

## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

### Meta-análise de associação genômica ampla para duração do período gestacional em bovinos da raça Nelore – Resultados preliminares<sup>1\*</sup>

Márcia Cristina Matos<sup>2\*</sup>, Yuri Tani Utsunomiya<sup>3</sup>, Adriana Santana do Carmo<sup>4</sup>, Wilter Ricardo Russiano Vicente<sup>5</sup>, Alexeia Barufatti Grisolia<sup>6</sup>, José Fernando Garcia<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Trabalho financiado pelo CNPq (560922/2010-8 e 483590/2010-0) e Fapesp (2011/16643-2 e 2010/52030-2).

<sup>2</sup>Doutora em Medicina Veterinária. e-mail: [marciacmattos@yahoo.com.br](mailto:marciacmattos@yahoo.com.br)

<sup>3</sup>Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – FCAV/UNESP, Jaboticabal. Bolsista FAPESP.

<sup>4</sup>Deoxi Biotecnologia, Araçatuba. Bolsista SET-C do CNPq

<sup>5</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal – FCAV/UNESP, Jaboticabal.

<sup>6</sup>Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais – FCBA/UFMG, Dourados.

<sup>7</sup>Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal – FMVA/UNESP, Araçatuba.

\*Trabalho desenvolvido durante curso de doutorado (Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – FCAV/UNESP, Jaboticabal. Bolsista CAPES).

**Resumo:** Baseado em dois estudos independentes de associação genômica ampla (GWAS) foi conduzida uma meta-análise para duração do período gestacional (DPG) em touros e vacas da raça Nelore. As análises foram realizadas a partir de dados de ~777.000 marcadores do tipo polimorfismo de nucleotídeo de sítio único (SNP) e valores genéticos preditos (EBVs). O método dos quadrados mínimos ponderados com correção para estratificação populacional foi utilizado nas análises de associação e o método de Stouffer na meta-análise. A prospecção de genes candidatos nas regiões associadas foi realizada pelo mapeamento de genes potencialmente em desequilíbrio de ligação (LD) com o SNP. Foi identificado um SNP associado nos cromossomos 1, 10, 11 e 22 ( $P < 10^{-5}$ ) e, pela análise de LD, foram mapeados 36 genes: 2, 1, 30 e 3, respectivamente nestes cromossomos. Os genes e marcadores que foram identificados podem contribuir para maior entendimento da DPG e eficiência reprodutiva na raça Nelore.

**Palavras-chave:** análise genômica ampla, *Bos primigenius indicus*, característica reprodutiva, genômica funcional, SNP

### Meta-analysis of genome-wide association studies for gestation length in Nelore cattle - Preliminary results

**Abstract:** We performed a meta-analysis of two genome-wide association studies (GWAS) for gestation length (GL) using estimated breeding values (EBVs) of progeny-tested bulls and cows genotyped for over 777,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs). Association analyses were conducted with least squares method and corrected for population stratification. Stouffer's method was analytical approach used in meta-analysis. We prospected candidate genes within the detected regions by mapping of genes potentially in linkage disequilibrium (LD) with SNP. One SNP with  $P < 10^{-5}$  was identified on chromosomes 1, 10, 11 e 22 and 36 genes were mapped by LD analysis: 2, 1, 3 and 30, respectively on these chromosomes. These findings can contribute to the understanding of GL and reproductive performance in Nelore cattle.

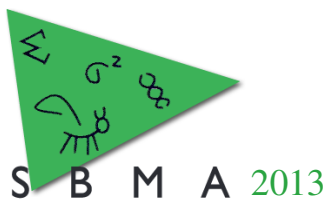
**Keywords:** *Bos primigenius indicus*, fertility trait, functional genomics, genome-wide analysis, SNP

### Introdução

A DPG é um dos componentes do intervalo entre partos e, por isso, apresenta importância econômica quando avaliada em conjunto com outras características reprodutivas. Este fato tem levado a sua inclusão nas atuais avaliações genéticas dos programas de melhoramento das raças de corte zebuínas (ROCHA et al., 2005; MUCARI et al., 2011).

Com a finalidade de identificar marcadores SNP em LD com variantes genéticas associadas à DPG, foi conduzida uma meta-análise de dois estudos independentes do tipo GWAS cujos resultados podem contribuir para a identificação de regiões cromossômicas, genes e vias biológicas implicadas na manifestação desse fenótipo reprodutivo na raça Nelore.

### Material e Métodos



## X Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Uberaba, MG – 18 a 23 de agosto de 2013

Os dados fenotípicos compostos utilizados neste estudo foram os EBVs para DPG de 602 touros e 1.221 fêmeas da raça Nelore (GWAS 1 e 2, respectivamente). Esses dados foram obtidos a partir da avaliação genética do ano de 2012 do Programa de Melhoramento Genético da Conexão Delta G (ALIANÇA, 2012). A DPG foi computada pelo intervalo entre as datas de inseminação artificial e de parto, baseado nos registros repetidos de progênie. As análises genéticas para o cálculo dos EBVs foram conduzidas utilizando o modelo animal multivariado e a característica foi analisada como uma característica da matriz.

O painel BovineHD BeadChip foi utilizado para a genotipagem do DNA extraído de amostras de sêmen ou foliculo piloso dos animais (Illumina Inc., EUA). A posição dos marcadores foi baseada na versão de montagem do genoma *Bos taurus* UMD 3.1. As análises foram realizadas sob auxílio de funções customizadas em R e biblioteca GenABEL (AULCHENKO et al., 2007). No controle de qualidade (QC) foram estabelecidos os seguintes critérios de exclusão de marcadores: “call rate” < 98%, MAF < 2% e  $P < 10^{-5}$  no Teste Exato de Fisher para HWE. Foram excluídas amostras duplicadas (>95% de IBS) e aquelas com mais de 10% de dados faltantes.

A associação entre cada EBV e cada SNP foi conduzida em três etapas: (1) regressão linear múltipla utilizando o método dos quadrados mínimos ponderados para o quadrado da acurácia do EBV, com a inclusão dos autovetores significativos da análise de escalonamento multidimensional (MDS); (2) obtenção dos resíduos estimados na regressão; e (3) teste de escore sobre os resíduos obtidos. Para corrigir a baixa inflação presente foi utilizado o Genomic Control. A abordagem utilizada na meta-análise consistiu no método de Stouffer. O valor de significância adotado no presente estudo foi  $P < 10^{-5}$  (associação moderada). O decaimento de LD em torno de cada SNP significativamente associado foi calculado por meio da correlação pareada entre este e marcadores vizinhos, considerando distância máxima de 500 kb. O segmento cromossômico delimitado foi considerado como um único *locus* e genes sobrepostos foram considerados em LD com o SNP. Esta análise foi realizada com o auxílio do software Plink.

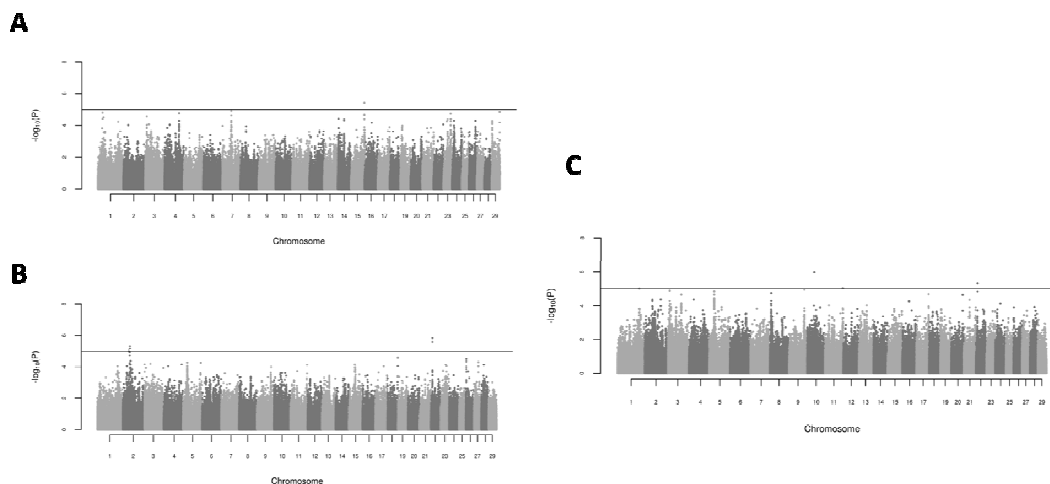
### Resultados e Discussão

Baseado nos critérios de QC, acurácia (>50%) e/ou valores marginais dos EBVs, permaneceram para as análises 587 touros e 496.893 SNPs e 1.126 fêmeas e 469.329 SNPs, respectivamente para GWAS 1 e 2. Os dados fenotípicos desses animais foram aproximadamente normais, com valores médios de  $-0,145 \pm 2,158$  dias e  $-0,229 \pm 1,712$  dias, correspondentemente para GWAS 1 e 2. No total, 28 e 45 autovetores das análises de MDS foram significativamente correlacionados com os EBVs e corresponderam a 12,30 e 14,66% da variabilidade genética dos mesmos. Os fatores de inflação lambda estimados para GWAS 1 e 2 foram leves e aceitáveis (1,04 e 1,01, respectivamente). A meta-análise dos dois GWAS foi conduzida para 1.713 animais e 447.800 SNPs.

Os resultados dos testes de associação e da meta-análise estão apresentados em "Manhattan Plots" ( $-\log_{10}$  dos valores de P) (Figura 1). Os picos mais relevantes detectados no GWAS 1 foram os dos cromossomos (BTAs) 4, 7, 15, 23, 24, 26 e 29. No GWAS 2 foram observados picos principalmente nos BTAs 2, 5, 15, 22 e 26. Em ambos os estudos houve destaque para o BTA15, com uma variante intergênica significativamente associada no GWAS 1 (rs110122464). Foram cinco SNPs significativamente correlacionados no GWAS 2, todos intergênicos e presentes no BTA2 (rs134124800, rs135320424 e rs135483619) e BTA22 (rs42666514 e rs135637131). Na meta-análise foram verificados picos relevantes nos BTAs 2, 3 e 5 e detectados três marcadores intergênicos significativos nos BTAs 10, 11 e 22 (rs134847975, rs1331182563 e rs135637131, respectivamente) e uma variante intrônica no BTA 1 (rs42888968). No total 36 genes foram mapeados contra as janelas de LD, distribuídos da seguinte maneira: BTA 1 (n=2), BTA 10 (n=1), BTA 11 (n=31) e BTA 22 (n=3) (Tabela 1).

### Conclusões

Tendo como base a metodologia utilizada e os bancos de dados acessados neste estudo, foram identificados 36 genes potencialmente candidatos para o fenótipo composto avaliado. Esses encontros podem, juntamente com a posterior verificação de suas funções e de regiões de QTL já descritas na literatura, contribuir para maior entendimento da DPG e da eficiência reprodutiva na raça Nelore.



**Figura 1.** (A) Associação de 496.893 SNPs com os valores genéticos preditos para duração do período gestacional em touros Nelore (GWAS 1). (B) Associação de 469.329 SNPs com os valores genéticos preditos para duração do período gestacional em vacas Nelore (GWAS 2). (C) Meta-análise de dois GWAS para duração do período gestacional baseada em 447.800 SNPs em bovinos Nelore.

**Tabela 1.** Resultados sumarizados da análise de decaimento de desequilíbrio de ligação para cada SNP significativamente associado na meta-análise GWAS.

<i>SNP</i>	<i>BTA</i>	<i>SNP</i> <i>“tags”</i>	<i>Genes</i> <i>mapeados</i>	<i>Nome do gene</i>
rs42888968	1	257	2	BT.87114, C3ORF58
rs134847975	10	106	1	BT.89031
rs1331182563	11	136	30	BT.45831, QSOX2, GPSM1, DNLZ, BT.26197, SNAPC4, SDCCAG3, PMPCA, INPP5E, SEC16A, NOTCH1, EGFL7, BT.22590, FAM69B, BT.29579, SURF6, MED22, RPL7A, SURF1, SURF2, C9ORF96, REXO4, ADAMTS13, MGC139698, BT.25025, TMEM8C, BT.52241, FAM163B, DBH, VAV2
rs135637131	22	224	3	BT.34295, BT.32379, BT.46948

#### Agradecimentos

Ao Zebu Genome Consortium (ZGC) e a Conexão Delta G.

#### Literatura citada

- ALIANÇA: **Sumário de touros 2012 Aliança Nelore**. GenSys Consultores Associados, 2012, 97p.
- AULCHENKO, Y.S.; RIPKE, S.; ISAACS, A. et al. GenABEL: an R library for genome-wide association analysis. *Bioinformatics*, v.23, p.1294-1296, 2007.
- MUCARI, T.B.; ALENCAR, M.M.; BARBOSA, P.F. et al. Análise genética do período de gestação em animais de um rebanho Canchim: estimação de parâmetros genéticos e escolha entre modelos animais alternativos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, v.40, n.6, p.1211-1216, 2011.
- ROCHA, J.C.M.C.; TONHATI, H.; ALENCAR, M.M. et al. Componentes de variância para o período de gestação em bovinos de corte. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v.57, n.6, p.784-791, 2005.