

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

IDENTIFICAÇÃO DE REGIÕES GENÔMICAS ASSOCIADAS A MANCHAS BRANCAS NA CABEÇA DE EQUINOS DA RAÇA QUARTO DE MILHA

Silel Vinicius Simões Andrade Maciel^{1*}, Victor Hugo Oliveira de Queiroz², Guilherme Luís Pereira³, Fernanda Nascimento de Godoi⁴, Rogério Abdallah Curi⁵, Raphael Bernal Costa⁶, Chiara Albano Araújo de Oliveira⁶, Gregório Miguel Ferreira de Camargo⁶.

*autor para correspondência: silel200@hotmail.com

¹Graduando em Zootecnia - UFBA, bolsista PIBIC/CNPq, Salvador, BA.

²Graduando em Zootecnia – UFBA, Salvador, BA.

³Aluno de doutorado em Genética e Melhoramento Animal/Unesp-Jaboticabal. Jaboticabal, SP.

⁴Professora Adjunto da UFRRJ, Seropédica, RJ.

⁵Professor Assistente Doutor Unesp-Botucatu. Botucatu, SP.

⁶Professor Adjunto da Escola de Medicina Veterinária e Zootecnia - UFBA. Salvador, BA.

Abstract: The white markings on head of horses have been under study and some genes such as: *MC1R*, *MITF*, *KIT* and *PAX3*, were associated to the trait. The aim of the presente study was to identify genomic regions associated with the presence of white spots on the head of a Quarter Horses. A total 360 animals were genotyped with SNPs chips and a single-step genome-wide association (GWAS) was used. The results indicated the trait as qualitative, since few loci were associated to it. The main chromosome windows were located on chromosomes ECA3, ECA10, ECA18 and ECA22, corresponding to 26.89%, 16.08%, 13.91% and 7.45% of the additive genetic variance, respectively. Across the genes identified, *MC1R* gene was highlighted, since it has been indicated by other studies. However, new genomic regions were herein identified for the first time, *ZEB2* gene appears as a candidate since it causes depigmentation in rats. The results permit future fine-mapping studies searching for mutations that affect the trait. It may permit horse selection in future.

Palavras-chave: GWAS, *MC1R*, SNP, *V1R*, *ZEB2*.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Introdução

Durante o processo evolutivo da humanidade, muitos animais foram domesticados, dentre eles os cavalos. Esse processo acarretou a diversas modificações fenotípicas sendo que uma delas o surgimento de manchas brancas em sua pelagem. Segundo Fang et al 2009, estudos comprovaram que a variação na pelagem de animais cresceu rapidamente após o início do processo de domesticação como resultado da ação seletiva ocasionada por humanos.

As manchas brancas na cabeça dos cavalos são acompanhadas de uma pele despigmentada. Logo, é um problema para animais que ficam muito tempo expostos ao sol, pois se tornam propensos a desenvolver melanoma na área despigmentada.

Estudos anteriores buscando a explicação para o surgimento de manchas brancas em cavalos encontraram alguns genes, estes são: *MC1R* (HAASE et al., 2013), *MITF* (HAASE et al., 2013; HAUSWIRTH et al., 2012), *KIT* (HAASE et al., 2013) e *PAX3* (HAUSWIRTH et al., 2012).

Logo, o trabalho tem o objetivo de identificar os genes responsáveis por causar manchas brancas na cabeça de equinos da raça Quarto de Milha. A identificação desses genes é de importância para entender a arquitetura genética da característica, além do que a Associação Brasileira dos Criadores de Cavalo Quarto de Milha tem critérios específicos sobre a extensão das manchas na cabeça dos animais para efetuar o registro. Assim, o estudo genético dessa característica analisa aspectos que definem a raça.

Material e Métodos

Para a realização da pesquisa foram utilizados 360 equinos registrados da raça Quarto de Milha, de ambos os sexos, nascidos entre 1985 e 2012. Parte dos animais foram genotipados com o chip Illumina Equine SNP50 BeadChip (54K) e parte com o Illumina Equine SNP70 BeadChip (65K). O critério de limpeza dos dados e imputação estão descritos em Pereira et al. (2017). Os fenótipos referentes às marcações presentes na cabeça dos animais foram obtidos a partir das resenhas cedidas pela Associação Brasileira

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

de Criadores de Cavalos Quarto de Milha (ABQM) feitas de maneira binária com notas de “0” para ausência de mancha branca e “1” para presença de mancha.

Para a associação ampla do genoma (GWAS) foi utilizada a metodologia single-step. O modelo unicaracterística foi aplicado: $Y = Za + e$, em que Y é o vetor fenotípico das observações, Z é a matriz de incidência que relaciona os fenótipos dos animais, a é o vetor do efeito dos animais e e é o vetor de efeitos residuais.

Para cálculo dos valores genômicos, utilizou-se o programa BLUPf90 e os efeitos dos SNPs foram obtidos a partir dos valores genômicos de forma iterativa com auxílio do programa postGSf90, usando-se duas iterações.

O gráfico do tipo Manhattan, contendo a variância explicada pelas janelas formadas por 100 SNPs adjacentes foram utilizados na identificação das regiões cromossômicas de maior efeito sobre a característica. A identificação dos genes presentes nas janelas de maior efeito foi realizada pelo NCBI (National Center for Biotechnology Information).

Resultados e Discussão

No presente estudo, os resultados foram apresentados num gráfico Manhattan plot (Figura 1). Sendo que cada SNP foi representado pela porcentagem de variância genética aditiva que ele explica. Foram observados poucos picos, o que nos leva a concluir que se trata de uma característica qualitativa. Os maiores picos, detectados foram nos cromossomos ECA3, ECA18, ECA10 e ECA22. As posições genômicas das janelas encontradas foram: 3:33.889.026pb – 38.443.100pb, 18:24.816.850pb – 28.495.276pb, 10:26.030.896pb – 29.730.492pb, 10:22.096.555pb – 25.796.358pb e 22:27.882.468pb – 31.464.084pb, respectivamente. As porcentagens de variância genética aditiva explicada pelas janelas anteriormente citadas foram 26,89%, 13,91%, 9,22%, 6,86% e 7,45%, respectivamente (Figura 1).

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Manhattan Plot SNP Variance explained by 100adjacents SNP window - Trait: 1 Effect: 1

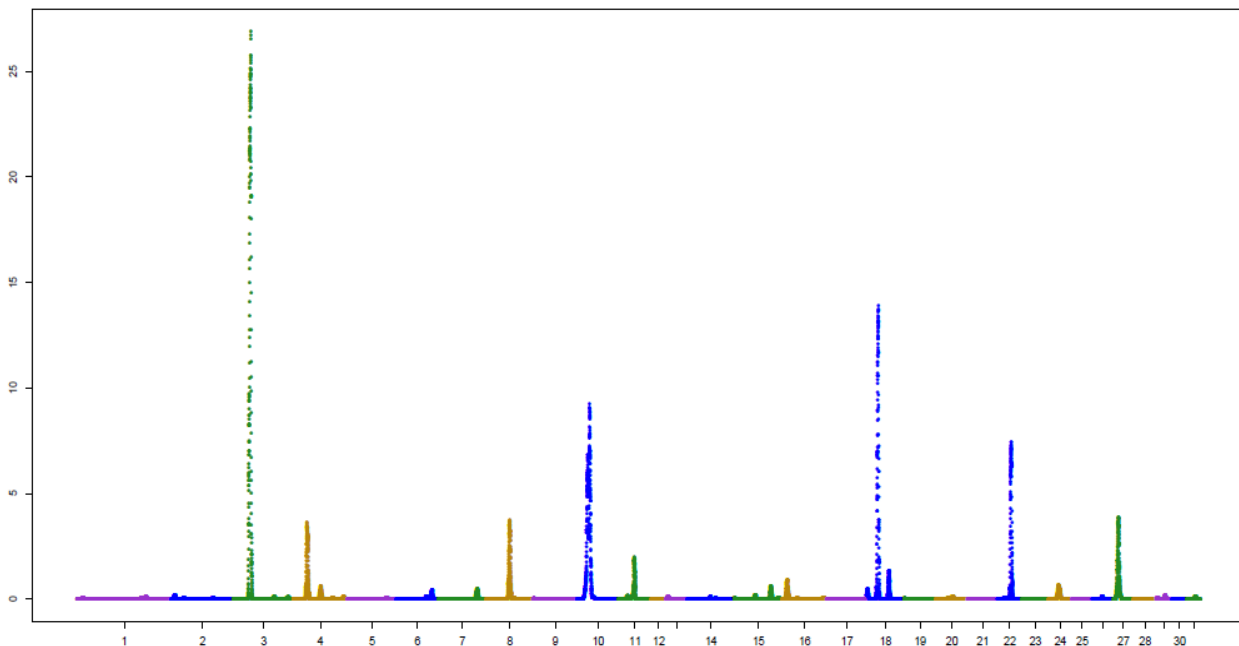


Figura 1. Manhattan Plot para presença/ausência de marcação branca na cabeça de equinos da raça Quarto de Milha. O eixo y indica a proporção de variância explicada pelos SNPs e o eixo x indica o número do cromossomo.

Após análises detalhadas dos cromossomos representativos para a característica, foram encontrados os genes candidatos *MC1R*, no ECA3, *ZEB2*, no ECA18 e *EQUCABV1R*, no ECA10.

Estudos semelhantes utilizando a associação genômica ampla (GWAS), para a mesma característica em outras raças, detectaram algumas regiões cromossômicas coincidentes com as encontradas no presente estudo. Haase et al (2013), ao realizar a análise do GWAS detectou picos nos cromossomos ECA1, ECA3, ECA16, ECA23 e ECA25. Destacam-se os genes candidatos *KIT* (ECA3), *MC1R* (ECA3) e *MITF* (ECA16). Para o presente estudo houve a coincidência para o gene *MC1R* que é responsável por ocasionar a mudança nas variações da coloração da pelagem alazão e preto/castanho, além de já ter sido associado a presença de manchas brancas (Haase et al 2013). Contudo, outras regiões encontradas no

CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

presente estudo ainda não foram associadas com o aparecimento de marcações na cabeça de equinos. .

Um dos genes candidatos é o ZEB2. Segundo Denecker et al (2014), o gene *ZEB2* é expresso nos melanócitos humanos, assim como nos folículos capilares de ratos, ocasionando despigmentação. Também é expresso na migração de melanoblastos do embrião de camundongos e seus precursores, as células da crista neural.

Nas duas janelas apresentadas no ECA10 foram apresentados genes e pseudogenes referentes ao receptor do vomeronasal, tornando-o um gene candidato para essa característica. O gene *V1R* desempenha um papel no órgão olfatório e existem algumas evidências embrionárias e evolutivas de que os neurônios sensoriais olfativos derivam de células epiteliais (Hansen et al., 2006).

Com os resultados obtidos no estudo, comprovou-se o papel do gene *MC1R* no aparecimento de manchas brancas, já associado à característica. Porém outros dois genes foram encontrados em regiões genômicas distintas das já relatadas para a característica. Portanto trata-se de um caso de heterogeneidade genética, pois o mesmo fenótipo, manchas brancas, é causado por diferentes genes.

Conclusão

O resultado encontrado no presente estudo é de grande importância, pois relata regiões/genes que ainda não tinham sido associados a presença de manchas brancas em equinos. Esse é o primeiro estudo de associação genômica ampla realizado com equinos da raça Quarto de Milha visando localizar prováveis genes responsáveis pelas manchas brancas nos animais e servirá como base para estudos posteriores de mapeamento fino.

Referências

Denecker, G., Vanamme, N., Akay, Ö., Koludrovic, D., Taminau, J., Lemeire, K., Gheldof, A., De Craene, B., Van Gele, M., Brochez, L., Udipi, G. M., Rafferty, M., Balint, B., Gallagher, W. M., Ghanem, G., Huylebroeck, D., Haigh, J., Van den Oord, J., Laure, L., Davidson, I., Marine, J. C., Berx, G. Identification of a ZEB2-MITF-ZEB1 transcriptional network that controls melanogenesis and melanoma progression. *Cell Death &*

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:



CONSTRUINDO SABERES, FORMANDO PESSOAS E TRANSFORMANDO A PRODUÇÃO ANIMAL

Differentiation, august 2014, Volume 21, issue 8, página 1250 – 1261, doi:10.1038/cdd.2014.44.

Fang, M., Larson, G., Ribeiro, H. S., Li, N., Andersson, L. Contrasting Mode of Evolution at a Coat Color Locus in Wild and Domestic Pigs. PLoS Genetics | January 2009 | Volume 8 | issue 5 | e1000341.

Haase, B., Signer-Hasler, H. Binns, M. M., Obexer-Ruff, G., Hauswirth, R., Bellone, R. R., Burger, D., Rieder, S., Wade, C. M., Leeb, T. Accumulating Mutations in Series of Haplotypes at the KIT and MITF Loci Are Major Determinants of White Markings in Franches-Montagnes Horses. PLOS ONE | September 2013 | Volume 8 | Issue 9 | e75071.

Hansen, A., Zielinski, B. S. Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: Development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components*. Journal of Neurocytology, February 2006, volume 34, página 183- 208.

Hauswirth, R., Haase, B., Blatter, M., Brooks, S. A., Burger, D., Drögemüller, C., Gerber, V., Henke, D., Janda, J., Rony, J., Magdesian, K. G., Matthews, J. M., Poncet, PA., Svansson, V. Tozaki, T. Wilkinson-White, L., Penedo, M. C. T., Rieder, S., Leeb, T. Mutations in MITF and PAX3 Cause “Splashed White” and Other White Spotting Phenotypes in Horses. PLoS Genetics | April 2012 | Volume 8 | Issue 4 | e1002653.

Pereira, G. L., Chud, T. C. S., Bernardes, P. A., Venturini G. C., Chardulo, L. A. L., Curi, R. A. Genotype imputation and accuracy evaluation in racing Quarter Horses genotyped using different commercial SNP panels. Journal of Equine Veterinary Science (2017), doi: 10.1016/j.jevs.2017.07.012.

Promoção e Realização:



Apoio Institucional:



Organização:

