

Biodiversidad humana y Evolución

Biodiversidad humana y Evolución

1ª Edición - Noviembre 2012

COMITÉ ORGANIZADOR

Comité Organizador

Presidente:

Daniel Turbón

Comité Científico Organizador:

Miguel Hernández, Lourdes Fañanás,
Domingo I. Toja, Mireia Esparza,
Araceli Rosa, Bárbara Arias, Carme
Rissech, Jordi Galbany, Laura Martínez

Miembros

Ana Clavero, Beatriz Pinilla, Amando
Juan, Aniol Pujol, Laura Baiges, Mireya
Alcina, Marta San Millán

Colaboradores

Anna Casas, Laura Franco,
Chantal Martí, Marta Merino,
Vanessa Muñoz, Carla Crespo,
Ares Rocañín, Lara Sellès

Patronos

Universidad de Barcelona
Sociedad Española de Antropología
Física (SEAF)
Laboratorios URIACH
Ministerio de Economía
y Competitividad

Diseño y maquetación

Purpurink. Estudi editorial

Ilustraciones de las cubiertas

Amando Juan

ISBN (impreso): 978-84-695-6322-9

ISBN (PDF): 978-84-695-6323-6

Biodiversidad humana y Evolución

**Daniel Turbón Borrega
Lourdes Fañanás Saura
Carme Rissech Badalló
Araceli Rosa de la Cruz
(editores)**



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD

Variabilidad genética en estudios de asociación. Estructura poblacional de 10 SNPs autosómicos relacionados con el metabolismo del hierro en mujeres españolas

Baeza Richer C¹, López-Parra AM¹, Blanco-Rojo R², Bertoncini S.³, Arroyo-Pardo E¹, Vaquero MP²

- 1 Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. España.
- 2 Departamento de Metabolismo y Nutrición, ICTAN, (CSIC), Madrid, España.
- 3 Departamento de Biología, Unidad de Antropología, Universidad de Pisa, Pisa, Italia.

Autor de contacto: Carlos Baeza Richer.
Departamento de Toxicología y Legislación Sanitaria,
Facultad de Medicina.
Universidad Complutense de Madrid. España.
e-mail: cbaezaricher@med.ucm.es

RESUMEN

En general, en los estudios de asociación sólo se obtiene un número reducido de SNPs con p significativas ($p < 10^{-7}$). Técnicas como la minisequenciación pueden ser una excelente opción para confirmar o rechazar el interés de dichos SNPs y poder plantear su utilización en el campo del diagnóstico clínico y de la salud pública. Un total de 10 SNPs, fueron seleccionados según los resultados obtenidos en diferentes trabajos de genotipado masivo relacionados con el metabolismo del hierro. Se analizaron en 284 muestras de mujeres españolas no relacionadas, mediante una estrategia de *SNaPshot*. La muestra fue dividida en tres fenotipos relacionados con la absorción de hierro de acuerdo a sus valores de hemoglobina y ferritina: control, deficiente y anémico. Se calcularon distancias genéticas (*FST*) entre los tres grupos y con poblaciones europeas disponibles en el *NCBI Reference Assembly*. No se observaron distancias genéticas significativas entre todos los grupos comparados lo que confirma que los marcadores seleccionados no revelan ninguna estructuración poblacional. Por último, dos SNPs (rs1375515 y rs1800562) mostraron una distribución genotípica significativamente diferente entre los tres grupos fenotípicos, con lo que se discute su posible valor predictivo para la deficiencia del hierro.

PALABRAS CLAVE: SNPs, deficiencia de hierro, *SNaPshot*, estructura poblacional, estudios de asociación genética.

Genetic variability in association studies. Population structure of 10 autosomal SNPs related with iron metabolism in Spanish women

ABSTRACT

Generally, genetic association studies only obtain a small number of SNPs with high significative p-values ($p < 10^{-7}$). Thus, some analysis methods as the minisequencing may be an excellent option whether to confirm or reject the interest of this SNPs as well as to propose their usage both in the diagnostic and public health field. A set of ten SNPs were selected according to some Genome Association Studies

(GWAS) in relation with iron metabolism and were analysed using *SNaPshot* method in 284 not related Spanish women. The sample was divided into three groups according to their hemoglobin and ferritin values in order to classify different phenotypes in relation with their iron levels: control group, iron deficient and anaemic. Genetic distance (*FST*) was assessed among these groups and with European populations available in the *NCBI Reference Assembly*. No significant genetic distances were found confirming that the markers selected do not reveal any population substructure. Finally two SNPs (rs1375515, rs1800562) showed a genotypic distribution among the three phenotypic groups which was significantly different and its possible predictor value for iron deficiency is discussed.

KEY WORDS: SNPs, iron deficiency, *SNaPshot*, population structure, genetic association studies

INTRODUCCIÓN

Los estudios de asociación mediante genotipado masivo han supuesto un gran avance técnico en la investigación de las enfermedades de herencia compleja. En dichos estudios aunque se maneja un número ingente de SNPs y otros marcadores, se suelen obtener un número discreto de SNPs asociados significativamente ($p < 10^{-7}$) a determinados fenotipos o parámetros. Actualmente para dar validez científica a estos hallazgos y como criterio de calidad para su publicación se exige replicar el estudio en una muestra independiente y es aquí donde es frecuente encontrar dificultades (Chanock *et al.*, 2007; Salas y Carracedo, 2007). Técnicas de desarrollo relativamente rápido y de bajo coste como la minisequenciación pueden ser una excelente opción para confirmar o rechazar (replicación) el interés de dichos SNPs y poder plantear su utilización en el campo del diagnóstico clínico y de la salud pública.

En el campo del metabolismo del hierro (Fig. 1) varios estudios de asociación mediante genotipado masivo (*GWAs*) han descubierto que ciertas mutaciones en proteínas clave de dicho metabolismo podrían ser factores de riesgo para enfermedades de herencia compleja como la hemocromatosis o la anemia siendo esta última una alteración calificada de pandemia por la Organización Mundial

de la Salud (OMS), que acarrea grandes costes económicos y sanitarios (de Benoist *et al*, 2008).

Una fuente de errores de tipo I y de tipo II en los GWAs es la selección de marcadores que presentan frecuencias muy diferenciadas según la población o bien la existencia de una fuerte subestructuración de las poblaciones analizadas (Balding, 2006; Salas y Carracedo, 2007). Así pues, los objetivos de este trabajo eran, por un lado, evaluar la técnica de la minisequenciación como herramienta para replicar la asociación de 10 polimorfismos genéticos con parámetros relacionados con el metabolismo del hierro y, por otro lado, comparar nuestra muestra con otras poblaciones mundiales con el fin de revelar una posible estratificación poblacional para los mencionados polimorfismos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Marcadores seleccionados

Un total de 10 *SNPs* (rs4820268, rs855791, rs1799852, rs2280673, rs1800562, rs3811647, rs2673289, rs1375515, rs1799945, y rs16826756), fueron seleccionados según los resultados obtenidos en diferentes trabajos de genotipado masivo relacionados con el metabolismo del hierro (Feder *et al*, 1996; Remacha *et al*, 2006; Benyamin *et al*, 2009; Chambers *et al*, 2009). En la Figura 1 se pueden observar varias proteínas en recuadros negros (HFE, Matriptasa, Transferrina) implicadas en dicho metabolismo en cuyos genes se encuentran algunos de los *SNPs* estudiados. Estos marcadores se analizaron mediante la técnica *SNaPshot* cuyo protocolo diseñado específicamente para estos polimorfismos se describe en Bertoni *et al*, 2011. Un ejemplo de electroferograma obtenido mediante *SNaPshot* para los *SNPs* analizados se muestra en la Figura 2.

Muestra

Se analizaron en 284 muestras de mujeres españolas, no relacionadas. Esta muestra fue dividida en tres grupos de acuerdo a sus valores de hemoglobina (g/dL) y ferritina (mg/L) a fin de clasificar los diferentes fenotipos en relación a los niveles de hierro, según criterios de la OMS: control (Hb >12, Ft >20), deficiente (Hb >20 y Ft <20 o Hb 12 y Ft >20), y anémico (Hb <12 y Ft <20).

Análisis estadísticos

Para testar la posible subestructuración, nuestra muestra, bien en conjunto o dividida en los tres grupos fenotípicos fue comparada con otros grupos poblacionales caucasoides empleando los datos disponibles en el *NCBI Reference Assembly* (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Se calcularon las distancias genéticas entre los diferentes grupos en forma de *FST* mediante el paquete estadístico Arlequin ver. 3.5.1.2 (Excoffier *et al*, 2005). Por medio de un análisis chi-cuadrado, incluido en el paquete estadístico SPSS (versión 19), se analizaron las posibles diferencias en la distribución genotípica de los *SNPs* en los tres grupos fenotípicos

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Figura 3 podemos observar la distribución de los diferentes genotipos de cada *SNP* en los 3 grupos fenotípicos. En algunos de los

SNPs se aprecia una distribución desigual de genotipos entre los grupos. Así para el *SNP* rs1800562 se aprecia como la variante que produce la mutación C282Y, es más frecuente en normales que en el resto de los grupos. Este resultado es el esperado teniendo en cuenta que esta mutación en homocigosis presenta un riesgo muy elevado de generar hemocromatosis y por tanto sea asociada a mayores niveles de hierro (Feder *et al*, 1996). En otros *SNPs* también se aprecian distribuciones notablemente diferentes (rs1375515, rs3811647). De hecho, según los análisis de chi-cuadrado tanto para rs1375515 (*p*-valor: 0,026) como para rs1800562 (*p*-valor: 0,024) se encontraron diferencias significativas para la distribución genotípica en los tres grupos. En el caso de rs1375515, seleccionado a partir de una región que mostró una señal de ligamiento en el estudio de Remacha *et al*, 2006 se aprecia que el homocigoto mutante se distribuye preferentemente en el grupo de anémicas (Fig. 3). Estos resultados de chi-cuadrado sugieren que se debe profundizar en el estudio de rs1375515 y rs1800562 para comprobar su posible valor diagnóstico en la deficiencia del hierro.

El resto de *SNPs* no muestran diferencias significativas en sus distribuciones genotípicas. Esto se puede deber, entre otros motivos, a que no hay asociación entre estos *SNPs* y el desarrollo de la anemia o también a que los límites definidos para los grupos fenotípicos no sean los adecuados (Salas y Carracedo, 2007). En cualquier caso, la falta de significación no implica la ausencia de relación entre los *SNPs* y ciertos parámetros bioquímicos relacionados con el metabolismo del hierro tal y como se observa en otros estudios (Blanco-Rojo, en prensa)

A la hora de testar la posible subestructuración de la muestra, no se observaron distancias genéticas (*FST*) significativas para los *SNPs* analizados entre los 3 grupos y/o entre las diferentes poblaciones caucasoides disponibles (datos no mostrados). Por lo tanto no se observa estratificación poblacional para estos marcadores en población caucasoide.

En conclusión, a tenor de las diferentes distribuciones genotípicas encontradas entre los grupos y de la falta de estratificación poblacional, consideramos que este conjunto de *SNPs*, analizados mediante *SNaPshot*, puede ser de interés para replicar los resultados significativos encontrados en los estudios de asociación genética relacionados con metabolismo del hierro.

Bibliografía

- Balding DJ (2008) A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat. Rev. Genet.*, 7(10):781-797.
- Benyamin B, Mcrae AF, Zhu G, Gordon S, Henders AK, Palotie A, Peltonen L, Martin NG, Montgomery GW, Whitfield JB, Visscher PM (2009). Variants in TF and HFE explain approximately 40% of genetic variation in serum-

transferrin levels. *Am. J. Hum. Genet.*, 84(1):60-65.

Bertoncini S, Blanco-Rojo R, Baeza C, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP Lopez-Parra AM (2011). A novel SNaPshot assay to detect genetic mutations related to iron metabolism. *Genet. Test. Mol. Biomarkers.*, 15(3):173-179.

Blanco-Rojo R, Baeza-Richer C, López-Parra AM, Pérez-Granados AM, Brichs A, Bertoncini S, Buil A, Soria JM, Arroyo-Pardo E, Vaquero MP (2011) Four variants in transferrin and HFE genes as potential markers of iron deficiency anaemia risk: an association study in menstruating women. *Nutr. Metab.* (En prensa)

Chambers JC, Zhang WLI Y, Sehmi J, Wass MN, Zabaneh D, Hoggart C, Bayeal H, McCarthy MI, Peltonen L, Freimer NB, Srai SK, Maxwell PH, Sternberg MJ, Ruokonen A, Abecasis G, Jarvelin MR, Scott J, Elliott P, Koener JS (2009) Genome-wide association study identifies variants in *TMPRSS6* associated with hemoglobin levels. *Nat. Genet.*, 41:1170-1172.

Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M (2007) Replicating genotype-phenotype associations. *Nature.*, 447 (7145):655-660.

De Benoist B, McClean E, Egli I, Cogswell M (2008) Worldwide prevalence of anaemia 1993-2005: WHO Global Database on Anaemia. Geneva, World Health Organization.

Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online.*, 1:47-50.

Feder JN, Gnirke A, Thomas W, Tsuchihashi Z, Ruddy DA, Basava A, Dormishian F, Domingo R Jr, Ellis MC, Fullan A, Hinton LM, Jones NL, Kimmel BE, Kronmal GS, Lauer P, Lee VK, Loeb DB, Mapa FA, McClelland E, Meyer NC, Mintier GA, Moeller N, Moore T, Morikang E, Prass CE, Quintana L, Starnes SM, Schatzman RC, Brunke KJ, Drayna DT, Risch NJ, Bacon BR, Wolff RK (1996). A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. *Nat. Genet.*, 13(4):399-408.

Mariani R, Trombini P, Pozzi M, Piperno A (2009). Iron Metabolism in Thalassemia and Sickle Cell Disease. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 1: e2009006 DOI 10.4084/MJHID.2009.006.

Remacha AF, Souto JC, Soria JM, Buil A, Sarda MP, Lathrop M, Blangero J, Almasy L, Fontcuberta J (2006). Genomewide linkage analysis of soluble transferrin receptor plasma levels. *Ann. Hematol.*, 85(1):25-28.

Salas A, Carracedo A. (2007). Estudios de asociación en enfermedades complejas: problemas estadísticos relacionados con el análisis de polimorfismos genéticos. *Rev Clin Esp* 11:563-5.

SPSS Inc. (1998). SPSS Base 8.0 for Windows User's Guide. SPSS Inc., Chicago

www.ncbi.nlm.nih.gov/

Figura 1: Esquema de la regulación del metabolismo del hierro. Modificado de Mariani *et al*, 2009.

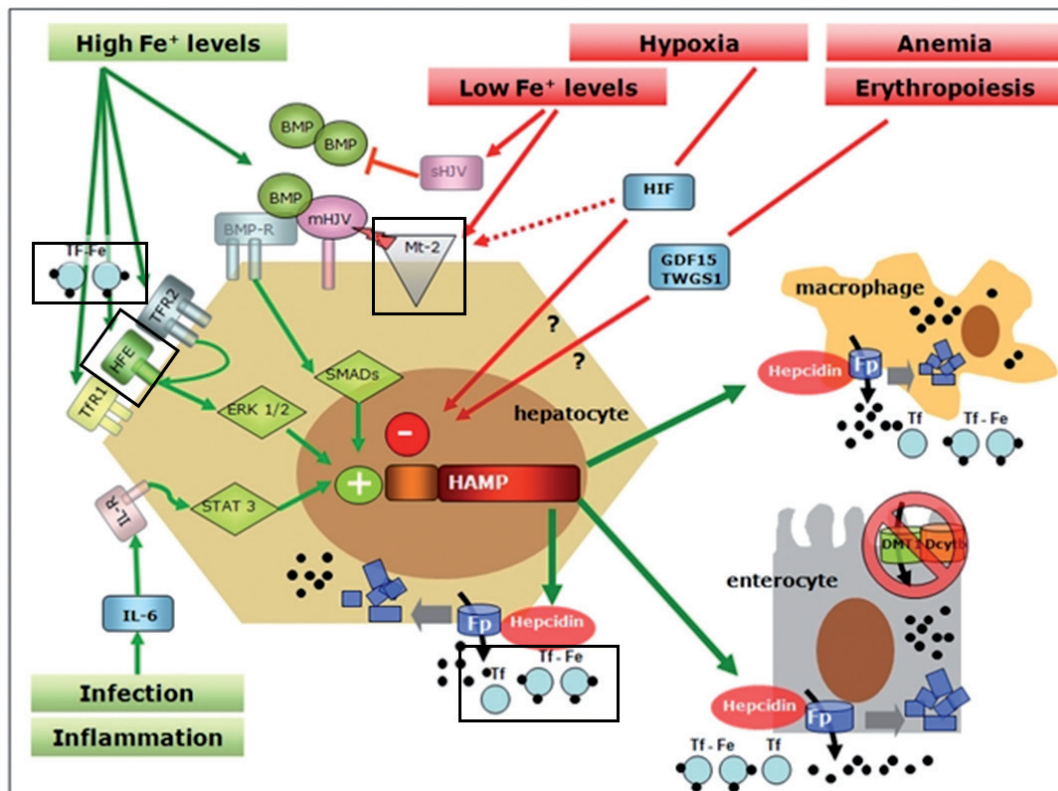


Figura 2. Electroferograma obtenido a partir de la técnica *SNaPshot* en la que se analizan 10 SNPs en una sola reacción

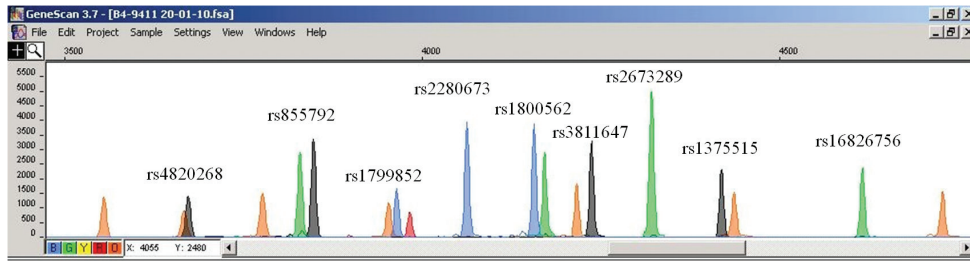


Figura 3. Distribución de los genotipos de cada SNP en los tres grupos fenotípicos. En el caso de rs1800562 el color amarillo representa el genotipo heterocigoto correspondiente a la mutación C282Y. En el caso de rs1375515 el color granate representa el homocigoto mutante perceptiblemente más abundante en el grupo de anémicas.

