

EFFECTO DE LA SELECCIÓN POR TASA DE OVULACIÓN EN EL TRANSCRIPTOMA DE TEJIDO OVÁRICO EN CONEJO

Peiró^{1,2}, R., Serna^{1,3}, M., Serna³, E. y Santacreu¹, M.A.

¹Instituto de Ciencia y Tecnología Animal, Universitat Politècnica de València. ²Dirección actual: Instituto de Conservación y Mejora de la Agrodiversidad Valenciana, Universitat Politècnica de València. ³Unidad Central de Investigación de Medicina, Universitat de València. msantacr@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

Una de las alternativas que se ha propuesto para mejorar la respuesta en tamaño de camada en conejo es la selección por tasa de ovulación. En la Universitat Politècnica de València se ha llevado a cabo un experimento de selección por tasa de ovulación durante 10 generaciones. La selección por tasa de ovulación ha tenido éxito; la línea seleccionada presenta un aumento de tres óvulos pero no ha habido una respuesta correlacionada en tamaño de camada debido a un aumento en la mortalidad prenatal (Laborda et al., 2012). Este incremento de la mortalidad podría ser debido, en parte, a un aumento del número de ovocitos inmaduros producidos por el ovario de acuerdo con lo observado en cerdas seleccionadas por tasa de ovulación (Koenig et al., 1986). El objetivo de este trabajo es estudiar cuál ha sido el efecto de la selección sobre la expresión génica diferencial en el tejido ovárico mediante el uso de microarrays.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se ha analizado seis muestras de tejido ovárico (entre 34-40 mg) de seis conejas nulíparas sacrificadas a las 16 horas post-monta. Tres muestras de tejido ovárico procedían de conejas de una línea seleccionada por tasa de ovulación durante 10 generaciones y las otras tres muestras de una población control. La población control se reconstituyó en la generación 10 a partir de embriones vitrificados de hembras de la generación base de selección.

La integridad del RNA total extraído se ha determinado utilizando el kit RNA 6000 Nano LabChip® y el Bioanalizador Agilent 2100 (Agilent Technologies) y la cuantificación se ha realizado utilizando el espectrofotómetro GeneQuant Pro™ (GE Healthcare).

El microarray *GeneChip® Rabbit Gene 1.0 ST Array* permite analizar un total de 23.282 genes mediante 496.321 sondas distintas, con una mediana de 22 sondas por gen. Para ello, utiliza secuencias de transcritos anotados procedentes de las bases de datos Oryzun 2.0 y Ensembl (Mayo 2009). Previamente al análisis de expresión génica, se ha realizado un control de calidad para cada uno de los chips mediante el análisis de la imagen del biochip, el control de la hibridación del oligo B2 y el análisis de parámetros a nivel de sonda, de set de sondas y de categorías. Para ello se ha utilizado el software *Expression Console™ 1.4.1.46* de Affymetrix. Para la realización del análisis transcriptómico, se ha realizado un análisis de componentes principales y un análisis de expresión diferencial mediante un análisis de la varianza utilizando el software comercial Partek Genomics Suite 6.6. Los p-values obtenidos en el ANOVA se han ajustado por el método False Discovery Rate (FDR) de Benjamini y Hochberg (1995) para estudios de comparaciones múltiples. Finalmente, los genes diferencialmente expresados se introdujeron en el programa Pathway Studio versión 9 (Ariadne Genomics® software, Elsevier® Inc, Rockville, MD, USA) para la identificación de la red asociada a muerte celular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Todas las muestras analizadas han presentado valores de RIN (acrónimo de *RNA Integrity Number*) superiores a 8, por lo que ninguna de las muestras está degradada. La pureza del RNA total de las seis muestras también ha sido adecuada ya que han presentado valores del ratio A260/A280 cercanos a 2,00. La concentración de RNA total en las muestras ha sido elevada (1.500 ng/μl en promedio) y similar. Las muestras analizadas han mostrado unos parámetros adecuados de calidad para el análisis de la imagen del biochip y la hibridación del oligo B2. El análisis del pre-procesado de las muestras mediante el método RMA (acrónimo de *Robust Multiarray Average*) indican un adecuado control de calidad de los datos de expresión obtenidos (visión global de la calidad de los datos de expresión, control de sesgos y

comparabilidad de las muestras, control de calidad del marcaje de las muestras y control de calidad de la hibridación de las muestras).

En la figura 1 se representa el análisis de componentes principales de las seis muestras analizadas (tres muestras de la población control y tres de la línea seleccionada). Las tres primeras componentes principales explican aproximadamente el 65 % de la variación y se puede observar que las muestras de ambas poblaciones, control y seleccionada, se diferencian desde el punto de vista transcriptómico.

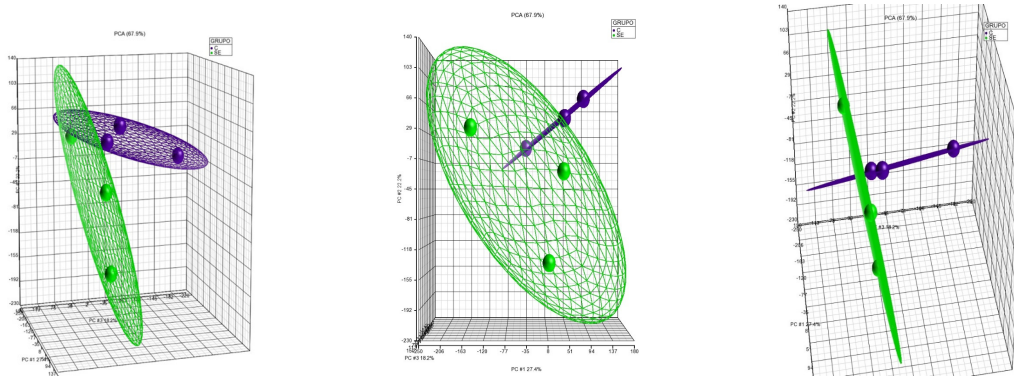


Figura 1. Tres representaciones gráficas del resultado del análisis de componentes principales para muestras de tejido ovárico procedentes de tres conejas de una línea seleccionada por tasa de ovulación durante 10 generaciones (verde) y tres conejas de la población control (morado).

El número de genes diferencialmente expresados ha sido de 1.357 (p valores $\leq 0,05$). Se ha realizado la representación de los genes con diferente expresión mediante un *heatmap* para cada una de las muestras estudiadas (Figura 2) y se ha observado un patrón de expresión similar entre las muestras del mismo grupo pero diferente entre los grupos selección y control. De los 1.357 genes, 800 genes han presentado unos valores de cambio de expresión (*fold change*) positivos en la población seleccionada, de los cuales 59 presentaban un valor de cambio de expresión mayor de 1,5. El resto, 557, son genes infraexpresados en la población seleccionada, de los cuales 44 presentan valores inferiores a -1,5. De todos los genes expresados diferencialmente, 922 genes están anotados (529 sobreexpresados y 393 genes infraexpresados). De éstos, 14 y 19 genes presentan valores superiores e inferiores a un cambio de expresión de 1,5, respectivamente.

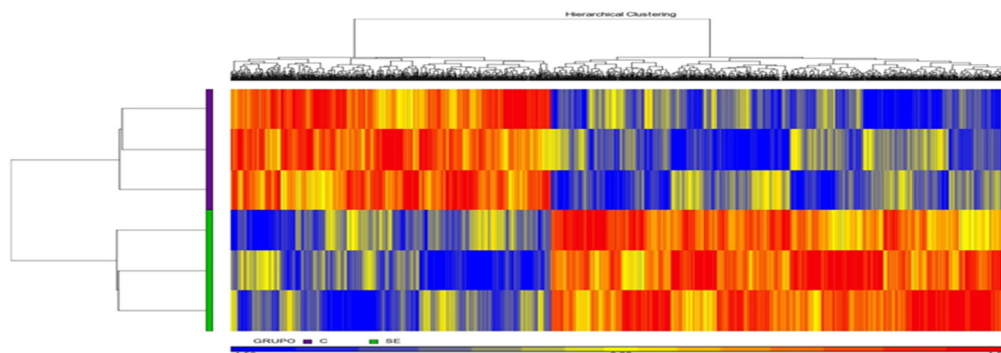


Figura 2. Heatmap de los 1.357 genes diferencialmente expresados en tejido ovárico procedente de tres conejas de una línea seleccionada por tasa de ovulación durante 10 generaciones (verde) y las otras muestras de tres conejas de la población control (morado). Los genes sobreexpresados se representan en rojo y los infraexpresados en azul.

De los 33 genes anotados y expresados diferencialmente en las hembras de las poblaciones seleccionada y control, 19 genes están implicados directamente con la muerte celular: *STC1*, *IDO1*, *CDK1*, *CD38*, *APOD*, *ENPP2*, *WEE2*, *NFYB*, *CCL21*,

SFRP2, *ADIPOQ*, *UCHL1*, *BMP5*, *NR1H4*, *RGS22*, *F2R*, *STK17A*, *PIK3IP1*, *CA2* (Figura 3). Entre estos genes destaca el gen *STC1* (*Stanniocalcin 1*) que sintetiza una glicoproteína implicada en la regulación de múltiples procesos biológicos, incluyendo la angiogénesis y la esteroidogénesis, ambos eventos fundamentales en la función ovárica (Gerritsen y Wanner, 2005). Es la primera vez que se describe la expresión del gen *STC1* en tejido ovárico de conejos. En porcino, *STC1* tiene un papel fisiológico y modulador en la esteroidogénesis en el folículo ovárico. Además, *STC1* tiene un efecto negativo en la producción de estradiol 17 β y un efecto positivo en la producción de progesterona de las células de la granulosa (Baioni et al., 2009). Estos resultados indican que el gen *STC1* tiene una función importante en la maduración del folículo y podría ser uno de los genes implicados en el aumento de la tasa de ovulación y/o mortalidad prenatal observada en el experimento de selección por tasa de ovulación en conejo (Laborda et al., 2012).

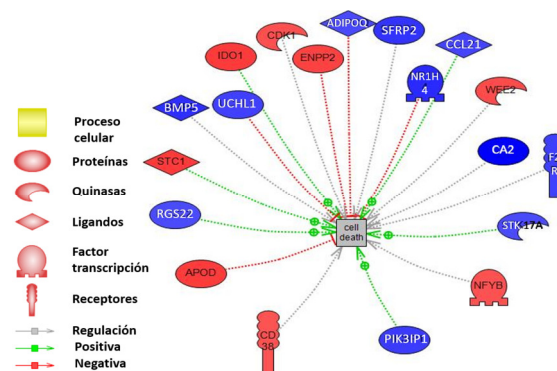


Figura 3. Representación de 19 genes diferencialmente expresados en tejido ovárico procedente de tres conejas de una línea seleccionada por tasa de ovulación y de tres conejas de la población control. Los genes sobreexpresados e infraexpresados en la población seleccionada se representan en rojo y en azul, respectivamente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baioni, L., Basini, S., Bussolati, F. & Grasselli, F. 2009. *Vet. Res. Commun.* 33:73-76.
- Benjamini, Y. & Hochberg, Y. 1995. *J. R. Stat. Soc. Ser. B Stat. Methodol.* 57:289-300.
- Gerritsen, M.E. & Wanner, G.F. 2005. *Vitam. Horm.* 70:105-135.
- Koenig, J.L.F., Zimmerman, D.R., Eldrige, F.E. & Kopf, J.D. 1986. *J. Anim. Sci.* 63:202 (Abstr).
- Laborda, P., Santacreu, M.A., Blasco, A. & Mocé, M.L. 2012. *J. Anim. Sci.* 90:3392-3397.

Agradecimientos: El trabajo ha sido financiado por el MEC (AGL2014-55921-C2-1-P) y la Generalitat Valenciana (Prometeo 2009/125).

EFFECT OF SELECTION FOR OVULATION RATE ON OVARY TISSUE TRANSCRIPTOME IN RABBITS

ABSTRACT: Selection for ovulation rates has been proposed to improve the response in litter size. After 10 generations of selection, an increase of three ova was achieved increasing prenatal mortality. The aim is to study the effect of selection on differential gene expression in ovarian tissue using microarrays. A total of six samples, three from females belong to selection line and three to the control line, were recovered 16 hours after mating. Total RNA was processed for genome-wide expression analysis using Affymetrix gene arrays. A total of 1,357 genes were differentially expressed. A total of 14 annotated genes were overexpressed (differential expression higher than 1.5) in the selection line, whereas 19 annotated genes were underexpressed (differential expression lower than -1.5). *Stanniocalcin 1* is one of the overexpressed genes and it seems to be relevant gene since it is related to reproductive procedures.

Key words: litter size, microarrays, ovary, ovulation rate, rabbit.