

GENES CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONEJOS: I. GEN DEL RECEPTOR DE LA PROGESTERONA

Peiró R.¹, Merchán M.², Santacreu M.A.¹, Argente M.J.³, Garcia M.L.³, Agea I.³, Muelas R.³, Folch J.M.², Blasco A.¹

¹ Unidad de Mejora Genética, Departamento de Ciencia Animal, UPV. ropeibar@dca.upv.es

² Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments, UAB

³ División de Producción Animal, Departamento de Tecnología Agroalimentaria, UMH

INTRODUCCIÓN

Se ha realizado un experimento de selección divergente por capacidad uterina (CU) durante 10 generaciones de selección en conejo. Las líneas difieren en tamaño de camada debido principalmente a la diferente supervivencia prenatal (Santacreu *et al.*, 2005). Estudios en las primeras etapas de la gestación mostraron que las diferencias en la supervivencia y en el desarrollo embrionario se producen antes de la implantación (Mocé *et al.*, 2004; Peiró *et al.*, 2007). Hay indicios de la presencia de un gen mayor relacionado con la CU y de un gen mayor relacionado con el número de embriones implantados (Argente *et al.*, 2003; Blasco *et al.*, 2005). Un gen candidato podría ser el gen del receptor de la progesterona. El receptor de progesterona (*PGR*) está involucrado en la liberación del óvulo maduro, en el proceso de implantación del embrión y en el mantenimiento de la gestación (Graham y Clarke, 1997). Merchán *et al.* (2005) encuentran un SNP en el promotor del gen *PGR* (SNP 2464, secuencia publicada en el Genbank (X06623)) asociado a las líneas seleccionadas para aumentar la CU (H) y disminuir la CU (L). El objetivo es estudiar el efecto del SNP 2464 del gen *PGR* en la supervivencia y desarrollo embrionario temprano en una población F2 resultado del cruce recíproco de las líneas H y L. Este trabajo es complementario a los presentados en estas jornadas por García *et al.* (2007) y Argente *et al.* (2007).

MATERIAL Y MÉTODOS

Animales: Se han utilizado hembras de una población F2 procedente del cruce de 3 machos de la línea H y 12 hembras de la línea L y de 3 machos de la línea L y 5 hembras de la línea H. De estos cruces se obtuvieron un total de 10 machos y 70 hembras F1, que se cruzaron entre sí para obtener un total de 498 hembras F2. De estas, 172 hembras se sacrificaron a las 48 horas post-monta y 159 hembras se sacrificaron a las 72 horas post-monta.

Genotipado del gen del receptor de progesterona (*PGR*): El DNA genómico se extrajo a partir de muestras de sangre siguiendo el protocolo de ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepSation (Applied Biosystems). El genotipado del SNP G/A₂₄₆₄ se realizó por PCR-RFLP. Se amplificó un fragmento de la PCR de 558 pb y se digirió con la endonucleasa de restricción Eco31I (Fermentas). Los animales genotipados como G/G₂₄₆₄ se designaron como GG, los G/A₂₄₆₄ como GA y los A/A₂₄₆₄ como AA.

Caracteres: Se registró la tasa de ovulación (TO), estimada como el número de cuerpos hemorrágicos presentes en los ovarios; el número de embriones normales (EN); el número de embriones anormales (EA: embriones con fragmentación citoplasmática o células desestructuradas) y el número de ovocitos (OO). Los EN se catalogaron como inicios de mórulas (IM), mórulas compactas (MC) o blastocistos (B). Se calculó la tasa de fecundación (TF) como $(100 * (EN + EA) / (EN + EA + OO))$, así como el porcentaje de embriones en cada uno de los estados de desarrollo. La supervivencia embrionaria (SE) se estimó con los valores de EN corregidos por la covariable TO.

Análisis estadísticos: El análisis se realizó utilizando métodos bayesianos. Los datos de las variables SE, IM, MC y B a 48 y 72 horas de sacrificio se analizaron de forma separada. Para estas variables, los efectos sistemáticos considerados en el modelo fueron el efecto año-estación (3 niveles), el número de folículos hemorrágicos (3 niveles), los días transcurridos

entre el último destete y el sacrificio (2 niveles), el operario (3 niveles) y el genotipo para el gen del *PGR* (3 niveles). Los datos de las variables TO y TF de 48 y 72 horas de sacrificio se analizaron conjuntamente y se consideraron los efectos anteriores y el efecto del momento de sacrificio (2 niveles). Para los caracteres de supervivencia y desarrollo embrionario a 72 h, se incluyó el efecto de presencia o ausencia de embriones en el útero (2 niveles) en el modelo. Para todos los efectos sistemáticos se utilizó un prior plano acotado, y se asumió que las variables eran normales. Las distribuciones marginales posteriores de los parámetros desconocidos se estimaron usando muestreo de Gibbs. Se utilizó una cadena de 100,000 iteraciones con un periodo de quemado de 20,000 iteraciones y se guardó una muestra de cada 10 iteraciones. La convergencia de las cadenas se comprobó utilizando el criterio Z de Geweke.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media bruta para la TO, TF y ER es similar a la obtenidas en las líneas parentales (Tabla 1), al igual que el grado de desarrollo de los embriones a las 72 h (Peiró *et al.*, 2007). El estado de desarrollo de los embriones a las 48 h es más avanzado que el observado en las líneas parentales (Peiró *et al.*, 2007).

En el presente trabajo sólo se presentan los resultados de los animales homocigotos. Así, del total de 172 hembras sacrificadas a las 48 h de gestación, 63 presentaban el genotipo GG, 55 el genotipo GA y 54 el genotipo AA. De las 159 hembras sacrificadas a las 72 h, 33 presentaban el genotipo GG, 96 el genotipo GA y 30 el genotipo AA.

En la Tabla 2 se muestran los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre los genotipos homocigotos y los valores propuestos que se han considerado como relevantes. Las distribuciones son simétricas. En todas las variables el test de Geweke no detecta falta de convergencia y el error de Monte Carlo es pequeño. La probabilidad de que la TO para el genotipo GG (más frecuente en la línea H) sea superior a la del genotipo AA es del 87% pero la probabilidad de que esa diferencia sea relevante es pequeña ($Pr=6\%$). Los genotipos GG y AA tampoco presentan diferencias relevantes para la TF ni para la SE a las 48 horas. Estos resultados están en concordancia con los resultados previos obtenidos en las líneas parentales (Mocé *et al.*, 2004; Peiró *et al.*, 2007). A las 72 h existe una diferencia para SE de 0.36 embriones recuperados a favor del genotipo GG, esta diferencia corresponde a un 40% de las diferencias encontradas entre las líneas parentales. La probabilidad de que el genotipo GG presente una supervivencia embrionaria mayor que el AA es del 80% y de que esta diferencia sea relevante es del 60%. El valor de relevancia propuesto, 0.25 embriones, representa un 25% de las diferencias entre las líneas H y L. Al evaluar el desarrollo embrionario a las 48 horas, las diferencias entre ambos genotipos no son relevantes ($D = -0.40\%$). A las 72 horas de gestación, el genotipo GG sí presenta un mayor desarrollo embrionario que el genotipo AA. La probabilidad de que el genotipo GG presente un mayor porcentaje de B que AA es del 91%. Para el genotipo GG se observa un menor porcentaje de los estados embrionarios menos desarrollados ($D = -2.15$ y -7.09 para IM y MC, respectivamente) y un mayor porcentaje del estado embrionario más desarrollado ($D=9.24$ para B). El valor de relevancia propuesto es del 4% que corresponde a la cuarta parte de las diferencias en el desarrollo embrionario entre las líneas H y L. La probabilidad de que la diferencia entre GG y AA sea relevante es del 76%. La mayor supervivencia y mayor desarrollo embrionario a las 72 horas de gestación podrían explicar las diferencias encontradas entre los genotipos a la implantación (0.62 embriones) y al nacimiento (0.76 gazapos) en esta población F2.

CONCLUSIONES

El SNP 2464 encontrado en el promotor del gen *PGR* explica parte de las diferencias encontradas en supervivencia y desarrollo embrionario en las primeras etapas de la gestación entre las líneas H y L (Peiró *et al.*, 2007). El genotipo GG presenta una mayor supervivencia y desarrollo embrionario a las 72 h, de acuerdo con los resultados obtenidos para el tamaño de camada y número de embriones implantados en esta población F2 (Peiró *et al.*, 2006).

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado con los proyectos CICYT AGL2001-3068-C03 y AGL2005-07624-C03.

REFERENCIAS

- Argente, M.J., Blasco, A., Ortega, J.A., Haley, C.S., Visscher, P.M. (2003) *Genetics* 163:1061-1068.
 Blasco, A., Ortega, J.A., Climent, A., Santacreu, M.A. (2005) *J. Anim. Sci.* 83:2297-2302.
 Graham, J.D., Clarke, C.L. (1997) *Endocr. Rev.* 18:502-519.
 Merchán, M., Peiró, R., Estellé, J., Sastre, Y., Santacreu, M.A., Folch, J.M. (2005) *Reprod. Domest. Anim.* 40 (4) : 409 (Abstract)
 Mocé, M.L., Santacreu, M.A., Climent, A., Blasco, A. (2004) *J. Anim. Sci.* 82:68-73.
 Peiró, R., Merchán, M., Santacreu, M.A., Argente, M.J., Garcia, M.L., Agea, I., Folch J.M., Blasco, A. (2006) 8th WCGALP. Belo Horizonte (Brasil).
 Peiró, R., Santacreu, M. A., Climent, A., Blasco, A. (2007) *J. Anim. Sci.* In press.
 Santacreu, M.A., Mocé, M.L., Climent, A., Blasco, A. (2005) *J. Anim. Sci.* 83:2303-2307.

Tabla 1. Media bruta (M) y desviación estándar (d.e.) para la tasa de ovulación (TO), tasa de fecundación (TF), embriones recuperados (ER) y porcentaje de inicios de mórula (IM), mórulas compactas (MC) y blastocistos (B) a las 48 horas y a las 72 horas de gestación de la población F2.

| | | | 48 horas | | | 72 horas | | | |
|------|-------|-------|----------|--------|--------|----------|--------|--------|-------|
| | TO | TF% | ER | IM (%) | MC (%) | ER | IM (%) | MC (%) | B (%) |
| M | 12.93 | 97.87 | 11.88 | 13.34 | 86.66 | 11.83 | 12.19 | 72.90 | 14.91 |
| d.e. | 2.53 | 5.61 | 2.35 | 27.57 | 27.57 | 2.66 | 26.49 | 32.23 | 25.67 |

Tabla 2. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre el genotipo GG y AA del gen *PGR* para la tasa de ovulación (TO), la tasa de fecundación (TF), la supervivencia embrionaria (SE), y el porcentaje de inicio de mórulas (IM) y mórulas compactas (MC) a las 48 y 72 h de gestación.

| | D | HPD _{95%} | P(D>0) (%) | b | Pr (%) | P(D>b) (%) | MCse | Z |
|---------------------------|-------|--------------------|------------|------|--------|------------|--------|-------|
| TO | 0.42 | -0.30 , 1.15 | 87 | 1 | 6 | 6 | 0.0036 | -0.37 |
| TF (%) | -0.38 | -4.07 , 5.52 | 52 | 7 | 0 | 0 | 0.0161 | -0.11 |
| 48 horas gestación | | | | | | | | |
| SE | 0.14 | -0.55 , 0.82 | 65 | 0.25 | 32 | 25 | 0.0029 | 0.87 |
| IM (%) | -0.40 | -15.38 , 13.80 | 52 | 4 | 58 | 32 | 0.0638 | -1.32 |
| 72 horas gestación | | | | | | | | |
| SE | 0.36 | -0.53 , 1.18 | 80 | 0.25 | 67 | 60 | 0.0043 | 1.27 |
| IM (%) | -2.15 | -17.34 , 11.61 | 39 | 4 | 62 | 21 | 0.0831 | -0.99 |
| MC (%) | -7.09 | -25.14 , 9.26 | 21 | 4 | 74 | 11 | 0.0988 | -1.00 |
| B (%) | 9.24 | -3.63 , 22.62 | 91 | 4 | 81 | 76 | 0.0897 | 0.46 |

D: media posterior de la diferencia entre los genotipos GG y AA; HPD_{95%}: región de alta densidad posterior al 95%; P(D>0): probabilidad de que la diferencia sea mayor que cero; b: diferencia relevante; Pr: probabilidad de

la relevancia (probabilidad de que D sea mayor que b en valor absoluto); $P(D > b)$: probabilidad que D sea relevante a favor del genotipo GG; MCse: error estándar de Monte Carlo; Z : valor Z del test de Geweke.