

## GENES CANDIDATOS PARA EL DESARROLLO EMBRIONARIO EN CONEJO: III. GEN DEL *TIMP1*

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

<sup>1</sup> División de Producción Animal, Departamento de Tecnología Agroalimentaria, UMH.  
mj.argente@umh.es

<sup>2</sup> Unidad de Mejora Genética, Departamento de Ciencia Animal, UPV

<sup>3</sup> Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. UAB

### INTRODUCCIÓN

El tamaño de camada es un carácter de considerable importancia económica en conejo (Armero y Blasco, 1992). Sin embargo, su selección ha tenido un éxito limitado, debido a su baja heredabilidad (Blasco *et al.*, 1993). Blasco *et al.* (1994) proponen la selección por capacidad uterina como un método alternativo para mejorar el tamaño de camada en conejo e inician un experimento de selección divergente por este carácter. Tras diez generaciones de selección, Santacreu *et al.* (2005) encuentran una diferencia entre la línea de alta (H) y de baja capacidad uterina (L) de 1.79 embriones a la implantación y 2.35 gazapos al parto. El menor desarrollo de los embriones observado por Mocé *et al.* (2004) en la línea L a las 72 horas de gestación podría estar relacionado con la mayor mortalidad de esta línea a las 72 horas de gestación (Mocé *et al.*, 2004) y a la implantación (Santacreu *et al.*, 2005). Los resultados de un análisis de segregación compleja (Argente *et al.*, 2003) sugerían como probable la existencia de un gen mayor para el carácter capacidad uterina y para el número de embriones implantados en esta población. Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs) están relacionadas con los procesos de proliferación celular, embriogénesis y angiogénesis que tienen lugar durante el desarrollo del embrión y su implantación. A su vez, la actividad enzimática de las MMPs está regulada por inhibidores tisulares específicos (TIMPs). Uno de estos inhibidores tisulares (TIMP-1) parece tener un papel importante en el desarrollo del embrión (Hwang *et al.*, 2000). En el trabajo de Estellé *et al.* (2006), realizado con conejos del experimento de selección divergente por capacidad uterina (Argente *et al.*, 1997), se observa una mayor expresión del gen *TIMP1* en oviducto a las 62 horas de gestación en animales de la línea H en comparación con la línea L.

El objetivo del presente trabajo es analizar el efecto del polimorfismo estudiado del gen *TIMP1* sobre el número de embriones y su desarrollo a 48 y 72 horas de gestación en una población de conejas F2 obtenidas 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 Peiró *et al.* (2007).

### MATERIAL Y MÉTODOS

Animales. Se utilizó la misma población de animales F2 que en los trabajos de Peiró *et al.* (2007) y García *et al.* (2007).

Genotipado para el gen del *TIMP1*. Se realizaron extracciones de ADN genómico a partir de muestras de sangre siguiendo el protocolo del ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepSation (Applied Biosystems). Los animales fueron genotipados mediante pirosecuenciación para el SNP A/G identificado en el promotor del gen *TIMP1* de conejo (Merchán *et al.*, no publicado).

Caracteres. Se recogieron los siguientes caracteres a 48 y 72 horas de gestación: tasa de ovulación (TO); supervivencia embrionaria, estimada como el número de embriones recuperados normales utilizando la TO como covariable (SE); tasa de fecundación, estimada como el cociente de embriones recuperados respecto al total recuperado (ocitos y embriones) multiplicado por 100 (TF); porcentaje de embriones en estado de inicio de mórula (IM); porcentaje de embriones en estado de mórula compacta (MC), y porcentaje de embriones en estado de blastocisto (B).

Análisis estadísticos. Los análisis se realizaron utilizando metodología bayesiana. Los modelos empleados para TO, TF, SE, IM, MC y B incluyeron los mismos efectos que los descritos en Peiró *et al.* (2007), aunque en este caso el efecto del genotipo hace referencia al gen *TIMP1*. Se usaron priors planos uniformes acotados para todos los parámetros

desconocidos y se asumió que los datos se distribuían de forma normal. Las distribuciones marginales posteriores de las variables analizadas fueron estimadas por Gibbs Sampling. Se utilizó una cadena de 100,000 muestras descartando las primeras 20,000 (burning) y salvando una de cada 10 muestras para evitar una alta correlación. La convergencia fue testada usando el criterio de Geweke.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se sacrificaron un total de 172 hembras a 48 horas de gestación, de las cuales 73 eran homocigotas AA y 11 homocigotas GG, y un total de 159 hembras a 72 horas de gestación, de las cuales 72 eran homocigotas AA y 7 homocigotas GG. La Tabla 1 muestra los parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre el genotipo AA (genotipo más frecuente en la línea H) y GG (genotipo más frecuente en la línea L) para la tasa de ovulación, la supervivencia y el desarrollo de los embriones a 48 y 72 horas de gestación. Estas distribuciones fueron aproximadamente normales. Los errores estándar de Monte Carlo (MCse) fueron pequeños y el test de Geweke detectó la convergencia de todas las cadenas. Una ventaja de las técnicas Bayesianas es la posibilidad de construir fácilmente cualquier clase de intervalo de confianza. De forma que podemos calcular la probabilidad que la diferencia sea mayor de cero, y también la probabilidad que estas diferencias sean económicamente o biológicamente relevante (Pr). En la Tabla 1 figuran las cantidades que nosotros consideramos como diferencias relevantes.

Respecto a la TO, 1 óvulo de diferencia entre las hembras del genotipo AA y GG puede considerarse una diferencia relevante ( $b=1$ ). La probabilidad que la TO sea mayor de 1 óvulo en el genotipo AA frente al genotipo GG es pequeña ( $P(D>b)=15\%$ ). Por lo que se puede indicar que la diferencia estimada ( $D=0.38$  óvulos, Tabla 1) es irrelevante. Tampoco los genotipos AA y GG parecen diferir en TF, pues la probabilidad que la diferencia supere el valor de relevancia establecido ( $b=8\%$ ) es cero. Estos resultados estarían de acuerdo con los obtenidos por Mocé *et al.* (2004), estos autores no encontraron diferencias en TO y TF en las líneas parentales de alta y de baja capacidad uterina que dieron lugar a esta población F2.

En relación a la SE y el desarrollo embrionario, se consideraron unas diferencias entre el genotipo AA y GG de 0.25 embriones y 4% como diferencias relevantes respectivamente. A las 48 horas de gestación, los genotipos AA y GG no presentan diferencias relevantes para SE ni para IM ( $D=-0.01$  y  $-3.28\%$ , respectivamente Tabla 1). Sin embargo a las 72 horas de gestación, la probabilidad que el genotipo AA tenga 0.25 embriones más que el genotipo GG es relativamente elevada ( $P(D>b)=83\%$ , Tabla 1). Respecto al desarrollo embrionario, el genotipo AA muestra un menor porcentaje de IM ( $D=-16.33\%$ ,  $P(D<-b)=86\%$ ) y un mayor porcentaje de MC ( $19.85\%$ ,  $P(D>b)=87\%$ , Tabla 1) que el genotipo GG. Un desarrollo embrionario más acelerado podría ser el responsable de la mayor supervivencia embrionaria a las 72 horas de gestación (0.88 embriones) y a la implantación (2 embriones, según Merchán *et al.*, datos no publicados) encontrada en el genotipo AA cuando se compara con el genotipo GG, aunque estas diferencias desaparecen al parto (Merchán *et al.*, datos no publicados). Este resultado estaría de acuerdo con el mayor desarrollo y supervivencia de los embriones observado por Mocé *et al.* (2004) a las 72 horas de gestación en la línea H.

## CONCLUSIONES

El polimorfismo estudiado para el gen *TIMP1* parece tener un papel importante en el desarrollo del embrión y su supervivencia a partir de las 72 horas de gestación.

## AGRADECIMIENTOS

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

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Argente, M.J., Blasco, A., Ortega, J.A., Haley, C.S. Visscher, P.M. 2003 Genetics 163 : 1061-1068.
- Argente, M.J., Santacreu, M.A., Climent, A., Bolet, G. Blasco, A. 1997 J. Anim. Sci. 75 : 2350-2354.
- Armero, E. Blasco, A. (1992) Proc. 5<sup>th</sup> WRC 1 : 637-642.
- Blasco, A., Argente, M.J., Haley, C.S. Santacreu, M.A. 1994 J. Anim. Sci. 72 : 3066-3072.
- Blasco, A., Bidanel, J.P., Bolet, G., Haley, C.S. Santacreu, M.A. 1993 Livest. Prod. Sci. 37:1-21.
- Estellé, J., Sastre, Y., Merchán, M., Peiró, R., Santacreu, MA., Folch, JM. 2006 Mol Reprod Dev. 73(6): 678-84
- García, M.L., Muela, R., Agea, I., Merchán, M., Peiró, R., Blasco, A., Santacreu, M.A., Folch, JM., Argente, M.J. 2007 ITEA
- Hwang W, Kim H, Lee E, Lim J, Roh S, Shin T, Hwang K, Lee B. 2000. J Vet Med Sci 62(1):1-5.
- 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. García, M.L., Agea, I., Muela, R. Folch, J.M Blasco, A. 2007 ITEA
- Santacreu, M.A., Mocé, M. L., Climent, A. Blasco, A. 2005 J. Anim. Sci. 83 : 2303-2307.

Tabla 1. Parámetros de las distribuciones marginales posteriores de las diferencias entre el genotipo AA y GG del gen *TIMP1* para la tasa de ovulación (TO), tasa de fecundación (TF), supervivencia embrionaria (SE), porcentaje de inicio de mórulas (IM) y porcentaje de mórulas compactas (MC).

	<b>D</b>	<b>HPD<sub>95%</sub></b>	<b>P(D&gt;0) (%)</b>	<b>b</b>	<b>Pr (%)</b>	<b>P(D&gt;b) (%)</b>	<b>MCse</b>	<b>Z</b>
<b>TO</b>	0.38	-0.78, 1.50	74	1	16	15	0.006	-0.022
<b>TF (%)</b>	-2.62	-4.86, 1.65	7	8	0	0	0.022	-0.144
<b>. 48 horas gestación</b>								
<b>SE</b>	-0.01	-0.92, 0.89	49	0.25	58	29	0.004	0.625
<b>IM (%)</b>	-3.28	-22.73, 17.66	38	4	38	24	0.087	-0.388
<b>. 72 horas gestación</b>								
<b>SE</b>	0.88	-0.55, 2.21	90	0.25	88	83	0.006	-0.999
<b>IM (%)</b>	-16.33	-39.49, 5.96	8	4	90	4	0.113	0.902
<b>MC (%)</b>	19.85	-7.68, 46.4	92	4	92	87	0.135	0.902

D: media posterior de la diferencia entre los genotipos AA y GG; HPD<sub>95%</sub>: región de alta densidad posterior al 95%; P(D>0): probabilidad que la diferencia sea mayor de cero, b: diferencia relevante asumida; Pr: probabilidad de la relevancia (probabilidad que D sea mayor que b en valor absoluto); P(D>b): probabilidad que D sea relevante a favor del genotipo AA; MCse: error estándar de Monte Carlo; Z: valor Z del test de Geweke.