ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 127-133

ANÁLISIS DE ASOCIACIÓN ENTRE GENOTIPOS DE PrP Y PRODUCCIÓN DE LECHE EN LA RAZA LATXA

A. Legarra, E. Ugarte, I. Beltrán de Heredia

NEIKER, A.B. Instituto vasco de investigación y desarrollo agrario. Apdo. 46, 01080, Vitoria-Gasteiz, España
Correo electrónico: alegarra@neiker.net

Introducción

El prúrigo lumbar o "scrapie" es una enfermedad neurodegenerativa que afecta a la especie ovina. Aunque descrita desde hace más de 200 años y con baja relevancia económica en la cabaña, en los últimos años el prúrigo lumbar ha tomado importancia por su posible relación con la encefalopatía espongiforme bovina, habiéndose especulado con la existencia de un riesgo para el hombre.

Asimismo se conoce que, a diferencia del vacuno, existe un parcial determinismo genético en la sensibilidad a la enfermedad (Díaz *et al.*, 2001). Dicho determinismo está basado en la existencia de diferentes alelos del gen PrP, que codifica para la proteína prión y es precisamente una forma anómala de esta proteína la responsable de dicha enfermedad. Las formas alélicas más comunes se dan por polimorfismos en los codones 136, 154 y 171, en las que se encuentran las variantes A (alanina) y V(valina), R (arginina) y H (histidina), y Q (glutamina), R y H respectivamente. Se ha demostrado la existencia de alelos que confieren resistencia a la enfermedad (alelo ARR), alta susceptibilidad (VRQ) o simplemente susceptibilidad (el resto). Por esta razón, el comité científico de la Unión Europea recomienda la selección genética para aumentar la frecuencia del alelo ARR con el objetivo de incrementar el número de animales resistentes a prúrigo lumbar. En este sentido, se prevé que, en España, el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación emita un Real Decreto.

En este marco, se ha hecho necesario para los diferentes esquemas de selección existentes en ovino analizar las posibles consecuencias que tendría dentro de los mismos la introducción de este aspecto. Dichas consecuencias son básicamente tres: (1) Pérdida de variabilidad genética. (2) Descenso en la intensidad de selección y por tanto del progreso genético para caracteres productivos. Ambos aspectos vendrían derivados de la necesidad de restringir como animales candidatos a selección a aquellos que fueran portadores de alelos ARR. La tercera consecuencia (3) sería un hipotético cambio en el carácter de interés, por selección correlacionada, debido a una asociación (causal o de ligamiento) entre el gen de la PrP y algún gen o genes responsables del carácter de interés.

En este trabajo se aborda esta última cuestión. El objetivo es analizar la posible asociación entre el gen del PrP y la producción lechera como carácter objeto de selección en el esquema de mejora de la raza Latxa, para sus diferentes ecotipos de Latxa Cara Negra en la Comunidad Autónoma Vasca (LCN-CAPV), Latxa Cara Negra de Navarra (LCN-NA) y Latxa Cara Rubia (LCR), que siguen esquemas de selección diferenciados.

Material

En la raza Latxa, hasta la actualidad, se han genotipado para el gen de la PrP aproximadamente unos tres mil animales. Las frecuencias genotípicas y alélicas de dichos animales se presentan en el cuadro 1. Se aprecia que el genotipo ARQ/ARQ con una frecuencia en torno al 50% y el alelo ARQ (entre 67-70%) son los más presentes en los diferentes ecotipos. La baja frecuencia del alelo ARR, y por tanto la mayor dificultad de su selección, hace más necesario aún la determinación de si existe una asociación y por este motivo se planteó un diseño experimental mediante genotipado selectivo para estudiar la posible asociación entre la producción de leche y el gen de la PrP.

Dicho genotipado se realizó intentando minimizar los gastos de genotipado, como se encuentra descrito en ALFONSO (2002). Así, se diseñó un muestreo de 100 hembras de cada una de las colas de alto, medio y bajo valor genético a las que tomar una muestra de sangre para la posterior extracción del ADN. Sin embargo, existieron dificultades en la toma de muestra y el número de animales efectivamente muestreados fue inferior, especialmente en los grupos de medio y bajo nivel productivo,

Cuadro 1. Número de animales genotipados y frecuencias genotípicas y alélicas para el gen de la PrP en los diferentes ecotipos de la raza Latxa

Genotipo/Alelo	LCN-CAPV	LCN-NA	LCR
N° de animales genotipados	1804	844	1802
Machos	612	391	489
Hembras	1192	453	1313
AHQ/AHQ			0,06
AHQ/ARH	0,06		
ARH/ARH			0,17
ARH/VRQ	0,28		0,83
ARQ/AHQ	1,72		0,39
ARQ/ARH	3,55	4,98	11,82
ARQ/ARQ	47,89	47,87	44,12
ARQ/VHQ	0,06		
ARQ/VRQ	2,99	0,36	4,50
ARR/AHQ	0,83	0,12	0,11
ARR/ARH	1,05	2,13	3,72
ARR/ARQ	35,09	36,37	28,97
ARR/ARR	5,49	7,94	4,27
ARR/VRQ	0,83	0,24	1,00
VRQ/VRQ	0,17		0,06
AHQ	1,30	0,06	0,31
ARH	2,47	3,55	8,35
ARQ	69,60	68,72	66,95
ARR	24,39	27,37	21,17
VHQ	0,03		
VRQ	2,22	0,30	3,22

debido principalmente a que dichos animales fueron eliminados de los rebaños. También se observó que la dispersión de hembras de bajo valor genético era mucho mayor, es decir, se encontraban en un gran número de rebaños diferentes, lo que dificultó la recogida de muestras. El número de animales efectivamente muestreados y genotipados para cada nivel de producción, así como el valor genético medio de cada grupo, se presenta en el cuadro 2. El bajo número de animales presentes en las categorías media y baja hace que la potencia de los test estadísticos utilizados, que se detallan a continuación, sea menor de lo inicialmente previsto.

Cuadro 2. Número de animales genotipados en cada nivel de producción (arriba) y valor genético medio (abajo, media ± desviación estándar) de cada uno de los grupos

	LCN-CAPV	LCN-NA	LCR
Alta	116	116	63
	55,9±9,7	52,7±11,0	51,5±13,5
Baja	33	35	63
	-28,6±3,5	-25,7±5,0	-30,4±5,1
Media	34	24	66
	4,1±17,4	9,4±21,9	9,6±19,8

Métodos

Se han realizado tres tipos de análisis estadísticos para estudiar la posible asociación entre el gen de la PrP y la producción de leche:

I) Test chi-cuadrado de distribución de genotipos o haplotipos entre los grupos de alta, media y baja producción. Este análisis se realizó con el procedimiento FREQ del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 1999) incluyendo la opción de cálculo del test exacto por Montecarlo, ya que el test asintótico tiende a dar p-valores más bajos.

II) Análisis de máxima verosimilitud entre las estimas del valor aditivo (â) obtenidas en las valoraciones BLUP de la raza para producción de leche y los genotipos tanto en forma de genotipos (efecto fijo) como en forma de haplotipos (considerando la presencia o no de determinado alelo como una covariable en el modelo). Además se incluyó el efecto año para tener en cuenta el progreso genético para producción de leche. Por tanto el modelo utilizado fue:

$$\hat{a} = genotipos\ (haplotipos) + año + efecto\ poligénico$$

donde el efecto poligénico es equivalente al residuo. Cada valor de â se ponderó por la inversa de la varianza del error de predicción. En dicho modelo se asume que tras las valoraciones genéticas, â retuvo la información correspondiente al hipotético efecto del genotipo del PrP. El número de animales incluidos en el análisis fue de 1549, 775 y 1572 en LCN-CAPV, LCN-NA y LCR, respectivamente.

Posteriormente se hizo un test de cociente de verosimilitudes a partir de los valores

obtenidos de este modelo y de un modelo (correspondiente a la hipótesis nula) donde no se incluyó el efecto del genotipo. Este análisis se realizó mediante el procedimiento MIXED del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc., 1999). Además se calculó el Factor de Bayes (probabilidad del modelo nulo frente al modelo complejo) a través del "Bayesian Information Criterion" o BIC (SORENSEN y GIANOLA, 2002), asumiendo las mismas posibilidades a priori para cada modelo. Este criterio en principio es más conservador que el test de cociente de verosimilitudes, ya que tiene en cuenta la complejidad del modelo y el número de datos utilizado. Además, a diferencia del test de cociente de verosimilitudes, el Factor de Bayes puede apoyar la hipótesis nula.

III) Análisis de máxima verosimilitud donde se modelizó directamente la producción de leche (lactación tipo estandarizada a 120 días) de las hembras y donde se incluyó además de los efectos correspondientes al modelo de evaluación genética habitual en la raza el efecto del genotipo. En este modelo sólo se utilizó la información genotípica de las hembras y debido al escaso número de datos de los que se disponía se hizo necesario modificar ligeramente el modelo de evaluación genética dividiendo el efecto rebaño-año-mes en dos efectos diferentes: rebaño-año y mes. El modelo resultante quedó como sigue:

leche = rebaño-año + mes + edad-número de parto

+ número de corderos nacidos vivos + intervalo parto-primer control

+ genotipo (haplotipo) + valor aditivo + efecto permanente

donde rebaño-año se consideró como efecto aleatorio, debido precisamente al escaso número de datos en cada clase. El valor aditivo se modelizó con la matriz de parentesco. Los datos incluidos en el modelo se muestran en el cuadro 3.

Cuadro 3. Datos utilizados en el análisis de máxima verosmilitud para producción en cada uno de los ecotipos de la raza Latxa

	LCN-CAPV	LCN-NA	LCR
Hembras con dato	992	425	130
Número de datos	3399	1278	3913
Número de grupos de comparación	565	143	299

Las estimas máximo-verosímiles se obtuvieron mediante una modificación del programa REMLF90 (MISZTAL *et al.*, 2002), utilizando un algoritmo EM como el descrito por SORENSEN y GIANOLA (2002, p. 468). Posteriormente, del mismo modo que en el análisis anterior, este modelo se testó mediante cociente de verosimilitudes y también se calculó el Factor de Bayes.

Resultados y discusión

Los resultados de los análisis realizados se muestran en el cuadro 4, reflejando los *p-valores* de la hipótesis nula (no existe efecto del genotipo del PrP) frente a la alternativa (sí existe efecto). Los valores del Factor de Bayes (probabilidad del modelo nulo

frente al modelo testado) se muestran en el cuadro 5.

Se puede observar que los p-valores del análisis II indicarían asociación producción de leche-genotipo del PrP para todas las razas, mientras que los p-valores del resto de análisis no soportan esta hipótesis para ninguna de las razas. En cambio el Factor de Bayes, en todos los casos, soporta la hipótesis nula.

Analizando los diferentes análisis realizados, como se ha comentado anteriormente, la potencia del análisis I se vio muy reducida debido a la reducción producida en el número de animales genotipado.

Cuadro 4. P-valor obtenido en las pruebas de hipótesis de efecto del genotipo/haplotipo del PrP

Análisis		LCN-CAPV	LCN-NA	LCR
I	Genotipo	0,87	0,46	0,22
	Haplotipo	0,82	0,35	0,35
II	Genotipo	10^{-4}	0,01	10^{-3}
	Haplotipo	10^{-5}	0,05	0,01
III	Genotipo	0,36	0,72	0,50
	Haplotipo	0,60	0,70	0,98

Cuadro 5. Factor de Bayes del modelo nulo frente al modelo incluyendo efecto del genotipo/haplotipo

Análisis		LCN-CAPV	LCN-NA	LCR
II	Genotipo	10^{11}	107	10^{13}
	Haplotipo	155	8128	2000
III	Genotipo	10^{20}	10^{10}	10^{8}
	Haplotipo	10^{10}	10^{7}	10^{21}

En cuanto al análisis II, tampoco resulta completamente satisfactorio, dado que no contempla la existencia de correlación entre las estimas de â para pares de animales como medias hermanas o animales en el mismo grupo de comparación. Para un análisis correcto sería necesario tener en cuenta la estructura de varianzas y covarianzas de â. Sin embargo, sólo se dispuso de la información correspondiente a los términos en la diagonal (la varianza del error de predicción de cada individuo). Por tanto el análisis asume que no hay correlación entre estimas de â para cada individuo, aunque sí una mayor o menor incertidumbre. Como alternativa, BRANDSMA *et al.* (2004) modeli-

zaron el efecto poligénico según la matriz de parentesco. Sin embargo dicha matriz ya ha sido utilizada en el cálculo de â pudiendo entenderse que se está considerando dos veces el mismo efecto.

En nuestra opinión el análisis más fiable es el análisis III, si bien también cuenta con un reducido número de datos, especialmente a la hora de estimar los efectos de rebaño-año.

Es importante señalar que en un primer análisis se encontró indicación de asociación mediante el análisis I en el ecotipo de Latxa Cara Rubia. Analizados los datos con más detenimiento, se observó que de entre los animales genotipados del grupo de alto valor genético, se encontraban 19 hijas de un macho mejorante. Esto supuso que los alelos de dicho macho se encontraran con mayor frecuencia en la población de alto valor genético. Una vez descartados estos datos, la evidencia de asociación desapareció. Esto ilustra los problemas a los que se pueden enfrentar los esquemas de selección: la existencia de familias de alto valor genético para caracteres productivos con alelos que no sean de interés para la lucha contra el scrapie. Una mala planificación (por ejemplo una utilización exclusiva de machos ARR/ARR) haría que dichas familias fueran descartadas como progenitores de la siguiente generación, originando a corto plazo un fuerte descenso en el progreso genético.

Teniendo en cuenta la problemática planteada, se puede decir que no se encuentra asociación entre el genotipo para PrP y la producción de leche, al igual que en otros trabajos, tanto para producción de leche (BARILLET *et al.*, 2002; PARADA *et al.*, 2003) como para producción de carne (RODEN *et al.*, 2001; PROKOPOVA *et al.*, 2002; BRANDSMA *et al.*, 2004).

Conclusión

No se observa una asociación entre las diferentes formas alélicas del gen del PrP y la producción de leche. Se puede considerar que, en el funcionamiento del esquema de mejora de la raza Latxa, la selección para el alelo ARR no afectará por asociación a la producción de leche. Sin embargo, existen otro tipo de causas que pueden afectar de forma importante al progreso genético en leche. Estas causas son principalmente dos. Por un lado, el escaso número de animales con los genotipos deseables obligaría a una bajada drástica en la presión de selección para leche, si se tiene como objetivo principal el aumento rápido de la frecuencia de esos genotipos. Por otro lado, está el hecho de la existencia de una relación estructural derivada del propio proceso de selección para leche, que, especialmente en determinados ecotipos, ha sido ejercida sobre un escaso número de familias produciéndose una relación casual y no causal.

Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto EET2001-4891-C03-01 del Ministerio de Ciencia y Tecnología y la ayuda concedida por el INIA para la contratación de A. Legarra. Agradecemos a Leo Alfonso su ayuda y comentarios y a Miguel Pérez Enciso la ayuda en la programación del método de máxima verosimilitud. Asimismo agradecemos a las asociaciones de criadores de la raza Latxa (ELE, AGORALA, ACOL y ASLANA) su labor en la recogida de muestras.

Bibliografía

ALFONSO L., 2002. A comparison of different genotyping designs in population association analyses by changes in allele frequency. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. CD-ROM Communication N° 22-31.

BARILLET F., ANDREOLETTI O., PALHIERE I., AGUERRE X., ARRANZ J.M., MINERY S., SOULAS C., BELLOC, J.P., BRIOIS M., FREGEAT G., TEINTURIER P., AMIGUES ASTRUC J.M., BOSCHER M.Y., SCHELCHER F., 2002. Breeding for scrapie resistance using Prp genotyping in the french dairy sheep breeds. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. CD-ROM Communication N° 13-20.

BRANDSMA J.H., JANSS L.L.H., VISSCHER, A.H., 2004. Association between PrP genotypes and littersize and 135 days weight in Texel sheep. Liv.Prod.Sci., 85, 59-64.

DÍAZ C., SERRANO M., TORRES J.M., 2001. Base genética de la resistencia-susceptibilidad a las encefalopatías espongiformes transmisibles en las especies bovina y ovina. ITEA, 97A, 131-144.

MISZTAL I., TSURUTA S., STRABEL T., AUVRAY B., DRUET T., LEE D.H., 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90). 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. CD-ROM Communication N° 28-07.

PARADA A., MARCOTEGUI N., ALFONSO A., ARANA A., 2003. Análisis de asociación entre el genPrP y la producción de leche en un rebaño de ovejas Assaf. ITEA, Vol. Extra N° 24, 438-440.

PROKOPOVA L., LEWIS R.M., DINGWALL W.S., SIMM G., 2002. Scrapie genotype: a correlation with lean growth rate? 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. CD-ROM Communication N° 13-44.

RODEN J.A., HARESIGN W., ANDERSON J.M.L., 2001. Analysis of PrP genotype in relation to performance traits in Suffolk sheep. Proc.Brit.Soc.An.Sc. 45 (2001).

SAS Institute Inc., 1999. SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, North Carolina.

SORENSEN D., GIANOLA D., 2002. Likelihood, Bayesian, and MCMC methods in quantitative genetics. Springer-Verlag, New York.