ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 234-237

# ANÁLISIS DE LOS GENES CANDIDATOS DE LA OVIDUCTINA, UTEROGLOBINA Y RECEPTOR DE PROGESTERONA EN DOS LÍNEAS DIVERGENTES SELECCIONADAS POR CAPACIDAD UTERINA EN CONEJO

**M. Merchán[*], R. Peiró[**], J. Estellé[*], Y. Sastre[*], M.A. Santacreu[**], J.M. Folch[*]**

* Unitat de Genètica i Millora Animal, Departament de Ciència Animal i dels Aliments. Facultat de Veterinària, UAB. 08193 Bellaterra

** Departamento de Ciencia Animal, Universidad Politécnica de Valencia, P.O. Box 22012, 46071 Valencia

RESUMEN

En el presente trabajo se ha analizado la existencia de polimorfismos en los genes candidatos de la uteroglobina, de la oviductina y del receptor de la progesterona en dos líneas divergentes seleccionadas por capacidad uterina en conejo. En el gen de la uteroglobina se han detectado 6 posiciones polimórficas en la región promotora pero no se observa relación entre los genotipos de estas variantes polimórficas y la clasificación de los animales de alta y baja capacidad uterina. En el receptor de la progesterona se han detectado 5 posiciones polimórficas y parece haber una cierta relación entre algunos de estos genotipos y la clasificación de los animales en ambas líneas. En la oviductina se han detectado 11 posiciones polimórficas determinando 3 de éstas 2 cambios aminoacídicos. Se ha observado un haplotipo más frecuente en los animales de la línea alta que en los de la línea baja. Los animales analizados son los parentales que se utilizarán para producir un cruce F2 en el que se analizarán las variantes detectadas en el gen de la oviductina y del receptor de la progesterona para comprobar si existe alguna asociación entre dichas variantes y la capacidad uterina.

## Introducción

El conejo es un animal de interés productivo y particularmente adecuado como modelo en experimentos de selección que no serían factibles en otras especies ganaderas. En la producción de conejo, al igual que en porcino, el carácter tamaño de camada es uno de los que tiene más repercusión productiva y económica.

En el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Politécnica de Valencia se ha llevado a cabo un experimento de selección divergente por capacidad uterina (ARGENTE *et al.*, 1997). La selección por capacidad uterina ha tenido éxito, la divergencia entre las líneas fue de 2.6 gazapos al nacimiento (BLASCO *et al.*, 2000). La mayor respuesta se ha presentado en la línea seleccionada para disminuir la capacidad uterina, 2.1 gazapos menos al nacimiento que la

población control; el menor tamaño de camada en esta línea se debe esencialmente a un aumento de la mortalidad embrionaria hasta el momento de la implantación (SANTACREU *et al.* 2000). MOCÉ *et al.* (2004) encuentran que la mayor parte de la mortalidad pre-implantación se produce antes de las 72 horas de la gestación, cuando los embriones todavía se encuentran en el oviducto. La mitad de la respuesta estimada en capacidad uterina se produjo en las dos primeras generaciones de selección. ARGENTE *et al.* (2003) han encontrado evidencias de la existencia de un QTL con un efecto importante sobre la capacidad uterina y el número de embriones implantados en la generación base.

El presente trabajo de investigación se enmarca en el proyecto AGL2001-3068-C03 que pretende la identificación del gen mayor responsable de las diferencias en supervivencia embrionaria observadas en las líneas indicadas anteriormente. Se van a estudiar tres genes candidatos: uteroglobina, receptor de la progesterona y oviductina. La uteroglobina es el principal componente proteico (40-60%) de la secreción uterina durante la implantación y está implicada en el transporte de progesterona, en la protección del blastocito contra la respuesta inmunitaria materna y tiene una actividad anti-inflamatoria (BEIER, 2000; GUTIÉRREZ-SAGAL *et al.*, 1993). El gen del receptor de la progesterona está relacionado con la liberación del ovocito maduro, la implantación del embrión, el mantenimiento de la gestación y el crecimiento uterino (GUTIÉRREZ-SAGAL *et al.*, 1993). Además, induce la expresión y la liberación de la uteroglobina. El gen de la oviductina en conejo se expresa específicamente en el oviducto y en el cérvix (HENDRICK *et al.*, 2001) y está implicado en la fecundación, en el desarrollo embrionario temprano y en la protección del epitelio oviductal (BUHI *et al.*, 2002).

## Material y métodos

Los animales proceden de un experimento de selección por capacidad uterina descrito por ARGENTE *et al.* (1997). La selección se llevó a cabo durante diez generaciones y posteriormente se relajó hasta la generación 17. Se han utilizado un total de 21 animales de la generación 17: 6 hembras y 2 machos de la línea seleccionada por alta capacidad uterina (CU+) y 11 hembras y 2 machos de la línea seleccionada para disminuir la capacidad uterina (CU-). Estos animales son los parentales de los cruces para producir una F2, en la que se analizaran los posibles genes candidatos que regulan la capacidad uterina.

El análisis de los diferentes genes se realizó partiendo de ADN genómico extraído de muestras de 100 mg de oreja y/o de ARN total extraído de muestras de 100 mg de tejido oviductal. Se diseñaron cebadores a partir de las secuencias publicadas de conejo en el *GenBank* de cada uno de los genes candidatos (receptor de progesterona: X06623 y M14547; uteroglobina: X01423; oviductina: AF347052). Se amplificaron por PCR y/o RT-PCR extensas regiones de los 3 genes. Los productos amplificados fueron purificados y posteriormente secuenciados con el kit *Big Dye ® Terminator v.3.1 Cycle Sequencing* en el secuenciador automático *ABI PRISM 3100 Avant* (Applied Biosystems). Las secuencias fueron ensambladas y alineadas mediante el programa SeqScapeTM (Applied Biosystems) para la detección de polimorfismos.

## Resultados y discusión

### Uteroglobina

Se ha amplificado mediante PCR un fragmento del gen de 3703 pb del que se ha obtenido una secuencia de 485 pb de la región promotora, de todos los exones (E1, E2 y E3), parcialmente de los intrones y de 145 pb de la región 3' flanqueante. En el análisis de todos los animales parentales se han detectado un total de 30 posiciones polimórficas con respecto a la secuencia publicada en el GenBank (X01423) que consisten mayoritariamente en substituciones nucleotídicas, aunque también existen inserciones y deleciones de 1 ó 3 nucleótidos. Once de estas variantes están localizadas en el promotor, una en el intrón 1, dos en el exón 2, quince en el intrón 2 y una en la región 3' flanqueante. Sin embargo, sólo seis de estas posiciones son polimórficas entre los animales analizados y se localizan en la región promotora del gen. Estos polimorfismos se han encontrado sólo en 4 de los 21 animales parentales y no están asociados a ninguna de las dos líneas estudiadas.

### Receptor de progesterona

Se han amplificado por PCR 2 fragmentos solapados del gen de 700 y 1759 pb y mediante RT-PCR un fragmento del ARNm de 1245 pb. Se ha obtenido la secuencia de 447 pb del promotor, 698 pb de la región 5' UTR, toda la región codificante (excepto parte del exón 1) y 58 pb de la región 3' UTR. El promotor y la región 5' UTR han sido secuenciados en todos los animales parentales, la región codificante y la región 5' UTR sólo han sido secuenciadas en las hembras parentales. Solamente se han encontrado 5 posiciones polimórficas entre los animales analizados, una en el promotor, tres en la región 5'UTR del exón 1 y una en la región codificante del exón 7 (substitución silenciosa). En los machos CU+ se ha observado un haplotipo diferente al de los machos CU-, sin embargo, en las hembras esta asociación no es tan evidente.

### Oviductina

Se ha amplificado mediante RT-PCR un fragmento del ARNm de 1528 pb del que se ha obtenido una secuencia de 1372 pb de la región codificante y 31 pb de la región 3' UTR en las hembras parentales. Se han amplificado mediante PCR dos fragmentos solapados del gen de unas 6 y 8 kb en los machos parentales. Estos 2 fragmentos han sido parcialmente secuenciados.

Se han encontrado 11 posiciones polimórficas entre los animales analizados. Una posición está localizada en la región 3'UTR del exón 11. Las otras 10 posiciones restantes están localizadas en la región codificante; dos en el exón 3, dos en el exón 6, una en el exón 8 y cinco en la región codificante del exón 11. Tres de estas cinco variantes localizadas en el exón 11 implican un cambio aminoacídico, mientras que el resto de las variantes detectadas son silenciosas. Se ha observado un haplotipo de estas tres variantes más frecuente en los animales de la línea CU+ (frecuencia del haplotipo $p = 0.88$) que en los de la línea CU- ($p = 0.35$). Los resultados previos muestran que la mayor parte de la diferencia en tamaño de camada entre las líneas CU+ y CU-, se debe a una diferente tasa de supervivencia hasta las 72 horas de gestación (Mocé *et al.*, 2004). La expresión de este gen en oviducto, lugar en el que se localiza el embrión a las 72 horas de la gestación, refuerza el interés de estos polimorfismos.

Las variantes encontradas en los genes del receptor de progesterona y de la oviductina serán analizadas en las hembras F2 para poder realizar estudios de asociación con parámetros reproductivos.

## Agradecimientos

Trabajo financiado con el proyecto MCYT (AGL2001-3068-C03-03) y con una beca FPI a M. Merchan (MCYT) y a R. Peiró (OCYT).

## Bibliografía

ARGENTE M.J., SANTACREU M.A., CLIMENT A., BOLET G., BLASCO A., 1997. Divergent Selection for Uterine Capacity in Rabbits. *J. Anim. Sci.* 75: 2350-2354.

ARGENTE M.J., BLASCO A., ORTEGA J.A., HALEY C.S., VISSCHER P.M., 2003. Analyses for the presence of a major gene affecting uterine capacity in unilaterally ovariectomized does. *Genetics* 163: 1061-1068.

BEIER H.M., 2000. The Discovery of Uteroglobin and its Significance for Reproductive Biology and Endocrinology. *Annals of the New York Academy of Sciences* 923: 9-24.

BLASCO A., ORTEGA J.A., SANTACREU M.A., 2000. Selection for uterine capacity. I Genetic trends and correlated response in components of litter size. *7th World Rabbit Congress* A: 347-352.

BUHI W.C., 2002. Characterization and biological roles of oviduct-specific, oestrogendependent glycoprotein. *Reproduction* 123: 355-362.

GUTIÉRREZ-SAGAL R., PÉREZ-PALACIOS G., LANGLEY E., PASAPERA A.M., CASTRO I., CERBÓN M.A., 1993. Endometrial Expression of Progesterone Receptor and Uteroglobin Genes During Early Pregnancy in the Rabbit. *Molecular Reproduction and Development* 34: 244-249.

HENDRIX E., HEWETSON A., MANSHARAMANI M., CHILTON B.S., 2001. Oviductin (Muc 9) is Expressed in Rabbit Endocervix. *Endocrinology* Vol. 142, Nº 5: 2151-2154.

MOCE M.L., SANTACREU M.A., CLIMENT A., BLASCO A., 2004. The effect of divergent selection for uterine capacity on prenatal survival in rabbits: Maternal and embryonic genetic effects. *J. Anim. Sci.* 82: 68-73.

SANTACREU M.A., ARGENTE M.J., MOCÉ M.L., BLASCO A., 2000. Selection for uterine capacity. II Response to selection estimated with a cryopreserved control population. *7th World Rabbit Congress* A: 491-496.