



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**

Análisis del transcriptoma y detección de polimorfismos en piel pigmentada y no pigmentada del párpado en ganado Hereford

Eugenio Jara

**TESIS DE DOCTORADO EN PRODUCCION ANIMAL**

**URUGUAY**

**2022**



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**  
**Programa de Posgrados**

Análisis del transcriptoma y detección de polimorfismos en piel pigmentada y no pigmentada del párpado en ganado Hereford

Eugenio Jara

Dra. Eileen Armstrong, Ph.D.

Directora de Tesis

Dr. Francisco Peñaricano

Dr. Andrés Iriarte

Co-directores

**2022**

# INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Nélide Rodríguez. Ph.D

Centro Universitario Regional Litoral Norte

Universidad de la República - Uruguay

Dr. Hugo Naya, Ph.D

Pasteur de Montevideo

Dra. Ángela Cánovas, Ph.D.

University of Guelph



## ACTA DE TESIS DE DOCTORADO

**ORIENTACIÓN:** Producción animal

**FECHA:** 12/9/2022

**TRIBUNAL:** Nélide Rodríguez, Hugo Naya, Ángela Cánovas

CI	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
3852260-8	JARA TELLECHEA, EUGENIO SALVADOR		11

**NOTA:** La calificación mínima para aprobar la defensa es B.B.B (6)

Este tribunal considera que la tesis presentada es un trabajo organizado y coherente, con objetivos claros, los cuales se cumplieron y se ven reflejados en tres publicaciones en revistas de alto impacto. El estudiante defendió muy bien su tesis, presentó de manera clara y concisa, con un buen manejo del tiempo y respondió adecuadamente a las preguntas realizadas por el tribunal.

Tribunal:

Ángela Cánovas  
Integrante

Hugo Naya  
Integrante

Nélide Rodríguez Osorio  
Presidente

## **DEDICATORIA**

A Junama, Facu y a Flor.

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Eileen, por compartir e introducirme en su línea de investigación y *Bos Taurus*.

A Francisco, por permitirme conocer su laboratorio y su forma de trabajar tan dedicada y con un gran impulso y claridad.

Andrés, por bancarme tanto tiempo (2010), y poder enseñarme tanto dentro como fuera de la ciencia.

A mis compañeros de trabajo; Silvia, Rody, María, Narine, Rosa e Iris.

Gastón y Lucia por recolectar las muestras y compartir sus conocimientos conmigo.

Claudia por realizar con paciencias los análisis de laboratorio.

A Ignacio y Olga por organizar los datos que se me fueron compartidos del INIA. A Elly y Gabriel por enseñarme a realizar e interpretar los análisis de GWAS, muchas gracias.

A Gastón por darme una gran mano cuando fui de pasantía a los Estados Unidos. A Lihe por compartir todo su impulso y entusiasmo en la ciencia.

A Nélica, Hugo y Ángela por dedicar parte de su tiempo en leer corregir esta tesis.

A Emiliano y Ernesto.

A mi familia

A la familia de Florencia

A Florencia, Juanma, Facu, Lupi y Miko

## ESTRUCTURA DE LA TESIS Y PUBLICACIONES

Este trabajo de tesis está basado en las siguientes publicaciones, las que se encuentran referenciadas en el texto mediante números romanos. En la Tesis se presentan los aspectos más destacados de cada publicación.

Jara E, Peñagaricano F, Menezes C, Tardiz L, Rodons G, Iriarte A, Armstrong E. Transcriptomic analysis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *Anim Genet.* 2020 Dec;51(6):935-939. doi: 10.1111/age.13004. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33058316.

Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Menezes C, Tardiz L, Rodons G, Iriarte A. Identification of Long Noncoding RNAs Involved in Eyelid Pigmentation of Hereford Cattle. *Front Genet.* 2022 May 4;13:864567. doi: 10.3389/fgene.2022.864567. PMID: 35601493; PMCID: PMC9114348.

Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Ciappesoni G, Iriarte A, Navajas EA. Revealing the genetic basis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *J Anim Sci.* 2022 Apr 7:skac110. doi: 10.1093/jas/skac110. Epub ahead of print. PMID: 35390123.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. Introducción y antecedentes.....	1
1.1 Pigmentación ocular en bovinos .....	1
1.2 Expresión génica en la pigmentación de la piel.....	1
1.3 Parámetros genéticos y estudios de asociación del genoma completo de la pigmentación ocular2	
1.4 Caracterización del problema.....	3
2. Hipótesis.....	4
3. Objetivos .....	5
4. Estrategia de investigación.....	6
5. Publicaciones .....	7
5.1 Publicación I: Análisis transcriptómico de la pigmentación de párpados en ganado Hereford.....	7
5.2 Publicación II: Identificación de ARN largos no codificantes involucrados en la pigmentación de los párpados en ganado Hereford.....	16
5.3 Publicación III: Revelando la base genética de la pigmentación de los párpados en el ganado Hereford.....	33
6. Discusión general .....	44
7. Conclusiones generales.....	48
8. Referencias bibliográficas .....	49

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Gráfico de volcano que explora la relación entre el “Fold Change” y el nivel de significación. Los puntos rojos representa genes significativos, mientras que los puntos negros representa genes no significativos.

Figure 2. Redes de genes; pigmentación (GO:0043473), melanosoma (GO:0042470), respuesta de defensa a las bacterias (GO:0042742).

Figura 3. Números de ARN largos no codificantes putativos basados en los programas CPC2, PLEK y CPAT.

Figura 4. Distribución de nuevos ARN largos no codificantes, ARN largos no codificantes conocidos y genes codificadores de proteínas en el genoma bovino.

Figura 5. Características genómicas de lncRNAs conocidos putativos y genes codificadores de proteínas. a) Comparación de nivel de expresión. b) Distribución del contenido de guanina-citosina (GC). c) Distribución de la longitud de los transcritos. d) Distribución de energía libre mínima normalizada (MEN). e) Distribución del número de exones.

Figura 6. Términos y vías funcionales significativamente enriquecidos en el conjunto de genes asociados con la pigmentación de los párpados. Se utilizaron diferentes bases de datos de anotaciones, incluidas GO, Medical Subject Headings, InterPro, Reactome y MSigDB.

Figura 7. Validación de resultados de secuenciación de ARN por RT-PCR cuantitativa. Los datos se muestran como la media  $\pm$  error estándar.

Figura 8. Análisis genómico de la pigmentación total del párpado. A) Regiones genómicas implicadas en la pigmentación de los párpados según la cantidad de variación genética explicada por ventanas de 2,0 Mb. B) Regiones genómicas implicadas en la pigmentación de los párpados según los P valores.

Figura 9. Términos y vías funcionales significativamente enriquecidos en el conjunto de genes asociados con la pigmentación total del párpado. Se analizaron seis bases de datos de anotaciones de genes: GO, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), MeSH, Reactome, InterPro y MsigDB. El eje y muestra los nombres de los términos y vías significativos. Los puntos negros representan la importancia del enriquecimiento (valor  $P -\log_{10}$ , prueba exacta de Fisher) y el eje x representa el porcentaje de genes significativos en cada término funcional.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estadísticas de secuenciación de ARN.

Tabla 2. Estadísticas de red.

Tabla 3. Comparación de nuevos lncRNA, lncRNA conocidos y genes codificadores de proteínas.

Tabla 4. LncRNAs y genes diana.

Tabla 5. Secuencias de cebadores y tamaños esperados de amplicón utilizados para ensayos de reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-PCR).

Tabla 6. Parámetros genéticos relevantes asociados con la pigmentación de los párpados en ganado Hereford.

Tabla 7. Regiones candidatas y genes asociados con la pigmentación de los párpados en ganado Hereford.

## RESUMEN

Varias patologías oculares en el ganado, como el carcinoma ocular de células escamosas y la queratoconjuntivitis infecciosa, se han asociado con una baja pigmentación de los párpados. El objetivo general de la tesis fue explorar la base genética de la pigmentación de los párpados en ganado Hereford y su posible implicancia en la incidencia de patologías oculares. Se analizó el transcriptoma completo de la piel del párpado de dos grupos de novillos Hereford: uno con párpados 100% pigmentados y otro con párpados 0% pigmentados. A su vez se trabajó con registros de pigmentación de párpados de 1.165 toros y novillos Hereford, evaluados visualmente en cinco categorías entre 0% y 100% de pigmentación en cada ojo. Los datos genotípicos de 774.660 marcadores de polimorfismo de un solo nucleótido (SNP) estaban disponibles para 886 de estos animales con registros de pigmentación. Se consideró la información genealógica de tres generaciones de ancestros de los animales con fenotipo, con un total de 4.929 animales. En esta tesis se demostró que existe expresión diferencial de genes entre las muestras 100% vs. 0% pigmentadas, no sólo en relación a genes implicados en la melanogénesis y procesos metabólicos de la pigmentación, en el cáncer y la respuesta inmune (Publicación I). Sumado a esto, se detectaron 4.937 genes putativos de RNA largos no codificantes (lncRNA), enriqueciendo el catálogo de lncRNA en *Bos taurus*. Se identificaron 27 lncRNAs expresados diferencialmente entre párpados pigmentados y no pigmentados, lo que sugiere su participación en esta característica. Además, revelamos vínculos potenciales entre algunos lncRNA diferencialmente expresados y ARNm “diana” involucrados en la respuesta inmune y la pigmentación (Publicación II). En general, este estudio amplía el catálogo de lncRNA en el ganado y contribuye a una mejor comprensión de la biología de la pigmentación de los párpados. Con respecto al análisis genómico de asociación genotipo-fenotipo, los resultados obtenidos sugieren que la pigmentación de los párpados es un rasgo complejo afectado por múltiples loci, incluidos genes relacionados con la biología de los melanocitos, la melanogénesis y el desarrollo de melanoma, presentando esta característica una heredabilidad media con un valor de 0,41. Estos resultados aportan a una mejor comprensión de las variantes genéticas y los mecanismos biológicos subyacentes a la pigmentación de párpados en ganado Hereford, de potencial utilidad en selección de reproductores como estrategia para reducir la incidencia de patologías oculares.

## SUMMARY

Several ocular pathologies in cattle, such as ocular squamous cell carcinoma and infectious keratoconjunctivitis, have been associated with low pigmentation of the eyelids. The general objective of the thesis was to explore the genetic basis of eyelid pigmentation in Hereford cattle and its possible implication in the incidence of ocular pathologies. The complete transcriptome of eyelid skin from two groups of Hereford steers was analyzed: one with 100% pigmented eyelids and one with 0% pigmented eyelids. In turn, we worked with eyelid pigmentation records of 1,165 Hereford bulls and steers, visually evaluated in five categories between 0% and 100% pigmentation in each eye. Genotypic data for 774,660 single nucleotide polymorphism (SNP) markers were available for 886 of these animals with pigmentation records. The genealogical information of three generations of ancestors of the animals with phenotypes was considered, with a total of 4,929 animals. This thesis shows that there is differential gene expression between the samples of 100% vs. 0% pigmented eyelids, not only in relation to genes involved in melanogenesis and metabolic processes of pigmentation but also in cancer and the immune response (Publication I). In addition to this, 4,937 putative long non-coding RNA (lncRNA) genes were detected, enriching the lncRNA catalog in *Bos taurus*. We identified 27 lncRNAs differentially expressed between pigmented and non-pigmented eyelids were identified, suggesting their involvement in this trait. Furthermore, we revealed potential links between some differentially expressed lncRNAs and “target” mRNAs involved in immune response and pigmentation (Publication II). Overall, this study expands the lncRNA catalog in cattle and contributes to a better understanding of the biology of eyelid pigmentation. Regarding the genotype-phenotype association analysis, the the obtained results suggest that eyelid pigmentation is a complex trait affected by multiple loci, including genes related to melanocyte biology, melanogenesis, and melanoma development. We found an average heritability of Eyelid pigmentation of 0.41. These results contribute to a better understanding of the genetic variation and biological mechanisms underlying eyelid pigmentation in Hereford cattle, and have potential utility in breeding stock selection as a strategy to reduce the incidence of eye pathologies.

# 1. Introducción y antecedentes

## 1.1 Pigmentación ocular en bovinos

El estudio del color de la piel y el pelaje en el ganado tiene intereses tanto económicos como científicos. Este rasgo presenta una heredabilidad media a alta (Vogt et al., 1963; Rees, 2004; Reimann et al., 2018). La baja pigmentación de los párpados se considera un factor predisponente a la aparición de carcinoma ocular de células escamosas (SCC), lesiones oculares y queratoconjuntivitis infecciosa (IBK) (Heeney y Valli 1985; Anderson, 1991; Newton et al., 1996; Snowden et al., 2005; Angelos, 2015), particularmente bajo una exposición creciente a la radiación solar (Pausch et al., 2012). SCC y IBK son las dos patologías oculares más comunes que afectan a la producción bovina (Tsujiya y Plummer, 2010; Irby y Angelos, 2018), presentando un impacto económico considerable, ya que los animales afectados sufren pérdida de peso y son mal pagados al sacrificio (Seid, 2019). Hay que destacar que, si bien no hay información disponible sobre las correlaciones genéticas entre la pigmentación de los párpados con las enfermedades, SCC o IBK, la pigmentación de los párpados es un rasgo que se puede registrar fácilmente y, por lo tanto, se podría esperar que la selección de animales con párpados pigmentados contribuya a disminuir la incidencia de patologías oculares en los rodeos (Vogt et al., 1963). Los animales y los humanos que presentan un mayor grado de pigmentación tienen una mayor proporción de melanina en la piel y, por tanto, una mejor protección frente a los rayos ultravioleta (UV) (Haider et al., 2014; Solano, 2014). En Hereford, una raza británica de ganado de carne mundialmente extendida, varios estudios han demostrado una fuerte relación entre la baja pigmentación de los párpados y la aparición de diversas patologías oculares (Snowden et al., 2005; Davis et al., 2015).

En nuestro país se ha evaluado el porcentaje de pigmentación de los párpados en Hereford de diferentes rodeos nacionales mediante análisis de imágenes, confirmando la relación significativa entre la baja pigmentación y la ocurrencia de diversas patologías oculares (Tardiz et al., 2016). En un estudio similar llevado a cabo en rodeos de Estados Unidos, también hallaron un porcentaje significativamente mayor de lesiones oculares en los animales Hereford puros menos pigmentados en relación a otras razas con mayor pigmentación (Davis et al., 2015).

## 1.2 Expresión génica en la pigmentación de la piel

La transcriptómica es una de las ramas de la genómica que estudia los perfiles de expresión de transcriptos (genes codificantes y no codificantes para proteínas) a escala global, a partir de estudios comparativos. Se ha utilizado la secuenciación masiva con el fin de obtener los transcriptos y poder realizar el estudio del transcriptoma completo, lo que se conoce como “RNA-seq” (Conesa et al., 2016). De los resultados obtenidos por el RNA-seq se pueden obtener perfiles de funcionalidad de los genes generados son de un tejido específico o de una condición fisiológica específica. que se encuentren sub o sobre expresados perfiles generados son de un tejido específico o de una condición fisiológica específica. A estos grupos de genes se los pueden caracterizar en busca de

enriquecimiento de ciertas vías metabólicas comparándolos con la representación de estas vías en el resto de los genes (Conesa et al., 2016).

Por otra parte, el RNA-seq facilita la detección de genes codificantes y no codificantes, por ejemplo, ARN no codificantes largos (lncRNAs) que no han sido identificados todavía en la especie (Trapnell et al., 2010; Weikard et al., 2013). Los lncRNA son transcritos de más de 200 pb que no codifican proteínas funcionales (Qureshi et al., 2010). Se transcriben y procesan como los ARN mensajeros (ARNm), ya que están poliadenilados en 3', presentan una caperuza en 5' y son multiexónicos (Carninci, 2005; Derrien et al., 2012; Li et al., 2019). Se han estudiado y caracterizado en varias especies animales, incluidos ratones (Kadakkuzha et al., 2015), humanos (Gibb et al., 2011), ovinos (Bakhtiarizadeh et al., 2016), caprinos (Ren et al., 2016; Ling et al., 2017), pollos (You et al., 2019) y bovinos (Huang et al., 2012; Weikard et al., 2013; Billerey et al., 2014; Koufariotis et al., 2015; Kern et al., 2018). Constituyen una clase muy heterogénea de ARN, incluidos ARN potenciadores, transcritos antisentido y lncRNA intergénicos (Boon et al., 2016). Por lo general, se expresan en niveles bajos y se encuentran bajo restricciones selectivas más débiles que los genes que codifican proteínas (Derrien et al., 2012). Los lncRNAs están poco conservados entre diferentes especies en comparación con los ARNm, y su expresión es específica de tejido (Pang et al., 2006; Cabili et al., 2011; Derrien et al., 2012; Kern et al., 2018). Sin embargo, se ha demostrado que los lncRNA conservan las funciones entre diferentes especies (Camillieri-Robles C et al., 2022). Los lncRNAs están asociados con varios procesos biológicos críticos, principalmente a través de la regulación de la expresión génica (Clemson et al., 1996; Gupta et al., 2010; Ma et al., 2013; Weikard et al., 2013; Dempsey y Cui, 2017). Los lncRNAs pueden regular la expresión génica en las etapas de pre-transcripción, transcripción y pos-transcripción, tanto en *trans* como en *cis* (Kornienko et al., 2013; Li et al., 2019).

En los últimos años, se ha demostrado la importancia de los lncRNAs en la biología de la piel (Wan y Wang, 2014) en diferentes especies de ganado, incluidos ovinos (Yue et al., 2016), caprinos (Ren et al., 2016) y bovinos (Weikard et al., 2013). Weikard y colaboradores (2013) analizaron la expresión génica de regiones de piel pigmentada y no pigmentada (manchas corporales) en bovinos cruza Charolais x Holstein, obteniendo 10.884 transcritos no anotados de los cuales 4.365 son potenciales lncRNAs. Los cromosomas que presentan mayor expresión de transcritos de los nuevos transcritos son los cromosomas 3 y 5, presentando varios loci implicados en procesos de diferenciación epidérmica y queratinocitaria, trastornos de la piel y procesos asociados a la pigmentación. Estos autores concluyen que el patrón de transcripción para la piel bovina es complejo y sugieren una posible relevancia funcional de los nuevos transcritos, incluyendo lncRNA, en la modulación de los procesos de pigmentación (Weikard et al., 2013). Actualmente el catálogo de lncRNAs involucrados en la pigmentación de la piel en bovinos no es muy extenso y se limita a lncRNAs intergénicos (Weikard et al., 2013).

### 1.3 Parámetros genéticos y estudios de asociación del genoma completo de la pigmentación ocular

El conocimiento de los parámetros genéticos (heredabilidad, varianzas y correlaciones) es necesario para establecer criterios de selección y diseñar programas de mejoramiento (Cardoso et al., 2001). Se han reportado estimaciones de heredabilidad de la pigmentación ocular con un rango

de magnitud de media a alta (0,46, 0,41 y 0,55; Reimann et al., 2018, Anderson et al., 1957, Vogt et al., 1963, respectivamente) para ganado Hereford. El valor estimado de heredabilidad para la raza bovina Fleckvieh, es de 0,79 (Pausch et al. 2012). Como se ha mencionado previamente, las dos patologías oculares más comunes que afectan a la producción bovina son SCC e IBK (Tsujita y Plummer, 2010; Irby y Angelos, 2018). A pesar de la relevancia de estas dos enfermedades en el ganado, se sabe poco sobre su base genética. Ambas enfermedades tienen heredabilidades bajas, con estimaciones de alrededor de 0,10 para SCC (Russell et al., 1976) y entre 0,0 y 0,26 para IBK (Snowder et al., 2005).

El análisis de asociación de genoma completo (GWAS) es una herramienta poderosa que permite identificar regiones genómicas asociadas con variaciones fenotípicas en una población para comprender mejor la arquitectura genética del fenotipo. Esta técnica ha demostrado ser muy importante en el estudio de características poligénicas en el bovino (Pausch et al., 2012; Sigdel et al., 2021; Cavani et al., 2022). Los estudios GWAS analizan sistemáticamente la variación genética en todo el genoma para estudiar sus efectos en el cambio fenotípico, detectando correlaciones entre variantes genéticas y los fenotipos. Su éxito puede estar determinado por factores como el tamaño de la muestra, la calidad del genotipado y la cobertura de marcadores genéticos (Wang et al., 2005; Altshuler et al., 2008). El advenimiento de los chips de genotipado de menor costo condujo a que el GWAS suplantara los estudios de genes candidatos, permitiendo interrogar de forma rentable cientos de miles de marcadores en todo el genoma.

Se han realizado varios estudios de GWAS para identificar regiones genómicas y genes individuales asociados con patrones de pigmentación en bovinos (por ejemplo: Pausch et al., 2012; Fan et al., 2014; Mészáros et al., 2015). Específicamente, se han detectado asociaciones significativas entre genes y regiones genómicas en siete cromosomas implicadas en la generación de manchas perioculares (Pausch *et al.*, 2012). Los genes destacados por estos autores y que se encuentran en estas regiones son *MCM6*, *PAX3*, *ERBB3*, *KITLG*, *LEF1*, *DKK2*, *KIT*, *CRIM1*, *ATRN*, *GSDMC*, *MITF* y *NBEAL2*, posibles genes candidatos involucrados en la pigmentación periocular.

#### 1.4 Caracterización del problema.

Existe preocupación a nivel de productores y criadores de nuestro país sobre la incidencia de patologías oculares en bovinos, especialmente en animales Hereford de las categorías de más edad (animales reproductores). Una de las formas de combatir este problema es aumentando la pigmentación de la zona ocular de estos animales, especialmente de los párpados, cuya pigmentación no evoluciona con la edad, a diferencia de la que se puede encontrar en la región corneoescleral (Anderson, 1991). Siendo un carácter poligénico y altamente variable (Pausch et al., 2012; Tardiz et al., 2016), su selección no es sencilla. Utilizar polimorfismos genéticos directamente relacionados con este carácter permitiría efectuar una selección asistida por marcadores mucho más directa y rápida que la que es posible solamente con selección fenotípica, y para ello es de gran importancia detectar los genes implicados.

## 2. Hipótesis

### 2.1. Hipótesis General

En bovinos Hereford, individuos con párpados pigmentados presentan un perfil de expresión génica a nivel de la piel y una arquitectura genética diferente a nivel genómico con respecto a individuos con párpados no pigmentados.

### 2.2. Hipótesis específicas

- 1) La piel de los párpados pigmentados en bovinos Hereford presenta genes diferencialmente expresados con respecto a las muestras de piel de párpados no pigmentados.
- 2) Los genes con expresión diferencial entre las muestras de párpados pigmentados vs. no pigmentados estarían implicados en vías metabólicas relacionadas con la pigmentación de la piel.
- 3) La piel de los párpados pigmentados en bovinos Hereford presenta lncRNAs diferencialmente expresados con respecto a las muestras de piel de párpados no pigmentados.
- 4) Los lncRNAs con expresión diferencial entre las muestras de párpados pigmentados vs. no pigmentados estarían implicados en la regulación de la expresión de genes asociados a vías metabólicas relacionadas a la pigmentación.
- 5) La pigmentación de los párpados presenta una heredabilidad media en la población de bovinos de raza Hereford de la Central de Pruebas de Kiyú (San José, Uruguay).
- 6) 6) Existen múltiples genes y regiones genómicas asociados a la variación de la pigmentación en la raza Hereford, los cuales pueden ser identificados mediante un análisis GWAS.

### 3. Objetivos

#### 3.1. *Objetivo general*

Identificar mediante secuenciación de transcriptomas completos (RNA-Seq) y análisis de asociación de genoma completo (ssGWAS), genes y ARN largos no codificantes (lncRNAs) asociados a la pigmentación de los párpados en bovinos Hereford.

#### 3.2. *Objetivos específicos*

- 1) Analizar el transcriptoma completo de la piel de los párpados pigmentados y no pigmentados en bovinos Hereford mediante la secuenciación de ARN de hebra específica de cadena (ssRNA-seq).
- 2) Evaluar el perfil de expresión génica diferencial y realizar un análisis de red de co-expresión génica para revelar la base genética que subyace a este fenotipo complejo.
- 3) En los transcriptomas obtenidos, caracterizar e identificar lncRNAs potencialmente involucrados en la pigmentación de los párpados.
- 4) Analizar la expresión diferencial de los lncRNA y estimar las potenciales interacciones entre éstos y genes codificantes para revelar otros aspectos genéticos que determinan este fenotipo complejo.
- 5) Estimar la heredabilidad de la pigmentación de los párpados en ganado Hereford.
- 6) Identificar regiones genómicas y genes asociados a la pigmentación de párpados en un estudio de asociación de todo el genoma de un solo paso (ssGWAS).
- 7) Analizar el conjunto de genes para detectar genes individuales y conjuntos de genes funcionales que podrían explicar parte de la variación fenotípica observada en la pigmentación de los párpados.

#### 4. Estrategia de investigación

La pigmentación de los párpados en el ganado Hereford es relevante dada la relación existente entre la ausencia de pigmentación ocular y la incidencia de lesiones oculares. Sin embargo, aún se desconoce en gran medida su base genética. En esta tesis se incluyen tres aproximaciones genéticas al tema, utilizando métodos bioinformáticos para el análisis de datos. En primer lugar, se desarrolló un experimento para analizar la expresión génica global en muestras contrastantes de piel de los párpados de animales totalmente pigmentados vs. animales sin ningún tipo de pigmentación periocular. En segundo lugar, se abordó la identificación y el análisis de expresión diferencial de lncRNAs entre éstas mismas muestras. Se estudió el vínculo a nivel *trans* y *cis* entre los lncRNAs con expresión diferencial y sus genes diana. En tercer lugar, se utilizó una extensa base de datos del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA) de animales Hereford con datos de pigmentación ocular y de genotipos de miles de marcadores distribuidos por todo el genoma, para estimar parámetros genéticos y estudiar la estructura genética de la pigmentación mediante análisis de asociación genotipo-fenotipo. En todos los experimentos se estimó las rutas metabólicas enriquecidas de los genes con expresión diferencial. Con estos tres abordajes se espera generar insumos que puedan ser aplicados en futuros proyectos con el objetivo de contribuir a la selección de reproductores en esta raza de ganado, una de las más utilizadas en nuestro país para la producción de carne.

## 5. Publicaciones

### 5.1 *Publicación I: Análisis transcriptómico de la pigmentación de párpados en ganado Hereford*

Jara E, Peñagaricano F, Menezes C, Tardiz L, Rodons G, Iriarte A, Armstrong E. Transcriptomic analysis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *Anim Genet.* 2020 Dec;51(6):935-939.

doi: 10.1111/age.13004. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33058316.

#### *Introducción*

La pigmentación de la piel es un rasgo poligénico complejo (Cichorek et al., 2013; Ainger et al., 2017). Este rasgo es el resultado de diferencias en los procesos bioquímicos y en la actividad de los melanocitos (Solano, 2014), que producen dos tipos de melanina: eumelanina (negra/marrón) y feomelanina (roja/amarilla) (Le Pape et al., 2008). Hay muchos genes expresados específicamente en los melanocitos, como *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *PMEL*, *MITF* y *MLANA* (Plonka et al., 2009; D’Mello et al., 2016; Ainger et al., 2017). Dada la relevancia de la pigmentación de la piel, ésta ha sido estudiada en diferentes especies, por ejemplo, en salmón (Zhu et al., 2016; Djurdjevič et al., 2019), humano (Sturm, 2009; Haltaufderhyde y Oancea 2014), cabra (Ren et al., 2016; Bhat et al., 2019), pollo (Zhang et al., 2015; Yu et al. 2018), cerdo (Xu et al., 2019), caballo (Li et al., 2018), bovino (Weikard et al., 2013) y ovino (Peñagaricano et al., 2012; Fan et al., 2013). En el ganado, un estudio evaluó la región de la piel pigmentada y no pigmentada (manchas corporales) y concluyó que los patrones de expresión génica en la piel bovina son complejos y sugirió una posible relevancia funcional de nuevos transcritos e isoformas (Weikard et al., 2013).

#### *Objetivos específicos*

El objetivo principal de este estudio fue analizar el transcriptoma de la piel de los párpados en bovinos Hereford utilizando tecnología RNA-seq. Se evaluaron dos grupos contrastantes, animales con los párpados de ambos ojos completamente pigmentados y animales sin pigmentación en los párpados de ambos ojos, todos machos castrados y de la misma edad (novillos). Se evaluó la expresión diferencial de genes entre estos dos grupos y se realizó un análisis de red de co-expresión génica para revelar la base genética que subyace a este fenotipo complejo en el ganado.

## *Materiales y métodos*

### *Muestreo*

Se recogieron muestras de piel del párpado de 12 animales, seis con párpados totalmente pigmentados en ambos ojos y seis con párpados totalmente despigmentados en ambos ojos, en establecimientos frigoríficos comerciales. Los animales provenían de diferentes establecimientos ganaderos dedicados a la producción de bovinos para carne. Las muestras fueron tomadas al azar de novillos Hereford sanos (2-3 años de edad), no más de 20 minutos después del sacrificio. Luego, las muestras se incluyeron en solución RNAlater inmediatamente después de la recolección y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción de ARN.

### *Aislamiento de ARN, preparación de bibliotecas y secuenciación*

Las muestras se homogeneizaron con MP Bio Fastprep (MP Biomedicals, EE. UU.), con dos rondas de 40 segundos cada una a una intensidad de 6 m/s. Se utilizó el reactivo Trizol (Invitrogen, EE. UU.) para extraer el ARN total de las muestras de tejido de acuerdo con las pautas del fabricante. Tanto la concentración como la integridad del ARN (valores RIN) se midieron en un espectrofotómetro Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent, EE. UU.). Se utilizó un total de 4 µg de ARN por muestra para las preparaciones de las bibliotecas de ARN. Las bibliotecas se generaron utilizando el kit Illumina Truseq Stranded ARNm. De las 12 muestras, once pasaron el análisis de calidad al presentar un valor RIN superior a 7. Las once bibliotecas se secuenciaron con la tecnología SBS de Illumina en MacroGen (Corea), en un carril, con lecturas (“reads”) de extremos emparejados de 150 pb. Se produjeron aproximadamente 40 millones de “reads” de cada muestra.

### *Mapeo al genoma de referencia*

El control de calidad de los “reads” de la secuenciación por muestras se realizó mediante FastQC (Andrews, 2010). Cuando fue necesario, se eliminaron los adaptadores y “reads” de baja calidad, usando los programas scythe (v 0.991, <https://github.com/vsbuffalo/scythe>) y sickle (v1.33, <https://github.com/najoshi/hoz>). Después del procesamiento se realizó un segundo análisis de control de calidad a las muestras procesadas utilizando el programa FastQC. Las muestras con los “reads” limpios se asignaron al último genoma de referencia bovino (*Bos taurus*) (ARS-UCD1.2) utilizando el software Hisat2 (v2.1.0) (Kim et al., 2015). Hisat2 se ejecutó con '--rna-strandness RF' y '-k 1', con todos los demás parámetros configurados como predeterminados.

### *Ensamblaje de transcriptos y estimación de abundancia*

Se utilizó Cufflinks (v2.2.1) para realizar el ensamblado y establecer los transcriptos a partir del mapeo de los “reads” (Trapnell et al., 2010). Este software recrea un conjunto de modelos de transcripción que explican mejor el mapeo de los “reads” de la secuenciación observados en las muestras. Cufflinks se ejecutó ajustando '--library-type fr-firststrand' y el resto de los parámetros

configurados como predeterminados, para cada muestra por separado. Luego, se generó un único archivo de anotación utilizando la herramienta Cuffmerge. Este software fusiona cada uno de los ensamblados de cada muestra con el archivo de anotaciones de referencia para combinar transcritos nuevos con transcritos anotados conocidos. Finalmente, para cada muestra se calculó el número total de “reads” que efectivamente mapearon a cada gen descrito en el ensamblaje final utilizando la función featureCounts de la librería Rsubread (Liao et al., 2014).

### *Análisis de expresión génica y enriquecimiento génico*

Los genes expresados diferencialmente se detectaron utilizando el paquete R edgeR (v.3.26.4) con parámetros predeterminados (Robinson et al., 2010). Para este análisis, solo se utilizaron genes con al menos un recuento de un “read” en al menos seis muestras. Aquellos genes que tienen un P-valor ajustado  $\leq 0,05$  (Benjamini y Hochberg, 1995) y un valor de  $|\log_2FC| \geq 1,5$  se consideraron como genes expresados diferencialmente (DEG) entre los dos grupos en estudio. Los roles funcionales de los genes expresados diferencialmente se evaluaron mediante un análisis de enriquecimiento de Gene Ontology (GO). Los términos GO significativamente enriquecidos con DEG se detectaron mediante una prueba exacta de Fisher, una prueba de proporciones basada en la distribución hipergeométrica.

### *Análisis de red de co-expresión de genes*

Se realizó un análisis de modelado de red para caracterizar tres términos GO de particular interés: *melanosoma* (GO:0042470), *pigmentación* (GO:0043473) y *respuesta de defensa a bacterias* (GO:0042742). Para cada condición, es decir, muestras pigmentadas versus no pigmentadas, se construyó una matriz de correlación de genes  $R = (r_{ij})$  con dimensiones  $n \times n$  utilizando los coeficientes de correlación de Pearson de los genes que mostraron expresión en el análisis de RNA-seq. Luego, cada matriz de correlación se tradujo en una matriz de adyacencia  $A = (a_{ij})$ , una matriz  $n \times n$  con entradas 0 o 1. Aquí, si  $|r_{ij}| \geq 0.9$  y P-valor  $\leq 0.05$ , entonces  $a_{ij} = 1$ , de lo contrario  $a_{ij} = 0$ . La construcción de la red se realizó con el paquete igraph en R (Csardi y Nepusz, 2006). Finalmente, para cada condición y cada término GO, se construyó una red no ponderada basada en la matriz de adyacencia, donde dos genes  $i$  y  $j$  estaban conectados ( $a_{ij} = 1$ ) o desconectados ( $a_{ij} = 0$ ). La estructura y la topología de cada red se evaluaron mediante la conectividad de nodos y el coeficiente de agrupación de nodos (Langfelder et al., 2011). La conectividad  $k_i$  del gen  $i$ , definida como  $k_i = \sum_{j \neq i} a_{ij}$ , mide la fuerza de conexión del gen  $i$  con todos los demás genes. El coeficiente de grupo  $c_i$  del gen  $i$ , definido como,

$$c_i = \frac{\sum_{j \neq i} \sum_{k \neq i} a_{ij} a_{jk} a_{ki}}{(\sum_{j \neq i} a_{ij})^2 - \sum_{j \neq i} (a_{ij})^2}$$

representa la densidad local de una red con  $0 \leq c_i \leq 1$ . Por ejemplo, en una red no ponderada con un coeficiente de grupo igual a 1, se puede explicar si y solo si todos los vecinos del gen  $i$  también

están vinculados entre sí. Todos estos análisis se realizaron utilizando el paquete R WGCNA (versión 1.68) (Langfelder y Horvath 2008).

## Resultados y discusión

### Secuenciación y ensamblaje del transcriptoma

Este trabajo tuvo como objetivo explorar los mecanismos subyacentes a las diferencias de expresión génica entre la piel de los párpados pigmentada y no pigmentada en el ganado Hereford. Se caracterizó el transcriptoma de la piel del párpado mediante secuenciación de ARN. Se obtuvo un total de 649.915.594 (46,1 G) de “reads” sin procesar de 11 muestras; después de la extracción y limpieza de los adaptadores y por calidad y longitud, se conservaron 542.751.474 “reads” limpios (38,5 G) que se utilizaron en los análisis posteriores. El porcentaje de los “reads” de la secuenciación que quedaron después del control de calidad fue de alrededor del 82-84% de los originales (Tabla 1). Se mapearon los “reads” limpios al genoma de referencia ARS-UCD1.2 de *Bos taurus*. La tasa de mapeo general varió de 91 al 93 % considerando los “reads” mapeados de manera única (Tabla 1). Se detectaron un total de 35.311 genes anotados y transcriptos novedosos; después de filtrar por expresión génica, es decir, transcriptos con al menos un “read” en al menos seis muestras, se conservaron 27.187 genes para análisis posteriores.

Tabla 1. Estadísticas de secuenciación de ARN (M=millones).

	“Reads” sin procesar (M)	Pares de “reads” limpias (M)	“reads” solos limpios (M)	“reads” limpios (M)	“reads” mapeados (M)	Pares mapeados concordante mente (M)	Tasa de alineación general (%)
Pigmentado 1	66	49	5	54	51	22	93,1
No pigmentado 1	56	42	4	47	43	19	93,6
No pigmentado 2	78	59	5	65	60	25	91,9
No pigmentado 3	70	54	5	59	55	24	93,1
Pigmentado 2	55	42	4	46	43	19	93,8
No pigmentado 4	48	36	3	40	37	16	92,4
No pigmentado 5	57	43	4	48	44	19	92,7
No pigmentado 6	53	40	4	44	41	18	92,3
Pigmentado 3	59	45	4	49	45	20	92,4
Pigmentado 4	56	43	4	47	46	19	93,8
Pigmentado 5	46	35	3	38	38	15	92,8

### Expresión génica y análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes

Se detectaron un total de 151 genes expresados diferencialmente entre grupos (P-valor ajustado  $\leq 0,05$  y  $|\log_2FC| \geq 1,5$ ). Cincuenta y siete genes estaban sobre-expresados, mientras que 94 estaban sub-expresados en las muestras de párpados pigmentados (Figura 1, S1, Apéndice S1, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>). Entre los genes sobre-expresados, detectamos ocho genes que son clave para la generación,

almacenamiento y distribución de melanina: *MC1R*, *TYR*, *TYRP1*, *KIT*, *DCT*, *PMEL*, *MLANA* y *SLC24A5* (Figura S2, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>). Por ejemplo, *MC1R* es un receptor acoplado a una proteína G que estimula la melanogénesis, en particular la eumelanogénesis, al promover una regulación transcripcional general de la maquinaria necesaria para la biogénesis y transporte de melanosomas (Lin y Fisher 2007; Wolf Horrell et al., 2016). De manera similar, los genes *TYR*, *TYRP1* y *DCT* codifican enzimas que están involucradas en la calidad y cantidad de la producción de melanina (Takeda et al., 2007; Brenner y Hearing 2008). Entre los 94 genes sub-expresados, hay genes estrechamente relacionados con el cáncer y el sistema inmunitario, como; *ARG1*, *FGF23* y *KRT6B* (Figura 1 y S1, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>). El gen *ARG1* cataliza la conversión de L-arginina a L-ornitina y urea, se considera un oncogén en el carcinoma hepatocelular (You et al. 2018) y su expresión elevada indica toxicidades cutáneas agudas inducidas por radioterapia (Jung et al. 2015). El gen *FGF23* actúa como una citoquina proinflamatoria, y su alta expresión se asocia con un mayor riesgo de mortalidad, probablemente debido a su contribución a la disminución de la respuesta de defensa del huésped a la infección, hipertrofia ventricular izquierda, inflamación y anemia (Courbebaisse y Lanske 2017). El gen *KRT6B* se le asocia con el cáncer de piel de células escamosas (Kavak et al., 2010). En general, estos hallazgos arrojan luz sobre el vínculo entre la baja pigmentación de los párpados y la alta susceptibilidad tanto al cáncer de ojo como a las enfermedades infecciosas. Cabe señalar que los resultados de la secuenciación del ARN se validaron con éxito utilizando qRT-PCR cuantitativa (Tabla S2, Figura. S3, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>).

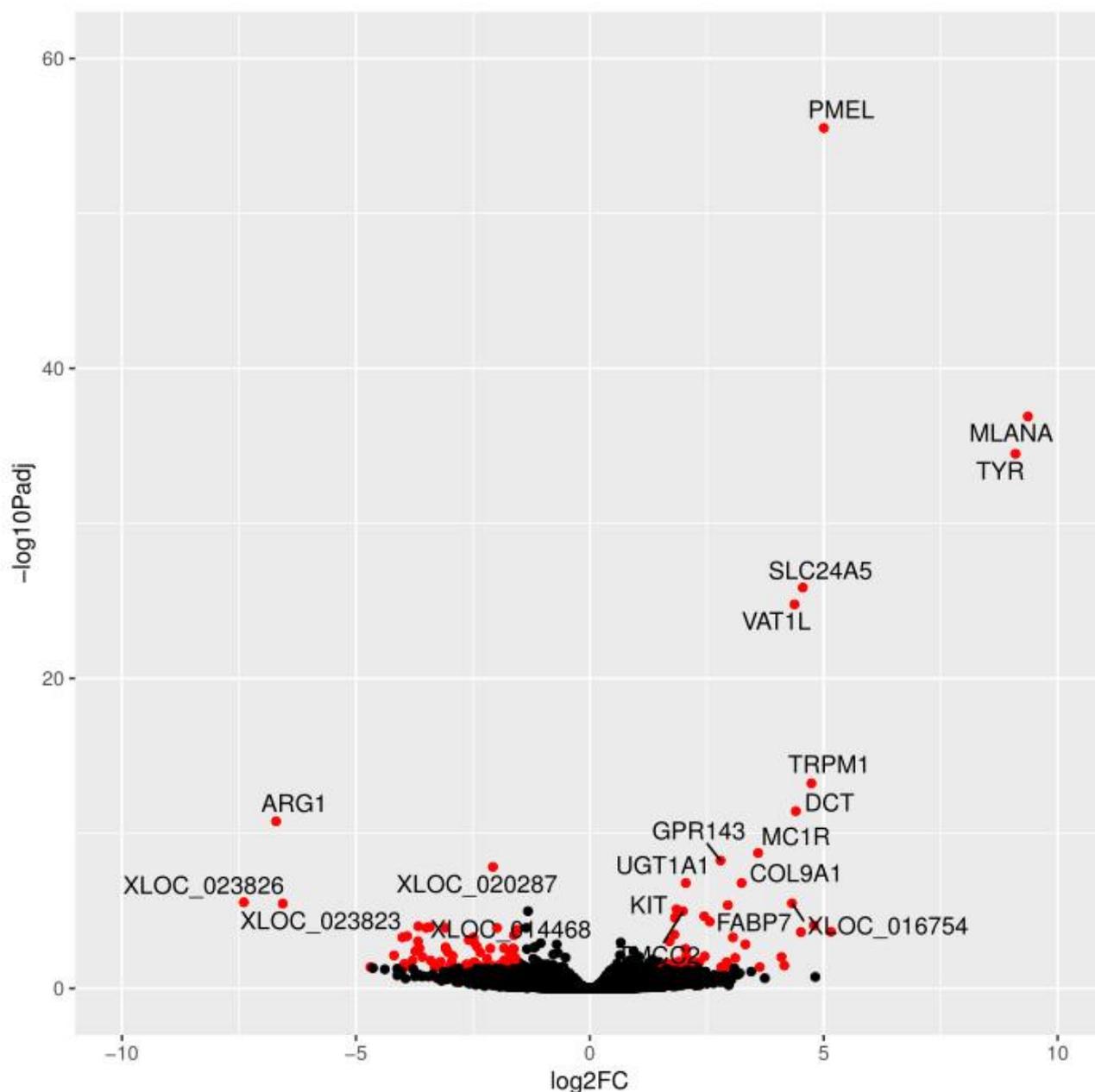


Figura 1. Gráficos que exploran la relación entre el “log2 Fold change” y el nivel de significación. Los puntos rojos representan genes significativos, mientras que los puntos negros representan genes no significativos.

Se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes utilizando la base de datos GO. Los términos más significativos se encontraron relacionados con la *melanosoma*, *pigmentación*, *organización del melanosoma*, *proceso biosintético de melanina y pigmentación*, *diferenciación de melanocitos* y *región extracelular* (Figura S4, Apéndice S2, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>). Estos hallazgos sugieren que los DEGs encontrados en este estudio presentan un papel importante en el fenotipo del párpado pigmentado en el ganado Hereford.

### Análisis de redes

Los términos GO más relevantes, *pigmentación* (32 genes), *melanosoma* (59 genes) y *respuesta de defensa a bacteria* (72 genes) se investigaron mediante análisis de redes de co-expresión génica. Estos términos tenían un total de 32, 59 y 72 genes de los cuales 5, 6 y 3 mostraron expresión diferencial entre condiciones, respectivamente. El objetivo fue investigar si las redes de co-expresión entre las dos condiciones, es decir, párpados pigmentados frente a no pigmentados, presentan el mismo perfil o patrón. Los términos GO *pigmentación* y *melanosoma* fueron elegidos por su relación directa con el fenotipo en estudio. Se eligió el término GO *respuesta de defensa a bacteria* debido a la asociación documentada entre la pigmentación de los párpados y la queratoconjuntivitis infecciosa bovina (Snowder et al., 2005). El ganado Hereford ha mostrado la mayor incidencia de queratoconjuntivitis bovina infecciosa entre varias razas (Snowder et al., 2005). Esta alta susceptibilidad se atribuye en parte a la despigmentación de los párpados. De hecho, nuestro grupo informó que aproximadamente el 20% del ganado Hereford en Uruguay no tiene pigmento en los párpados (Figura S6, S7, <https://drive.google.com/drive/folders/1TQ0qAT-3xCx8VZTG2l-Bt1bAs5RL4i36?usp=sharing>) (Tardiz et al., 2016). De especial interés, nuestro análisis mostró que los genes del término GO *respuesta de defensa a bacteria* estaban altamente co-expresados en muestras pigmentadas en comparación con muestras no pigmentadas. De hecho, la conectividad promedio de la red en los párpados pigmentados fue igual a 5,0 mientras que en las muestras no pigmentadas fue de 1,8 (Tabla 2). Por lo tanto, estos hallazgos sugieren que una mayor co-expresión génica y una regulación génica más estricta en los párpados pigmentados provocando potencialmente una mejor respuesta contra los patógenos, lo que podría explicar por qué los animales pigmentados tienen una menor incidencia de queratoconjuntivitis en comparación con los animales no pigmentados. En particular, las redes de genes de las muestras pigmentadas mostraron más conexiones que las de las muestras no pigmentadas, mostrando por lo tanto una mayor conectividad como valores de coeficiente de grupo (Figura 2, S5, Tabla 2).

Tabla 2. Estadísticas de red.

	<b>Pigmentación GO:0043473</b>		<b>Melanosoma GO:0042470</b>		<b>Respuesta de defensa a bacteria GO:0042742</b>	
	Pig	No pig	Pig	No pig	Pig	No pig
Connectivity	2,3	0,8	5,9	1,7	5	1,8
ClusterCoef	0,4	0,07	0,5	0,1	0,4	0,2



Figura 2. Diferencia de conectividad de las redes de los genes del término GO *pigmentación* (GO:0043473), *melanosoma* (GO:0042470), *respuesta de defensa a bacteria* (GO:0042742).

### *Conclusión*

En general, este estudio proporciona una descripción general completa de las diferencias transcriptómicas entre la piel de los párpados totalmente pigmentada y la completamente no pigmentada en Hereford, una raza de ganado comúnmente afectada por enfermedades oculares relacionadas con la despigmentación facial. Curiosamente, nuestros hallazgos indican que en las muestras de párpados pigmentados se detectó sobreexpresión de varios genes involucrados en la pigmentación. Mientras que en las muestras de párpados despigmentados se detectó sobreexpresión de varios genes relacionados a la respuesta inflamatoria, vías infecciosas y tumorales. Dada la relación entre la pigmentación y las enfermedades oculares, nuestros hallazgos pueden contribuir a la comprensión de los mecanismos biológicos subyacentes tanto al cáncer de ojo como a la incidencia de conjuntivitis en el ganado.

## 5.2 *Publicación II: Identificación de ARN largos no codificantes involucrados en la pigmentación de los párpados en ganado Hereford*

Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Menezes C, Tardiz L, Rodons G, Iriarte A. Identification of Long Noncoding RNAs Involved in Eyelid Pigmentation of Hereford Cattle. *Front Genet.* 2022 May 4;13:864567. doi: 10.3389/fgene.2022.864567. PMID: 35601493; PMCID: PMC9114348.

### *Introducción*

Los lncRNA son transcritos de más de 200 pb que no codifican proteínas funcionales (Qureshi et al., 2010). Constituyen una clase muy heterogénea de ARN, incluidos ARN potenciadores, transcritos antisentido y lncRNA intergénicos (Boon et al., 2016). Se transcriben y procesan como los ARN mensajeros (ARNm), ya que están poliadenilados en 3', presentan una caperuza en 5' y son multiexónicos (Carninci, 2005; Derrien et al., 2012; Li et al., 2019). Se han estudiado y caracterizado en varias especies animales, incluidos ratones (Kadakkuzha et al., 2015), humanos (Gibb et al., 2011), ovinos (Bakhtiarizadeh et al., 2016), caprinos (Ren et al., 2016; Ling et al., 2017), pollos (You et al., 2019) y bovinos (Huang et al., 2012; Weikard et al., 2013; Billerey et al., 2014; Koufariotis et al., 2015; Kern et al., 2018). Por lo general, se expresan en niveles bajos y se encuentran bajo restricciones selectivas más débiles que los genes que codifican proteínas (Derrien et al., 2012). Los lncRNAs están poco conservados entre diferentes especies en comparación con los ARNm, y su expresión es específica de tejido (Pang et al., 2006; Cabili et al., 2011; Derrien et al., 2012; Kern et al., 2018). Dadas estas características, los lncRNAs se consideraban como "ruido" transcripcional (Chakalova et al., 2005; Ma et al., 2013), aunque hoy se sabe que los lncRNAs están asociados con varios procesos biológicos críticos, principalmente a través de la regulación de la expresión génica (Clemson et al., 1996; Gupta et al., 2010; Ma et al., 2013; Weikard et al., 2013; Dempsey y Cui, 2017). Los lncRNAs pueden actuar como "signals", "decoys", "guides" y "scaffolds" para regular la expresión génica en las etapas de pre-transcripción, transcripción y post-transcripción, regulando la expresión génica en *trans* y *cis* (Kornienko et al., 2013; Li et al., 2019). En los estudios de asociación de genoma completo (GWAS), la gran mayoría de los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) significativos se encuentran en regiones no codificantes (Laurent et al., 2014; Goddard et al., 2016), lo que sugiere que los transcritos no codificantes podrían desempeñar un papel más importante de lo esperado, estando directamente involucrados en la variación fenotípica (Kosinska-Selbi et al., 2020). En particular, el catálogo de lncRNA en animales de producción en comparación con humanos y ratones está lejos de ser completo (Kern et al., 2018; Kosinska-Selbi et al., 2020).

El estudio del color del pelaje y la piel en el ganado bovino tiene interés tanto económico como científico. Varias patologías oculares, como el carcinoma ocular de células escamosas, también conocido como cáncer de ojo, y la queratoconjuntivitis infecciosa, también conocida como

conjuntivitis, se han asociado con una baja pigmentación de los párpados (Heeney y Valli, 1985; Anderson, 1991). Estas patologías oculares tienen un impacto económico considerable ya que los animales afectados sufren pérdida de peso y son mal pagados en el sacrificio. La pigmentación de la piel es un rasgo poligénico complejo (Cichorek et al., 2013; Ainger et al., 2017). Este rasgo es el resultado de diferencias en los procesos bioquímicos y la actividad de los melanocitos (Solano, 2014), que producen dos tipos de melanina, eumelanina (negra/marrón) y feomelanina (roja/amarilla) (Le Pape et al., 2008). La falta de pigmentación de los párpados en el ganado Hereford es el resultado de un contexto genético que afecta el desarrollo de los melanocitos, incluida la migración celular. Este contexto genético puede ser causado por variaciones en la expresión del gen *KIT* durante el desarrollo del embrión, lo que da como resultado una migración deficiente de los precursores de melanocitos a la región alrededor de los ojos (Grichnik, 2006). El receptor tirosina kinasa *KIT* y su ligando (*KITLG*) desempeñan un papel importante en el desarrollo de los melanocitos, incluida la migración, la supervivencia, la proliferación y la diferenciación (Grichnik, 2006; Mort et al., 2015; Ainger et al., 2017). Se ha informado que el gen *KITLG* es un gen candidato que afecta tanto la pigmentación del área de los ojos como la pigmentación de los párpados en el ganado (Pausch et al., 2012; Jara et al., 2022). Hay muchos genes expresados específicamente en los melanocitos, como *TYR*, *TYRP1*, *DCT*, *PMEL*, *MITF* y *MLANA* (D'Mello et al., 2016; Ainger et al., 2017). No se ha estudiado la regulación de estos importantes genes por los lncRNA en relación con la pigmentación de los párpados en el ganado. En los últimos años, la importancia de los lncRNA en la biología de la piel (Wan y Wang, 2014) en diferentes especies de ganado, incluidas ovejas (Yue et al., 2016), cabras (Ren et al., 2016) y bovinos (Weikard et al., 2013), se ha demostrado. En el ganado bovino, se identificaron 4.848 lncRNAs potenciales en un estudio que comparó regiones de piel pigmentada y no pigmentada (manchas corporales) (Weikard et al., 2013). Los autores concluyeron que el patrón de transcripción de la piel bovina es complejo y sugirieron una posible relevancia funcional de las nuevas transcripciones, incluidos los lncRNA, en la modulación de la pigmentación. El catálogo de lncRNAs involucrados en la pigmentación de la piel en bovinos no es muy extenso y se limita a lncRNAs intergénicos (Weikard et al., 2013).

### *Objetivos específicos*

El objetivo principal de este estudio fue analizar el transcriptoma de la piel de los párpados en el ganado Hereford utilizando la secuenciación de ARN de hebra específica de cadena (ssRNA-seq) para caracterizar e identificar lncRNA involucrados en la pigmentación de los párpados. Se evaluaron dos grupos contrastantes: novillos con párpados completamente pigmentados versus novillos sin pigmentación en ambos párpados. Se evaluó la expresión diferencial de los lncRNA entre estos dos grupos y se analizaron las interacciones entre los lncRNA y los genes codificantes diana para revelar la base genética que subyace a este fenotipo complejo y económicamente relevante.

## *Materiales y métodos*

### *Muestreo*

Para este estudio se utilizaron las mismas muestras que en el Publicación I y se realizaron los mismos procesos de análisis de los “reads”, alineamiento y ensamblado.

### *Identificación de lncRNA*

Los lncRNAs potenciales se identificaron utilizando filtros sucesivos a partir de todos los transcriptos obtenidos. En primer lugar, se filtraron los transcriptos que presentaban el código de clase "=", "e", "p" y "c" del resultado generado por Cuffcompare (You et al., 2019). También se filtraron los transcriptos con menos de dos exones y con niveles de expresión bajos (diez “reads” mapeados por muestra en al menos cinco réplicas biológicas) y con menos de 200 pb de longitud. Las secuencias de ADN de los transcriptos se extrajeron utilizando gffread (Trapnell et al., 2010). Las secuencias de lncRNAs conocidos se descargaron de dos bases de datos de varias especies: ALDB (base de datos de lncRNA de animales domésticos) (Li et al., 2015a) y NONCODE (Zhao et al., 2016b), que contienen 8.250 y 23.515 lncRNA de ganado bovino, respectivamente. Se usó BLASTn (versión 2.2.31) (Altschul et al., 1990) para alinear los transcriptos no anotadas con los lncRNAs en estas dos bases de datos usando parámetros estrictos (valor  $e \leq 1 \times 10^6$ , cobertura de identidad  $\geq 90\%$ ). Los transcriptos alineadas con precisión contra ALDB o NONCODE (5.0) se consideraron como lncRNA conocidos. Por otro lado, los transcriptos que no se alinearon con las secuencias en ALDB o NONCODE se consideraron nuevos lncRNAs putativos. Este pipeline fue adaptado de Konsinska-Selbi et al., (2020).

### *Análisis del potencial de codificación*

Se calculó el potencial de codificación de cada transcripto utilizando tres programas complementarios: *Coding Potential Calculator 2* (CPC2, versión 0.1) (Kang et al., 2017), *Coding-Potential Assessment Tool* (CPAT, versión 2.0.0) (Wang et al., 2013), y *Predictor of long noncoding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme* (PLEK, versión 1.2) (Li et al., 2014). PLEK y CPC2 se basan en el mismo modelo de clasificación basado en máquinas de vectores de soporte (SVM), mientras que CPAT se basa en el método de regresión logística (Wang et al., 2013; Antonov et al., 2019). Todos estos programas no utilizan alineamientos y han demostrado ser altamente efectivos para discriminar lncRNAs (Han et al., 2016).

El programa CPAT estima puntuaciones de probabilidad de codificación. El valor de corte óptimo para la probabilidad de codificación de proteínas es específico de la especie y, por lo tanto, el programa CPAT se entrenó utilizando un conjunto de 10.000 transcriptos que codifican proteínas bovinas conocidas (Bos\_taurus.ARS-UCD1.2.cds.all.fa, versión 95) y un conjunto de 10.000 secuencias bovinas no codificantes (más de 200 bases de longitud). El conjunto de datos de

referencia final de los ARN no codificantes comprendía 37.695 secuencias (5.930 de Bos\_taurus.ARS-UCD1.2.ncrna.fa [versión 95], 23.515 de NONCODEv5\_cow.fa y 8.250 de ALDB.cow.lincRNAs.v1.0.fa). Los transcritos codificantes de proteínas bovinas y las secuencias no codificantes se extrajeron aleatoriamente de cada anotación, siguiendo estudios publicados previamente (Billerey et al., 2014; Gupta et al., 2019). En resumen, los dos conjuntos de entrenamiento se dividieron aleatoriamente en diez partes diferentes para realizar un análisis de validación cruzada de 10 veces. El valor de corte se seleccionó para maximizar la especificidad y la sensibilidad. Por otro lado, PLEK utiliza un enfoque basado en una ventana deslizante para analizar los transcritos en función de una distribución de frecuencias de  $k$ -mer. PLEK se entrenó usando el mismo conjunto de secuencias que se usó para entrenar el programa CPAT.

Los transcritos que mostraban un valor inferior a 0,5, 0,36 y 0 de los programas CPC2, CPAT y PLEK respectivamente, se consideraron genes no codificantes y se utilizaron en análisis posteriores.

#### *Análisis de expresión génica*

Los genes expresados diferencialmente se identificaron utilizando el paquete de DESeq2 (versión 1.18.1) en R con parámetros predeterminados (Love et al., 2014). En este análisis estadístico se incluyeron los lncRNAs nuevos, lncRNAs conocidos y genes que codifican proteínas anotados. Solo se consideraron los genes con al menos diez “reads” por muestra en al menos cinco réplicas biológicas. Genes con un valor de P-valor ajustado  $\leq 0,05$  (Benjamini y Hochberg, 1995) y un  $|\log_2FC| \geq 1,5$  se consideraron diferencialmente expresados (DE) entre muestras pigmentadas y no pigmentadas.

#### *Análisis de secuencia*

La caracterización de las secuencias se realizó en 14.361 genes codificantes (34.447 transcritos), 4.937 lncRNA nuevos putativos y 218 lncRNA conocidos. El contenido de GC y la longitud de los transcritos se obtuvieron utilizando la función infoseq del paquete EMBOSS versión: 6.6.0.0. El número de exones se estimó utilizando scripts desarrollados por nuestro laboratorio en bash. La abundancia se estimó utilizando Cuffnorm. La energía libre mínima (ME) se calculó utilizando el programa RNAfold incluido en el paquete ViennaRNA versión 2.4.9 (Zuker y Stiegler, 1981; Lorenz et al., 2011). Para hacer comparable el valor de ME de las diferentes secuencias de ARN, se normalizó el ME por la longitud de las secuencias, dando como resultado el MEN (energía libre mínima normalizada). Por lo tanto, MEN se calculó dividiendo el valor de ME por el tamaño del transcripto y multiplicándolo por 100. Así, el valor de MEN relaciona la estimación de ME con un segmento de 100 nucleótidos:  $MEN = (ME/longitud\ de\ secuencia) * 100$  (Zhang et al., 2006).

#### *Predicción de genes diana*

Se utilizaron dos estrategias para estudiar la asociación entre lncRNAs y genes diana que actúan en *cis* y *trans*. En el primer caso, todos los genes codificantes de proteínas "vecinos" que mostraban expresión diferencial (DEG, P-valor  $\leq 0,01$  y  $|\log_2FC| \geq 1$ ) se identificaron en un rango de 300 kb hacia arriba y abajo de los lncRNAs expresados diferencialmente (DEG, P-valor ajustado  $\leq 0,05$  y  $|\log_2FC| \geq 1,5$ ). Los genes que mostraron coeficientes de correlación significativos a nivel de expresión con los lncRNAs "vecinos" (Pearson,  $r \geq |0,60|$ , P-valor  $\leq 0,05$ ) se consideraron genes diana *cis*.

Por otro lado, para inferir las asociaciones potenciales a nivel *trans* entre los genes que codifican proteínas expresados diferencialmente (P-valor  $\leq 0,01$  y  $|\log_2FC| \geq 1$ ), con lncRNA expresados diferencialmente (P-valor ajustado  $\leq 0,05$  y  $|\log_2FC| \geq 1,5$ ), se analizó la complementariedad de secuencias utilizando el programa LncTar (Li et al., 2015b). Es importante destacar que se usó un umbral más estricto para detectar lncRNAs con expresión diferencial que para detectar genes que codifican proteínas con expresión diferencial, con el fin de obtener una muestra más completa y diversa de genes que codifican proteínas y sus funciones. El programa LncTar identifica objetivos potenciales del lncRNA encontrando la energía libre mínima de las estructuras conjuntas de pares de lncRNA y ARNm. Este programa se ejecutó con un valor umbral de  $\Delta G -0,08$ . Todas las interacciones predichas entre los lncRNAs y los ARNm diana que mostraron una correlación de co-expresión significativa (Pearson,  $r \geq |0,60|$ , P-valor  $\leq 0,05$ ) se mantuvieron para su posterior análisis.

Los roles funcionales de los genes diana se evaluaron utilizando el paquete R EnrichKit (<https://github.com/liulihe954/EnrichKit>). En el análisis de enriquecimiento se interrogaron diferentes bases de datos de conjuntos de genes, incluidos GO, MeSH, Reactome, InterPro y MsigDB. Los términos significativamente enriquecidos dentro de los genes diana se detectaron utilizando la prueba exacta de Fisher, una prueba de proporciones basada en la distribución hipergeométrica.

#### *Validación de datos de RNA-Seq*

Los resultados del análisis de RNA-seq se validaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR). Seleccionamos tres lncRNAs expresados diferencialmente y tres genes codificadores de proteínas expresados diferencialmente para la validación. Las secuencias de cebadores y las longitudes esperadas de los productos se enumeran en la Tabla 5. Las PCR en tiempo real se realizaron con 7,5  $\mu$ L de SYBR® Green master mix (Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), con viales ROX separados, Thermo Scientific™, EE. UU.), cantidades equimolares de cebadores directos e inversos (200 nM, Operon Biotechnologies GmbH, Colonia, Alemania), y 20 ng de cDNA diluido (1:7,5 en agua libre de RNase/DNase) en un volumen final de 15  $\mu$ L. Las muestras se analizaron por duplicado en un Rotor-Gene™ 6000 de 72 discos (Corbett Life Sciences, Sydney, Australia). Las condiciones estándar de amplificación fueron 10 min a 95 °C y 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 15 s a 72 °C. Al final de cada corrida se analizaron las curvas de disociación para asegurar que se detectó el amplicón deseado, descartando el ADN contaminante o los dímeros de cebadores. La expresión génica se normalizó utilizando *ACTG1* como gen "housekeeping". Los valores de expresión génica normalizados ( $\Delta Ct$ ) se analizaron

utilizando un modelo lineal que incluía el grupo de pigmentación como variable independiente. La asociación entre la expresión génica normalizada y el grupo de pigmentación se probó mediante una prueba t. La media y el rango del cambio log<sub>2</sub>-fold para cada gen se calcularon como log<sub>2</sub>(2<sup>-ΔΔCt</sup>) utilizando el valor estimado de ΔΔCt ± error estándar.

## *Resultados y discusión*

El objetivo de este estudio fue identificar y analizar los lncRNAs asociados con la pigmentación de los párpados en ganado Hereford. Nuestros hallazgos proporcionan evidencia adicional de que los lncRNAs están activamente involucrados en la pigmentación, como lo sugieren estudios previos no sólo en bovinos (Weikard et al., 2013), sino también en cerdos (Zou et al., 2018), cabras (Ren et al., 2016), humanos (Zhao et al., 2016a; Tang et al., 2020) y organismos invertebrados como *Crassostrea gigas* (Feng et al., 2018).

### *Identificación de lncRNA*

Se obtuvo un total de 111.791 transcritos, incluidas 27.806 transcritos sin anotar, después de mapear los “reads” con la última referencia del genoma bovino. Entre los nuevos transcritos, 218 se detectaron en las bases de datos ALDB y NONCODE y, por lo tanto, se consideran como lncRNA conocidos (Apéndice S1, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). Después del entrenamiento, se seleccionó un valor de corte óptimo de 0,36 para el programa CPAT. Este valor maximiza la especificidad y la sensibilidad (98,3 %) (Figura S1, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)), similar a otros estudios (Billerey et al., 2014; Gupta et al., 2019). Todos los transcritos con una puntuación inferior a 0,36 se conservaron como posibles lncRNAs. Después de integrar los resultados de CPC2, CPAT y PLEK, identificamos un total de 4.937 transcritos no anotados como supuestos lncRNA (Figura 3).

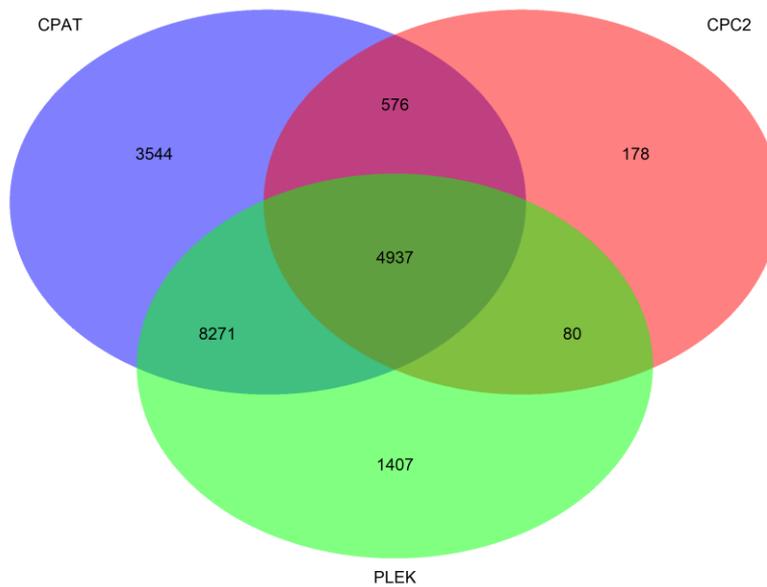


Figura 3. ARN largos no codificantes putativos basados en los programas CPC2, PLEK y CPAT.

Basado en un análisis de RNA-seq de 18 tejidos diferentes, Koufariotis et al., (2015) identificaron 9.778 lncRNAs en ganado bovino. De especial interés, se encontró que siete lncRNA se expresaban diferencialmente entre muestras de piel blanca y negra (Koufariotis et al., 2015). Se han reportado un total de 1.535 lncRNAs expresados codificados por 1.183 genes no codificantes putativos en ovocitos bovinos (Wang et al., 2020). Más específicamente, Weikard et al. (2013) reportaron 4.848 lncRNAs asociados a la pigmentación en el ganado, lo que respalda la idea de que los lncRNAs juegan un papel importante en la pigmentación de la piel. En particular, esta cantidad de lncRNAs es similar a las 4.937 transcritos que informamos en el presente estudio, aunque solo 314 son comunes. La diferencia entre los estudios podría explicarse en términos del *pipeline* analítico que se utilizó para identificar los lncRNAs putativos en cada caso. En el momento de escribir este manuscrito no existe un *pipeline* ampliamente aceptado para identificar lncRNAs.

#### *Comparación entre ARNm, lncRNA novedosos y lncRNA conocidos*

Identificamos un total de 4.937 lncRNA nuevos y 218 conocidos en nuestro conjunto de datos de RNA-seq. Los lncRNAs nuevos se caracterizaron como; nuevas isoformas (51,5%), superposición con exones en el sentido de la hebra de ADN (14,5%), superposición con intrones en la hebra antisentido (12,3%), formas intergénicas (16,5%) y superposición con exones en la hebra antisentido (5,2%) (Figura S3, Apéndice S1, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). Del 51,5 % caracterizado como isoforma novedosa, el 94% se generó a partir de regiones que albergan genes que codifican proteínas, mientras que el 6% son isoformas novedosas de lncRNAs conocidos. Resultados similares fueron informados recientemente por Alexandre et al., (2020) trabajando en lncRNA asociados con la eficiencia alimenticia en ganado bovino.

Los lncRNA nuevos y conocidos se distribuyeron uniformemente en todo el genoma, desde 1,3% (lncRNA nuevos) y 0,45% (lncRNA conocidos) en BTA20 hasta 6,6% (lncRNA nuevos) y 6,8% (lncRNA conocidos) en BTA3 (Figura 4).

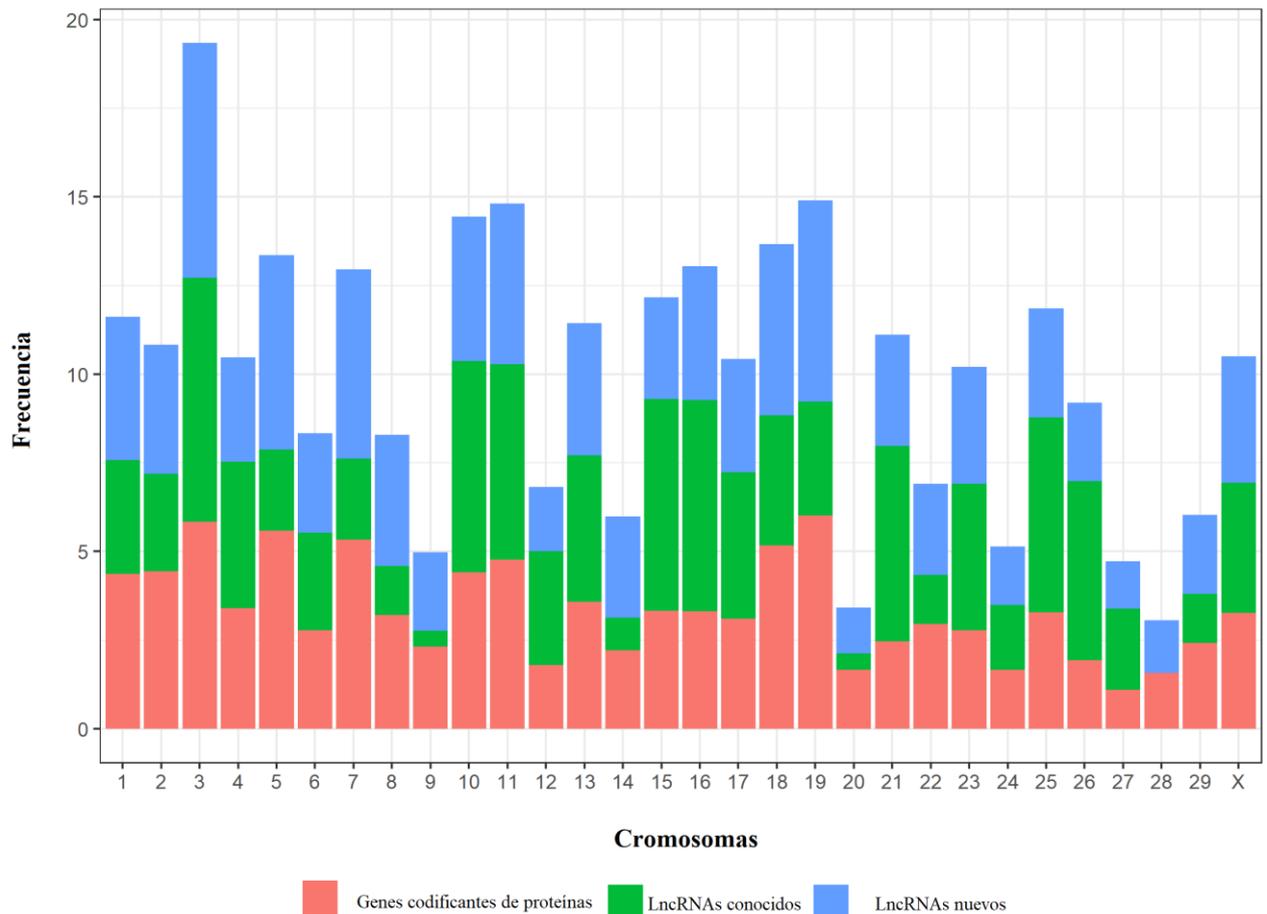


Figura 4. Distribución de nuevos ARN largos no codificantes, ARN largos no codificantes conocidos y genes codificantes de proteínas en el genoma bovino.

Se analizó el contenido de guanina-citosina (GC), la energía libre mínima normalizada (MEN), la longitud de los transcritos, el número de exones y el nivel de expresión de todos los lncRNAs putativos nuevos y comparamos estos rasgos con los de los lncRNAs conocidos y los genes que codifican proteínas. Ambos grupos de lncRNAs mostraron un contenido de GC significativamente más bajo (Figura 5B), una longitud más corta (Figura 5C) y MEN más altos (Figura 5D) que los genes que codifican proteínas (P-valor  $\leq 0,05$ , prueba de Wilcoxon, Tabla 3). No encontramos diferencias significativas en el contenido de GC ni en la MEN entre los lncRNAs nuevos y conocidos (P-valor = 0,37 y P-valor = 0,55, prueba de Wilcoxon, respectivamente, Tabla 3). Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraron que los lncRNAs tienen algunas características de secuencias únicas en comparación con los genes que codifican proteínas (Niazi y Valadkhan, 2012).

Tanto los lncRNA putativos nuevos como los conocidos mostraron valores de MEN significativamente más altos que los genes que codifican proteínas (P-valor  $\leq 0,05$ , prueba de Wilcoxon, Tabla 3). Hay que destacar que la secuencia en sí misma puede contribuir considerablemente a MEN, ya que las secuencias con el mismo contenido de GC pueden presentar potencialmente diferentes valores de energía de plegamiento en función de su estructura secundaria (Niazi y Valadkhan, 2012). A partir de este resultado, se puede inferir que los lncRNAs tienen una estructura más flexible que los ARNm, lo que puede reflejar un mayor potencial para interactuar con otras moléculas. De hecho, se ha demostrado que los lncRNAs tienen valores de GC y MEN similares a los de las secuencias 3' UTR, lo que sugiere que los lncRNAs tienen potenciales funciones reguladoras (Niazi y Valadkhan, 2012).

Los lncRNAs nuevos son significativamente más largos que los lncRNA conocidos (P-valor  $\leq 0,05$ , prueba de Wilcoxon, Tabla 3). Ambos grupos de transcritos no codificantes mostraron niveles de expresión más bajos (Figura 5A) y un número menor de exones (Figura 5E) que los genes que codifican proteínas (P valor  $\leq 0,05$ , prueba de Wilcoxon).

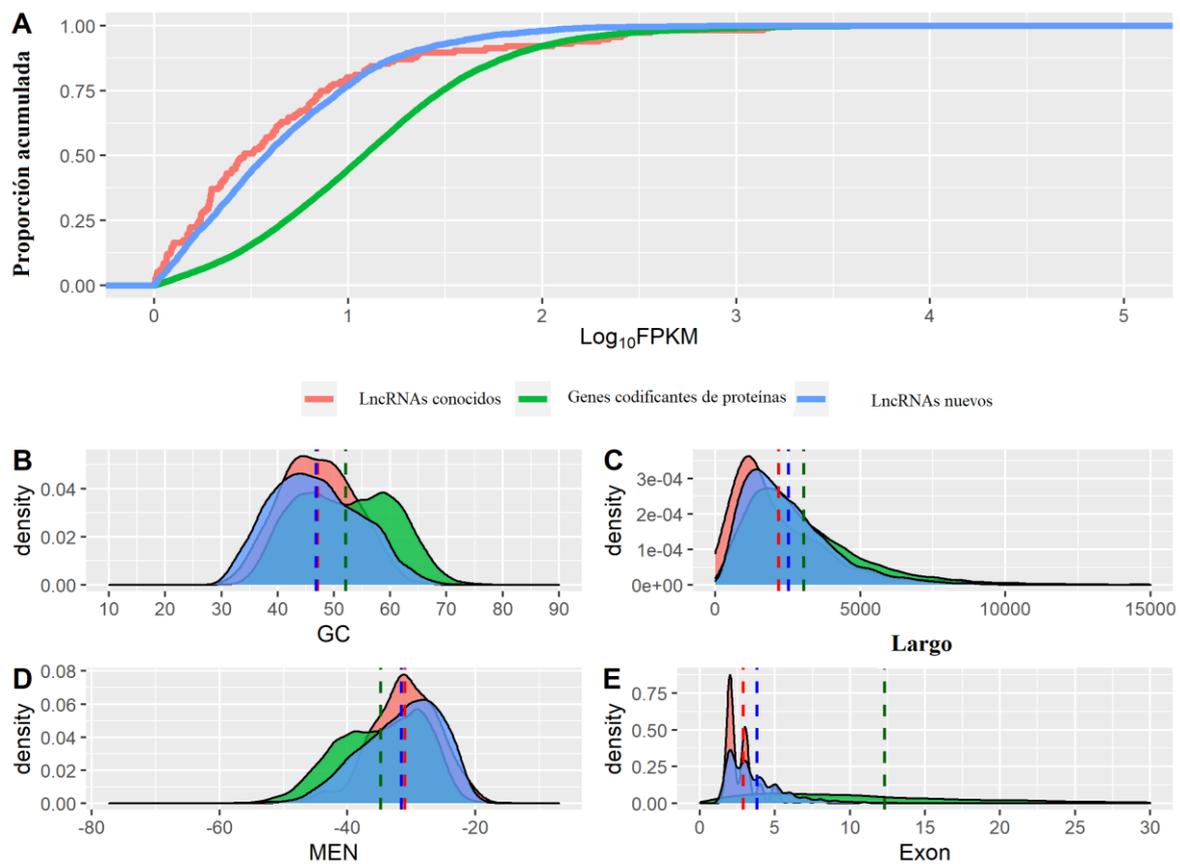


Figura 5. Características genómicas de lncRNAs conocidos, putativos nuevos y genes que codifican proteínas. a) Comparación del nivel de expresión. b) Distribución del contenido de guanina-citosina (GC). c) Distribución de la longitud de los transcritos. d) Distribución de energía libre mínima normalizada (MEN). e) Distribución del número de exones.

Tabla 3. Comparación de nuevos lncRNA, lncRNA conocidos y genes que codifican proteínas.

Categorías	GC	Longitud	MEN	Exones	Expresión
LncRNAs nuevos	46.9 ± 0.11 <sup>A</sup>	2532 ± 24 <sup>A</sup>	-31.5 ± 0.09 <sup>A</sup>	3.8 ± 0.03 <sup>A</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>A</sup>
LncRNAs conocidos	47 ± 0.44 <sup>A</sup>	2199 ± 15 <sup>B</sup>	-31.0 ± 0.35 <sup>A</sup>	2.9 ± 0.09 <sup>B</sup>	0.21 ± 0.05 <sup>B</sup>
Genes codificantes proteínas	52 ± 0.05 <sup>B</sup>	3056 ± 11 <sup>C</sup>	-34.7 ± 0.04 <sup>B</sup>	12.3 ± 0.06 <sup>C</sup>	0.98 ± 0.01 <sup>C</sup>

Expresión: log<sub>10</sub> FPKM.

Letras diferentes representan diferencias significativas (*Wilcox test*, P-valor ≤ 0.01).

En general, los resultados mostraron que los lncRNAs se caracterizan por un menor número de exones, menor contenido de GC, menor nivel de expresión y mayor energía libre mínima normalizada y tienden a ser más cortos que las secuencias codificantes de proteínas (Derrien et al., 2012; Harrow et al., 2012; Billerey et al., 2014). Estos análisis respaldan la confiabilidad de los nuevos lncRNA putativos identificados. Las diferencias marginales observadas en la longitud, el nivel de expresión y el menor número de exones entre los lncRNA nuevos y los conocidos podrían explicarse por el catálogo limitado de lncRNA en el bovino (Kosinska-Selbi et al., 2020). Sin embargo, no se puede descartar por completo la posibilidad de que algunos de los nuevos lncRNA sean pseudogenes o secuencias codificantes mal identificadas.

#### *Análisis de expresión*

Se identificaron 65 genes que codifican proteínas expresados diferencialmente (P-valor ajustado ≤ 0.05 y |log<sub>2</sub>FC| ≥ 1.5) entre las muestras pigmentadas y no pigmentadas (Apéndice S1, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). Entre ellos, *MC1R*, *TYR*, *PMEL*, *DCT* y *MLANA* mostraron sobre-expresión en muestras de párpados pigmentados (Jara et al., 2020). Estos genes son clave para la generación, almacenamiento y distribución de melanina (D’Mello et al., 2016). En el presente estudio identificamos un total de 27 lncRNAs diferencialmente expresados (P-valor ajustado ≤ 0,05 y |log<sub>2</sub>FC| ≥ |1,5|); 24 de los cuales eran lncRNAs nuevos putativos y tres conocidos. Ocho lncRNAs mostraron sobre-expresión y 19 mostraron sub-expresión en las muestras de párpados pigmentados con respecto a las muestras no pigmentadas. El lncRNA con mayor sub-expresión fue TCONS\_00073858 (nuevo) con log<sub>2</sub>FoldChange = -10,3, mientras que el lncRNA con mayor sobre-expresión fue TCONS\_00088900 (nuevo) con log<sub>2</sub>FoldChange = 7,7.

### Asociación de lncRNA con genes diana putativos que actúan en cis

Analizamos los posibles ARNm diana de los lncRNA que actúan en *cis*, es decir, genes que codifican proteínas dentro de los 300 kb hacia arriba y abajo de la ubicación de los lncRNAs con expresión diferencial significativa. Encontramos cuatro genes diana putativos, *CXCL13*, *FABP4*, *GPR143* y *UGT1A1*, en las regiones flanqueantes de cuatro lncRNA expresados diferencialmente, TCONS\_00094682 (nuevo), TCONS\_00021379 (nuevo), TCONS\_00109545 (nuevo) y TCONS\_00078693 (nuevo), respectivamente (Tabla 4). Los lncRNAs TCONS\_00094682 y TCONS\_00021379 mostraron sub-expresión en las muestras pigmentadas y actuarían a nivel *cis* con los genes *CXCL13* y *FABP4*, respectivamente. El gen *CXCL13* codifica una quimiocina homeostática que transporta células B y está implicada en la respuesta inmunitaria (Müller et al., 2002). Por otro lado, se demostró que los transportadores de ácidos grasos, como *FABP4*, aumentan su expresión durante el desarrollo del melanoma metastásico, lo que sugiere una mayor absorción de ácidos grasos y una reprogramación metabólica que sirve como firma para esta afección (Lee et al., 2020). Por el contrario, los lncRNAs TCONS\_00109545 y TCONS\_00078693 mostraron sobre-expresión en las muestras pigmentadas. El lncRNA TCONS\_00109545 interactuaría a nivel *cis* con el gen *GPR143*, que desempeña un papel fundamental tanto en la salud como en el desarrollo de la retina (McKay, 2019). Se han asociado mutaciones en el gen *GPR143* con el fenotipo de albinismo ocular tipo 1 (*OAI*) (Gao et al., 2020), un trastorno genético caracterizado por una pigmentación ocular reducida. Finalmente, lncRNA TCONS\_00078693 se correlacionó con la expresión de *UGT1A1*, un gen implicado en la unión del ácido retinoico. La señalización de retinoides se ve afectada en la carcinogénesis temprana (Tang y Gudas, 2011), y el ácido retinoico se usa a menudo para prevenir el fotoenvejecimiento de la piel humana, evitando la atipia melanocítica y queratinocítica (Cho et al., 2005). Todos estos lncRNA mostraron una correlación positiva con sus genes diana, por lo que planteamos la hipótesis de que estos lncRNAs interactúan a nivel *cis*, promoviendo la expresión de estos genes a través del reclutamiento de proteínas que permiten los bucles de transcripción (Long et al., 2017; Li et al., 2019; Gil y Ulitsky, 2020).

Tabla 4. lncRNAs y genes diana.

lncRNAs	Genes diana	Correlación (r)
TCONS_00094682	<i>CXCL13</i>	0.99
TCONS_00021379	<i>FABP4</i>	0.97
TCONS_00109545	<i>GPR143</i>	0.96
TCONS_00078693	<i>UGT1A1</i>	0.98

### *Asociación de lncRNA con genes diana putativos que actúan en trans*

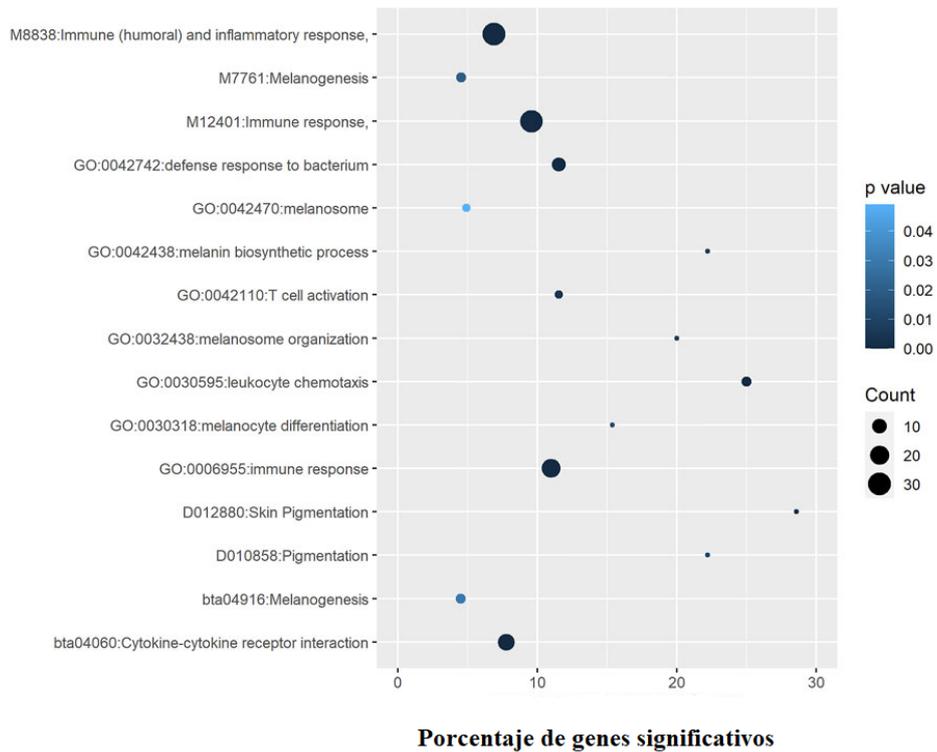
Analizamos los posibles ARNm diana de los lncRNAs que actúan en *trans*, de un total de 273 genes expresados diferencialmente que mostraron complementariedad de secuencia con al menos uno de los veintisiete lncRNAs expresados diferencialmente. De estos 273 genes, 193 mostraron correlaciones significativas a nivel de expresión con lncRNAs significativos (Pearson,  $r > |0,60|$ , valor P-valor  $< 0,05$ ) (Apéndice S3, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)); por lo tanto, se clasificaron como posibles genes diana en *trans*. Se identificó como genes diana a *MC1R*, *PMEL*, *MLANA*, *PAX3*, *IGFBP2*, *FGF23* y *TREM-2*, estando implicados en la melanogénesis, desarrollo de melanosomas (Lin y Fisher, 2007; Kubic et al., 2008; Schmutz y Dreger, 2013), procesos de pigmentación (Lalueza-Fox et al., 2007; Enriqu Steinberg et al., 2013), vías tumorales (Hoashi et al., 2005), inmunidad innata y señalizacion inflamatoria (Ito et al., 2015). Es interesante resaltar que muchos de estos posibles genes diana en *trans* fueron reportados anteriormente como genes expresados diferencialmente en estas mismas muestras de piel de los párpados pigmentados vs. no pigmentados (Jara et al., 2020) (Figura S4, Apéndice S3, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). Los genes *MC1R*, *PMEL*, *MLANA* y *PAX3* mostraron sobre-exposicion en las muestras pigmentadas e interactuaron con lncRNA sobre y sub-expresados (Apéndice S2, S3, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). *MC1R* es un gen clave de la pigmentacion y su activacion en los melanocitos estimula la melanogénesis, particularmente en la produccion de la eumelanina (Beaumont et al., 2007; Cheli et al., 2010; Steinberg et al., 2013). El gen *PMEL* es un componente clave en la biogénesis de los melanosomas de mamíferos (Clark et al., 2006), y peces (Watt et al., 2013; Burgoyne et al., 2015). Se ha demostrado que mutaciones en el gen *PMEL* regulan los fenotipos hipopigmentados en vertebrados (Kwon et al., 1995; Kerje et al., 2004). El factor de transcripcion *PAX3* interactúa con el lncRNA TCONS\_00088900 y regula la expresion del gen *MITF* (Lin y Fisher, 2007), un gen asociado con la pigmentacion circumocular bilateral en el bovino (Pausch et al., 2012). Los niveles de expresion de *MC1R* y *MLANA* mostraron correlaciones positivas significativas con los nuevos lncRNAs TCONS\_00088900 y TCONS\_00091890, mientras que *PMEL* también mostró una correlacion positiva significativa con TCONS\_00091890. *MLANA* codifica una proteína (MART-1) que se localiza en los melanosomas (De Maziere et al., 2002). *MLANA* interactúa con el gen *PMEL* y regula su expresion, estabilidad, tr fico y procesamiento (Hoashi et al., 2005). *MLANA* mostró correlaciones negativas con los lncRNAs ALDBBTAT0000004273 y TCONS\_00106295. Los lncRNAs tienen diferentes formas de afectar la transcripcion de genes diana en *trans*, por ejemplo, estabilizando el ARNm (Cao et al., 2017; Long et al., 2017; Li et al., 2019). Recientemente se ha discutido la participacion de los lncRNAs en la estabilizacion del ARNm y en el aumento de la expresion de genes específicos (Li et al., 2019). Nuestros resultados sugieren que los lncRNAs ALDBBTAT0000004273 y TCONS\_00106295 podrían estar involucrados en la reduccion de la estabilidad del ARNm codificado por el gen *MLANA* y, en consecuencia, contribuyendo a reducir su expresion en muestras no pigmentadas. Además, los lncRNAs podrían estar involucrados en la

estabilización de los ARNm de ciertos genes responsables de la pigmentación, como *PMEL* y *MC1R*, y así potenciar sus niveles de expresión en párpados pigmentados. Los genes *IGFBP2*, *FGF23* y *TREM-2* mostraron sub-expresión en las muestras pigmentadas e interactuaron con lncRNAs sobre y sub-expresados (Apéndice S2, S3, [https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f\\_HrH\\_5-gqgT6tkP?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/14PcSyjXsjkvY7ao7f_HrH_5-gqgT6tkP?usp=sharing)). El gen *FGF23* puede actuar como una citoquina proinflamatoria (Ito et al., 2015), sugiriendo una conexión entre *FGF23* y procesos inflamatorios (Courbebaisse y Lanske, 2018). De hecho, la alta expresión de *FGF23* se asocia con un mayor riesgo de mortalidad, probablemente debido a su contribución a la disminución de la respuesta de defensa del huésped a la infección, la inflamación y la anemia (Courbebaisse y Lanske, 2018). *FGF23* mostró correlaciones positivas con los lncRNA ALDBBTAT0000004273 y TCONS\_00106295. El gen *IGFBP2* está involucrado en las vías tumorales (Pickard y McCance, 2015) y mostró correlaciones positivas con los lncRNA ALDBBTAT0000001157 y TCONS\_00106295. El gen de la proteína de unión a ácidos grasos 7 (*FABP7*) también se describió como un regulador clave de la metástasis del cáncer (Cordero et al., 2019) y su expresión aumentó en muestras pigmentadas (Jara et al., 2020). Este gen mostró correlaciones positivas y negativas significativas con varios lncRNA. El gen *TREM-2* está implicado en la inmunidad innata y la señalización inflamatoria (Sharif y Knapp, 2008) y presentó una correlación positiva con lncRNA TCONS\_00073858. La expresión del gen *TREM* (*TREM-1/TREM-2*) es menor en el melanoma cutáneo que en las muestras de control (Nguyen et al., 2015), y estos genes podrían tener valor pronóstico y terapéutico en el tratamiento del melanoma (Nguyen et al., 2015; Nguyen et al., 2016). A partir de nuestros resultados, se puede especular que los lncRNA descritos aquí participan en la estabilización de los ARNm de genes implicados en el sistema inmunitario y el cáncer, como *FGF23* (Courbebaisse y Lanske, 2018), *IGFBP2* (Pickard y McCance, 2015) y *TREM-2*.

#### *Expresión génica y análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes*

Se identificaron un total de 193 genes diana putativos de los lncRNAs con expresión diferencial. Para identificar funciones enriquecidas entre los genes diana se realizó un análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes utilizando la anotación de diferentes bases de datos, incluidas GO, KEGG, MeSH, InterPro, Reactome y MSigDB. La Figura 8 muestra los términos biológicos más relevantes y las vías asociadas con la pigmentación de los párpados. Los términos funcionales más significativos están relacionados con la pigmentación de la piel, como *melanosoma* (GO:0042470), *proceso biosintético de melanina* (GO:0042438), *organización de melanosomas* (GO:0032438), *diferenciación de melanocitos* (GO:0030318), *melanogénesis (bta04916)*, *pigmentación de la piel* (D012880), *pigmentación* (D010858) y *melanogénesis* (M7761) (Figura 6). En particular, encontramos varios términos significativos relacionados con la respuesta inflamatoria y las vías infecciosas y tumorales: *respuesta inmune* (GO:0006955), *respuesta de defensa a la bacteria* (GO:0042742), *quimiotaxis de leucocitos* (GO:0030595), *interacción citoquina-receptor de citoquina* (bta04060), *activación de células T* (GO:0042110), *interacción citoquina-receptor de citoquina* (bta04060), *respuesta inmunitaria* (M12401) y *respuesta inmunitaria (humoral) e inflamatoria* (M8838) (Figura 6). Estos hallazgos indican que los genes diana de los lncRNA sobre

y sub-  
en la piel  
párpados  
asociados  
con la



expresados  
de los  
están  
no sólo

pigmentación o la melanogénesis, sino también con la respuesta inmune.

Figura 6. Términos y vías funcionales significativamente enriquecidos con genes asociados a la pigmentación de los párpados. Se utilizaron diferentes bases de datos de anotaciones, incluidas GO, Medical Subject Headings, InterPro, Reactome y MSigDB. El color de los puntos esta asociado al p-valor, el tamaño esta asociado al número de genes significativos en cada termino.

*Validación de la expresión génica mediante PCR cuantitativa en tiempo real*

Validamos los hallazgos de RNA-seq usando qRT-PCR. Se evaluaron tres lncRNAs y tres

Gene <sup>a</sup>	Accession no	Primer sequence <sup>b</sup>	Length (bp)
MC1R	ENSBTAG00000023731	F-GTCCTCTACGTCCACATGCT R-GCCAAAGCCCTGATGAATGG	96

<sup>a</sup> MC1R Melanocortin 1 receptor; TYR Tyrosinase; MLANA melan-A; KRT6B Keratin 6B; FGF23 Fibroblast growth factor 23; KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase; ARG1 Arginase 1; ACTG1 Actin gamma 1

<sup>b</sup> F= forward, R= reverse

genes codificantes. La Figura 7 muestra las diferencias de log<sub>2</sub>-fold change en la expresión génica medidas tanto por RNA-Seq como por qRT-PCR, lo que confirma que los seis genes mostraron patrones de abundancia muy similares con ambos métodos.

Gene	Accession	Forward Primer (5' to 3')	Reverse Primer (5' to 3')	Product Size (bp)
MLANA	ENSBTAG00000011813	F- ATCTACTGAGCCGACGCATCC	R- CGCAGTAATGGTCCCTCAGA	112
KRT6B	ENSBTAG00000038033	F- ATTTGGTTTTGGTGCTGGGG	R- TTCGGTATCCACTTCGTCGT	136
FGF23	ENSBTAG00000030343	F- ATGATCAGGTCGGAGGATGC	R- GAGACTCTGGTTGACGGTGA	117
KIT	ENSBTAG00000002699	F-GCAGAGGCCACAAATACAGG	R- GCTCTCCGGACTGAAGTGAT	143
ARG1	ENSBTAG00000012403	F- CCATCTTTCACGCCAGCTAC	R- ACCAGCGTGTCGTTTTCTTC	138
ACTG1	ENSBTAG00000006189	F- GCCAACCGTGAGAAGATGAC	R- CCCAGAGACGGATTCACCT	90
			R-GTACAGAGACAGCACAGCCT	

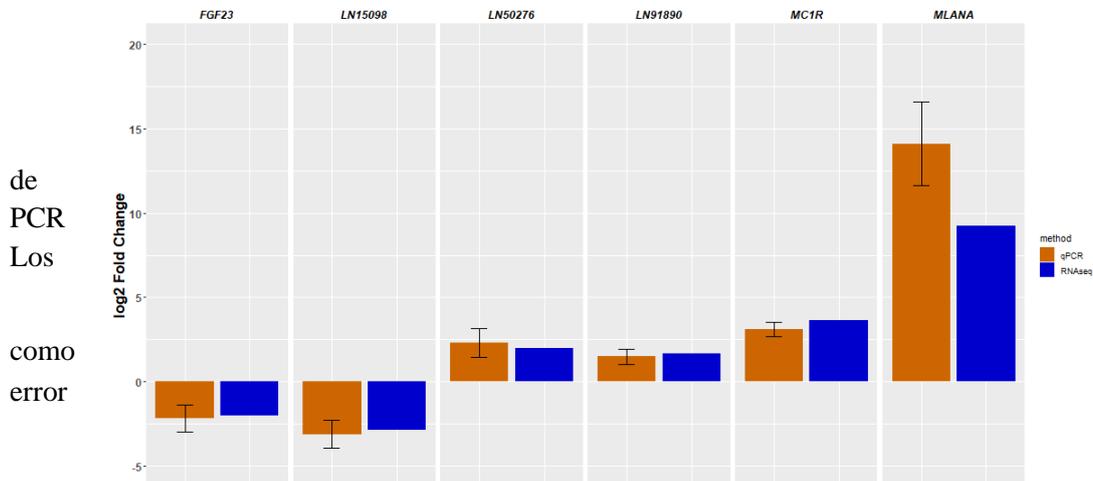


Figura 7. Validación de resultados de secuenciación ARN por RT-cuantitativa. Los datos se muestran como la media  $\pm$  estándar.

## Conclusión

En este trabajo, describimos los patrones de expresión de lncRNAs en la piel de los párpados del ganado. Predijimos 4.937 lncRNAs putativos novedosos asignados al último genoma de referencia bovino y comparamos sus características de secuencia con las de lncRNAs conocidos y genes codificadores de proteínas. Se identificaron un total de 27 lncRNA expresados diferencialmente entre las muestras pigmentadas y no pigmentadas. Se encontraron asociaciones potenciales entre lncRNA específicos y genes diana putativos directamente implicados en la pigmentación, las respuestas inmunitarias y el desarrollo del cáncer. En general, nuestro estudio enriquece el catálogo de lncRNAs en *Bos taurus*, específicamente aquellos relacionados con la regulación de la pigmentación de la piel de los párpados. Estudios funcionales futuros deberían evaluar más a fondo las funciones biológicas de estos importantes lncRNA.

### ***5.3 Publicación III: Revelando la base genética de la pigmentación de los párpados en el ganado Hereford***

Jara E, Peñagaricano F, Armstrong E, Ciappesoni G, Iriarte A, Navajas EA. Revealing the genetic basis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *J Anim Sci.* 2022 Apr 7;skac110. doi: 10.1093/jas/skac110. Epub ahead of print. PMID: 35390123.

#### *Introducción*

Las dos patologías oculares más comunes que afectan a la producción bovina son el carcinoma ocular de células escamosas (SCC) y la queratoconjuntivitis infecciosa (IBK) (Tsujita y Plummer, 2010; Irby y Angelos, 2018). Ambas patologías tienen un impacto económico considerable en la producción de carne de res, ya que los animales afectados tienen un peor rendimiento y una vida productiva reducida y son mal pagados en el sacrificio debido a los bajos pesos finales y problemas sanitarios (Seid, 2019). A pesar de la relevancia de SCC e IBK, se sabe poco sobre la base genética de estas dos enfermedades en el ganado. Ambas enfermedades tienen heredabilidades bajas, con estimaciones alrededor de 0,10 para SCC (Russell et al., 1976), y entre 0,00 y 0,26 para IBK (Snowder et al., 2005).

Se ha informado una alta incidencia de SCC e IBK en razas bovinas con piel blanca en la cabeza, como Hereford, Simmental y Holstein. Hay que destacar, que en estudios que comparan diferentes razas de ganado han demostrado que Hereford tiene la mayor incidencia de patologías oculares (Snowder et al., 2005). La baja pigmentación de los párpados se considera un factor predisponente que conduce a la aparición de SCC, lesiones oculares y posterior IBK (Snowder et al., 2005; Angelos, 2015), particularmente bajo una exposición creciente a la radiación solar (Pausch et al., 2012). Aunque no hay información disponible sobre las correlaciones genéticas de la pigmentación de los párpados con SCC o IBK, la pigmentación de los párpados es posiblemente un rasgo que se puede registrar fácilmente y, por lo tanto, se podría esperar que la selección de animales con párpados pigmentados contribuya a disminuir la incidencia de patologías oculares en la población (Vogt et al., 1963).

La pigmentación de los párpados está relacionada con la producción de pigmento de melanina en los melanocitos de la piel. Aunque la pigmentación de los párpados en el ganado ha recibido menos atención, la pigmentación de la piel se ha estudiado y caracterizado en humanos (Rees, 2004) y animales domésticos (Anderson, 1991). Se han realizado varios estudios para identificar regiones genómicas y genes individuales asociados con patrones de pigmentación en bovinos (Pausch et al., 2012; Fan et al., 2014; Mészáros et al., 2015). Las diferencias en la pigmentación de la piel se deben a las diferencias en la actividad de los melanocitos en combinación con otros factores no genéticos, como las condiciones ambientales y fisiológicas, por ejemplo, exposición a la radiación ultravioleta y reacción al estrés térmico (Jablonski y Chaplin, 2000). Tanto los animales como los humanos con mayor grado de pigmentación tienen una mayor proporción de

melanina en la piel y, por tanto, una mejor protección frente a la radiación ultravioleta (Haider et al., 2014; Solano, 2014). Nuestro trabajo anterior ha demostrado que la pigmentación de los párpados en el ganado bovino está relacionada con la expresión de genes implicados en la biología de los melanocitos, la respuesta inflamatoria, los procesos infecciosos y las vías tumorales (Jara et al., 2020).

### *Objetivos específicos*

Identificar la base genética de la pigmentación de los párpados en ganado Hereford mediante la estimación de la heredabilidad de esta característica, un estudio de asociación de todo el genoma de un solo paso (ssGWAS) y un análisis posterior de conjuntos de genes para detectar genes individuales y conjuntos de genes funcionales que podrían explicar parte de la variación fenotípica observada en este carácter de importancia sanitaria y económica.

### *Materiales y métodos*

#### *Datos fenotípicos, pedigrí y genómicos*

Los registros de pigmentación se recolectaron en la Central de Pruebas de Toros de Kiyú (San José, Uruguay) entre los años 2014 y 2018. El porcentaje de pigmentación de los párpados en cada ojo fue evaluado visualmente por dos técnicos cuando los animales tenían  $382 \pm 95$  días de edad. El porcentaje del área del párpado que estaba pigmentada de cada ojo se clasificó en cinco niveles, 0%, 25%, 50%, 75% y 100% de pigmentación. Un total de 1.165 animales Hereford, incluidos toros y novillos, tenían registros de pigmentación y se utilizaron en este estudio.

El archivo de pedigrí se creó rastreando el pedigrí de los animales con registros de pigmentación hasta tres generaciones e incluyó un total de 4.929 animales. Además, 886 de los animales con registros de pigmentación tenían información genotípica. Estos animales fueron genotipados con el BeadChip bovino de alta densidad de Illumina con aproximadamente 777.000 SNP. Se eliminaron los SNP que se mapeaban en los cromosomas sexuales, monomórficos, tengan una frecuencia de alelos menor al 5% y “call rates” inferiores al 90%. Después de la edición de datos, se retuvieron un total de 591.755 marcadores SNP para análisis genómicos posteriores.

#### *Estimación de componentes de varianza*

Los componentes de varianza se estimaron para la pigmentación del párpado izquierdo y derecho, y también para la pigmentación total del párpado, definida como la suma de la pigmentación del párpado en cada ojo, utilizando el siguiente modelo mixto lineal univariado (modelo 1),

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{u} + \mathbf{e}$$

donde  $\mathbf{y}$  es el vector de registros de pigmentación,  $\boldsymbol{\beta}$  es el vector de efectos fijos, incluyendo los técnicos (2 niveles), sexo (2 niveles; toros y novillos (castrado)), y edad como covariables lineales y cuadráticas, y  $\mathbf{u}$  es el vector de efectos aleatorios genéticos aditivos. Las matrices  $\mathbf{X}$  y  $\mathbf{Z}$  son las matrices de incidencia para los efectos fijos y aleatorios, respectivamente. Se supuso que los efectos aleatorios siguen una distribución normal con  $\mathbf{u} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{A}\sigma_u^2)$  y  $\mathbf{e} \sim N(\mathbf{0}, \mathbf{I}\sigma_e^2)$ , donde  $\mathbf{A}$  es la matriz de relación aditiva e  $\mathbf{I}$  es la matriz de identidad,  $\sigma_u^2$  es la varianza genética aditiva y  $\sigma_e^2$  es la varianza residual. Los datos genómicos no se incluyeron para la estimación del componente de varianza.

Además, se estimaron componentes de (co)varianza para la pigmentación del párpado izquierdo y derecho en un análisis bivariado usando modelos lineales que incluyeron los mismos efectos fijos que en el análisis univariado (modelo 1). Se asumió que los efectos aleatorios de  $\mathbf{u}$  y  $\mathbf{e}$  siguen la distribución normal multivariada con media cero;  $\text{Var}(\mathbf{u}) = \mathbf{G} \otimes \mathbf{A}$  y  $\text{Var}(\mathbf{e}) = \mathbf{R} \otimes \mathbf{I}$ , donde  $\mathbf{A}$  es la matriz de relación del numerador,  $\mathbf{I}$  es la matriz de identidad, y  $\mathbf{G}$  y  $\mathbf{R}$  son la matriz genética aditiva y covarianza residual, respectivamente; y  $\otimes$  es el producto de Kronecker.

Los componentes de varianza y covarianza se estimaron en un marco bayesiano utilizando el programa GIBBS2F90 (versión 1.93) (Misztal et al., 2002). Se realizaron un total de 500.000 iteraciones, con las primeras 100.000 iteraciones descartadas como “burn-in”. Cada 100 muestras se guarda una muestra para calcular las características de las distribuciones posteriores, como las medias posteriores y los desvíos estándar. Este enfoque de muestreo dio como resultado un total de 4000 muestras que se utilizaron para el análisis posterior a Gibbs utilizando el programa POSTGIBBSF90 (versión 3.14) (Misztal et al., 2002).

La heredabilidad ( $h^2$ ) para la pigmentación del párpado izquierdo y derecho y la pigmentación total del párpado se calculó como  $h^2 = \sigma^2 / (\sigma_u^2 + \sigma_e^2)$ , donde  $\sigma_u^2$  es la varianza genética aditiva y  $\sigma_e^2$  es la varianza residual. Además, se estimó la correlación genética entre la pigmentación del párpado derecho e izquierdo como;

$$r_{id}^G = \sigma_{id}^2 / \sqrt{\sigma_i^2 \cdot \sigma_d^2}$$

donde  $\sigma_i^2$  y  $\sigma_d^2$  son la varianza genética aditiva del párpado izquierdo y derecho, respectivamente, y  $\sigma_{id}$  es la covarianza genética.

### *Regiones genómicas y genes individuales*

Se realizó un estudio de ssGWAS para identificar regiones genómicas y genes candidatos que afectan la pigmentación total de los párpados. Este método, inicialmente desarrollado para realizar predicciones genómicas que luego se extendió para realizar mapeos genéticos, permite la inclusión de animales genotipados y no genotipados en un solo análisis, basado en valores genéticos genómicos (GEBV) que fueron estimados usando el modelo 1 pero reemplazando la relación de pedigrí, matriz  $\mathbf{A}$  por la matriz  $\mathbf{H}$ , que combina información genealógica y genotípica (Aguilar et al., 2010). La inversa de  $\mathbf{H}$  se calculó como

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{pmatrix} \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{G}^{-1} - \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{pmatrix}$$

donde  $\mathbf{A}^{-1}$  es la inversa de la matriz de relación de pedigrí,  $\mathbf{A}^{-1}_{22}$  es la inversa de la matriz de relación de pedigrí de los animales con datos genómicos. La matriz de relación genómica aditiva  $\mathbf{G}$  se calculó según el primer método de VanRaden (2008) con frecuencias alélicas directamente estimadas a partir de los genotipos. La matriz  $\mathbf{G}^{-1}$  es la matriz de relación genómica inversa y tiene una dimensión de  $886 \times 886$ , mientras que la matriz  $\mathbf{A}^{-1}$  tiene una dimensión de  $4.929 \times 4.929$ .

Las regiones genómicas asociadas con la pigmentación total de los párpados se identificaron con base en dos enfoques alternativos. Un enfoque fue la cantidad de varianza genética explicada por una ventana de 2,0 Mb de SNP adyacentes evaluados en todo el genoma bovino. Dados los GEBV, los efectos SNP se pueden estimar como

$$\hat{\mathbf{s}} = \mathbf{DM}'[\mathbf{MDM}']^{-1}\hat{\mathbf{a}}_g;$$

donde  $\hat{\mathbf{s}}$  es el vector de los efectos del marcador SNP,  $\mathbf{D}$  es una matriz diagonal de ponderaciones de SNP,  $\mathbf{M}$  es una matriz que relaciona el genotipo de cada marcador de SNP con las observaciones y  $\hat{\mathbf{a}}_g$  es el vector de GEBV para individuos genotipados (Wang et al., 2012). El porcentaje de variación genética explicada por una región dada de 2,0 Mb fue entonces calculado como se describe por Wang et al. (2014):

$$\frac{\text{var}(u_i)}{\sigma_a^2} \times 100 = \frac{\text{var}(\sum_{j=1}^B M_j s_j)}{\sigma_a^2}$$

donde  $u_i$  es el valor genético de la  $i^{\text{th}}$  región genómica en consideración,  $B$  es el número total de SNP adyacentes dentro de una región de 2,0 Mb,  $M_j$  es el código de genotipo del  $j^{\text{th}}$  marcador,  $s_j$  es el efecto del marcador del  $j^{\text{th}}$  SNP dentro de la  $i^{\text{th}}$  región. En este estudio, todos los SNP se ponderaron por igual. El segundo enfoque fue la identificación de marcadores SNP relevantes en función de sus P-valor (Aguilar et al., 2019). Todos estos cálculos se realizaron mediante el programa POSTGSF90 (Aguilar et al., 2014; 2019).

#### *Análisis de conjuntos de genes*

El análisis de conjuntos de genes, también conocido como análisis de enriquecimiento, es una poderosa herramienta para revelar las vías biológicas y mecanismos moleculares que subyacen a fenotipos complejos. El análisis del conjunto de genes consistió básicamente en tres pasos (Han y Peñaricano, 2016): primero, la asignación de marcadores SNP a genes anotados; luego, la

asignación de genes a conjuntos de genes funcionales; y finalmente, la asociación entre cada término funcional y el fenotipo de interés.

La asignación de SNP a genes bovinos se realizó utilizando el paquete biomaRt de Bioconductor R (versión 2.48.3) basado en el ensamblaje del genoma bovino UMD3.1 (Durinck et al., 2009). Los SNP se asignaron a los genes si estaban ubicados dentro de la secuencia genómica del gen o como máximo 5 kb, ya sea hacia arriba o abajo del gen. Los genes putativos que afectan la pigmentación de los párpados se definieron como aquellos genes que contenían al menos un SNP significativo ( $P\text{-valor} \leq 0,05$ ). Se utilizaron diferentes bases de datos de genes, incluidas GO, KEGG, MeSH, Reactome, InterPro y MsigDB, para definir conjuntos funcionales de genes. Finalmente, la identificación de conjuntos de genes significativamente asociados con la pigmentación de los párpados se evaluó mediante una prueba exacta de Fisher (Peñagaricano et al., 2013). El análisis del conjunto de genes se realizó utilizando el paquete R EnrichKit, desarrollado por Lihe Liu y Francisco Peñagaricano, disponible en <https://github.com/liulihe954/EnrichKit>.

## *Resultados y discusión*

### *Estimación de componentes de varianza*

Los componentes de varianza para la pigmentación de los párpados izquierdo y derecho se estimaron mediante un análisis BLUP clásico. Los resultados muestran que ambos rasgos de pigmentación son moderadamente hereditarios, con estimaciones de heredabilidad de  $h^2_I = 0,26 \pm 0,06$  y  $h^2_D = 0,31 \pm 0,06$ , para la pigmentación del párpado izquierdo y derecho, respectivamente (Tabla 6). También evaluamos la correlación genética entre la pigmentación del párpado izquierdo y derecho mediante un análisis BLUP bivariado. Como era de esperar, estos dos rasgos están altamente correlacionados ( $r^G_{id} = 0,94 \pm 0,06$ ) (Tabla 6). Ahora, dada su sencillez práctica, decidimos utilizar como rasgo de interés la pigmentación total del párpado, definida como la suma de la pigmentación de los párpados de ambos ojos. La pigmentación total del párpado captura la variación en ambos ojos, con un mayor número de clases y una distribución más continua. Este rasgo es moderadamente heredable con una estimación de heredabilidad igual a  $0,41 \pm 0,12$  (Tabla 6). Esta estimación de heredabilidad fue más baja que estudios previos también realizados en ganado Hereford (0,55, Vogt et al., 1963) y probablemente debido a una diferencia importante en la metodología disponible en ese momento. Nuestra estimación es muy similar al valor informado por Reimann et al. (2018) trabajando en Hereford y Braford. Estimaron la heredabilidad por BLUP (solo información genealógica) y por BLUP genómico de un solo paso (pedigrí y genotipos), lo que resultó en estimaciones de heredabilidad de 0,46.

En general, la magnitud de la heredabilidad indica que sería posible aumentar el contenido de pigmentos en los párpados del ganado Hereford por selección genética, y así contribuir a reducir la predisposición a patologías oculares. Nótese que la selección directa contra patologías oculares es complicada de implementar dado que estos fenotipos complejos son difíciles de recolectar y poco heredables (0,1 para SSC, Russell et al., 1976; 0,0 a 0,26 para IBK, Snowden et al., 2005). Nuestros resultados sugieren que la pigmentación de los párpados es más heredable que SCC o IBK, lo que

refuerza el valor de la pigmentación de los párpados como criterio de selección para reducir la incidencia de enfermedades oculares en la población de Hereford. Sin embargo, la magnitud de la respuesta correlacionada depende de la correlación genética entre la pigmentación del párpado y las patologías oculares, lo que requiere más investigaciones.

Tabla 6. Parámetros genéticos relevantes asociados con la pigmentación de los párpados en ganado Hereford.

Parámetros	Estimaciones
$\sigma_u^2$	2116(661) [956; 3419]
$\sigma_e^2$	2982 (620) [1745; 4115]
$h^2$	0.41 (0.12) [0.17; 0.63]
$h_i^2$	0.26 (0.06) [0.04;0.49]
$h_d^2$	0.31 (0.06) [0.08;0.54]
$r_{id}^G$	0.94 (0.06) [0.81;1]

Varianza genética aditiva ( $\sigma_u^2$ ), varianza residual ( $\sigma_e^2$ ) y heredabilidad ( $h^2$ ) de la pigmentación total del párpado, definida como la suma de la pigmentación del párpado en ambos ojos. Heredabilidad de la pigmentación del párpado izquierdo ( $h_i^2$ ) y derecho ( $h_d^2$ ), respectivamente. Correlación genética ( $r_{id}^G$ ), entre la pigmentación del párpado derecho e izquierdo. Las desviaciones estándar posteriores están entre paréntesis, mientras que los intervalos de densidad posterior más altos (95 %) se muestran entre paréntesis.

### Mapeo de genes

Las regiones genómicas y los genes putativos asociados con la pigmentación de los párpados se identificaron mediante un enfoque ssGWAS. La figura 8A muestra la proporción de la variación genética aditiva explicada por ventanas de SNP de 2,0 Mb en todo el genoma bovino. El ssGWAS identificó picos considerables en BTA1, BTA5, BTA14, BTA16 y BTA19 asociados con la pigmentación en los párpados. Estas regiones genómicas albergan genes putativos, como *PLDI* (BTA1, 95,37-97,37 Mb, P-valor = 0,03), *KITLG* (BTA5, 16,51-18,51 Mb, P-valor = 0,02), *ADCY8* (BTA14, 10,11-12,11 Mb, P-valor = 8,5x10-05) y *PRKCA* (BTA19, 63,50-63,58 Mb, P-valor = 0,002), que están todos implicados en la melanogénesis y la pigmentación de la piel (Tabla 7). Por ejemplo, el gen *ADCY8* codifica una enzima unida a la membrana que cataliza la formación de AMP cíclico a partir de ATP, y los altos niveles de AMP cíclico desencadenan la expresión de varios genes clave, incluidos *TYR*, *TYRP1* y *DCT*, que están directamente implicados en la calidad y cantidad de producción de melanina (Takeda et al., 2007; Brenner y Hearing, 2008). Los genes *TYR*, *TYRP1* y *DCT* mostraron sobre-expresión en muestras de párpados pigmentados en

comparación con no pigmentados en ganado bovino (Jara et al., 2020). Ambos genes, *PLDI* y *PRKCA*, juegan un papel clave en la regulación de la melanogénesis (D'Mello et al., 2016). El gen *KITLG* está involucrado en el desarrollo y proliferación de melanocitos y en la distribución de melanina. Se ha demostrado que las mutaciones en *KITLG* causan diferentes trastornos de la pigmentación (Amyere et al., 2011) y, de especial interés, se ha sugerido a *KITLG* como un gen candidato que afecta la pigmentación del área de los ojos con protección UV en el ganado (Pausch et al., 2012). En general, nuestro análisis identificó varios genes con funciones conocidas en la melanogénesis y en la pigmentación de la piel como genes putativos que afectan la pigmentación de los párpados en el ganado. En particular, algunos de estos genes candidatos, como *ADCY8* y *KITLG*, participan en múltiples vías de señalización que activan la melanogénesis, incluidas las vías cAMP-PKA-CREB y RAS/MAPK (Dessinioti et al., 2011; D'Mello et al., 2016).

Por otro lado, el análisis ssGWAS identificó varios genes candidatos que están directamente implicados en el desarrollo del melanoma, incluida la *otoconin 90* y *GSDMC* (BTA14, 10.11–12.11 Mb, P-valor =  $8,5 \times 10^{-05}$ ), *NUP93*, *NLRC5*, *SETD6* y *CX3CL1* (BTA18, 24,86-26,86 Mb, P-valor = 0,001), *TMX3* (BTA24, 8,69-10,69, P-valor = 0,002), *CEP350* (BTA16, 61,27-63,27 Mb, valor P = 0,003) e *IGFBP7* (BTA6 , 73,14-75,14 Mb, P-valor = 0,02) (Tabla 7). Por ejemplo, la expresión de *otoconin 90* está asociada con diferentes tipos de cáncer, y especialmente con el melanoma de piel (Pearlman et al., 2019). El gen *GSDMC*, miembro de la familia de la gasdermina, está sobre-expresado en el melanoma metastásico y está implicado en el curso de la tumorigénesis y la progresión del melanoma (Watabe et al., 2001). También fue identificado como uno de los genes que afectan la pigmentación del área circumocular en el ganado por Pausch et al. (2012). El gen *NUP93* media la represión del gen *HOXA*, y los niveles de expresión aberrantes de *HOXA* se correlacionan con diferentes tipos de cáncer, incluido el melanoma cutáneo (Maeda et al., 2005). Los genes *NLRC5* y *CEP350* estimulan la inmunidad antitumoral protectora en el melanoma (Mann et al., 2015; Chelbi y Guarda, 2016; Rodriguez et al., 2016). De hecho, la expresión elevada de *NLRC5* se asocia con una disminución del crecimiento del melanoma en modelos murinos y una supervivencia prolongada de humanos con cáncer de piel (Kim et al., 2020). El gen *SETD6* está sobre-expresado en melanocitos de individuos de piel oscura (López López et al., 2015), así como en líneas celulares de cáncer de melanoma (Mukherjee et al., 2017). El gen *TMX3* está involucrado en el estadio y la gravedad del melanoma (Zhang et al., 2019). El gen *IGFBP7* media la senescencia en los melanocitos y suprime el crecimiento del melanoma in vivo al inducir la apoptosis (Wajapeyee et al., 2008). En resumen, nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que los genes implicados en el desarrollo del cáncer de piel explican al menos parte de las diferencias observadas en la pigmentación de los párpados en el ganado. Los genes candidatos involucrados en la melanogénesis, así como los involucrados en la formación de melanoma, son objetivos prometedores para futuras investigaciones destinadas a identificar mutaciones funcionales que afectan la pigmentación de los párpados en el ganado.

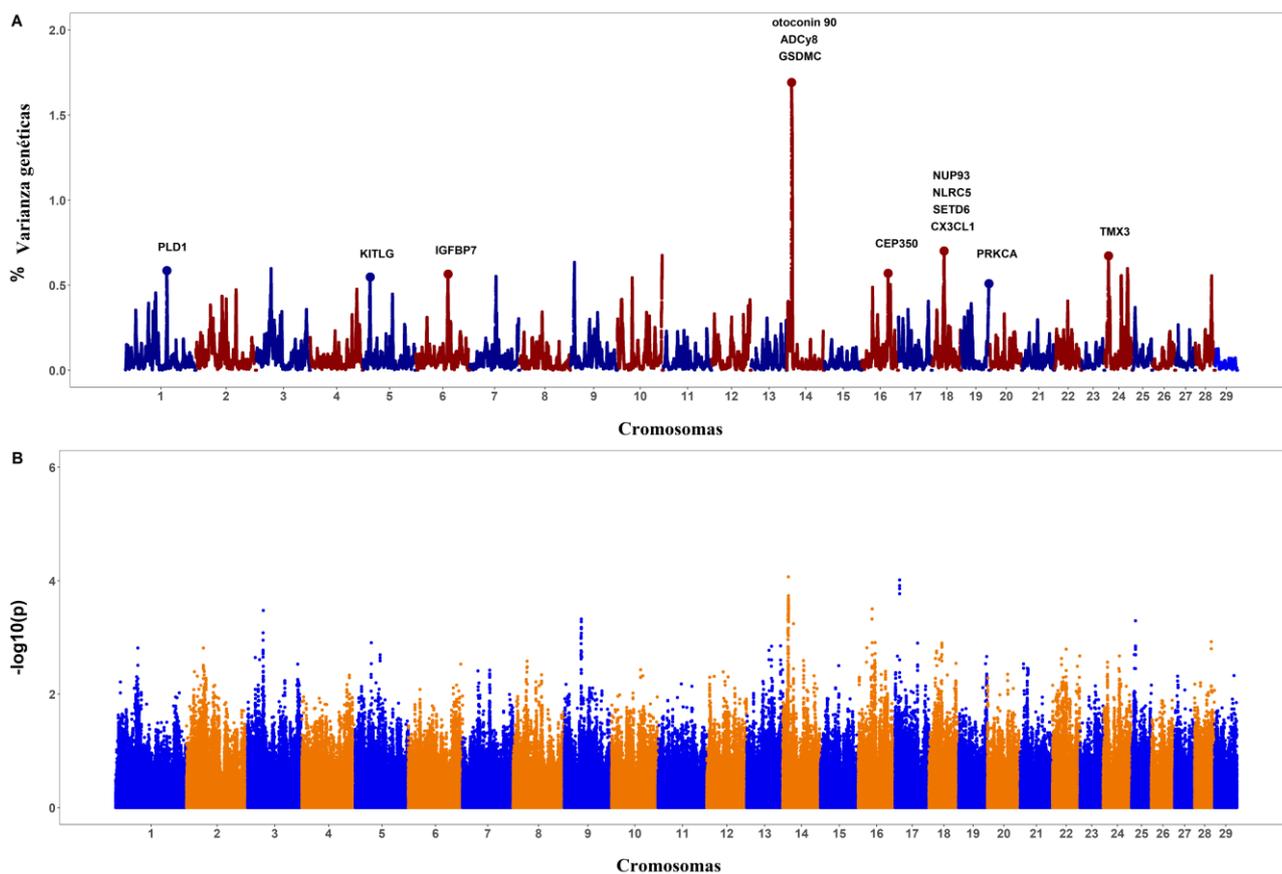


Figura 8. Análisis genómico de la pigmentación total del párpado. A) Regiones genómicas implicadas en la pigmentación de los párpados según la cantidad de variación genética explicada por ventanas de 2,0 Mb. B) Regiones genómicas implicadas en la pigmentación de los párpados según los P valores.

Tabla 7. Regiones candidatas y genes asociados con la pigmentación de los párpados en ganado Hereford

Cromosomas	Posición (Mb)	Varianza (%)	P-value	Genes candidatos
BTA14	10.11-12.11	1,69	8,5x10 <sup>-05</sup>	<i>otoconin 90, ADCY8, GSDMC</i>
BTA18	24.86-26.86	0,7	0,001	<i>NUP93, NLRC5, SETD6, CX3CL1</i>
BTA24	8.69-10.69	0,67	0,002	<i>TMX3</i>
BTA1	95.37-97.37	0,58	0,03	<i>PLD1</i>
BTA16	61.27-63.27	0,57	0,003	<i>CEP350</i>
BTA6	73.14-75.14	0,56	0,02	<i>IGFBP7</i>
BTA5	16.51-18.51	0,54	0,02	<i>KITLG</i>
BTA19	61.98-63.98	0,50	0,002	<i>PRKCA</i>

## Análisis de conjuntos de genes

Un subconjunto de 1.344 genes bovinos se consideró significativamente asociado a la pigmentación de los párpados, dado que estos genes estaban marcados por al menos un SNP significativo ( $P$ -valor  $\leq 0,05$ , Figura 8B). La Figura 9 muestra los conjuntos de genes más relevantes asociados con la pigmentación de los párpados. Los términos más relevantes estuvieron involucrados en al menos tres procesos, a saber, la regulación positiva de la diferenciación de melanocitos, la actividad de la proteína quinasa y la regulación de la cascada ERK1 y ERK2 (Apéndice S1, [https://drive.google.com/drive/folders/1Ka2kX5VpssRt41\\_fLeRu5oWuuWKOjpME?usp=sharing](https://drive.google.com/drive/folders/1Ka2kX5VpssRt41_fLeRu5oWuuWKOjpME?usp=sharing)).

Algunos de los términos enriquecidos están directamente involucrados en la pigmentación de la piel, incluida *regulación positiva de la diferenciación de melanocitos* (GO:0045636), *regulación de la cascada ERK1 y ERK2* (GO:0070372), *regulación positiva de la transducción de señales de proteína Ras* (GO:0046579), *dominio de proteína quinasa* (IPR000719) y *actividad de proteína quinasa* (GO:0004672) (Figura 9). El gen *KITLG* está involucrado en la distribución de melanina, la proliferación de melanocitos y el desarrollo de melanocitos. Las mutaciones en el gen *KITLG* causan diferentes trastornos de la pigmentación (Amyere et al., 2011), y se ha sugerido como un gen candidato que afecta la pigmentación del área circumocular en el ganado (Pausch et al., 2012). El gen *ADAMTS20* pertenece a la familia de las metaloproteasas y se ha demostrado que mutaciones puntuales, sin sentido en el gen *ADAMTS20* causan defectos de pigmentación en ratones (Rao et al., 2003). De hecho, las mutaciones en *ADMTS20* provocan un aumento de la muerte de células pigmentarias, lo que genera una disminución en el número de dichas células (Silver et al., 2008). Además, los ratones mutantes *ADMTS20* han interrumpido la función de *KIT* y/o *KITLG*, proteínas que regulan el desarrollo de células pigmentarias (Silver et al., 2008). Finalmente, dos términos enriquecidos están directamente involucrados en la vía de la melanogénesis, a saber, *regulación de la cascada ERK1 y ERK2* (GO:0070372) (Herraiz et al., 2011) y *regulación positiva de la transducción de señales de la proteína Ras* (GO:0046579) (D Mello et al., 2016).

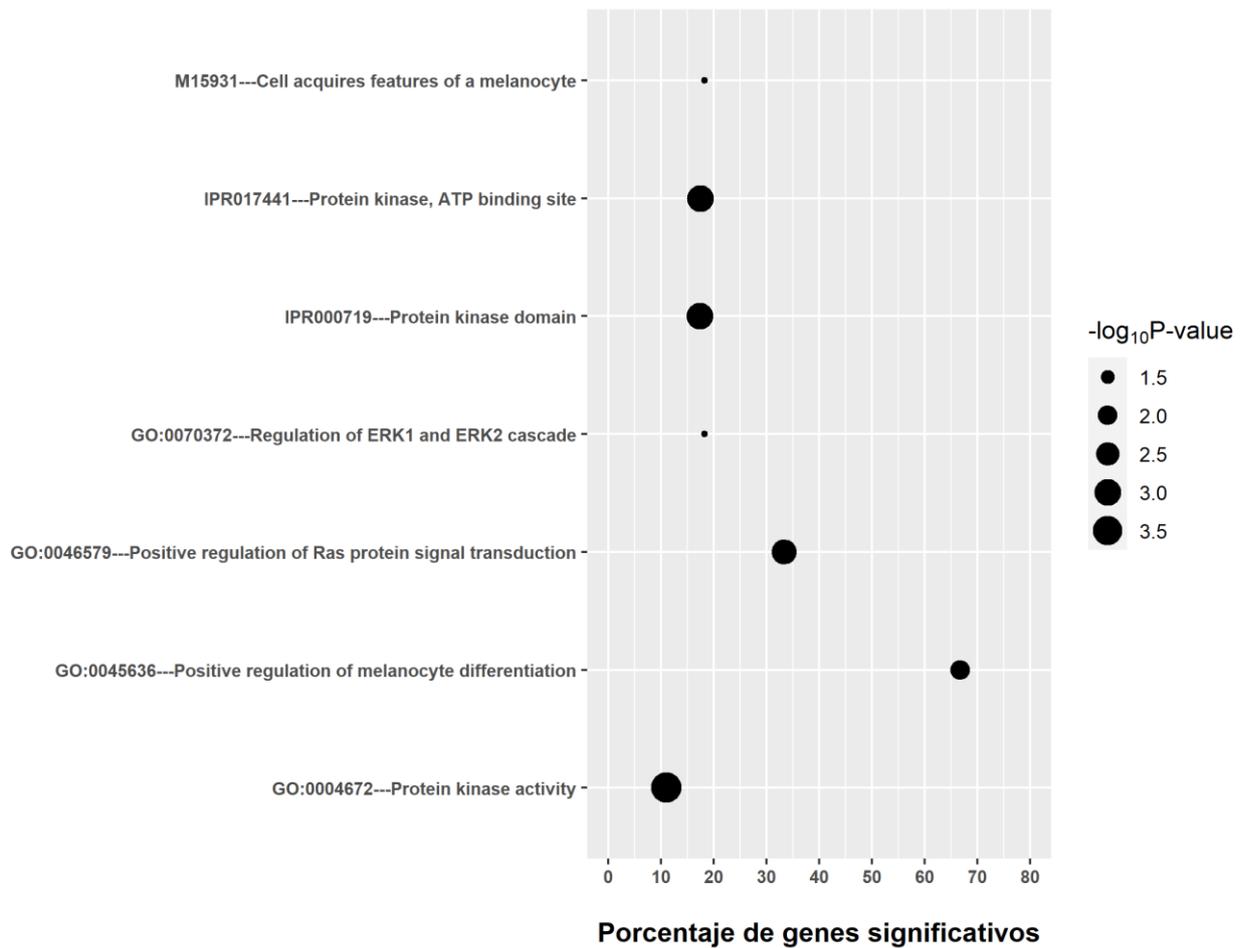


Figura 9. Términos y vías funcionales significativamente enriquecidos con genes asociados con la pigmentación total del párpado. Se analizaron seis bases de datos de anotaciones de genes: GO, Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG), MeSH, Reactome, InterPro y MsigDB. El eje y muestra los nombres de los términos y vías significativos. Los puntos negros representan la importancia del enriquecimiento (valor  $P -\log_{10}$ , prueba exacta de Fisher) y el eje x representa el porcentaje de genes significativos en cada término funcional.

## *Conclusión*

Nuestro estudio proporciona una descripción completa de las bases genéticas y biológicas de la pigmentación de los párpados en el ganado Hereford. Primero, nuestros resultados indican que la pigmentación de los párpados es un rasgo heredable en el ganado, y la magnitud de la estimación de la heredabilidad sugiere un alcance importante para aumentar la pigmentación de los párpados mediante selección genética. Dada la relación entre las patologías oculares y la pigmentación reportada en la literatura, la selección directa para la pigmentación de los párpados podría reducir la incidencia de enfermedades oculares en la población de Hereford, incluido el carcinoma de células escamosas oculares y queratoconjuntivitis infecciosa. Se necesita más investigación para estimar la correlación genética entre la pigmentación de los párpados y las patologías oculares y cuantificar la respuesta genética correlacionada esperada. En segundo lugar, el ssGWAS reveló que la pigmentación de los párpados es un rasgo complejo afectado por múltiples loci, incluidos genes relacionados con la biología de los melanocitos, la melanogénesis, la pigmentación de la piel y el desarrollo de melanoma. En tercer lugar, el análisis de sobrerrepresentación proporcionó más pruebas de que los procesos biológicos, como la diferenciación de los melanocitos, explican parte de la variación observada en la pigmentación de los párpados. En general, este estudio proporciona una mejor comprensión de la genética subyacente a la pigmentación de los párpados en Hereford y podría contribuir al desarrollo de estrategias de reproducción más efectivas para reducir la incidencia de patologías oculares en el ganado mediante selección genómica.

## 6. *Discusión general*

La pigmentación de los párpados en Hereford es un rasgo cada vez más importante dada su implicancia en la incidencia de patologías oculares, tales como el carcinoma ocular de células escamosas (SCC) y la queratoconjuntivitis infecciosa (IBK) (Heeney y Valli 1985; Anderson, 1991; Newton et al., 1996; Snowden et al., 2005; Angelos, 2015). La selección directa contra estas patologías es difícil de implementar dado que estos fenotipos complejos son difíciles de registrar y presentan heredabilidad baja (0.10 para SSC, Russell et al., 1976; 0.00 a 0.26 para IBK, Snowden et al., 2005). Entender la base genética de la pigmentación y sus parámetros genéticos, es crucial para realizar programas de mejora genética con el fin de aumentar la pigmentación de la zona ocular para así disminuir la incidencia de lesiones y enfermedades oculares. Esto traería aparejado un importante beneficio económico y de bienestar animal. La pigmentación de los párpados es una característica que es fácil de registrar, por lo que una estrategia posible sería seleccionar animales con los párpados pigmentados para seleccionar en forma indirecta a los animales con una menor probabilidad de incidencia de lesiones oculares y enfermedades oculares.

En este trabajo la pigmentación de los párpados de bovino Hereford fue abordada desde tres enfoques complementarios: en el primer estudio se analizó la expresión génica de muestras de párpados 100% vs. 0% pigmentados con el fin de identificar genes con expresión diferencial que expliquen el fenotipo observado. En el segundo estudio se identificó, caracterizó y analizó los lncRNAs asociados a genes diana que están involucrado en la pigmentación de los párpados. Por último, en el tercer estudio se estimaron los parámetros genéticos de esta característica y se realizó un análisis de ssGWAS con el fin de identificar regiones, genes y vías metabólicas asociados a la pigmentación de los párpados.

En el Publicación I se estudió mediante RNA-seq la expresión génica en párpados 100% vs. 0% pigmentados con el fin de identificar genes con expresión diferencial y, por lo tanto, que puedan tener algún vínculo con esta característica. Se detectaron 151 genes con expresión diferencial entre muestras pigmentadas y no pigmentadas. Entre los genes sobre-expresados en muestras pigmentadas se encuentran, como era esperable, los genes clave para la generación, almacenamiento y distribución de melanina: *MC1R*, *TYR*, *TYRP1*, *KIT*, *DCT*, *PMEL*, *MLANA* y *SLC24A5*. Sin embargo, además se detectaron genes sub-expresados en las muestras pigmentadas relacionados con procesos tumorales y el sistema inmunitario, lo cual resulta novedoso y apoya la relación entre la pigmentación ocular y la incidencia de patologías oculares.

En concordancia con estos hallazgos, en el análisis de enriquecimiento de conjuntos de genes, los términos GO más significativos fueron *melanosoma*, *pigmentación*, *respuesta de defensa a bacterias*, *organización del melanosoma*, *proceso de biosíntesis de melanina* y *pigmentación*, *diferenciación de melanocitos* y *región extracelular*. Los términos GO más relevantes, *pigmentación* (32 genes), *melanosoma* (59 genes) y *respuesta de defensa a bacteria* (72 genes) se analizaron mediante análisis de redes de co-expresión génica. Las redes de genes de las muestras pigmentadas presentaron más conexiones que las de las muestras no pigmentadas, mostrando, por lo tanto, una mayor conectividad y mayores valores de coeficiente de grupo. Esto significa que los genes de las muestras pigmentadas muestran una mayor expresión, co-expresión y un mecanismo de

co-regulación más estricto. Teniendo en cuenta el vínculo entre la respuesta a bacterias, la pigmentación e IBK, se podría inferir que la regulación y co-expresión génica en muestras pigmentadas podría estar relacionada con una mejor respuesta frente a patógenos, y así explicar por qué los animales Hereford con párpados pigmentados tienen una menor incidencia de queratoconjuntivitis en comparación con animales con párpados no pigmentados. Estos indicios ameritan investigaciones más profundas, que eventualmente podrían tener implicancias en el manejo sanitario de los rodeos bovinos.

A partir de los resultados del Publicación II se comprobó la hipótesis de que existen lncRNAs con expresión diferencial entre las muestras en estudio. Se han reportado lncRNAs asociados a la pigmentación de la piel en bovinos, lo que respalda la idea de que los lncRNAs participan en un papel importante en la pigmentación de la piel (Weikard et al., 2013; Koufariotis et al., 2015). En general, los resultados mostraron que los lncRNAs se caracterizan por un menor número de exones, menor contenido de GC, menor nivel de expresión y mayor energía libre mínima normalizada y tienden a ser más cortos que las secuencias codificantes de proteínas (Derrien et al., 2012; Harrow et al., 2012; Billerey et al., 2014). Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraron que los lncRNAs tienen algunas características de secuencias únicas en comparación con los genes que codifican proteínas (Niazi y Valadkhan, 2012). Estos análisis y la caracterización de las secuencias respaldan la confiabilidad de los nuevos lncRNA putativos identificados.

Del total de lncRNAs detectados, identificamos un total de 27 expresados diferencialmente entre muestras pigmentadas y no pigmentadas. Ocho mostraron sobre-expresión y 19 sub-expresión en las muestras de párpados pigmentados. Estos lncRNAs se asociaron con genes diana a nivel *cis* y *trans* sugiriendo que podrían estar implicados de alguna forma en la regulación génica de estos genes, por ejemplo, promoviendo la expresión a través del reclutamiento de proteínas que generan bucles de transcripción (Long et al., 2017; Li et al., 2019; Gil y Ulitsky, 2020). Recientemente se ha discutido la participación de los lncRNAs en la estabilización del ARNm y en el aumento de la expresión de genes específicos (Li et al., 2019). A partir de nuestros resultados, podemos inferir que los lncRNAs, podrían estar involucrados tanto en la reducción como en el aumento de la estabilidad del ARNm codificado por los genes diana y, en consecuencia, reduciendo o potenciando la expresión.

De los genes diana para los lncRNAs que actúan en *trans*, algunos están implicados en la melanogénesis, en el desarrollo de melanosomas (Lin y Fisher, 2007; Kubic et al., 2008; Schmutz y Dreger, 2013) y en procesos de pigmentación (Lalueza-Fox et al., 2007; Enriqu Steinberg et al., 2013), como *MC1R*, *PMEL* y *MLANA*. Otros están implicados en vías tumorales (Hoashi et al., 2005), en la inmunidad innata y en la señalización inflamatoria (Ito et al., 2015), como *PAX3*, *IGFBP2*, *FGF23* y *TREM-2*. Sumado a esto, los términos funcionales más significativos están relacionados con la pigmentación de la piel, la respuesta inflamatoria y las vías infecciosas y tumorales. Todo esto refuerza los hallazgos del Publicación I en cuanto a la relación entre pigmentación ocular y patologías oculares, y demuestra que la pigmentación es un rasgo complejo en la cual están involucrados varios factores genéticos y con implicancias en la salud animal.

La estimación de parámetros genéticos es necesaria para poder diseñar una estrategia de selección. Nuestros resultados indican que la heredabilidad de la pigmentación de los párpados izquierdo y derecho presenta un valor medio de  $h^2_i = 0,26 \pm 0,06$ ,  $h^2_d = 0,31 \pm 0,06$ , respectivamente. La correlación genética entre la pigmentación del párpado izquierdo y derecho presenta una correlación genética alta ( $r^G_{id} = 0,94 \pm 0,06$ ). La pigmentación total del párpado es moderadamente heredable con una estimación de heredabilidad igual a  $0,41 \pm 0,12$ , más baja que estudios previos en ganado Hereford (0,55, Vogt et al., 1963), pero es muy similar al valor informado por Reimann et al. (2018). Nuestros resultados sugieren que la pigmentación de los párpados es más heredable que SCC o IBK, lo que refuerza el valor de la pigmentación de los párpados como criterio de selección para reducir la incidencia de enfermedades oculares en los rodeos Hereford de nuestro país.

Con respecto a los genes putativos ubicados en las regiones genómicas asociadas a la pigmentación de los párpados (valor mayor a 0,5% de varianza genética), se identificaron varios genes con funciones conocidas en la melanogénesis y en la pigmentación de la piel, como *PLD1*, *KITLG*, *ADCY8* y *PRKCA*. En particular, algunos de estos genes candidatos, como *ADCY8* y *KITLG*, participan en múltiples vías de señalización que activan la melanogénesis, incluidas las vías cAMP-PKA-CREB y RAS/MAPK (Dessinioti et al., 2011; D'Mello et al., 2016). Por otro lado, el análisis ssGWAS identificó varios genes candidatos que están directamente implicados en el desarrollo de melanomas, incluido *otoconina 90*, *GSDMC*, *NUP93*, *NLRC5*, *SETD6*, *CX3CL1*, *TMX3*, *CEP350* e *IGFBP7* (Pearlman et al., 2019; Watabe et al., 2001; Maeda et al., 2005; Mann et al., 2015; Chelbi y Guarda, 2016; Rodriguez et al., 2016), reforzando una vez más la relación entre la pigmentación de los párpados y patologías oculares. Los términos de Gene Ontology más relevantes estuvieron involucrados en al menos tres procesos, a saber, la regulación positiva de la diferenciación de melanocitos, la regulación positiva de la transducción de señales de la proteína Ras (GO: 0046579) (D Mello et al., 2016). y la regulación de la cascada ERK1 y ERK2 (GO: 0070372) (Herraiz et al., 2011).

Los resultados de los tres estudios de esta tesis van en una misma dirección, en la cual se puede inferir que la pigmentación de los párpados es una característica genéticamente compleja que involucra genes asociados no sólo a la pigmentación sino también vinculados a procesos tumorales y al sistema inmune. Nuestros hallazgos proporcionan evidencia de que genes implicados en el desarrollo del cáncer de piel explican al menos parte de las diferencias observadas en la pigmentación de los párpados en bovinos Hereford. Genes candidatos involucrados en la melanogénesis, en el sistema inmune y en el desarrollo del cáncer son objetivos prometedores para futuras investigaciones destinadas a identificar mutaciones funcionales que afectan la pigmentación de los párpados y sus potenciales implicancias en la salud ocular en el ganado. Este punto es importante de destacar, dado que el registro de la pigmentación de los párpados es relativamente sencillo de hacer, pero la base genética que existe detrás es compleja. Esta complejidad en el contexto genético puede ser uno de los factores que explique la menor incidencia de patologías oculares en los bovinos con párpados pigmentados. Una posible respuesta de los animales con

párpados despigmentados ante los rayos UV y otros factores ambientales es la expresión de genes vinculados a la respuesta inmune.

Por otro lado, la magnitud de la heredabilidad indica que sería posible aumentar el contenido de pigmentos en los párpados del ganado Hereford por selección genética, y así contribuir a reducir la predisposición a patologías oculares. Sin embargo, la magnitud de la respuesta correlacionada depende de la correlación genética entre la pigmentación del párpado y las patologías oculares, lo que requiere más investigaciones.

## *7. Conclusiones generales*

La pigmentación de los párpados es una característica genéticamente compleja, en la cual intervienen tanto genes que codifican proteínas como genes de ARN no codificantes, reguladores de la expresión génica. Los genes diferencialmente expresados (Publicación I), los genes diana de los lncRNAs (Publicación II) y los genes asociados a regiones con alta varianza genética (Publicación III), están involucrados en la melanogénesis, en el desarrollo de procesos tumorales y en la respuesta inmunitaria. Estos resultados refuerzan la relación entre la pigmentación de los párpados y la incidencia de patologías oculares. Nuestros resultados indican que la pigmentación de los párpados es un rasgo hereditario en el ganado bovino. La magnitud de la estimación de la heredabilidad sugiere un alcance importante para aumentar la pigmentación de los párpados mediante selección fenotípica. Por lo tanto, una forma de atender la problemática de las enfermedades oculares en Hereford sería hacer uso de selección directa para la pigmentación de los párpados, pudiendo reducir la incidencia de enfermedades oculares, incluido el carcinoma ocular de células escamosas y la queratoconjuntivitis infecciosa. Se necesita más investigación para estimar la correlación genética entre la pigmentación de los párpados y las patologías oculares y cuantificar la respuesta genética correlacionada.

En general, este estudio proporciona una mejor comprensión de la genética subyacente a la pigmentación de los párpados en Hereford y podría contribuir al desarrollo de estrategias de selección más efectivas para reducir la incidencia de patologías oculares en el ganado.

## 8. Referencias bibliográficas

- Aguilar I, Misztal I, Johnson DL, Legarra A, Tsuruta S, Lawlor TJ. Hot topic: a unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J Dairy Sci.* 2010 Feb;93(2):743-52. doi: 10.3168/jds.2009-2730. PMID: 20105546.
- Aguilar, I., I. Misztal, S. Tsuruta, A. Legarra, and H. Wang. 2014. PREGSF90–POSTGSF90: computational tools for the implementation of single-step genomic selection and genome-wide association with ungenotyped individuals in BLUPF90 programs. In: Proceedings of the 10th world congress of genetics applied to livestock production. doi:10.13140/2.1.4801.5045
- Aguilar I, Legarra A, Cardoso F, Masuda Y, Lourenco D, Misztal I. Frequentist p-values for large-scale-single step genome-wide association, with an application to birth weight in American Angus cattle. *Genet Sel Evol.* 2019 Jun 20;51(1):28. doi: 10.1186/s12711-019-0469-3. PMID: 31221101; PMCID: PMC6584984.
- Ainger SA, Jagirdar K, Lee KJ, Soyer HP, Sturm RA. Skin Pigmentation Genetics for the Clinic. *Dermatology.* 2017;233(1):1-15. doi: 10.1159/000468538. Epub 2017 May 3. PMID: 28463841.
- Alexandre PA, Reverter A, Berezin RB, Porto-Neto LR, Ribeiro G, Santana MHA, Ferraz JBS, Fukumasu H. Exploring the Regulatory Potential of Long Non-Coding RNA in Feed Efficiency of Indicine Cattle. *Genes (Basel).* 2020 Aug 25;11(9):997. doi: 10.3390/genes11090997. PMID: 32854445; PMCID: PMC7565090.
- Altshuler D, Daly MJ, Lander ES. Genetic mapping in human disease. *Science.* 2008 Nov 7;322(5903):881-8. doi: 10.1126/science.1156409. PMID: 18988837; PMCID: PMC2694957.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990 Oct 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- Anderson DE. Genetic study of eye cancer in cattle. *J Hered.* 1991 Jan-Feb;82(1):21-6. doi: 10.1093/jhered/82.1.21. PMID: 1997589.
- Andrews S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data.
- Angelos JA. Infectious bovine keratoconjunctivitis (pinkeye). *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2015 Mar;31(1):61-79, v-vi. doi: 10.1016/j.cvfa.2014.11.006. Epub 2015 Jan 6. PMID: 25576389.
- Antonov IV, Mazurov E, Borodovsky M, Medvedeva YA. Prediction of lncRNAs and their interactions with nucleic acids: benchmarking bioinformatics tools. *Brief Bioinform.* 2019 Mar 22;20(2):551-564. doi: 10.1093/bib/bby032. PMID: 29697742.
- Amyere M, Vogt T, Hoo J, Brandrup F, Bygum A, Boon L, Vikkula M. KITLG mutations cause familial progressive hyper- and hypopigmentation. *J Invest Dermatol.* 2011 Jun;131(6):1234-9. doi: 10.1038/jid.2011.29. Epub 2011 Mar 3. PMID: 21368769.

- Bakhtiarizadeh MR, Hosseinpour B, Arefnezhad B, Shamabadi N, Salami SA. In silico prediction of long intergenic non-coding RNAs in sheep. *Genome*. 2016 Apr;59(4):263-75. doi: 10.1139/gen-2015-0141. Epub 2016 Feb 19. PMID: 27002388.
- Beaumont KA, Shekar SN, Newton RA, James MR, Stow JL, Duffy DL, Sturm RA. Receptor function, dominant negative activity and phenotype correlations for MC1R variant alleles. *Hum Mol Genet*. 2007 Sep 15;16(18):2249-60. doi: 10.1093/hmg/ddm177. Epub 2007 Jul 5. Erratum in: *Hum Mol Genet*. 2007 Dec 1;16(23):2988. Shekar, Sri L [corrected to Shekar, Sri N]. PMID: 17616515.
- Benjamini, Y., and Hochberg, Y. (1995). Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal statistical society: series B (Methodological)* 57(1), 289-300.
- Billerey C, Boussaha M, Esquerré D, Rebours E, Djari A, Meersseman C, Klopp C, Gautheret D, Rocha D. Identification of large intergenic non-coding RNAs in bovine muscle using next-generation transcriptomic sequencing. *BMC Genomics*. 2014 Jun 19;15(1):499. doi: 10.1186/1471-2164-15-499. PMID: 24948191; PMCID: PMC4073507.
- Boon RA, Jaé N, Holdt L, Dimmeler S. Long Noncoding RNAs: From Clinical Genetics to Therapeutic Targets? *J Am Coll Cardiol*. 2016 Mar 15;67(10):1214-1226. doi: 10.1016/j.jacc.2015.12.051. PMID: 26965544.
- Brenner M, Hearing VJ. Modifying skin pigmentation - approaches through intrinsic biochemistry and exogenous agents. *Drug Discov Today Dis Mech*. 2008;5(2):e189-e199. doi: 10.1016/j.ddmec.2008.02.001. PMID: 19578486; PMCID: PMC2678743.
- Burgoyne T, O'Connor MN, Seabra MC, Cutler DF, Futter CE. Regulation of melanosome number, shape and movement in the zebrafish retinal pigment epithelium by OA1 and PMEL. *J Cell Sci*. 2015 Apr 1;128(7):1400-7. doi: 10.1242/jcs.164400. Epub 2015 Feb 17. PMID: 25690007; PMCID: PMC4379728.
- Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev*. 2011 Sep 15;25(18):1915-27. doi: 10.1101/gad.17446611. Epub 2011 Sep 2. PMID: 21890647; PMCID: PMC3185964.
- Camilleri-Robles C, Amador R, Klein CC, Guigó R, Corominas M, Ruiz-Romero M. Genomic and functional conservation of lncRNAs: lessons from flies. *Mamm Genome*. 2022 Jun;33(2):328-342. doi: 10.1007/s00335-021-09939-4. Epub 2022 Jan 31. PMID: 35098341; PMCID: PMC9114055.
- Cao L, Zhang P, Li J, Wu M. *LAST*, a c-Myc-inducible long noncoding RNA, cooperates with CNBP to promote *CCND1* mRNA stability in human cells. *Elife*. 2017 Dec 4;6:e30433. doi: 10.7554/eLife.30433. PMID: 29199958; PMCID: PMC5739540.
- Carninci, P. (2005). FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group). The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 309, 1559-1563.
- Cavani L, Poindexter MB, Nelson CD, Santos JEP, Peñagaricano F. Gene mapping, gene-set analysis, and genomic prediction of postpartum blood calcium in Holstein cows. *J Dairy Sci*.

- 2022 Jan;105(1):525-534. doi: 10.3168/jds.2021-20872. Epub 2021 Oct 28. PMID: 34756434.
- Chakalova, L., Debrand, E., Mitchell, J.A., Osborne, C.S., and Fraser, P. (2005). Replication and transcription: shaping the landscape of the genome. *Nature Reviews Genetics* 6(9), 669-677. doi: 10.1038/nrg1673.
- Chelbi ST, Guarda G. NLRC5, a promising new entry in tumor immunology. *J Immunother Cancer*. 2016 Jul 19;4:39. doi: 10.1186/s40425-016-0143-z. PMID: 27437103; PMCID: PMC4950760.
- Cheli Y, Ohanna M, Ballotti R, Bertolotto C. Fifteen-year quest for microphthalmia-associated transcription factor target genes. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2010 Feb;23(1):27-40. doi: 10.1111/j.1755-148X.2009.00653.x. Epub 2009 Nov 25. PMID: 19995375.
- Cho S, Lowe L, Hamilton TA, Fisher GJ, Voorhees JJ, Kang S. Long-term treatment of photoaged human skin with topical retinoic acid improves epidermal cell atypia and thickens the collagen band in papillary dermis. *J Am Acad Dermatol*. 2005 Nov;53(5):769-74. doi: 10.1016/j.jaad.2005.06.052. PMID: 16243124.
- Cichorek M, Wachulska M, Stasiewicz A, Tymińska A. Skin melanocytes: biology and development. *Postepy Dermatol Alergol*. 2013 Feb;30(1):30-41. doi: 10.5114/pdia.2013.33376. Epub 2013 Feb 20. PMID: 24278043; PMCID: PMC3834696.
- Clark LA, Wahl JM, Rees CA, Murphy KE. Retrotransposon insertion in SILV is responsible for merle patterning of the domestic dog. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006 Jan 31;103(5):1376-81. doi: 10.1073/pnas.0506940103. Epub 2006 Jan 9. PMID: 16407134; PMCID: PMC1360527.
- Clark P, Stark AE, Walsh RJ, Jardine R, Martin NG. A twin study of skin reflectance. *Ann Hum Biol*. 1981 Nov-Dec;8(6):529-41. doi: 10.1080/03014468100005371. PMID: 7199888.
- Clemson CM, McNeil JA, Willard HF, Lawrence JB. XIST RNA paints the inactive X chromosome at interphase: evidence for a novel RNA involved in nuclear/chromosome structure. *J Cell Biol*. 1996 Feb;132(3):259-75. doi: 10.1083/jcb.132.3.259. PMID: 8636206; PMCID: PMC2120729.
- Conesa A, Madrigal P, Tarazona S, Gomez-Cabrero D, Cervera A, McPherson A, Szczesniak MW, Gaffney DJ, Elo LL, Zhang X, Mortazavi A. A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biol*. 2016 Jan 26;17:13. doi: 10.1186/s13059-016-0881-8. Erratum in: *Genome Biol*. 2016;17(1):181. PMID: 26813401; PMCID: PMC4728800.
- Cordero A, Kanojia D, Miska J, Panek WK, Xiao A, Han Y, Bonamici N, Zhou W, Xiao T, Wu M, Ahmed AU, Lesniak MS. FABP7 is a key metabolic regulator in HER2+ breast cancer brain metastasis. *Oncogene*. 2019 Sep;38(37):6445-6460. doi: 10.1038/s41388-019-0893-4. Epub 2019 Jul 19. PMID: 31324889; PMCID: PMC6742563.
- Courbebaisse M, Lanske B. Biology of Fibroblast Growth Factor 23: From Physiology to Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018 May 1;8(5):a031260. doi: 10.1101/cshperspect.a031260. PMID: 28778965; PMCID: PMC5932574.

- D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling Pathways in Melanogenesis. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 15;17(7):1144. doi: 10.3390/ijms17071144. PMID: 27428965; PMCID: PMC4964517.
- De Mazière AM, Muehlethaler K, van Donselaar E, Salvi S, Davoust J, Cerottini JC, Lévy F, Slot JW, Rimoldi D. The melanocytic protein Melan-A/MART-1 has a subcellular localization distinct from typical melanosomal proteins. *Traffic.* 2002 Sep;3(9):678-93. doi: 10.1034/j.1600-0854.2002.30909.x. PMID: 12191019.
- Dempsey JL, Cui JY. Long Non-Coding RNAs: A Novel Paradigm for Toxicology. *Toxicol Sci.* 2017 Jan;155(1):3-21. doi: 10.1093/toxsci/kfw203. Epub 2016 Nov 17. PMID: 27864543; PMCID: PMC5216656.
- Derrien T, Johnson R, Bussotti G, Tanzer A, Djebali S, Tilgner H, Guernec G, Martin D, Merkel A, Knowles DG, Lagarde J, Veeravalli L, Ruan X, Ruan Y, Lassmann T, Carninci P, Brown JB, Lipovich L, Gonzalez JM, Thomas M, Davis CA, Shiekhataar R, Gingeras TR, Hubbard TJ, Notredame C, Harrow J, Guigó R. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012 Sep;22(9):1775-89. doi: 10.1101/gr.132159.111. PMID: 22955988; PMCID: PMC3431493.
- Dessinioti C, Antoniou C, Katsambas A, Stratigos AJ. Melanocortin 1 receptor variants: functional role and pigmentary associations. *Photochem Photobiol.* 2011 Sep-Oct;87(5):978-87. doi: 10.1111/j.1751-1097.2011.00970.x. Epub 2011 Aug 17. PMID: 21749400.
- Durinck S, Spellman PT, Birney E, Huber W. Mapping identifiers for the integration of genomic datasets with the R/Bioconductor package biomaRt. *Nat Protoc.* 2009;4(8):1184-91. doi: 10.1038/nprot.2009.97. Epub 2009 Jul 23. PMID: 19617889; PMCID: PMC3159387.
- Enrique Steinberg, J., Baeza, M., and Corva, P. (2013). Detection of polymorphisms in the PMEL17 gene in beef cattle of Argentina. *Revista Argentina de Producción Animal* 33(1), 31-41.
- Fan Y, Wang P, Fu W, Dong T, Qi C, Liu L, Guo G, Li C, Cui X, Zhang S, Zhang Q, Zhang Y, Sun D. Genome-wide association study for pigmentation traits in Chinese Holstein population. *Anim Genet.* 2014 Oct;45(5):740-4. doi: 10.1111/age.12189. Epub 2014 Jul 3. PMID: 24988941.
- Feng D, Li Q, Yu H, Kong L, Du S. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs in mantle of *Crassostrea gigas* and their association with shell pigmentation. *Sci Rep.* 2018 Jan 23;8(1):1436. doi: 10.1038/s41598-018-19950-6. PMID: 29362405; PMCID: PMC5780484.
- Gao X, Liu T, Cheng X, Dai A, Liu W, Li R, Zhang M. A novel GPR143 mutation in a Chinese family with X-linked ocular albinism type 1. *Mol Med Rep.* 2020 Jan;21(1):240-248. doi: 10.3892/mmr.2019.10813. Epub 2019 Nov 12. PMID: 31746431; PMCID: PMC6896309.
- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer.* 2011 Apr 13;10:38. doi: 10.1186/1476-4598-10-38. PMID: 21489289; PMCID: PMC3098824.

- Gil N, Ulitsky I. Regulation of gene expression by cis-acting long non-coding RNAs. *Nat Rev Genet.* 2020 Feb;21(2):102-117. doi: 10.1038/s41576-019-0184-5. Epub 2019 Nov 15. PMID: 31729473.
- Goddard ME, Kemper KE, MacLeod IM, Chamberlain AJ, Hayes BJ. Genetics of complex traits: prediction of phenotype, identification of causal polymorphisms and genetic architecture. *Proc Biol Sci.* 2016 Jul 27;283(1835):20160569. doi: 10.1098/rspb.2016.0569. PMID: 27440663; PMCID: PMC4971198.
- Gupta P, Peter S, Jung M, Lewin A, Hemmrich-Stanisak G, Franke A, von Kleist M, Schütte C, Einspanier R, Sharbati S, Bruegge JZ. Analysis of long non-coding RNA and mRNA expression in bovine macrophages brings up novel aspects of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis infections. *Sci Rep.* 2019 Feb 7;9(1):1571. doi: 10.1038/s41598-018-38141-x. PMID: 30733564; PMCID: PMC6367368.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature.* 2010 Apr 15;464(7291):1071-6. doi: 10.1038/nature08975. PMID: 20393566; PMCID: PMC3049919.
- Haider S, Cho D, Amelard R, Wong A, Clausi DA. Enhanced classification of malignant melanoma lesions via the integration of physiological features from dermatological photographs. *Annu Int Conf IEEE Eng Med Biol Soc.* 2014;2014:6455-8. doi: 10.1109/EMBC.2014.6945106. PMID: 25571474.
- Han Y, Peñagaricano F. Unravelling the genomic architecture of bull fertility in Holstein cattle. *BMC Genet.* 2016 Nov 14;17(1):143. doi: 10.1186/s12863-016-0454-6. PMID: 27842509; PMCID: PMC5109745.
- Han S, Liang Y, Li Y, Du W. Long Noncoding RNA Identification: Comparing Machine Learning Based Tools for Long Noncoding Transcripts Discrimination. *Biomed Res Int.* 2016;2016:8496165. doi: 10.1155/2016/8496165. Epub 2016 Nov 29. PMID: 28042575; PMCID: PMC5153550.
- Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J.M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., et al. (2012). GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res* 22(9), 1760-1774. doi: 10.1101/gr.135350.111.
- Heeney JL, Valli VE. Bovine ocular squamous cell carcinoma: an epidemiological perspective. *Can J Comp Med.* 1985 Jan;49(1):21-6. PMID: 3986677; PMCID: PMC1236111.
- Herraiz C, Journé F, Abdel-Malek Z, Ghanem G, Jiménez-Cervantes C, García-Borrón JC. Signaling from the human melanocortin 1 receptor to ERK1 and ERK2 mitogen-activated protein kinases involves transactivation of cKIT. *Mol Endocrinol.* 2011 Jan;25(1):138-56. doi: 10.1210/me.2010-0217. Epub 2010 Nov 17. PMID: 21084381; PMCID: PMC3089036.
- Hoashi T, Watabe H, Muller J, Yamaguchi Y, Vieira WD, Hearing VJ. MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of

- melanosomes. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):14006-16. doi: 10.1074/jbc.M413692200. Epub 2005 Jan 28. PMID: 15695812.
- Huang W, Long N, Khatib H. Genome-wide identification and initial characterization of bovine long non-coding RNAs from EST data. *Anim Genet*. 2012 Dec;43(6):674-82. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02325.x. Epub 2012 Feb 8. PMID: 22497321.
- Irby, N. L., and J. A. Angelos. 2018. Ocular diseases, *Rebhun's Diseases of Dairy Cattle: Third Edition*. Elsevier. p. 668-712.
- Ito N, Wijenayaka AR, Prideaux M, Kogawa M, Ormsby RT, Evdokiou A, Bonewald LF, Findlay DM, Atkins GJ. Regulation of FGF23 expression in IDG-SW3 osteocytes and human bone by pro-inflammatory stimuli. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Jan 5;399:208-18. doi: 10.1016/j.mce.2014.10.007. Epub 2014 Oct 16. PMID: 25458698.
- Jablonski NG, Chaplin G. The evolution of human skin coloration. *J Hum Evol*. 2000 Jul;39(1):57-106. doi: 10.1006/jhev.2000.0403. PMID: 10896812.
- Jara E, Peñagaricano F, Menezes C, Tardiz L, Rodons G, Iriarte A, Armstrong E. Transcriptomic analysis of eyelid pigmentation in Hereford cattle. *Anim Genet*. 2020 Dec;51(6):935-939. doi: 10.1111/age.13004. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33058316.
- Jung K, Sabri S, Hanson J, Xu Y, Wang YW, Lai R, Abdulkarim BS. Elevated ARG1 expression in primary monocytes-derived macrophages as a predictor of radiation-induced acute skin toxicities in early breast cancer patients. *Cancer Biol Ther*. 2015;16(9):1281-8. doi: 10.1080/15384047.2015.1056945. PMID: 26061397; PMCID: PMC4622861.
- Kadakkuzha BM, Liu XA, McCrate J, Shankar G, Rizzo V, Afinogenova A, Young B, Fallahi M, Carvalloza AC, Raveendra B, Puthanveetil SV. Transcriptome analyses of adult mouse brain reveal enrichment of lncRNAs in specific brain regions and neuronal populations. *Front Cell Neurosci*. 2015 Mar 6;9:63. doi: 10.3389/fncel.2015.00063. PMID: 25798087; PMCID: PMC4351618.
- Kang YJ, Yang DC, Kong L, Hou M, Meng YQ, Wei L, Gao G. CPC2: a fast and accurate coding potential calculator based on sequence intrinsic features. *Nucleic Acids Res*. 2017 Jul 3;45(W1):W12-W16. doi: 10.1093/nar/gkx428. PMID: 28521017; PMCID: PMC5793834.
- Kavak E, Unlü M, Nistér M, Koman A. Meta-analysis of cancer gene expression signatures reveals new cancer genes, SAGE tags and tumor associated regions of co-regulation. *Nucleic Acids Res*. 2010 Nov;38(20):7008-21. doi: 10.1093/nar/gkq574. Epub 2010 Jul 9. PMID: 20621981; PMCID: PMC2978353.
- Kerje S, Sharma P, Gunnarsson U, Kim H, Bagchi S, Fredriksson R, Schütz K, Jensen P, von Heijne G, Okimoto R, Andersson L. The Dominant white, Dun and Smoky color variants in chicken are associated with insertion/deletion polymorphisms in the PMEL17 gene. *Genetics*. 2004 Nov;168(3):1507-18. doi: 10.1534/genetics.104.027995. PMID: 15579702; PMCID: PMC1448810.
- Kern C, Wang Y, Chitwood J, Korf I, Delany M, Cheng H, Medrano JF, Van Eenennaam AL, Ernst C, Ross P, Zhou H. Genome-wide identification of tissue-specific long non-coding RNA in three farm animal species. *BMC Genomics*. 2018 Sep 18;19(1):684. doi: 10.1186/s12864-018-5037-7. PMID: 30227846; PMCID: PMC6145346.

- Kim H, Kim H, Feng Y, Li Y, Tamiya H, Tocci S, Ronai ZA. PRMT5 control of cGAS/STING and NLRC5 pathways defines melanoma response to antitumor immunity. *Sci Transl Med.* 2020 Jul 8;12(551):eaaz5683. doi: 10.1126/scitranslmed.aaz5683. PMID: 32641491; PMCID: PMC7508354.
- Kim D, Langmead B, Salzberg SL. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements. *Nat Methods.* 2015 Apr;12(4):357-60. doi: 10.1038/nmeth.3317. Epub 2015 Mar 9. PMID: 25751142; PMCID: PMC4655817.
- Kornienko AE, Guenzl PM, Barlow DP, Pauler FM. Gene regulation by the act of long non-coding RNA transcription. *BMC Biol.* 2013 May 30;11:59. doi: 10.1186/1741-7007-11-59. PMID: 23721193; PMCID: PMC3668284.
- Kosinska-Selbi B, Mielczarek M, Szyda J. Review: Long non-coding RNA in livestock. *Animal.* 2020 Oct;14(10):2003-2013. doi: 10.1017/S1751731120000841. Epub 2020 May 8. PMID: 32381139.
- Koufariotis LT, Chen YP, Chamberlain A, Vander Jagt C, Hayes BJ. A catalogue of novel bovine long noncoding RNA across 18 tissues. *PLoS One.* 2015 Oct 23;10(10):e0141225. doi: 10.1371/journal.pone.0141225. PMID: 26496443; PMCID: PMC4619662.
- Kubic JD, Young KP, Plummer RS, Ludvik AE, Lang D. Pigmentation PAX-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Dec;21(6):627-45. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00514.x. PMID: 18983540; PMCID: PMC2979299.
- Kwon BS, Halaban R, Ponnazhagan S, Kim K, Chintamaneni C, Bennett D, Pickard RT. Mouse silver mutation is caused by a single base insertion in the putative cytoplasmic domain of Pmel 17. *Nucleic Acids Res.* 1995 Jan 11;23(1):154-8. doi: 10.1093/nar/23.1.154. PMID: 7870580; PMCID: PMC306643.
- Lalueza-Fox C, Römpler H, Caramelli D, Stäubert C, Catalano G, Hughes D, Rohland N, Pilli E, Longo L, Condemi S, de la Rasilla M, Fortea J, Rosas A, Stoneking M, Schöneberg T, Bertranpetit J, Hofreiter M. A melanocortin 1 receptor allele suggests varying pigmentation among Neanderthals. *Science.* 2007 Nov 30;318(5855):1453-5. doi: 10.1126/science.1147417. Epub 2007 Oct 25. PMID: 17962522.
- Langfelder P, Luo R, Oldham MC, Horvath S. Is my network module preserved and reproducible? *PLoS Comput Biol.* 2011 Jan 20;7(1):e1001057. doi: 10.1371/journal.pcbi.1001057. PMID: 21283776; PMCID: PMC3024255.
- St Laurent G, Vyatkin Y, Kapranov P. Dark matter RNA illuminates the puzzle of genome-wide association studies. *BMC Med.* 2014 Jun 12;12:97. doi: 10.1186/1741-7015-12-97. PMID: 24924000; PMCID: PMC4054906.
- Le Pape E, Wakamatsu K, Ito S, Wolber R, Hearing VJ. Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2008 Aug;21(4):477-86. doi: 10.1111/j.1755-148X.2008.00479.x. Epub 2008 Jun 27. PMID: 18627531; PMCID: PMC2562678.
- Lee, H.J., Chen, Z., Collard, M., Chen, J.G., Wu, M., Alani, R.M., Cheng, J. FADS2-mediated fatty acid desaturation and cholesterol esterification are signatures of metabolic reprogramming

- during melanoma progression. *bioRxiv* 2020.07.12.198903; doi: <https://doi.org/10.1101/2020.07.12.198903>.
- Li A, Zhang J, Zhou Z. PLEK: a tool for predicting long non-coding RNAs and messenger RNAs based on an improved k-mer scheme. *BMC Bioinformatics*. 2014 Sep 19;15(1):311. doi: 10.1186/1471-2105-15-311. PMID: 25239089; PMCID: PMC4177586.
- Li A, Zhang J, Zhou Z, Wang L, Liu Y, Liu Y. ALDB: a domestic-animal long noncoding RNA database. *PLoS One*. 2015a Apr 8;10(4):e0124003. doi: 10.1371/journal.pone.0124003. PMID: 25853886; PMCID: PMC4390226.
- Li J, Ma W, Zeng P, Wang J, Geng B, Yang J, Cui Q. LncTar: a tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Brief Bioinform*. 2015b Sep;16(5):806-12. doi: 10.1093/bib/bbu048. Epub 2014 Dec 17. PMID: 25524864.
- Li Z, Zhao W, Wang M, Zhou X: The Role of Long Noncoding RNAs in Gene Expression Regulation. In *Gene Expression Profiling in Cancer*. IntechOpen;2019.
- Lin JY, Fisher DE. Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature*. 2007 Feb 22;445(7130):843-50. doi: 10.1038/nature05660. PMID: 17314970.
- Ling Y, Xu L, Zhu L, Sui M, Zheng Q, Li W, Liu Y, Fang F, Zhang X. Identification and analysis of differentially expressed long non-coding RNAs between multiparous and uniparous goat (*Capra hircus*) ovaries. *PLoS One*. 2017 Sep 21;12(9):e0183163. doi: 10.1371/journal.pone.0183163. PMID: 28934224; PMCID: PMC5608193.
- Liao Y, Smyth GK, Shi W. featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*. 2014 Apr 1;30(7):923-30. doi: 10.1093/bioinformatics/btt656. Epub 2013 Nov 13. PMID: 24227677.
- Long Y, Wang X, Youmans DT, Cech TR. How do lncRNAs regulate transcription? *Sci Adv*. 2017 Sep 27;3(9):eaao2110. doi: 10.1126/sciadv.aao2110. PMID: 28959731; PMCID: PMC5617379.
- López S, Smith-Zubiaga I, García de Galdeano A, Boyano MD, García O, Gardeazábal J, Martínez-Cadenas C, Izagirre N, de la Rúa C, Alonso S. Comparison of the Transcriptional Profiles of Melanocytes from Dark and Light Skinned Individuals under Basal Conditions and Following Ultraviolet-B Irradiation. *PLoS One*. 2015 Aug 5;10(8):e0134911. doi: 10.1371/journal.pone.0134911. PMID: 26244334; PMCID: PMC4526690.
- Lorenz R, Bernhart SH, Höner Zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF, Hofacker IL. ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms Mol Biol*. 2011 Nov 24;6:26. doi: 10.1186/1748-7188-6-26. PMID: 22115189; PMCID: PMC3319429.
- M. I. Love, W. Huber, S. Anders: Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-Seq data with DESeq2. *bioRxiv* 2014. doi:10.1101/002832.
- Ma L, Bajic VB, Zhang Z. On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol*. 2013 Jun;10(6):925-33. doi: 10.4161/rna.24604. Epub 2013 Apr 15. PMID: 23696037; PMCID: PMC4111732.
- Maeda K, Hamada J, Takahashi Y, Tada M, Yamamoto Y, Sugihara T, Moriuchi T. Altered expressions of HOX genes in human cutaneous malignant melanoma. *Int J Cancer*. 2005 Apr 10;114(3):436-41. doi: 10.1002/ijc.20706. PMID: 15551325.

- Mann MB, Black MA, Jones DJ, Ward JM, Yew CC, Newberg JY, Dupuy AJ, Rust AG, Bosenberg MW, McMahon M, Print CG, Copeland NG, Jenkins NA. Transposon mutagenesis identifies genetic drivers of Braf(V600E) melanoma. *Nat Genet.* 2015 May;47(5):486-95. doi: 10.1038/ng.3275. Epub 2015 Apr 13. PMID: 25848750; PMCID: PMC4844184.
- Mészáros G, Petautschnig E, Schwarzenbacher H, Sölkner J. Genomic regions influencing coat color saturation and facial markings in Fleckvieh cattle. *Anim Genet.* 2015 Feb;46(1):65-8. doi: 10.1111/age.12249. Epub 2014 Dec 16. PMID: 25515556.
- Misztal, I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D. Lee. 2002. Proceedings from the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production.
- McKay BS. Pigmentation and vision: Is GPR143 in control? *J Neurosci Res.* 2019 Jan;97(1):77-87. doi: 10.1002/jnr.24246. Epub 2018 May 14. PMID: 29761529; PMCID: PMC6235735.
- Müller G, Höpken UE, Stein H, Lipp M. Systemic immunoregulatory and pathogenic functions of homeostatic chemokine receptors. *J Leukoc Biol.* 2002 Jul;72(1):1-8. PMID: 12101256.
- Mukherjee N, Cardenas E, Bedolla R, Ghosh R. SETD6 regulates NF- $\kappa$ B signaling in urothelial cell survival: Implications for bladder cancer. *Oncotarget.* 2017 Feb 28;8(9):15114-15125. doi: 10.18632/oncotarget.14750. PMID: 28122346; PMCID: PMC5362471.
- Nguyen AH, Koenck C, Quirk SK, Lim VM, Mitkov MV, Trowbridge RM, Hunter WJ 3rd, Agrawal DK. Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells in Cutaneous Melanoma. *Clin Transl Sci.* 2015 Oct;8(5):441-4. doi: 10.1111/cts.12308. Epub 2015 Jul 16. PMID: 26184544; PMCID: PMC4626319.
- Nguyen AH, Lim VM, Fleegel JP, Hunter WJ, Agrawal DK. Cutaneous expression of TREM, vitamin D receptor and HMGB1 in vitamin D deficiency. *Int J Clin Exp Pathol.* 2016 Aug;9(8):8506-8512. Epub 2016 Aug 15. PMID: 32699567; PMCID: PMC7375687.
- Niazi F, Valadkhan S. Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and parallels with 3' UTRs. *RNA.* 2012 Apr;18(4):825-43. doi: 10.1261/rna.029520.111. Epub 2012 Feb 23. PMID: 22361292; PMCID: PMC3312569.
- Pang KC, Frith MC, Mattick JS. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet.* 2006 Jan;22(1):1-5. doi: 10.1016/j.tig.2005.10.003. Epub 2005 Nov 10. PMID: 16290135.
- Pausch H, Wang X, Jung S, Krogmeier D, Edel C, Emmerling R, Götz KU, Fries R. Identification of QTL for UV-protective eye area pigmentation in cattle by progeny phenotyping and genome-wide association analysis. *PLoS One.* 2012;7(5):e36346. doi: 10.1371/journal.pone.0036346. Epub 2012 May 2. PMID: 22567150; PMCID: PMC3342244.
- Pearlman A, Rahman MT, Upadhyay K, Loke J, Ostrer H. Ectopic Otoconin 90 expression in triple negative breast cancer cell lines is associated with metastasis functions. *PLoS One.* 2019 Feb 14;14(2):e0211737. doi: 10.1371/journal.pone.0211737. PMID: 30763339; PMCID: PMC6375562.

- Peñagaricano F, Weigel KA, Rosa GJ, Khatib H. Inferring quantitative trait pathways associated with bull fertility from a genome-wide association study. *Front Genet.* 2013 Jan 11;3:307. doi: 10.3389/fgene.2012.00307. PMID: 23335935; PMCID: PMC3542705.
- Pickard A, McCance DJ. IGF-Binding Protein 2 - Oncogene or Tumor Suppressor? *Front Endocrinol (Lausanne).* 2015 Feb 27;6:25. doi: 10.3389/fendo.2015.00025. PMID: 25774149; PMCID: PMC4343188.
- Qureshi IA, Mattick JS, Mehler MF. Long non-coding RNAs in nervous system function and disease. *Brain Res.* 2010 Jun 18;1338:20-35. doi: 10.1016/j.brainres.2010.03.110. Epub 2010 Apr 7. PMID: 20380817; PMCID: PMC2883659.
- Rao C, Foernzler D, Loftus SK, Liu S, McPherson JD, Jungers KA, Apte SS, Pavan WJ, Beier DR. A defect in a novel ADAMTS family member is the cause of the belted white-spotting mutation. *Development.* 2003 Oct;130(19):4665-72. doi: 10.1242/dev.00668. PMID: 12925592.
- Rees JL. The genetics of sun sensitivity in humans. *Am J Hum Genet.* 2004 Nov;75(5):739-51. doi: 10.1086/425285. Epub 2004 Sep 15. PMID: 15372380; PMCID: PMC1182105.
- Reimann, F.A., A.A. Boligon, G. S. Campos, L. L. Cardoso, V. S. Junqueira, and F. F. Cardoso. Genetic parameters and accuracy of traditional and genomic breeding values for eye pigmentation, hair coat and breed standard in Hereford and Braford cattle. *Livest. Sci.* 2018. 213. doi: 10.1016/j.livsci.2018.04.007.
- Ren H, Wang G, Chen L, Jiang J, Liu L, Li N, Zhao J, Sun X, Zhou P. Genome-wide analysis of long non-coding RNAs at early stage of skin pigmentation in goats (*Capra hircus*). *BMC Genomics.* 2016 Jan 19;17:67. doi: 10.1186/s12864-016-2365-3. PMID: 26785828; PMCID: PMC4719336.
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics.* 2010 Jan 1;26(1):139-40. doi: 10.1093/bioinformatics/btp616. Epub 2009 Nov 11. PMID: 19910308; PMCID: PMC2796818.
- Rodriguez GM, Bobbala D, Serrano D, Mayhue M, Champagne A, Saucier C, Steimle V, Kufer TA, Menendez A, Ramanathan S, Ilangumaran S. NLRC5 elicits antitumor immunity by enhancing processing and presentation of tumor antigens to CD8(+) T lymphocytes. *Oncoimmunology.* 2016 Mar 28;5(6):e1151593. doi: 10.1080/2162402X.2016.1151593. PMID: 27471621; PMCID: PMC4938303.
- Russell WC, Brinks JS, Kainer RA. Incidence and heritability of ocular squamous cell tumors in Hereford cattle. *J Anim Sci.* 1976 Dec;43(6):1156-62. doi: 10.2527/jas1976.4361156x. PMID: 1002622.
- Schmutz SM, Dreger DL. Interaction of MC1R and PMEL alleles on solid coat colors in Highland cattle. *Anim Genet.* 2013 Feb;44(1):9-13. doi: 10.1111/j.1365-2052.2012.02361.x. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22524257.

- Seid, A. Review on infectious bovine keratoconjunctivitis and its economic impacts in cattle. *Vet Sci J.* 2019. 9: 555774. DOI:10.19080/JDVS.2019.09.555774
- Sharif O, Knapp S. From expression to signaling: roles of TREM-1 and TREM-2 in innate immunity and bacterial infection. *Immunobiology.* 2008;213(9-10):701-13. doi: 10.1016/j.imbio.2008.07.008. Epub 2008 Sep 7. PMID: 18926286. Silver DL, Hou L, Somerville R, Young ME, Apte SS, Pavan WJ. The secreted metalloprotease ADAMTS20 is required for melanoblast survival. *PLoS Genet.* 2008 Feb 29;4(2):e1000003. doi: 10.1371/journal.pgen.1000003. PMID: 18454205; PMCID: PMC2265537.
- Snowder GD, Van Vleck LD, Cundiff LV, Bennett GL. Genetic and environmental factors associated with incidence of infectious bovine keratoconjunctivitis in preweaned beef calves. *J Anim Sci.* 2005 Mar;83(3):507-18. doi: 10.2527/2005.833507x. PMID: 15705746.
- Solano, F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New J. Sci.* 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/498276>
- Sturm RA, Duffy DL. Human pigmentation genes under environmental selection. *Genome Biol.* 2012 Sep 26;13(9):248. doi: 10.1186/gb-2012-13-9-248. PMID: 23110848; PMCID: PMC3491390.
- Takeda K, Takahashi NH, Shibahara S. Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J Exp Med.* 2007 Mar;211(3):201-21. doi: 10.1620/tjem.211.201. PMID: 17347546.
- Tang L, Liang Y, Xie H, Yang X, Zheng G. Long non-coding RNAs in cutaneous biology and proliferative skin diseases: Advances and perspectives. *Cell Prolif.* 2020 Jan;53(1):e12698. doi: 10.1111/cpr.12698. Epub 2019 Oct 6. PMID: 31588640; PMCID: PMC6985680.
- Tang XH, Gudas LJ. Retinoids, retinoic acid receptors, and cancer. *Annu Rev Pathol.* 2011;6:345-64. doi: 10.1146/annurev-pathol-011110-130303. PMID: 21073338.
- Tardiz L., Rodons G. yamp; Armstrong E. (2016) Pigmentación de los párpados en Hereford y su relación con patologías oculares. *Journal of Basic yamp; Applied Genetics* 27 (1), 196.
- Tsujita H, Plummer CE. Bovine ocular squamous cell carcinoma. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 2010 Nov;26(3):511-29. doi: 10.1016/j.cvfa.2010.08.003. PMID: 21056799.
- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, van Baren MJ, Salzberg SL, Wold BJ, Pachter L. Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 2010 May;28(5):511-5. doi: 10.1038/nbt.1621. Epub 2010 May 2. PMID: 20436464; PMCID: PMC3146043.
- VanRaden PM. Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci.* 2008 Nov;91(11):4414-23. doi: 10.3168/jds.2007-0980. PMID: 18946147.
- Vogt, D., D. E. Anderson, and G. Easley. Studies on bovine ocular squamous carcinoma (“cancer eye”) XIV. Heritabilities, phenotypic correlations, and genetic correlations involving corneoscleral and lid pigmentation. *J Hered.* 1963. 55:133-135. doi: 10.1093/oxfordjournals.jhered.a107311

- Wajapeyee N, Serra RW, Zhu X, Mahalingam M, Green MR. Oncogenic BRAF induces senescence and apoptosis through pathways mediated by the secreted protein IGFBP7. *Cell*. 2008 Feb 8;132(3):363-74. doi: 10.1016/j.cell.2007.12.032. PMID: 18267069; PMCID: PMC2266096.
- Wan DC, Wang KC. Long noncoding RNA: significance and potential in skin biology. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014 May 1;4(5):a015404. doi: 10.1101/cshperspect.a015404. PMID: 24789873; PMCID: PMC3996376.
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Fernando RL, Vitezica Z, Okimoto R, Wing T, Hawken R, Muir WM. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes in a single-step (ssGWAS) for 6-week body weight in broiler chickens. *Front Genet*. 2014 May 20;5:134. doi: 10.3389/fgene.2014.00134. PMID: 24904635; PMCID: PMC4033036.
- Wang H, Misztal I, Aguilar I, Legarra A, Muir WM. Genome-wide association mapping including phenotypes from relatives without genotypes. *Genet Res (Camb)*. 2012 Apr;94(2):73-83. doi: 10.1017/S0016672312000274. PMID: 22624567.
- Wang J, Koganti PP, Yao J. Systematic identification of long intergenic non-coding RNAs expressed in bovine oocytes. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020 Feb 21;18(1):13. doi: 10.1186/s12958-020-00573-4. PMID: 32085734; PMCID: PMC7035783.
- Wang L, Park HJ, Dasari S, Wang S, Kocher JP, Li W. CPAT: Coding-Potential Assessment Tool using an alignment-free logistic regression model. *Nucleic Acids Res*. 2013 Apr 1;41(6):e74. doi: 10.1093/nar/gkt006. Epub 2013 Jan 17. PMID: 23335781; PMCID: PMC3616698.
- Wang WY, Barratt BJ, Clayton DG, Todd JA. Genome-wide association studies: theoretical and practical concerns. *Nat Rev Genet*. 2005 Feb;6(2):109-18. doi: 10.1038/nrg1522. PMID: 15716907.
- Watabe K, Ito A, Asada H, Endo Y, Kobayashi T, Nakamoto K, Itami S, Takao S, Shinomura Y, Aikou T, Yoshikawa K, Matsuzawa Y, Kitamura Y, Nojima H. Structure, expression and chromosome mapping of MLZE, a novel gene which is preferentially expressed in metastatic melanoma cells. *Jpn J Cancer Res*. 2001 Feb;92(2):140-51. doi: 10.1111/j.1349-7006.2001.tb01076.x. PMID: 11223543; PMCID: PMC5926699.
- Watt B, van Niel G, Raposo G, Marks MS. PMEL: a pigment cell-specific model for functional amyloid formation. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2013 May;26(3):300-15. doi: 10.1111/pcmr.12067. Epub 2013 Feb 19. PMID: 23350640; PMCID: PMC3633693.
- Weikard R, Hadlich F, Kuehn C. Identification of novel transcripts and noncoding RNAs in bovine skin by deep next generation sequencing. *BMC Genomics*. 2013 Nov 14;14:789. doi: 10.1186/1471-2164-14-789. PMID: 24225384; PMCID: PMC3833843.
- Wolf Horrell EM, Boulanger MC, D'Orazio JA. Melanocortin 1 Receptor: Structure, Function, and Regulation. *Front Genet*. 2016 May 31;7:95. doi: 10.3389/fgene.2016.00095. PMID: 27303435; PMCID: PMC4885833.

- You Z, Zhang Q, Liu C, Song J, Yang N, Lian L. Integrated analysis of lncRNA and mRNA repertoires in Marek's disease infected spleens identifies genes relevant to resistance. *BMC Genomics*. 2019 Mar 28;20(1):245. doi: 10.1186/s12864-019-5625-1. PMID: 30922224; PMCID: PMC6438004.
- Yue Y, Guo T, Yuan C, Liu J, Guo J, Feng R, Niu C, Sun X, Yang B. Integrated Analysis of the Roles of Long Noncoding RNA and Coding RNA Expression in Sheep (*Ovis aries*) Skin during Initiation of Secondary Hair Follicle. *PLoS One*. 2016 Jun 8;11(6):e0156890. doi: 10.1371/journal.pone.0156890. PMID: 27276011; PMCID: PMC4898689.
- You J, Chen W, Chen J, Zheng Q, Dong J, Zhu Y. The Oncogenic Role of ARG1 in Progression and Metastasis of Hepatocellular Carcinoma. *Biomed Res Int*. 2018 Sep 18;2018:2109865. doi: 10.1155/2018/2109865. Erratum in: *Biomed Res Int*. 2019 Dec 13;2019:6212386. PMID: 30320132; PMCID: PMC6167590.
- Zhang X, Gibhardt CS, Will T, Stanisz H, Körbel C, Mitkovski M, Stejerean I, Cappello S, Pacheu-Grau D, Dudek J, Tahbaz N, Mina L, Simmen T, Laschke MW, Menger MD, Schön MP, Helms V, Niemeyer BA, Rehling P, Vultur A, Bogeski I. Redox signals at the ER-mitochondria interface control melanoma progression. *EMBO J*. 2019 Aug 1;38(15):e100871. doi: 10.15252/embj.2018100871. Epub 2019 Jul 15. PMID: 31304984; PMCID: PMC6669928.
- Zhang BH, Pan XP, Cox SB, Cobb GP, Anderson TA. Evidence that miRNAs are different from other RNAs. *Cell Mol Life Sci*. 2006 Jan;63(2):246-54. doi: 10.1007/s00018-005-5467-7. PMID: 16395542.
- Zhao W, Mazar J, Lee B, Sawada J, Li JL, Shelley J, Govindarajan S, Towler D, Mattick JS, Komatsu M, Dinger ME, Perera RJ. The Long Noncoding RNA SPRIGHTLY Regulates Cell Proliferation in Primary Human Melanocytes. *J Invest Dermatol*. 2016 Apr;136(4):819-828. doi: 10.1016/j.jid.2016.01.018. Epub 2016a Jan 29. PMID: 26829028; PMCID: PMC4857189.
- Zhao Y, Li H, Fang S, Kang Y, Wu W, Hao Y, Li Z, Bu D, Sun N, Zhang MQ, Chen R. NONCODE 2016: an informative and valuable data source of long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2016b Jan 4;44(D1):D203-8. doi: 10.1093/nar/gkv1252. Epub 2015 Nov 19. PMID: 26586799; PMCID: PMC4702886.
- Zou C, Li L, Cheng X, Li C, Fu Y, Fang C, Li C. Identification and Functional Analysis of Long Intergenic Non-coding RNAs Underlying Intramuscular Fat Content in Pigs. *Front Genet*. 2018 Mar 27;9:102. doi: 10.3389/fgene.2018.00102. PMID: 29662503; PMCID: PMC5890112.
- Zuker M, Stiegler P. Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res*. 1981 Jan 10;9(1):133-48. doi: 10.1093/nar/9.1.133. PMID: 6163133; PMCID: PMC326673.