

Descripción de información de un panel de SNP para carne en engorde de novillos Hereford

Ing. Agr. O. Ravagnolo¹, Lic. A. Branda¹, Ing. Agr. G. Brito¹, Ing. Agr. G. Ciappesoni¹, Dr. G. Rincón², F. Baldi¹, A. LaManna¹, G. Banchemo¹

(1)INIA, (2) Universidad de California-Davis, USA

INTRODUCCIÓN

Siguiendo la línea de trabajo de unos cuantos años en el Proyecto de Calidad de Carne y Genética, se ha decidió incursionar en el estudio de marcadores moleculares (los polimorfismos de un solo nucleótido - SNP) y la capacidad de ellos de predecir diferentes variables.

Como un puntapié inicial, se evaluó el efecto de diferentes dietas en el crecimiento animal, rendimiento carnicero y calidad de carne durante la recría y el engorde (Baldi et al., 2010) en INIA La Estanzuela. Complementando esta evaluación, se realizó el genotipado con marcadores SNP de genes candidatos (área nutrigenética) de estos animales (237 novillos Hereford). En estos animales se determinaron genotipos para 58 marcadores SNP que corresponden a las vías metabólicas del eje SREBP1/SCD, que activa la enzima desaturasa, y del eje GH/IGF1, que podría estar relacionado a diferencias de rendimiento. Este trabajo pertenece a un proyecto de más largo aliento de nutrigenética, que tiene por objetivo estudiar cómo estas dos variables interactúan. Los novillos utilizados provinieron de un sólo origen y estuvieron sujetos a condiciones experimentales desde el post destete hasta el momento de la faena y cuentan con toda la información recolectada en el transcurso del ensayo. Si bien el número de muestras es limitado, es una oportunidad para comenzar a ver cómo se comportan los diferentes marcadores SNP en nuestras condiciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

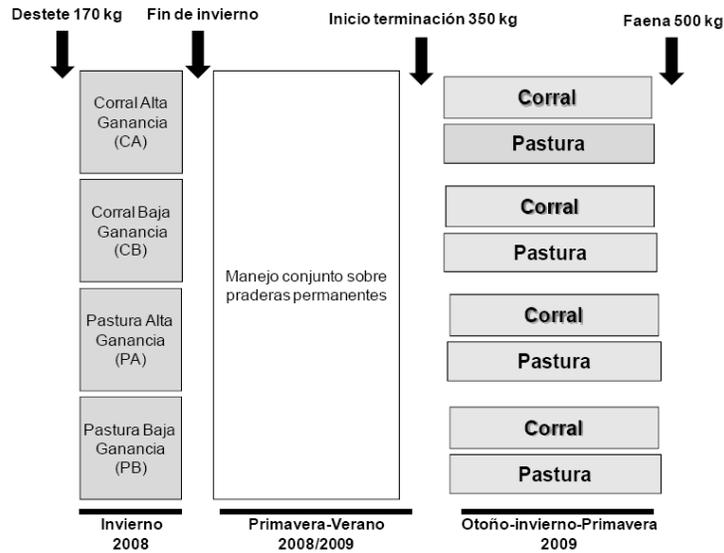
Se utilizaron 237 novillos Hereford pertenecientes al experimento sobre el efecto de niveles nutricionales durante el post-destete y período de terminación.

Las características inicialmente analizadas fueron las siguientes: Peso de canal caliente (PCC - kg) área del ojo del bife medida por ultrasonido (AOBu), en el frigorífico (AOB) y terneza medida en las muestras de carne con dos días de maduración (Terneza2d - kgF), el peso del bife (Bife), el marmoreo (MarbF), color del músculo con dos días de maduración (Croma2d), color de la grasa escala AUSMEAT (Colorgrasa), suma de cortes traseros (kg). En este artículo se presentarán a modo de ejemplo resultados preliminares para PCC y Terneza2d.

Durante todo el ensayo se realizaron pesadas sin ayuno cada 15 días y cada aproximadamente 90 días mediciones de ultrasonido (área de ojo del bife, espesor de grasa sobre éste y grasa intramuscular, junto con la medición de la altura del anca). A la faena se midieron peso de la canal caliente y fría, se clasificó de acuerdo a los sistemas de clasificación y tipificación Uruguayo (INACUR). Se tomaron a su vez mediciones morfológicas de las canales y pesos de

los principales cortes del trasero así como pH, terneza y color de la carne. Ver SAD No. 609 para una descripción detallada del ensayo.

Figura 1. Esquema del ensayo. Extraído de Baldi *et al.* 2010.



Se asignaron los novillos a uno de 4 diferentes tratamientos (Concentrado Alto, Concentrado Bajo, Pastura Alto y Pastura Bajo), luego se juntaron por un período y por último se volvieron a subdividir en dos diferentes tratamientos, alimentación a corral o alimentación a pasto (Figura 1). La segunda etapa se inició cuando el peso promedio de cada tratamiento (CA, CB, PA y PB) estaba entre 350-360 kg. En ese momento, cada grupo fue dividido en forma aleatoria en Corral o Pastura. Los animales se faenaron cuando el grupo en promedio alcanzaba los 500 kg.

Dado que se desconocía la genealogía de los novillos, se trató, a partir de la información proveniente de los SNP estimar grupos de medios hermanos. Para ello se utilizó el programa *Structure* (Pritchard *et al.* 2000, Hubisz *et al.*, 2009), el cual detecta estratificaciones en la población de interés. Se estimó la probabilidad de que cada muestra perteneciera a un grupo determinado (4 grupos dado que se tenía la información de que pertenecían a 4 padres diferentes). A efectos de realizar las correcciones, por motivos de practicidad, se asignó el padre con mayor probabilidad a cada animal. Para lograr mayores certezas en la paternidad de éstos animales sería necesario realizar estudios específicos de paternidad, (se usa normalmente para estos efectos un panel de más de 100 SNPs).

Cuadro 1. Distribución de padres probables según tratamiento.

Tratamiento	Padre 1	Padre 2	Padre 3	Padre 4
CA-C	8	7	8	6
CA-P	3	6	4	16
CB-C	6	6	5	12
CB-P	4	8	5	12
PA-C	6	5	7	8
PA-P	7	2	6	11
PB-C	6	3	7	10
PB-P	5	6	7	10
Total	45	43	49	85

Como se observa en el Cuadro 1, todos los padres probables estuvieron presentes en todos los tratamientos, con un mínimo de 2 hijos por tratamiento (Padre 2) y un máximo de 16 hijos por tratamiento (Padre 4). Se observa un desbalance importante hacia el Padre 4 en número de hijos en todos los tratamientos.

Para evitar confusiones entre efecto del tratamiento y efecto del padre al momento de estimar los efectos de los SNP sobre las variables, se corrigieron las variables de interés por dichos efectos.

Los registros fueron ajustados por el efecto del tratamiento y del padre a través del siguiente modelo:

$$y_{ijk} = T\delta_i + P_j + e_{ijk}$$

Donde:

y_{ijk} ... es la característica analizada (Terneza2d y PCC) del i -ésimo animal en el j -ésimo tratamiento,

$T\delta_i$... es el efecto de la i -ésima clase del Tratamiento (i de 1 a 8),

P_j ... es el efecto fijo del j -ésimo padre (j de 1 a 4), y

e_{ijk} ... es el residual.

Ambos análisis fueron realizados usando el procedimiento GLM del paquete estadístico SAS (SAS 2007).

Genotipado de las muestras

En la Unidad de Biotecnología se realizaron las extracciones de *ADN* a partir de las muestras de sangre de estos 237 novillos del experimento. Se logró genotipar todos los animales gracias a la buena calidad de las muestras enviadas.

Para el genotipado se utilizó un panel de *SNP* específico para carne, diseñado por el Laboratorio del Dr. Juan F. Medrano, del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad de

California, Davis (EEUU), con el fin de detectar variaciones a nivel de crecimiento, rendimiento carnicero y calidad de carne. Dicho panel consistió en 58 *SNPs* en genes candidatos relacionados con el eje que regula la hormona de crecimiento *GH/IGF1* y la formación y desaturación de ácidos grasos *SCD/SREBP1*. Estos marcadores analizados representan regiones en desequilibrio de ligamiento para diferentes genes que fueron re-secuenciados en diferentes razas bovinas (*tag SNP*).

La metodología utilizada para genotipar fue la de *Sequenom*, que utiliza una combinación de las técnicas *PCR* (Reacción en Cadena de la Polimerasa) y *MALDI TOF* (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization, Time of Flight*). En otras palabras, se realizó una reacción de *PCR* (en nuestro caso fueron dos reacciones de *PCR*) con cebadores específicos para cada alelo para unos 25 a 30 *SNP* por reacción, y para la lectura de los genotipos se midió el *Time of Flight* con la técnica de *Assisted Laser Desorption/Ionization* en un Espectrómetro de Masa (*MS*).

Análisis de los *SNP*

Los análisis se realizaron utilizando el programa *SVS7* (*Golden Helix Inc.*, Bozeman, Montana, USA). Para que cada *SNP* pudiera ingresar al análisis debía tener un *call rate* mayor a 0.85. Es decir que se haya podido identificar con certeza en por lo menos el 85 % de las muestras (animales). No se estableció ninguna exigencia de *call rate* para cada muestra individual. No se incluyó ninguna exigencia en cuanto a frecuencia del alelo menor (*MAF*) dado que los antecedentes indicaron que muchas veces son éstos los alelos que potencialmente podrían explicar mayores efectos. Tampoco se impusieron exigencias para cada uno de los registros. Se utilizó el modelo aditivo del análisis de asociación genotípica. Es decir, se estima un coeficiente de regresión entre los tres posibles genotipos (*dd*, *dD* y *DD*) para todos los *SNP* simultáneamente. Nos interesan aquellos *SNP* con mayor coeficiente de regresión (mayor efecto sobre la característica). Luego hay que estudiar si esos coeficientes de regresión son significativos o no. Para los análisis de todas las características se utilizaron los residuales resultantes del modelo que incluye los efectos de tratamiento y de padre.

Descripción de los *SNP* analizados

De los 58 *SNP* analizados, dos no se pudieron identificar correctamente en ninguna de las muestras y tres solamente se lograron identificar en un pequeño número de muestras, encontrándose en una proporción demasiado baja como para poder ser analizados. A su vez, hubo 10 que sólo tenían una variante presente en la población (por ejemplo, solo *DD* o *dd*, y ningún *Dd*) y 6 adicionales que tenían menos de 5 animales en alguna variante diferente a la principal. Es decir que de los 58 *SNP* originales, quedaron 43 *SNP* para analizar.

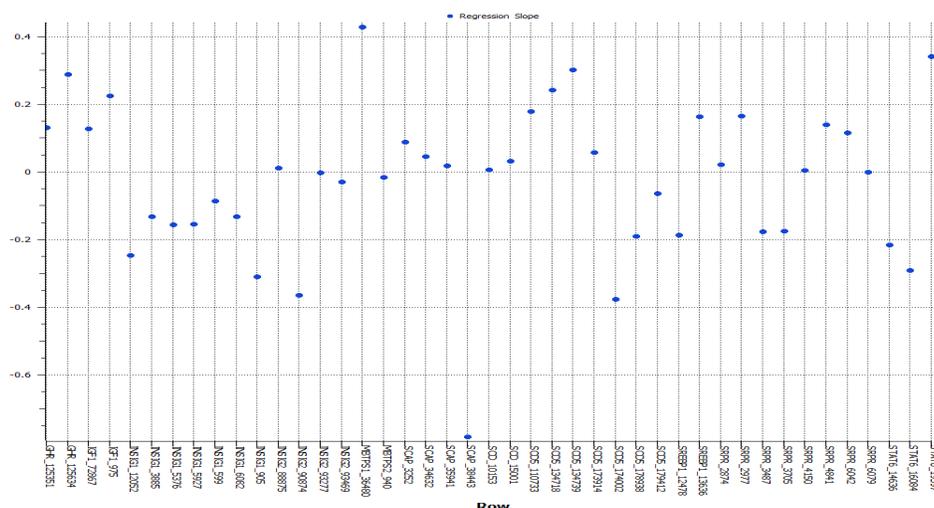
RESULTADOS

El estudio sobre efecto de estos *SNP* sobre algunas de las variables de crecimiento (ganancias diarias y deposición de tejidos), rendimiento carnicero (proporción de cortes valiosos) y de calidad de carne (terneza, porcentaje de grasa intramuscular y perfil de ácidos grasos entre otros) se encuentra aún en proceso de análisis. Pese a que en la mayoría de las variables estudiadas el efecto del Padre no fue significativo, éste se mantuvo en el modelo.

Análisis preliminar de Terneza2d

En la Figura 2, se presentan los análisis preliminares de la regresión para la característica Terneza2d para todos los SNP simultáneamente

Figura 2. Regresión estimada modelo genético aditivo sobre Terneza2d



De la Figura 2 se desprende como interesantes a estudiar los SNP: SCAP_38443, el MBTPS1_36480 y posiblemente los SCD5_174002, INSIG2_90874, STAT6_19597. En el Cuadro 2, se presentan el efecto de sustitución alélica (ESA), con su desvío estándar (D.E.), la significancia de la ESA (p de ESA), el alelo menor y la cantidad de animales por genotipo.

Cuadro 2. Descripción de los SNP de posible interés para Terneza 2d

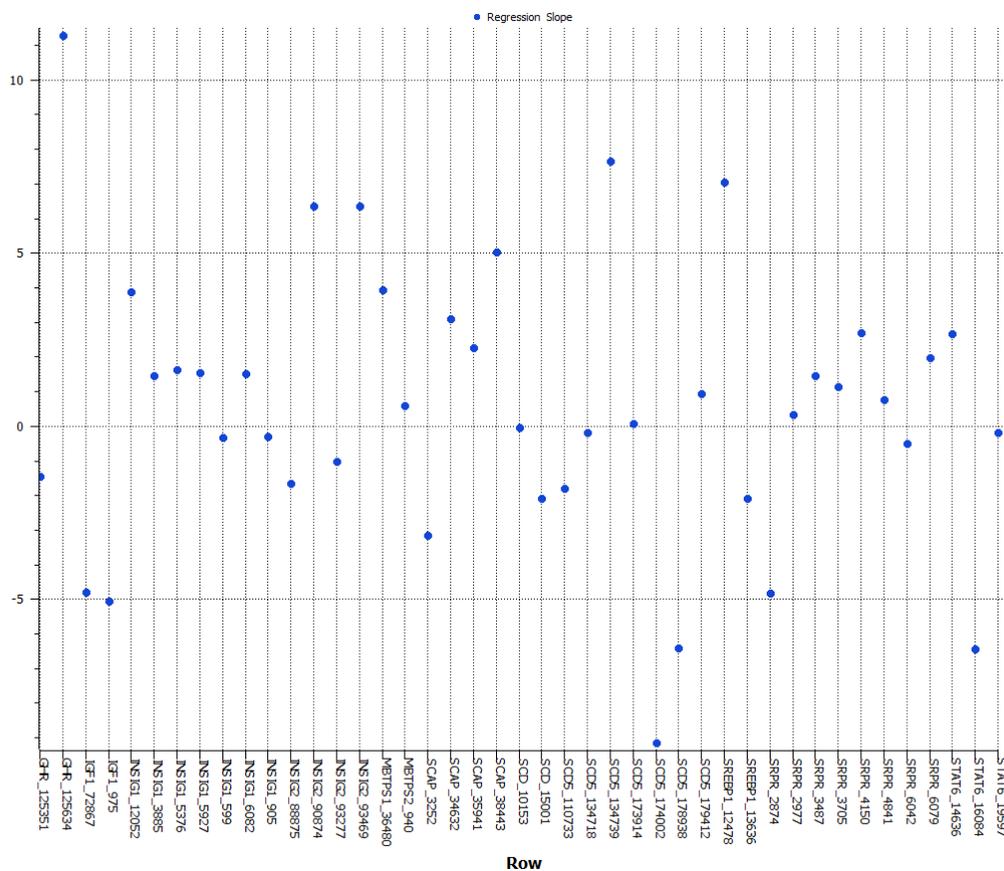
Marcador	ESA (kgF)	D.E. ESA (kgF)	p de ESA	Alelo Menor	Animales DD	Animales Dd	Animales dd
SCAP_38443	-0.782	1.050	0.456	T	0	1	213
SCD5_174002	-0.376	0.472	0.426	A	0	5	210
INSIG2_90874	-0.364	0.232	0.118	T	1	18	195
STAT6_19597	0.341	0.105	0.001	A	24	100	92
MBTPS1_36480	0.428	0.295	0.147	A	0	13	195

En el Cuadro 2 se observa claramente que en este estudio, el STAT6_19597 tiene un efecto significativo sobre la terneza. Podemos observar que si bien el efecto de sustitución alélica (obtenido a través del coeficiente de regresión) no es el mayor es el que tiene mejor distribución de los diferentes genotipos lo que le permite tener un efecto significativo sobre la variable. Los otros casos, tienen estimaciones más pobres dado que la regresión tuvo que ser estimada con uno de los puntos proveniente de muy pocos animales (1 y 5 para los dos primeros por ejemplo). El STAT6_19597 tiene a su vez una tasa de falso positivo menor a 0.2.

Este resultado concuerda con la línea de trabajo de la Universidad de California, Davis que ha trabajado en localizar SNP del STAT6 que tengan asociación con diferentes características de crecimiento y calidad de carne (Rincón et al, 2009). El STAT6 es un gen que funciona tanto como una molécula de señalización y como un factor de transcripción. Más de 39 SNP en el STAT6 han sido identificados y algunos con efectos significativos en espesor de grasa, rendimiento, peso de la canal caliente entre otros. Los resultados de este trabajo indicarían que uno de ellos, tendría potencial efecto en Terneza2d en éste experimento. Sería interesante estudiar si el incremento en el número de animales muestreados incrementaría el número de SNP significativos sobre esta característica, tal y como se ha observado en otras poblaciones.

Análisis preliminar de PCC

Figura 3. Regresión estimada modelo genético aditivo sobre Peso de Canal caliente (PCC).

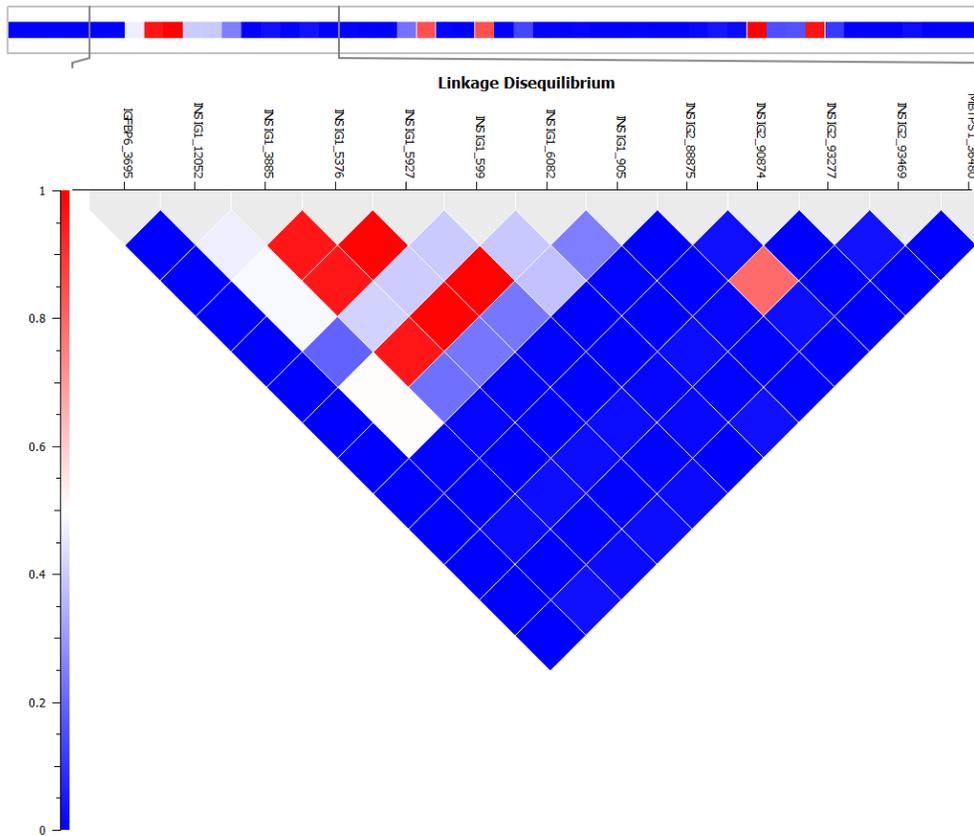


Según se observa en la Figura 3, los posibles SNP de interés serían, los que tienen coeficientes de regresión grandes (ya sea positivos o negativos), como ser: SCD5_174002, STAT6_16084, SCD5_178938, INSIG2_93469, INSIG2_90874, SREBP1_12478, SCD5_134739 y el GHR_125634.

Dado que hay algunos con efectos similares, es importante ver si están en desequilibrio de ligamiento (DL), en cuyo caso, ambos codificarían lo mismo. El programa SVS7 presenta esta información muy fácilmente de forma de poder detectar estos casos. Debemos entonces

confirmar si están o no en desequilibrio de ligamiento (más ligados cuanto mayor el valor, $r^2=$ de 0 a 1 (representado en color rojo en la Figura 4). En este caso, vemos que los SNP INSIG1_3885, INSIG1_5376 e INSIG1_5927 estarían en desequilibrio de ligamiento total. Pero no así INSIG2_93469 y INSIG2_90874, que nos estarían interesando en este caso a nosotros.

Figura 4. Análisis de Desequilibrio de Ligamiento entre los SNP estudiados



A continuación (Cuadro 3) se muestra una descripción de los SNP de posible interés asociados a PCC.

Cuadro 3. Descripción de los SNP de posible interés para PCC

Marcador	ESA	D.E. ESA	p de ESA	Alelo Menor	Animales DD	Animales Dd	Animales dd
STAT6_16084	-6.432	3.456	0.064	A	0	33	188
SCD5_178938	-6.406	18.427	0.728	C	0	1	220
INSIG2_93469	6.361	4.081	0.120	T	0	22	187
INSIG2_90874	6.374	4.059	0.118	T	1	18	201
SREBP1_12478	7.048	5.236	0.179	T	0	13	208
SCD5_134739	7.654	18.421	0.677	C	0	1	216
GHR_125634	11.288	9.272	0.224	A	0	4	217

Del Cuadro 3 se desprende que nuevamente habría un SNP del STAT6, en este caso el STAT6_16084 con efecto significativo sobre el peso de carcasa caliente. El resto de los SNP, tienen estimaciones de efecto importante pero no significativo. Si observamos el número de animales Dd o DD, vemos que para el resto de los SNP, son relativamente bajos. Sin embargo, podemos observar que el INSIG2_93469 y el INSIG2_90874, contienen información que pudiera tornarse significativa de tener mayor número de observaciones.

Tasa de Falsos Positivos (FDR)

Cuando se empiezan a estudiar tantos posibles SNP como candidatos a tener un efecto sobre las variables de interés, es importante tener en cuenta la tasa de falsos positivos (FDR). Si recordamos los conceptos de efectos significativos de estadística, ésta nos dice que con un 95 % de probabilidad (cuando manejamos un nivel de significancia de 0.05 por ejemplo), se va a cumplir que el tratamiento A es mayor al tratamiento B por ejemplo. Esto es sinónimo de que el 95 % de las veces, el Tratamiento A será mayor al tratamiento B. El 5% de las veces, no. O sea que implícitamente estamos diciendo que en 5 veces de 100, estaremos diciendo que hay un efecto que en realidad no está. Esto, cuando se están testeando muchos SNP simultáneamente tiene como implicancia que algunos de los SNP que detectamos con un efecto relevante, lo es por cuestiones del azar (cae dentro del 5%). Por eso debemos considerar la tasa de falsos positivos. En este trabajo, de haberla considerado, de las variables mencionadas, nos quedaría sólo uno de los SNP candidatos. Dado las pequeñas dimensiones del análisis, no se implementa éste filtro (normalmente para análisis de SNP el FDR se filtra en 0.2) ya que en esta etapa lo relevante es detectar posibles SNP de interés para futuros estudios.

En el Cuadro 4, se presentan las FDR, el efecto de sustitución alélica (ESA), con su desvío estándar (D.E.), la frecuencia del alelo menor (MAF) y los kilogramos promedio para cada variante del SNP (DD, Dd o dd).

Cuadro 4: Análisis preliminar para Peso de Canal Caliente (kg)

Marcador	ESA (kg)	D.E. ESA (kg)	P de ESA	FDR	MAF	kg promedio dd (obs.)	kg promedio Dd (obs.)	kg promedio DD (obs.)
SRPR_2874	4.813	2.054	0.020	0.874	0.22	AA: -7.36 (12)	AC: -2.792 (72)	CC: 2.097 (138)
STAT6_16084	6.432	3.456	0.064	0.920	0.07		AC : -5.495 (33)	AA : 0.937 (188)
INSIG2_90874	6.374	4.059	0.118	1.000	0.05	CC -7.41 (1)	CT: 7.951 (18)	TT : -0.695 (201)
SREBP1_12478	7.048	5.236	0.179	0.856	0.03		CT: 6.74 (13)	TT: -0.31 (208)
STAT6_14636	2.674	1.747	0.127	0.910	0.41	GG: 5.08 (39)	GC: -0.90 (103)	CC: -1.21 (78)
SRPR_4150	2.705	1.803	0.135	0.827	0.50	GG: 2.64 (52)	GC: -0.07 (116)	CC: -2.77 (52)
IGF1_72867	4.784	2.405	0.048	1.000	0.26	GG-10.89 (2)	GT:-1.79 (105)	TT: 2.76 (105)
INSIG2_93469	6.361	4.081	0.120	1.000	0.05		GT: 5.84 (22)	TT: -0.52 (187)
SCAP_34632	3.119	2.188	0.155	0.833	0.21	TT: 15.46 (8)	TC: -0.24 (78)	CC: -0.60 (135)

Consideraciones finales

El presente estudio es un análisis preliminar del ensayo, sin embargo el mismo arrojó que a pesar del reducido tamaño de la muestra, se pudieron detectar asociaciones significativas entre los marcadores y las características. Estudios más profundos serán necesarios para poder filtrar cuáles son relevantes en tanto a su efecto sobre cada una de las características.

Si bien no fue presentado en este estudio, se observó que varios de los marcadores tenían un efecto de entre 2 y 3 % de la variabilidad de las características, siendo terneza una de las que logró ser explicada en una mayor proporción.

Este estudio se encuentra enmarcado dentro de un proyecto de varios años que tiene por objetivo ir un paso más, de forma de poder analizar las posibles interacciones entre los SNPs y los diferentes tratamientos de nutrición. Esto es especialmente importante dado que la mayoría de los paneles de análisis genéticos son desarrollados en otras condiciones productivas.

Literatura citada

- Baldi, F, G. Banchemo, A. La Manna, E. Fernández, E. Pérez. 2010. Efecto del manejo nutricional post-destete y durante el período de terminación sobre las características de crecimiento y eficiencia de conversión en sistemas de recría y engorde intensivo. SAD No. 609.
- Rincón, G., E. A. Farber, C.R. Farber, J. D. Nkrumah, and J.F. Medrano. 2009. Polymorphisms in the STAT6 gene and their association with carcass traits in feedlot cattle. *Anim. Genet.* 40: 878-882.
- Hubisz M, Falush D, Stephens M and Pritchard J.K, 2009. Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* Volume 9, Issue 5, pages 1322–1332, September 2009.
- Pritchard J.K, Stephens M and Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959 (June 2000).
- SAS User's Guide: Statistics. Version 6.14 Edition 2007. SAS Inst., Inc., Cary .NC