

DETECCIÓN DE REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS AL CONTENIDO DE VITAMINA A Y E EN PLASMA EN RASA ARAGONESA

Öner, Y.¹, Serrano, M.², Bertolín, J.R.³, Sarto, M.P.³, Iguácel, L.P.³, Ramón, M.⁴, Blanco, M.³, Joy, M.³ y Calvo, J.H.^{3,5}

¹ Universidad de Uludag. Bursa. Turquía. ² INIA. Ctra. de La Coruña km 7,5. 28040 Madrid, España. ³ CITA-IA2. Av. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España. ⁴ IRIAF. Cersyra-Valdepeñas, Av. del vino 10, 13300, Ciudad Real, España. ⁵ ARAID. Av. Ranillas I-D, 50018, Zaragoza, España.; jhcalvo@aragon.es

INTRODUCCIÓN

Las vitaminas A (principalmente retinol) y E (principalmente α -tocoferol) son dos vitaminas liposolubles que pueden modificar la calidad y aspectos tecnológicos de la carne. La vitamina A es un retinoide natural que interviene en el proceso de diferenciación de los adipocitos (Arana et al., 2003), que dependiendo de la raza modifica el contenido de grasa intramuscular (Kruk et al., 2018) y perfil de ácidos grasos (Daniel et al., 2004) en rumiantes. La adición de vitamina E en los concentrados es un método efectivo para reducir la oxidación de los productos cárnicos y aumentar su vida útil (Ripoll et al., 2013), siendo el α -tocoferol su forma más activa (Daley et al., 2010). La forma más natural y económica para incrementar el contenido de estas vitaminas en carne es el pastoreo, debido a la elevada presencia de dichos compuestos en el forraje verde. En este trabajo se ha abordado la detección de regiones genómicas para el carácter contenido de retinol y α -tocoferol en plasma en ovejas en pastoreo mediante un análisis de asociación de genoma completo (GWAS) utilizando datos de genotipado masivo.

MATERIAL Y MÉTODOS

El ensayo se llevó a cabo en La Pardina de Ayés Oviaragón S.C.L., localizada en el pre-Pirineo aragonés (Ayés, Huesca; 42° 29' 48.55" N 0° 23' 37.54", 790 m. s. n. m.). Los animales incluidos en este estudio provenían de una población de 303 hembras entre 7,2 y 0,9 años de edad, con medidas de peso y condición corporal cada 3 semanas. Los animales considerados para este estudio no habían tenido ningún parto durante el año anterior. De noviembre a marzo, los animales fueron alimentados con paja y concentrado en establo. A partir de marzo pastaron a una pradera polifita. Tras un mes en pastoreo, cuando ya se había estabilizado el consumo de pasto en los animales, se tomó una muestra de sangre para medir el contenido de α -tocoferol y de retinol en plasma. La extracción de ambos analitos se realizó según la metodología descrita por Lyan et al. (2001). La cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida de ultra-alta resolución (UPLC, Acquity H-Class, Water; Milford, Massachusetts, EE. UU.) equipado con una columna Acquity UPLC HSS T3 (150 mm \times 2,1 mm \times 1,8 μ m), un detector de absorbancia (DAD, $\lambda_{\text{abs}} = 325$ nm, para el retinol) y otro de fluorescencia (FLD, $\lambda_{\text{exc}} = 295$, $\lambda_{\text{emi}} = 330$ nm, para el α -tocoferol) siguiendo la metodología expuesta en Bertolín et al. (2018).

Se obtuvieron genotipos para 192 hembras de raza Rasa aragonesa mediante los chips ovinos de SNPs de media (Illumina OvineSNP50 BeadChip; $n=113$) y alta densidad 680 K (Illumina AgResearch Sheep HD de 680 K; $n=79$). Los datos brutos de genotipado se depuraron eliminando aquellos SNPs que tuviesen para una frecuencia del alelo menos frecuente (MAF) $<0,01$, y que no estuviesen en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$) con el software PLINK 1.9 (Chang et al., 2015). Posteriormente, se imputaron con el software BEAGLE 4.0. (Browning y Browning, 2007) los genotipos faltantes entre el chip de alta y de media densidad, aceptándose sólo aquellos con una probabilidad superior al 0,95. Finalmente, se llevó a cabo un nuevo control de calidad eliminando aquellos SNPs que tuviesen para un $MAF < 0,01$, una frecuencia de individuos genotipados inferior a 0,75, y que no estuviesen en equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0,001$) con el software PLINK 1.9. Se llevó a cabo un estudio para conocer la posible estructuración de la población mediante escalado multidimensional (MDS), considerando una r^2 de 0,2 y ventanas de 50 SNPs. El GWAS se realizó con el software GCTA (Genome-wide Complex Trait Analysis) (Yang et al., 2011) utilizando un modelo lineal mixto (MLMA) y cromosómico con el MLMA-LOCO (leaving-one-chromosome-out), e incluyendo la edad como covariable discreta y la CC y peso como covariables cuantitativas. Los SNPs significativos fueron elegidos en base al p-valor obtenido y para un "false discovery rate" (FDR) del 10% a nivel cromosómico. Los genes se anotaron usando la

versión 3.1 del genoma ovino, y considerando un intervalo de 0,5 Mb, situando el SNP significativo en la posición media del intervalo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Tras el control de calidad se utilizaron 71.440 SNPs para los estudios de GWAS. El MDS mostró que la población presentaba cierta estructuración. Los resultados del GWAS con las aproximaciones MLMA y LOCO rindieron resultados muy similares. No se encontró ningún SNP con significación genómica para ninguno de los dos fenotipos. Un total de 28 y 6 SNPs resultaron significativos para el contenido de α -tocoferol y retinol en suero, respectivamente (Tabla 1). En el caso del contenido en α -tocoferol se han encontrado 20 SNPs significativos en el cromosoma OAR4, en tres regiones diferentes del mismo, y cercanos o en los genes *EVX1* (8 SNPs), *INHBA* (11 SNPs) y *GRM3* (1 SNP). Los dos primeros genes no presentan una relación clara con el contenido de α -tocoferol en plasma, aunque diversos experimentos de adición o supresión de vitamina E en la dieta provocan una modificación de la expresión de los genes (Funaba et al., 2006; Korosek et al., 2016; van den Broek et al., 2017). Sin embargo, el gen *GRM3* se ha encontrado bajo expresado en médula espinal de caballos que presentaban una distrofia neuroaxonal debido a una deficiencia en vitamina E (Finno et al., 2016). Otros estudios han encontrado que los genes *NR3C1* y *MPRI* están sobre-expresados en tratamientos en los que se adiciona vitamina E como antioxidante (Oommen et al., 2007; Tsavachidou et al., 2009). En cuanto al contenido de retinol en plasma, 6 SNPs fueron significativos a nivel cromosómico (Tabla 1). El gen *FAM155A* codifica para una proteína transportadora transmembrana, mientras que los genes *SCAMP5* y *PPCDC* han sido identificados como genes candidatos relacionados con autismo sin ninguna relación clara con el contenido de retinol. Finalmente, destaca el SNP rs423748277 localizado en el cromosoma X y cuyo gen más cercano es el *PRRG1*. Este gen es un transportador transmembrana relacionado con la vitamina K, que también es una vitamina liposoluble.

Para validar los resultados obtenidos, en un futuro próximo, se realizará el genotipado de los SNPs significativos en una población de Rasa aragonesa, en los que se evaluará el efecto de los mismos en el contenido de α -tocoferol y retinol en plasma y en músculo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arana, A. et al. 2003. *ITEA* 24: 139-141.
- Browning, SR. y Browning, BL. 2007. *Am. J. Hum. Genet.* 81: 1084-1097.
- Chang, C.C. 2015. *GigaScience* 4 (www.cog-genomics.org/plink/1.9/)
- Bertolín, J.R. et al. 2018. *Food Chem.* 257:182-188.
- Castermans, D., et al. 2010. *Hum. Mol. Genet.* 19 (7): 1368-1378.
- Daniel, Z.C.T.R. et al. 2004. *Anim Sci.* 78: 237-243.
- Finno, C.J. et al. 2016. *Free Radic. Biol. Med.* 101: 261-271.
- Kruk, Z.A. et al. 2018. *Meat Sci.* 137:139-146.
- Oommen, S. et al. 2007. *Free Radic. Res.* 41(1): 98-109.
- Ripoll, G. et al. 2013. *Meat Sci.* 93: 906-913.
- Tsavachidou, D. et al. 2006. *J. Natl. Cancer Inst.* 101(5): 306-320.
- Tsuchida, K. et al. 2017. *Poult. Sci.* 96 (3): 667-680.
- van den Broek, T.J. et al. 2017. *Genes Nutr.* 12: 5.
- Yang, J. et al. 2011. *Am. J. Hum. Genet.* 88(1): 76-82.

Agradecimientos: Financiado con fondos FEDER, proyecto INIA RTA2009-0091, Gobierno de Aragón (Grupo SAGAS Ref. A14_17R). Al Equipo Técnico Veterinario de UPRA-Grupo Pastores en la selección y toma de muestras. Yasemin Öner ha disfrutado de una ayuda del TUBITAK de Turquía (nº: BIDEB-2219-1059B19170062266). Contrato de M. Blanco financiado por INIA-FSE.

GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDIES FOR VITAMIN A AND E CONTENT IN PLASMA IN RASA ARAGONESA BREED

ABSTRACT: In this work, a GWAS analysis for α -tocopherol and retinol content in plasma was performed using the Illumina OvineSNP50 BeadChip (n=113) and Illumina AgResearch Sheep HD chip (n=79) genotypes from 192 ewes. After quality control and genotype imputation using Beagle, 71,440 SNPs were retained for GWAS. In this study, although all animals were from a single flock and breed, multidimensional scaling analysis revealed a substructure within the total dataset. Twenty-eight and six SNPs were significant at chromosome level with a FDR of 0.1 for α -tocopherol and retinol content, respectively. The annotation of these regions points to genes whose expression is regulated by vitamin E (*EVX1*, *INHBA*, *GRM3*, *NR3C1* and

MPRIF). Furthermore, SNP rs423748277 was associated to retinol content, being close to this SNP the gene *PRRG1*. This gene is a vitamin K-dependent single-pass transmembrane protein.

Keywords: sheep, α -tocopherol, retinol, GWAS

Tabla 1. SNPs significativos a nivel cromosómico, número de animales genotipados (n), frecuencia del alelo menor (MAF), valor medio del efecto permanente (b), límite de significación cromosómica para un FDR del 10% (FDR), y genes situados en un intervalo de 0,5 Mb situando el SNP en posición intermedia del intervalo.

Fenotipo	Chr	SNP	n	MAF	b	se	P-valor	FDR	Genes
α -tocoferol	4	rs412319237	192	0,17	0,22	0,05	2,00E-05	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs415100109	172	0,15	0,24	0,06	2,19E-05	5,60E-04	<i>EVX1*</i>
	4	rs410744624	189	0,17	0,22	0,05	2,91E-05	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs404965193	165	0,16	0,23	0,06	4,12E-05	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs429000686	192	0,36	-0,18	0,04	5,88E-05	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs405151767	169	0,06	0,33	0,08	7,59E-05	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs415295015	189	0,29	-0,16	0,04	1,53E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs407964031	190	0,29	-0,16	0,04	1,84E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs413306467	192	0,26	-0,18	0,05	1,89E-04	5,60E-04	<i>GRM3</i>
	4	rs402248871	192	0,29	-0,16	0,04	1,95E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs422885630	169	0,10	0,26	0,07	3,12E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs425392614	192	0,40	-0,14	0,04	3,15E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs403873931	189	0,46	0,14	0,04	3,21E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs412519396	179	0,11	0,24	0,07	3,30E-04	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs400885475	192	0,12	0,21	0,06	4,43E-04	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs418054519	192	0,34	0,15	0,04	4,55E-04	5,60E-04	<i>EVX1</i>
	4	rs404938510	182	0,30	-0,15	0,04	5,22E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs430686189	183	0,46	0,14	0,04	5,24E-04	5,60E-04	<i>INHBA*</i>
	4	rs404331730	192	0,46	0,14	0,04	5,32E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	4	rs417651431	192	0,46	0,14	0,04	5,32E-04	5,60E-04	<i>INHBA</i>
	5	rs160010435	192	0,26	-0,18	0,05	6,37E-05	1,80E-04	<i>SUGP2*</i>
	5	rs414805271	190	0,25	-0,18	0,05	9,49E-05	1,80E-04	<i>SUGP2*</i>
	5	rs422570995	185	0,01	0,65	0,17	1,64E-04	1,80E-04	<i>NR3C1*</i>
5	rs416938795	192	0,25	-0,17	0,05	1,74E-04	1,80E-04	<i>SUGP2*</i>	
11	rs409125273	192	0,26	0,17	0,04	1,06E-04	1,90E-04	<i>MPRIP</i>	
11	rs413075901	192	0,26	0,17	0,04	1,06E-04	1,90E-04	<i>MPRIP</i>	
11	rs416938795	189	0,26	0,17	0,04	1,73E-04	1,90E-04	<i>MPRIP</i>	
23	rs428016635	192	0,09	0,25	0,066	1,04E-04	1,10E-04	<i>RNF138</i>	
retinol	10	rs429728827	192	0,29	0,04	0,01	3,08E-05	3,10E-05	<i>FAM155A</i>
	18	rs414906347	166	0,27	0,04	0,01	7,41E-05	2,20E-04	<i>PPCDC*</i>
	18	rs419435493	184	0,29	0,03	0,01	1,56E-04	2,20E-04	<i>PPCDC*</i>
	18	rs405805808	192	0,32	0,03	0,01	1,36E-04	2,20E-04	<i>PPCDC*</i>
	18	rs406565761	168	0,34	0,03	0,01	2,17E-04	2,20E-04	<i>SCAMP5*</i>
	X	rs423748277	145	0,01	0,12	0,04	1,82E-03	1,90E-03	<i>PRRG1</i>

* indica que el SNP se localizó dentro del gen.