

Estudo de associação entre a variação no número de cópias (CNVs) e o conteúdo de ácidos graxos poliinsaturados da carne em bovinos da raça Nelore

Marcos Lemos¹, Sabrina Kluska¹, Mariana Piatto Berton², Angelica Simone Cravo Pereira², Lucia Galvão de Albuquerque¹ e Fernando Baldi¹,

¹ Departamento de Ciência Animal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, São Paulo, Brasil;

² Departamento de Nutrição e Produção Animal, Faculdade de Ciência Animal e Engenharia de Alimentos, Pirassununga, Brasil;

*Autor correspondente: sabrinakluska@gmail.com

Resumo: O objetivo do presente trabalho foi identificar regiões de CNVs (CNVRs) associadas ao perfil de ácidos graxos poliinsaturados da carne de bovinos da raça Nelore. Foram utilizadas informações de 3764 animais genotipados com um painel de alta densidade e 963 animais com informação fenotípica. Para a determinação do perfil de ácidos graxos foram retiradas amostras de carne do músculo *Longissimus thoracis*, entre a 12^a e 13^a costelas dos animais com informação de fenótipo e armazenadas a -80°C. Foram analisados o total de ácidos graxos poli-insaturados, os ômega 3 (alfa-linolênico e docosaexanóico) e os ômega 6 (araquidônico e linoleico). Posto isto, foram identificadas as CNVRs e associadas, por meio do estudo de associação ampla, com as características estudadas. Foram detectadas 66 CNVRs significativas para o grupo de ácidos graxos poliinsaturados, sendo o ácido graxo docosaexaenóico o qual apresentou o maior número de regiões. Foram identificadas regiões de perda, ganho e mistas. Nas CNVRs significativas foram encontrados 64 genes, no entanto nem todos são relacionados as características estudadas. Varias regiões CNV's associadas ao perfil de ácidos graxos poliinsaturados foram identificadas. A identificação dessas regiões permitirá o conhecimento de genes candidatos, aprimorando a seleção de tais características.

Palavras-chave: estratégias de seleção, GWAS, qualidade da carne

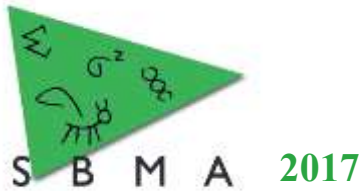
Association between variation in the number of copies (CNVs) and polyunsaturated fatty acids of the meat of Nelore cattle

Abstract: The objective of this study was to identify regions of CNVs (CNVRs) associated to the polyunsaturated fatty acid profile of Nelore beef cattle. We used information from 3764 animals genotyped with a panel of high density and 963 animals with phenotypic information. To determine the fatty acid profile, samples of *Longissimus thoracis* muscle were collected between the 12th and 13th ribs of the animals with phenotype information and stored at -80°C. The total number of polyunsaturated fatty acids, omega 3 (alpha-linolenic and docosahexoic acid) and omega 6 (arachidonic and linoleic) were analyzed. Thus, the CNVRs and associates were identified through the study of broad association with the characteristics studied. Sixty-six CNVRs were detected for the total polyunsaturated fatty acids, with the fatty acid docosahexaenoic having the highest number of regions. Loss, gain and mixed regions were identified. In the significant CNVRs, 64 genes were found, however not all are related to the characteristics studied. Several CNV regions associated with the polyunsaturated fatty acid profile were identified. The identification of these regions will allow the knowledge of candidate genes, improving the selection of such traits.

Keywords: GWAS, meat quality, selection strategies

Introdução

Além de importante para a saúde humana, o perfil de ácidos graxos da carne bovina é um dos fatores que determinam características que garantem a qualidade da carne, como sabor e suculência. Várias pesquisas com enfoque na qualidade da carne, visando estratégias capazes de adequar o produto as exigências do mercado consumidor tem sido realizadas. Entretanto, no se que se diz respeito a estudos genéticos, poucos são os trabalhos nessa área. Nesse sentido, o estudo de marcadores moleculares, tais como, variação no número de cópias (CNVs) são importantes para detectar variações genéticas, em número de cópias, relacionadas a fenótipos, possibilitando melhorar a compreensão dos mecanismos genéticos e fisiológicos que contribuem para as características produtivas, bem como a seleção de animais mais produtivos e eficientes. Já o estudo de associação ampla (GWAS) permite associar estes marcadores



XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

as características de interesse, o que possibilita a identificação de marcadores informativos. Nesse sentido, o objetivo do presente estudo foi estudar a associação genômica de CNVs com o perfil de ácidos graxos poliinsaturados da carne de bovinos da raça Nelore.

Material e Métodos

O banco de dados utilizado no presente estudo é composto por informações de 3794 animais genotipados, com um painel de alta densidade (Bovine High-Density BeadChip, Illumina) com 777 962 SNPs, e 963 animais com informação fenotípica. Os fenótipos foram coletados de animais machos da raça Nelore, terminados em confinamento, com aproximadamente 24 meses. Após o abate, as carcaças foram armazenadas durante 48 horas em temperatura 0-2 °C. Posto isto, retiraram-se amostras de carne do músculo *Longissimus thoracis*, entre a 12^a e 13^a costelas de cada animal e armazenaram-se as a -80°C até à análise para determinar o perfil de ácidos graxos. O perfil de ácidos graxos foi determinado no Laboratório de Ciências da Carne (LCC) no Departamento de Nutrição e Produção Animal da FMVZ / USP, utilizando o método de extração de Folch et al. (1957).

Foram analisados o perfil de ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) totais, os ômega 6, araquidônico e linoleico (C20:4 n-6 e C18:2 cis9 cis12 n-6), e os ômega 3, alfa-linolênico e docosaexanóico (C18:3 n-3 e C22:6 n-3), identificadas as regiões CNVRs e posteriormente realizado um estudo de associação genômica ampla (GWAS) para a identificação de regiões genéticas associadas às características estudadas. O fenótipo (Y) foi ajustado utilizando um modelo animal, considerando os efeitos fixos do grupo contemporâneo (ano, grupo de manejo e fazenda). Como covariável considerou-se a idade do animal ao abate. O modelo é dado por:

$$y = Xb + e$$

Onde y é um vetor dos valores fenotípicos das características, b é um vetor de efeitos fixos e covariáveis, X é a matriz de incidência de efeitos fixos e e é o vetor residual aleatório com distribuição:

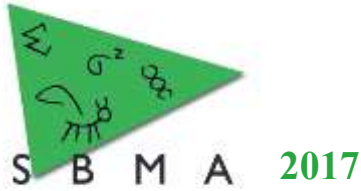
$$N \sim (0, \sigma_e^2)$$

Para análise dos dados foram criados dois grupos de animais com fenótipos extremos, para cada característica avaliada, uma vez que, na análise com todos os animais com informação fenotípica (963) poucos CNVR's significativos foram encontrados. Então, considerou-se 25% dos animais com maior valor para característica e 25% dos animais com os menores valores fenotípicos, sendo estes classificados como 1 e 0, respectivamente.

Para detecção dos CNVs, além dos dados SNP, foi utilizado o software Genome Studio 1.0, e o algoritmo PennCNV, o qual incorpora múltiplas fontes de informação, e é baseado em um modelo de Markov oculto para a detecção de CNV a partir dos dados de genotipagem de alta densidade. No controle de qualidade dos CNVs foram eliminadas amostras com desvio padrão para LRR (razão log R) > 0,30; BAF (frequência do alelo B) > 0,05 e valor do fator de ondas de > 0,01. As regiões CNV (CNVRs) foram geradas por CNVs sobrepostos entre amostras usando o software CNVRuler, onde sobreposições acima de 0,01 foram consideradas. Além disso, foram excluídas regiões genômicas com densidade <10% ("recorrência 0,1"), com o intuito de eliminar falsos-positivos. A pesquisa de CNVR significativas foi contrastada com o genoma bovino UMD3.1 descrito por pesquisadores do Centro Nacional de Biotecnologia e Informação (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e do banco dados Ensembl Genome Browser (<http://www.ensembl.org/index.html>). Nesses bancos de dados, foi possível identificar segmentos localizados dentro ou perto de genes que pudessem explicar a variabilidade fenotípica dos caracteres estudados. A classificação dos genes em relação à sua função biológica foi realizada pelo banco de dados para anotação, visualização e descoberta integrada (DAVID) usando como base todos os genes descritos no genoma bovino.

Resultados e Discussão

Sessenta e seis CNVRs foram significativos ($p < 0,05$) para o grupo de ácidos graxos poliinsaturados. O ácido graxo docosahexaenóico (C22: 3 n-6) apresentou o maior número de CNVRs associadas (17), sendo quatro regiões de perda, duas de ganho e 11 de região mista. O ácido linolênico



XII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal Ribeirão Preto, SP – 12 e 13 de junho de 2017

(C18: 3 n-3) e a soma dos PUFA apresentaram 14 CNVRs associados e ambos apresentaram grande número de regiões mistas (12 e 10, respectivamente).

A soma de PUFA apresentou 64 genes identificados nos seus CNVRs. No cromossomo 16 foi identificada uma região de perda denominada CNVR_4714_1 em que o gene SLC9C2 foi identificado. Este gene pertence à família de portadores de soluto e está relacionado a vias como o transporte de glicose e outros açúcares, sais biliares e ácidos orgânicos, íons metálicos e compostos de amina, sendo responsável pelo transporte de hexose para as células de mamíferos, uma vez que estes açúcares são incapazes de difundir através das membranas celulares e requerem proteínas transportadoras para entrar e sair das células (He et al., 2009).

Na CNVR_6481_3, uma região mista localizada no cromossomo 26 a 51 Mb está associada à soma dos PUFA, nesta região foram identificados os genes NKX6-2 e INPP5A. O gene NKX6-2, codifica proteínas para o desenvolvimento de organismos multicelulares (GO: 0007275), enquanto que o gene INPP5A codifica uma proteína que mobiliza o cálcio intracelular e atua como mediador da resposta celular a estímulos (Mills et al., 2008).

Para o ácido araquidônico foram observadas 11 CNVR significativas e vinte LOC dentro destas regiões CNV. Dentre as regiões significativas identificadas, apenas a região, CNVR_2687_1, localizada no cromossomo 11, apresentou gene relacionados às vias metabólicas dos AG, sendo ele o ALK. Observou-se o mesmo comportamento para o ácido linoleico, o qual apresentou 10 CNVR significativos com alguns LOC sem informação funcional descritas e apenas um gene identificado, RAPGEF6, numa CNVR mista denominada CNVR_1446_1 localizada no cromossomo 7. O gene RAPGEF6 está relacionado com a regulação da atividade da GTPase (GO:0043087). A CNVR_1446_1 localizada no cromossomo 7, também foi significativa para os ácidos graxos linolênico e docosahexaenóico.

Conclusão

Várias regiões CNVs foram associadas com o perfil de ácidos graxos polinsaturados. A identificação destas regiões e dos respectivos genes candidatos, associados a processos metabólicos lipídicos e à regulação da atividade de enzimas, devem contribuir para incrementar o conhecimento genético relacionado a ácidos graxos da carne de bovinos da raça Nelore (*Bos indicus*) e aprimorar a seleção de tais características para favorecer a saúde humana.

Literatura citada

FOLCH, J., LEES, M., SLOANE-STANLEY, G.H. A simple method for the isolation and purification of lipids from animal tissues. **J. Biol.Chem.** 1957;.226:497-509.

HE L, VASILIOU K, NEBERT DW.; Analysis and update of the human solute carrier (SLC) gene superfamily. **Hum Genomics.** 2009 Jan;3(2):195-206.

MILLS SJ1, VANDEPUT F, TRUSSELLE MN, SAFRANY ST, ERNEUX C, POTTER BV. Benzene polyphosphates as tools for cell signalling: inhibition of inositol 1,4,5-trisphosphate 5-phosphatase and interaction with the PH domain of protein kinase B alpha. **Chembiochem.** 2008 Jul 21;9(11):1757-66