

XIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal
Salvador, BA – 17 e 18 de junho de 2019

Análise de associação genômica para hérnia umbilical em suínos comerciais utilizando abordagem de marcadores múltiplos

Essamai Brizola Lagos¹, Michele Porto Pires², Rafael Keith Ono², Adriana Mércia Guaratini Ibelli², Jane de Oliveira Peixoto², Mauricio Egídio Cantão², Marcos Antonio Zanella Morés², Lana Teixeira Fernandes³, Victor Breno Pedrosa^{1*}, Mônica Corrêa Ledur²

¹Departamento de pós-graduação em Zootecnia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, PR, Brasil.

²Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC, Brasil.

³Centro de Diagnóstico de Sanidade Animal - CEDISA, Concórdia, SC, Brasil.

*Autor correspondente: vbpedrosa@uepg.br

Resumo: A hérnia umbilical é um defeito congênito muito frequente na suinocultura, na qual ocorre a saída de vísceras abdominais através do anel umbilical. Sua origem é multifatorial, envolvendo fatores ambientais e genéticos. No entanto, ainda não está bem definida a participação genética sobre o desenvolvimento das hérnias umbilicais, embora já existam alguns estudos genéticos. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi identificar regiões do genoma associadas a ocorrência deste defeito em suínos comerciais. Foi realizada associação genômica (GWAS) utilizando-se marcadores múltiplos, com 83 animais afetados e 203 animais controle. Foram encontrados 33 SNPs significativos, distribuídos nos cromossomos SSC4, SSC5, SSC6, SSC7, SSC10, SSC13 e SSC15, indicando influência genética para a ocorrência de hérnias umbilicais em suínos. Dessa forma, sugere-se que a ocorrência de SNPs significativos em algumas regiões distribuídas nos cromossomos, relacionados a ocorrência de hérnias umbilicais, poderá auxiliar na identificação de suínos susceptíveis a este problema.

Palavras-chave: Anel umbilical, Blossoc, Defeitos congênitos, influência genética, marcadores genéticos, perdas econômicas

Genome-wide association analysis for umbilical hernia in commercial pigs using multiple markers approach

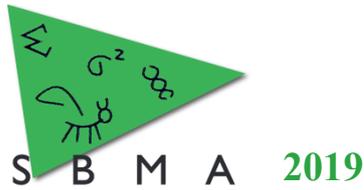
Abstract: Umbilical hernia is a very common congenital defect in swine, in which the abdominal contents pass through the umbilical ring. Its origin is multifactorial, involving environmental and genetic factors. However, genetic participation in the development of umbilical hernias is not well defined yet, although some genetic studies have already been conducted. Thus, the objective of this study was to identify genomic regions associated to the occurrence of this defect in commercial pigs. A genome-wide association study (GWAS) was performed using multiple markers, with 83 affected and 203 control pigs. There were 33 significant SNPs distributed on chromosomes SSC4, SSC5, SSC6, SSC7, SSC10, SSC13 and SSC15, indicating genetic influence on the occurrence of umbilical hernias in pigs. Therefore, it is suggested that the occurrence of significant SNPs in some regions distributed on the chromosomes, related to the occurrence of umbilical hernias, could help identifying pigs susceptible to this problem.

Keywords: Blossoc, congenital defects, economic losses, genetic influence, genetic markers, umbilical ring

Introdução

As hérnias umbilicais (HU) são defeitos congênitos de grande ocorrência na criação de suínos, caracterizados pelo aumento do anel umbilical e a protusão do conteúdo abdominal. Esse defeito gera perdas econômicas para a indústria, devido ao retardo do crescimento e a piora da conversão alimentar. A origem da HU é multifatorial, em que as causas podem ser ambientais ou genéticas. Não existe embasamento genético totalmente estabelecido que explique os fatores genéticos associados à HU. Porém, a presença deste defeito em animais pertencentes à mesma família e a diferença de incidência entre raças distintas torna provável que o componente genético seja relevante para o acometimento da anomalia.

Para obter mais informações a respeito da influência genética sobre HU, várias metodologias de associação genômica podem ser realizadas utilizando-se análises com marcadores únicos ou múltiplos. A



utilização de múltiplos marcadores pode reduzir o número de falsos positivos e aumentar o poder de detecção de SNPs de médio e pequeno efeito (Ledur et al., 2009). Desta forma, o objetivo deste estudo foi realizar análise de associação genômica para identificar regiões que controlam a hérnia umbilical em suínos comerciais, utilizando a abordagem de marcadores múltiplos.

Material e Métodos

Foram utilizados nesse estudo, 286 suínos comerciais híbridos (146 machos e 140 fêmeas) da linhagem Agroceres Pic®, com idade aproximada de 8 a 21 semanas, provenientes de granjas do estado de Santa Catarina. O diagnóstico dos animais com hérnia umbilical foi realizado pela observação clínica, sendo selecionados 83 animais afetados (casos) e 203 animais normais (controle - sem hérnias). Para a genotipagem, foram coletadas amostras do tecido da orelha dos animais, mantidas a -80°C até o momento da extração do DNA. O DNA foi extraído utilizando o Purelink Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Após a extração, o DNA foi quantificado e sua qualidade e integridade foram avaliadas por espectrofotometria (ND-200 NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA), na qual somente amostras de DNA que apresentaram a razão 260/280 entre 1,8 a 2,0 foram utilizadas para as próximas análises. Essas amostras foram preparadas, obtendo uma concentração final de 500 ng e posteriormente encaminhadas para genotipagem, realizada comercialmente pela empresa Neogen (Deoxi, Araçatuba, SP), usando o GGP *Porcine BeadChip* (Neogen, Lincoln, NE, EUA) que contém 51.558 SNPs distribuídos no genoma suíno. O controle de qualidade dos dados foi realizado com o programa PLINK (Purcell et al., 2007), em que foram excluídos SNPs com *call rate* $\leq 98\%$, frequência do alelo menor (MAF) $< 0,03$ e Equilíbrio de Hardy-Weinberg com $p < 1 \times 10^{-6}$. Foram removidas amostras com *call rate* $\leq 90\%$ do total de SNPs e com desvios-padrão de ± 3 da média de heterozigosidade. Foi realizada a análise da estrutura da população pelo gráfico de Escala Multidimensional (MDS). A análise de associação foi realizada com o programa Blossoc (Mailund et al., 2006), considerando-se os escores 4,79, 5,53 e 7,15 como sendo os limiares de associação sugestiva, moderada e significativa, respectivamente. Uma vez que o Blossoc utiliza abordagem Bayesiana, definiu-se os escores acima a partir de 1%, 0,5% e 0,1% do total de SNPs com maiores escores.

Resultados e Discussão

Após o controle de qualidade, 32.682 SNPs foram mantidos. A associação caso-controle dos SNPs com hérnia umbilical em suínos cruzados pode ser visualizada pelo gráfico Manhattan (Figura 1). Neste estudo, foram encontrados um total de 33 SNPs significativamente associados à ocorrência de hérnias umbilicais em suínos comerciais. Os SNPs encontram-se distribuídos em 7 cromossomos (SSC4, SSC5, SSC6, SSC7, SSC10, SSC13 e SSC15). Pôde-se observar que os cromossomos SSC4 e SSC15 foram os que apresentaram um maior número de marcadores significativos, com 9 e 11 SNPs, respectivamente. Fernandes et al. (2018) realizaram análise de associação genômica com marcadores únicos na mesma população utilizada neste estudo e encontraram SNPs associados a HU distribuídos em 4 cromossomos (SSC4, SSC6, SSC11, SSC13) e em uma região ainda não localizada no genoma, com um total de 5 SNPs associados com a doença. Tal fato reforça que análises de GWAS com marcadores múltiplos podem detectar mais SNPs em relação a análises com um único marcador, sendo estes possivelmente de médio ou mesmo de pequeno efeito.

Ding et al. (2009), estudando regiões no genoma de suínos que poderiam estar ligados a susceptibilidade a hérnias umbilicais em animais provenientes do cruzamento das raças Duroc e Erhualian, identificaram *loci* responsáveis pela susceptibilidade nos cromossomos SSC1, SSC2, SSC3, SSC4, SSC6, SSC7, SSC8, SSC10, SSC11, SSC13, SSC14 e SSC15. Sevillano et al. (2015), estudando a ocorrência de hérnias escrotais/inguinais em duas raças distintas de suínos (Large White e Landrace), verificaram 10 SNPs significativos na raça Large White, distribuídos em cinco regiões, sendo elas nos cromossomos SSC3, SSC5, SSC7, SSC8 e SSC13, e na raça Landrace, 22 SNPs significativos, distribuídos em cinco cromossomos: SSC1, SSC2, SSC4, SSC10 e SSC13. Isso indica a possibilidade de haver genes em comum influenciando as hérnias escrotais e umbilicais. Os SNPs identificados neste estudo abrangem alguns cromossomos nos quais já foram detectados SNPs associados a hérnias, sugerindo proximidade genômica entre algumas regiões para o acometimento de hérnias em suínos. As regiões encontradas neste trabalho

poderão auxiliar na detecção de genes responsáveis por fatores biológicos que levam a ocorrência de HU, sendo uma possível ferramenta a ser utilizada na seleção genética suína.

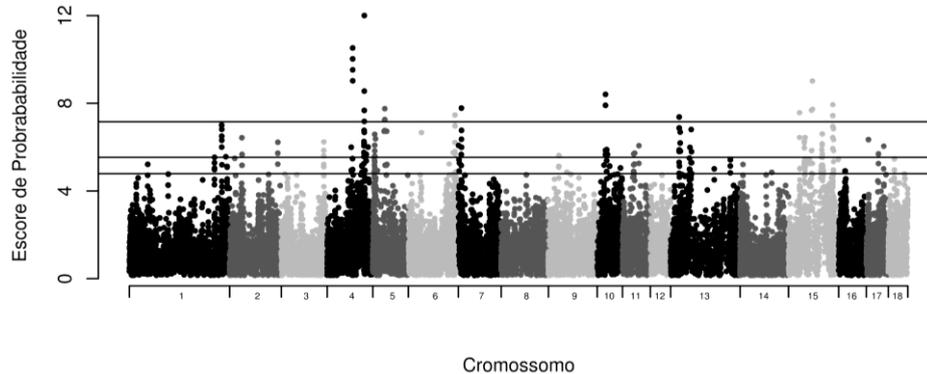


Figura 1. Gráfico Manhattan representando associação genômica para hérnias umbilicais em suínos. A linha superior representa o limiar de associação significativa com escore de probabilidade multinominal de 7,15, a linha média um limiar de associação moderada, de 5,53, e a linha inferior um limiar de associação sugestiva, com escore de probabilidade de 4,79.

Conclusão

Foram encontrados 33 SNPs significativos distribuídos nos cromossomos SSC4, SSC5, SSC6, SSC7, SSC10, SSC13 e SSC15 que poderão auxiliar no melhoramento genético dos rebanhos comerciais de suínos, por meio de análises genômicas.

Agradecimentos

Este projeto foi financiado pelo CNPq, processo número 476146/2013-5. Os autores agradecem a Alexandre L. Tessman pela assistência técnica e a Fundação Araucária pela concessão da bolsa de estudos ao primeiro autor. Michele P. Pires e Rafael K. Ono foram bolsistas do ICASA, SC, Brasil. Mônica C. Ledur é bolsista de produtividade do CNPq.

Literatura citada

- Ding N. S., Mao H. R., Guo Y.M., Ren J., Xiao S. J., Wu G. Z., Shen H. Q., Wu L. H., Ruan G. F., Brenig B. & Huang L. S. 2009. A genome-wide scan reveals candidate susceptibility loci for pig hernias in an intercross between White Duroc and Erhualian. *Journal of Animal Science*, v. 87, n. 8, p. 2469-2474.
- Fernandes L. T., Ono R. K., Ibelli A. M. G., Lagos E. B., Morés M. A. Z., Cantão M. E., Lorenzetti W. R., Peixoto J. de E., Pedrosa V. B. & Ledur, M. C. 2018. Novel putative candidate genes associated with umbilical hernia in pigs. In: World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, 2018, Auckland, New Zealand.
- Ledur M. C., Navarro N. & Pérez-enciso, M. 2009. Data modeling as a main source of discrepancies in single and multiple marker association methods. *BMC Proceedings*, v. 3, n. S1, p. S9.
- Mailund T., Besenbacher S. & Schierup M. H. 2006. Whole genome association mapping by incompatibilities and local perfect phylogenies. *BMC Bioinformatics*, v. 7, n. 1, p. 454.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M. A., Bender D., Maller J., Sklar P., Bakker P. I., 9 M. J. & Sham P. C. 2007. PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, v. 81, n. 3, p. 559–575.
- Sevillano, C. A., Lopes, M. S., Harlizius, B., Hanenberg, E. H., Knol, E. F., & Bastiaansen, J. W. 2015. Genome-wide association study using deregressed breeding values for cryptorchidism and scrotal/inguinal hernia in two pig lines. *Genetics Selection Evolution*, v. 47, n. 1, p. 18, 2015.