

BUSQUEDA DE LAS MUTACIONES CAUSALES PARA ARTROGRIPOSIS Y MACROGLOSIA EN VACUNO DE RAZA PIEMONTESE: RESULTADOS PRELIMINARES

Biscarini F.¹, Del Corvo M.¹, Stella A.¹, Albera A.², Ferenčaković M.³ y Pollott G.⁴

¹PTP, Departamento de bioinformática, Via Einstein, 26900 Lodi (Italia)

²ANABORAPI, Strada Trinità 32/A, 12061 Carrù (CN), Italia

³Universidad de Zagreb, Svetosimunska 25, 10000 Zagreb (Croacia)

⁴RVC, Departamento de producción y sanidad animal, Royal College Street, NW1 0TU Londres (RU)
filippo.biscarini@tecnoparco.org

INTRODUCCIÓN

Artrogriposis y macroglosia son dos malformaciones congénitas que pueden afectar al ganado vacuno. El término artrogriposis se refiere a la anquilosis de una o más de las articulaciones distales de las patas y a la subsiguiente atrofia degenerativa de los músculos relacionados. La macroglosia es una tumefacción de la lengua que puede dificultar la capacidad de amamantamiento del ternero. Ambas condiciones pueden producir distocia, mortalidad peri-natal y reducido incremento ponderal. Artrogriposis y macroglosia son problemas relevantes en la cría de vacuno de raza Piemontesa debido a la pérdida de terneros de alto valor comercial. Por lo tanto, se han tratado de implementar esquemas empíricos de selección basados en la incidencia de estas malformaciones en la progenie de los toros. Este tipo de selección fenotípica ha resultado ser bastante efectiva: en la población italiana de Piemontesas, la incidencia de artrogriposis ha caído de 4.4% en machos y 0.66% en hembras a principio de los años 1990, a 0.85% en machos y 0.16% en hembras en el 2010. De forma similar, la incidencia de macroglosia se ha reducido de 2.85% y 0.47% en los años noventa a 1.57% y 0.28% en 2010, en machos y hembras respectivamente. Mejoras en la gestión de la granja y en el tratamiento de estas malformaciones pueden haber contribuido a esta reducción de incidencia.

El patrón de transmisión genealógica de la artrogriposis y la macroglosia sugiere la existencia de una base genética en ambas malformaciones. No obstante, es posible que factores ambientales influyan en la manifestación y gravedad de las mismas. El descubrimiento de las mutaciones subyacentes a las dos malformaciones sería de gran interés para entender mejor sus mecanismos hereditarios y su patogénesis.

En el presente trabajo se analizaron animales afectados con artrogriposis y macroglosia (casos) y animales no afectados (controles) en una población italiana de vacuno de raza Piemontesa utilizando genotipados de marcadores SNPs. Se utilizaron dos métodos de análisis para detectar señales de asociación entre dichas malformaciones y regiones genómicas. Primero se llevó a cabo un estudio de asociación pangenómico, y posteriormente se aplicó el método de autocigosis por diferencia ("autozygosity by difference", Pollott, 2012) para buscar secuencias de homocigosis de posición y tamaño diferentes entre casos y controles.

MATERIAL Y MÉTODOS

Datos

Se utilizaron 479 bovinos de raza Piemontesa procedentes de granjas ubicadas en la región italiana de Piemonte. Los animales se repartieron en 3 grupos: el primero estuvo integrado por 15 terneros afectados por artrogriposis, el segundo por 15 terneros afectados por macroglosia, y el tercero por 449 toros de la prueba de progenie y que constituyeron el grupo de control. Todos los individuos analizados fueron machos. Los 479 animales se genotiparon con el chip bovino 50k de 54001 SNPs. Se eliminaron 3814 SNPs por presentar datos perdidos en > 5% de los animales o por ser su posición desconocida.

Métodos de análisis

Se realizaron y compararon dos tipos de análisis: un estudio de asociación pangenómico (GWAS) y la autocigosis por diferencia. Para el estudio de asociación, tratándose de datos binarios (caso-control), se utilizó un modelo de regresión logística:

$$\text{logit}(p) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 x$$

donde p es la probabilidad de estar afectado por la malformación, x es el número de copias del alelo menor a cada locus, β_0 es la intercepta y β_1 el coeficiente de regresión.

El método de la autocigosis por diferencia (Pollott, 2012) se basa en buscar largas secuencias homocigotas en casos y controles, fijándose en las regiones del genoma en que difieren (autocigosis en los casos y no en los controles, o viceversa). La hipótesis es que la región genómica en la que se halla la mutación presentará secuencias de homocigosis de mayor tamaño en los casos que en los controles. Primero se clasifican, en casos y controles por separado, los SNPs en base al tamaño de la secuencia de homocigosis en que se hallan, asignados un valor de homocigosis. Este proceso se realiza tanto en casos como en controles por separado. Posteriormente se suman los valores de homocigosis por cromosoma y, con estos datos, se ejecuta el siguiente modelo lineal:

$$\text{HomCrom}_{ij} = \text{Crom}_i + \text{Animal}_{j(k)} + (\text{Crom} \times \text{Status})_{ik} + e_{ij}$$

donde HomCrom_{ij} es el valor de homocigosis del cromosoma i en el animal j , Crom_i es el efecto del cromosoma i , $\text{Animal}_{j(k)}$ es el efecto del animal j anidado en el estado k (caso o control) y $\text{Crom} \times \text{Status}$ es la interacción entre cromosoma y estado (caso o control). Una interacción significativa entre cromosoma y estado indica que ese cromosoma puede albergar una mutación potencialmente relacionada con la enfermedad. En estos cromosomas se representan gráficamente los valores de homocigosis por SNP en casos y controles, y la diferencia entre los dos, con el fin de localizar las regiones SNP del genoma asociadas con las malformaciones.

La preparación de los datos y la regresión logística se realizaron con el entorno de programación R. El análisis de autocigosis por diferencia se realizó con los programas desarrollados por Pollott (2012).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontraron señales claras de asociación entre fenotipo y marcadores para ninguna de las dos malformaciones cuando se ejecutó el modelo de regresión logística en casos y controles. Solo se detectaron asociaciones esporádicas que probablemente fueran espurias (Figura 1).

Posteriormente se analizaron los datos con el método de autocigosis por diferencia. Primero se buscaron los cromosomas que potencialmente albergaran una mutación relacionada con las malformaciones. Se encontraron significativamente más SNPs homocigóticos en casos que en controles en el cromosoma 9 para la macroglosia, y en los cromosomas 1, 4, 10, 14, 15, 17, 18, 21 y 24 para la artrogriposis. En todos los casos se trató de diferencias mucho menores a las observadas en otros estudios en los que se aplicó la autocigosis por diferencia (Pollott 2012). El gráfico de los valores de homocigosis reveló una sola secuencia corta de homocigosis diferente entre casos y controles para artrogriposis en el cromosoma 6 (Figura 2, derecha). En el cromosoma 2 se detectó una secuencia larga de homocigosis común a casos y controles, entre 6116319 y 9553018 bps (Figura 2, izquierda). Esta región contiene el gen de la miostatina, cuya mutación es responsable de los desarrollados músculos (“doble grupa”) característicos de la raza Piemontesa. O’Rourke et al. (2012) y Grobet et al. (1998) sugirieron que se trata de una mutación de la miostatina distinta a la de otras razas con doble grupa (p. ej. la Blanco Azul Belga). Sin embargo, esta homocigosis común a toda la población podría deberse a penetrancia incompleta (animales con el mismo genotipo no expresan siempre el fenotipo correspondiente).

La falta de claras asociaciones entre marcadores y artrogriposis o macroglosia, podría ser consecuencia de sesgo muestral (“ascertainment bias”), de que los polimorfismos asociados a las mutaciones no se encuentran en el chip bovino 50k, o de que las malformaciones

están causadas por otro tipo de variabilidad genética como la variación del número de copias (CNV, sobre-expresión de genes).

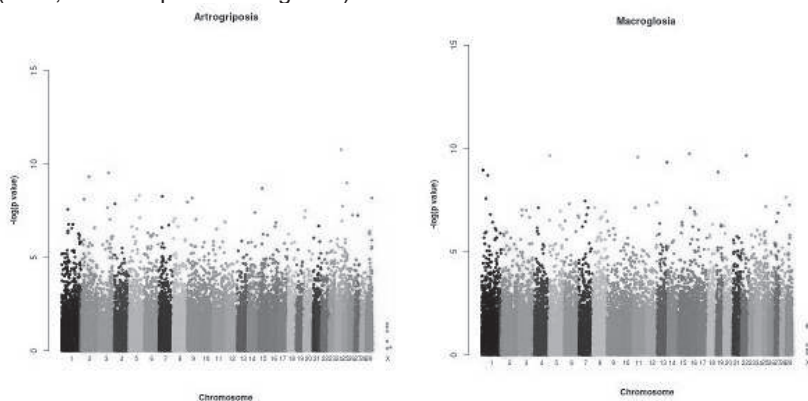


Figura 1: Manhattan plots de los resultados ($-\log(p_value)$) del estudio de asociación entre marcadores y artrogriposis (izquierda) o macroglosia (derecha)

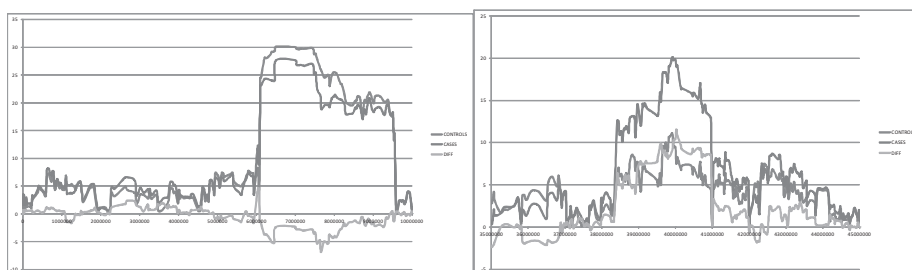


Figura 2: valores de homocigosis para casos (rojo), controles (azul) y diferencia entre los dos (verde) para macroglosia en el cromosoma 2 (izquierda) y para artrogriposis en el cromosoma 6 (derecha)

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Pollott, G.E. 2012. 63rd EAAP, Bratislava (Slovakia). • Grobet, L., Poncet, D., Royo, L.J., Brouwers, B., Pirottin, D., Michaux, C., Ménéssier, F., Zanotti, M., Dunner, S. & Georges, M. 1998. *Mamm. Genome* 9(3):210-213. • O'Rourke, B.A., Greenwood, P.L., Authur, P.F. & Goddard, M.E. 2012. *Anim. Genet.*

LOOKING FOR THE MUTATIONS FOR ARTHROGRYPOSIS AND MACROGLOSSIA IN PIEDMONTSE CATTLE: PRELIMINARY RESULTS

A population of Piedmontese cattle was analysed in a study aimed at looking for the causal mutations for arthrogrypsis and macroglossia. These two malformations affect calves and can lead to dystocia, peri-natal mortality and impaired growth. A sample of 15 calves affected by macroglossia and 15 calves affected by arthrogrypsis were available. The control sample was constituted by 449 bulls from the Italian Piedmontese cattle progeny testing scheme. All animals were genotyped with the Illumina 50k bovine SNP chip. Two methods of analysis were used: a genome-wide association study (GWAS) of cases and controls and the analysis of runs of homozygosity (autozygosity-by-difference). No clear signal of association was detected in the GWAS. On chromosome 6, a short sequence for which levels of homozygosity in cases and controls differed was detected for arthrogrypsis. On chromosome 2, a common stretch of homozygosity in cases and controls was detected, in the region harbouring the myostatin mutation, responsible for the characteristic double-muscling of Piedmontese cattle.

Keywords: Piedmontese cattle, arthrogrypsis, macroglossia, autozygosity by difference.