão localizados em genes com ligação biológica com as características analisadas. O método de desequilíbrio de ligação foi eficaz para identificar marcadores genéticos no gado Holstein canadense.

**Palavras-chave:** desequilíbrio de ligação, heterozigosidade, raça holandesa, seleção genômica

### **Introdução**

O método de análise de associação genômica tem sido o preferido para os painéis de alta densidade como o Bovine50K SNPchip. Esse método é prático porque é facilmente aplicado na análise de todos os SNPs (single nucleotide polymorphisms), sem precisar subdividir esses SNPs por cromossomos e conseqüentemente fazer a análise de ligação. Praticidade a parte, esta metodologia não está isenta de críticas. Nos estudos em humanos, para os quais esses chips de alta densidade já estão disponíveis há vários anos, a análise de associação genômica ainda não conseguiu desvendar os segredos contidos na *black box* (caixa preta) das doenças genéticas como prometido (Armstrong *et al.*, 2009; Yang *et al.*, 2007). As maiores críticas à esse método são a falta de ligação biológica entre os marcadores que demonstram associação estatística na análise e as características em si; a falta de transferência da associação de uma população para a outra (Frazer *et al.*, 2009) e a quantidade de amostras disponíveis para esse tipo de análises (NCI-NHGRI Working Group *et al.*, 2007). Ao invés do uso da análise de associação como uma ferramenta única, essa deveria ser utilizada como uma ferramenta complementar à análise de linkage para desvendar os mistérios por trás das variações genéticas das características complexas.

Uma maneira de melhorar o desempenho dos testes múltiplos nas análises de alta densidade é primeiro identificar os marcadores com efeitos redundantes na população de

interesse. Uma solução seria o cálculo do desequilíbrio de ligação (Linkage Disequilibrium) entre os marcadores e a seleção de um marcador de cada grupo, o que diminuiria o número de SNPs analisados sem a perda de informação. Marcadores podem ser selecionados com base na heterozigosidade, para garantir que os touros sejam capazes de transmitir esses alelos para a sua progênie. Neste estudo foi utilizado o método da associação genômica com base no cálculo de desequilíbrio de ligação para identificar marcadores no cromossomo bovino número 14 associados com características funcionais e de conformação no Holstein canadense.

### **Material e métodos**

**População e fenótipos.** Os touros da raça Holstein, foram disponibilizados pela Semex Canadá. A informação sobre o pedigree foi obtida no site [www.holstein.ca/english/Animlainq/animalinq.asp](http://www.holstein.ca/english/Animlainq/animalinq.asp). Nove características foram analisadas: facilidade de parto (efeito genético direto e materno), permanência no rebanho, fertilidade das filhas, sistema mamário, pés e pernas, conformação leiteira, velocidade de ordenha e escore de células somáticas.

**Mapeamento de QTL.** Duzentos e oitenta touros pertencendo a 7 famílias (entre 24 e 36 progenies por touro) participaram da análise de intervalo múltiplo de qtl apresentado por Knott *et al.* (1996). Probabilidades condicionais de herança alélica foram obtidas pelo programa QTL EXPRESS (Seaton *et al.*, 2002) e modeladas usando o SAS (2008). Os valores genéticos (DEPs) dos touros foram obtidos da website do Holstein Canada ([www.holstein.ca/english/Animlainq/animalinq.asp](http://www.holstein.ca/english/Animlainq/animalinq.asp)). As probabilidades condicionais foram utilizadas como fatores fixos, o genótipo do gene DGAT1 como covariável e a acurácia foi usada como um fator de ponderação, com o objetivo de remover a diferença no número de filhas que contribuíram para o cálculo da DEP de cada touro.

**Análises estatísticas.** O efeito de substituição dos alelos foi estimado com o PROC MIXED do SAS (SAS INSTITUTE 2008) usando o mesmo modelo estatístico da análise de QTL

**Compilação dos marcadores.** Haplotipos foram gerados de acordo com os procedimentos descritos em Marques *et al.* (2008). O software HAPLOVIEW (Barret *et al.*, 2005) foi usado para calcular o desequilíbrio de ligação e a heterozigosidade. Um total de 502 marcadores foram usados para gerar informação de desequilíbrio de ligação com o objetivo de selecionar marcadores com efeitos não-redundantes. A seleção de SNP resultou em 139 marcadores. Os genótipos foram gerados pelo ILLUMINA BEADSTATION 500G.

### **Resultados e Discussão**

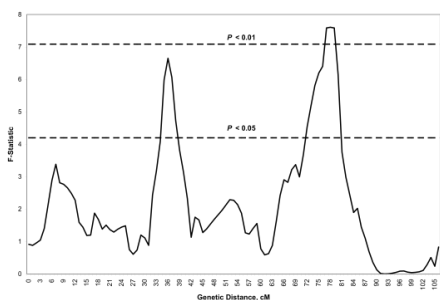
A análise de QTL utilizada nesse estudo é equivalente àquela descrita em Schnabel *et al.* (2005) que inclui o gene DGAT1 como um cofator para remover o efeito que esse gene tem em algumas das características incluídas neste estudo. Das nove características, sete (facilidade de parto, permanência no rebanho, sistema mamário, fertilidade das filhas, pés e pernas, velocidade de ordenha e escore de células somáticas) apresentaram resultados significativos (1% ou 5%). A Tabela 1 apresenta o local (distância em centiMorgans), os

efeitos de cada QTL, o nível de significância do QTL e o número de SNPs que fazem parte do QTL. A Figura 1 mostra os perfis de quatro características.

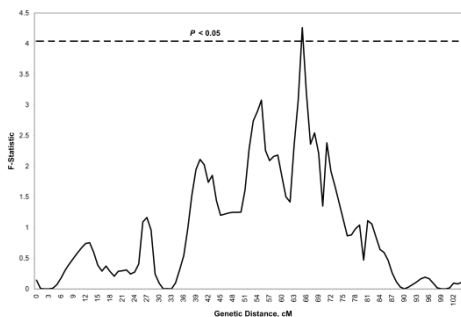
Tabela 1. Loci de Características Quantitativas (QTL) no cromossomo bovino 14 usando sete famílias de Holstein Canadense

Característica	centiMorgan	Efeito	Erro Padrão	Probabilidade	# SNPs (P<0.01)
Facilidade de parto	36	1.55	0.61	0.05	5
	78	1.60	0.59	0.01	7
Fertilidade das Filhas	65	0.92	0.45	0.05	3
Sistema Mamário	28	1.64	0.79	0.05	1
Velocidade de Ordenha	39	-1.30	0.58	0.05	0
	37	-0.15	0.04	0.01	4
Escore Cél. Somáticas	70	-0.16	0.04	0.01	3
	52	0.06	0.03	0.05	2
Permanência no Rebanho	65	0.06	0.03	0.05	7
	71	-1.15	0.60	0.05	1
Pés e Pernas	71	-1.15	0.60	0.05	1
	85	-1.30	0.60	0.05	2

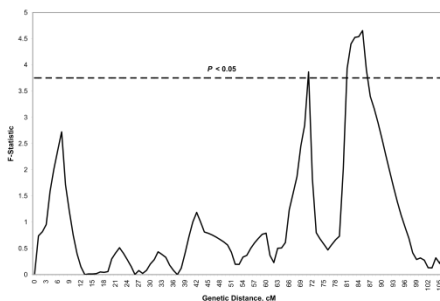
a) Facilidade de parto (efeito direto)



b) Fertilidade das filhas



c) Pés e pernas



d) Escore de células somáticas

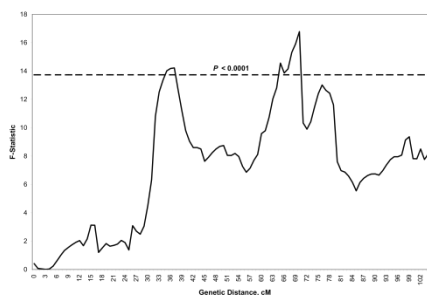


Figura 1: Testes de F entre famílias para os perfis de QTL no cromossomo 14 do bovino usando 139 SNPs com adoção do gene *DGATI* as cofator .

Para minimizar o número de falsos-positivos, apenas os SNPs sob QTL apresentando significância ( $P < 0,01$ ) foram listados. Entre as características na tabela 1, a velocidade de ordenha foi a única que não teve SNPs que atingissem significância de 1%. Ambos facilidade de parto e permanência no rebanho atingiram QTLs com sete SNPs com valor  $P < 0,01$ . Dos 35 SNPs desse QTL, um era em comum com outras características (fertilidade das filhas e permanência = 67.8 cM). Fertilidade das filhas e escore de células somáticas foram duas características que tiveram SNPs com os menores níveis de significância:  $1.77 \times 10^{-5}$  e  $1.48 \times 10^{-6}$  respectivamente. No caso de escore de células somáticas, o SNP faz parte do gene que atua na regulação dos mecanismos de defesa, confirmando a associação biológica entre a escore de células somáticas e o SNP. Na característica fertilidade das filhas, o SNP está localizado em um gene responsável por regular energia, atuando, em consequência, no aumento de peso. Mesmo que o link não seja óbvio, esse SNP pode ser um candidato importante, considerando o link entre fertilidade e o peso da vaca (Roche *et al.*, 2009).

### **Conclusões**

Combinando análises de associação e de ligação com o desequilíbrio de ligação, aumenta-se o poder de causalidade, reduzindo as possibilidades de ocorrência de falso-positivos. O método utilizado aqui, mesmo sendo trabalhoso, confirmou a sua eficiência com o painel de alta densidade. Para a avaliação de marcadores associados com características funcionais e de conformação no holstein canadense, análises futuras deverão incluir expansão do método com outros cromossomos.

### **Literatura citada**

- ARMSTRONG D. L.; REIFF, A.; MYONES, B. L. et al. *Genes and Imm.*, 10:446-456, 2009.
- BARRET, J. C.; FRY, B.; MALLER, J. et al. *Bioinformatics*, 21:263-265, 2005.
- FRAZER, K. A.; MURRAY, S. S.; SCHORK, N. J. et al. *Nat Rev Genet.*, 10: 241-251, 2009.
- KNOTT, S. A.; ELSEN, J. M.; AND HALEY, C.S. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 71-80, 1996.
- MARQUES, E.; SCHNABEL, R.D.; STOTHARD, P. et al. *BMC Genet*, 9: 45, 2008.
- CHANOCK, S. J.; MANOLIO, T. et al. NCI-NHGRI Working Group on Replication in Association Studies, *Nature*, 447: 655-60, 2007.
- ROCHE, J. R.; FRIGGENS, N. C.; KAY, J. K. et al. *J. Dairy Sci.*, 92:5769-5801, 2009.
- SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user's guide: version 9.1.3. Cary: SAS Institute, 2008.
- SCHNABEL, R.D; SONSTEGARD, T. S.; TAYLOR, J. F. et al. *Anim Genet.*, 36: 408-416, 2005.
- SEATON, G.; HALEY, C. S.; AND KNOTT, S. A. et al. *Bioinformatics*, 18: 339-340, 2002.
- YANG, Q.; BIERNACKA, J. M.; CHEN, M. H. et al. *Genetic Epidemiology*, 31: S34-42, 2007.