

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



TESIS DOCTORAL

**Caracterización de la resistencia genética de la perdiz roja
(Alectoris Rufa)**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Ignacio Gil Ochayta

DIRECTORAS

Natalia Sevane Fernández
Susana Dunner Boxberger

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN ANIMAL



**CARACTERIZACIÓN DE LA RESISTENCIA GENÉTICA
DE LA PERDIZ ROJA (*Alectoris Rufa*)**

Memoria para optar al grado presentada por

Ignacio Gil Ochayta

Dirigida por los doctores:

Natalia Sevane Fernández

Susana Dunner Boxberger

Madrid 2015

AGRADECIMIENTOS

Mi sincero agradecimiento a los doctores Natalia Sevane y Susana Dunner por dirigir esta tesis, por su increíble esfuerzo y paciencia que han tenido a lo largo de este tiempo, por estar siempre que los he necesitado.

A Javier Cañón por todos estos años de conversaciones de procesadores, discos e interesantes temas que siempre te hacen pensar y reevaluar las ideas.

A todos los compañeros del laboratorio que siempre han estado ahí con una sonrisa.

A Óscar y José, sin cuya ayuda no habría salido este ejemplar.

Como no a Carmen que me ha estado aguantando todo este tiempo echándome una mano en sacar tiempo y apoyándome todo lo que ha podido. Muchas gracias.

INDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	La perdiz roja.....	1
1.2.	Censos y repoblaciones.....	3
1.3.	Sistema inmunitario en las aves	7
1.4.	Desafíos infecciosos versus no infecciosos	8
1.4.1.	Inmunidad adquirida	10
1.4.2.	Inmunidad innata	11
1.5.	Estudio del Transcriptoma.....	11
1.5.1.	RNA-seq	12
1.5.2.	Utilización de microarrays de <i>Gallus gallus</i>	13
1.6.	Ontología	15
2.	OBJETIVOS	19
3.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	21
3.1.	Material animal.....	21
3.2.	Desafíos no infecciosos.....	24
3.3.	Extracción de ARN y RNAseq	26
3.4.	Análisis bioinformático de los datos RNA-seq	27
3.5.	Ontología de genes (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG pathway	28
3.6.	Validación con PCR a tiempo real (qPCR)	29
3.7.	Análisis estadístico.....	31
4.	RESULTADOS.....	33

4.1. Estandarización de las condiciones de cría y manejo de las perdices para poder separar el componente genético del ambiental dentro de la variabilidad individual en la respuesta ante un mismo estímulo patógeno.	33
4.2. Realización de desafíos no infecciosos para la clasificación de las perdices según su respuesta inmune.....	33
4.3. Localización de genes candidatos asociados con diferencias en la respuesta inmune mediante microarrays de pollo.	35
4.4. Valoración de la expresión génica diferencial en los distintos tejidos inmunes mediante Differential Display.....	37
4.5. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (RNA-Seq): obtención de un transcriptoma de referencia en perdiz.....	40
4.6. Identificación de SNPs.....	44
4.7. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (RNA-Seq): medida de la expresión génica diferencial en bazo y área de inyección de PHA	45
4.8. Análisis de la Ontología Génica	51
4.9. Localización y caracterización de SNPs en alta y baja RI	53
5. DISCUSIÓN	57
6. CONCLUSIONES.....	81
7. BIBLIOGRAFÍA	83
8. ANEXOS.....	97
ANEXO I. Cronología de los desafíos no infecciosos	97
9. RESUMEN.....	99
10. ABSTRACT	101

1. INTRODUCCIÓN

1.1. La perdiz roja

La perdiz roja (*Alectoris Rufa*) es un Phasianidae que pertenece al género *Alectoris*, que abarca siete especies distribuidas principalmente sobre el área mediterránea, con bajas tasas de dispersión que sustentan la especiación alopátrica (Watson, 1962; Ferrero et al 2011). Hoy en día, esta especie se reproduce naturalmente en el suroeste de Europa, principalmente en la Península Ibérica, lo que representa casi el 80% de las parejas reproductoras existentes (Blanco-Aguilar et al. 2004).

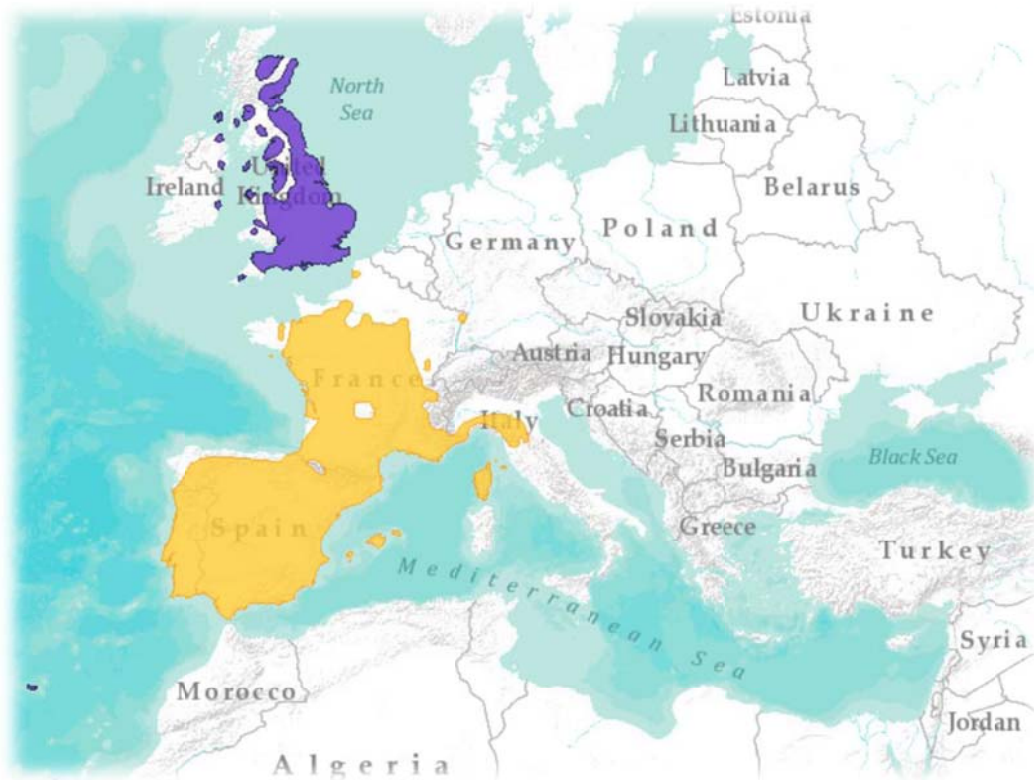


Figura 1: Distribución de *Alectoris Rufa*

A pesar de su amplia distribución (Figura 1), los cambios socio-económicos y ecológicos recientes han dado lugar a una disminución drástica de sus poblaciones

silvestres en el 95% de su área de distribución original (Duarte et al 2010; BirdLife International 2015). Esta situación ha convertido a la perdiz roja en una especie de especial interés para los gobiernos, los gestores medioambientales y ecologistas (Vargas et al., 2006), no sólo por su importancia socioeconómica como especies de caza (informe de la Real Sociedad Española de Caza 2011), sino también por ser un componente clave de la dieta de hasta 40 especies de depredadores en la Península Ibérica, incluyendo especies en peligro de extinción como el águila imperial (*Aquila adalberti*) o el águila (*Hieraaetus fasciatus perdicera*) (BirdLife International 2015).

La perdiz roja (*Alectoris rufa*) es la especie de caza menor más importante en España debido a sus características cinegéticas, lo que ha hecho de esta especie una pieza de caza codiciada y ha llevado a la realización de numerosos intentos por introducirla en lugares donde no existía. Es una Faisánida que pertenece al género *Alectoris*, integrado por especies que se distribuyen por tres continentes (Europa, África y Asia) y que incluye siete especies de perdiz, filogenética y morfológicamente muy próximas entre sí.

En el área mediterránea se localizan fundamentalmente cuatro especies independientes, adaptadas por evolución a las particularidades ecológicas de los diferentes hábitats que ocupan (Watson, 1962): la perdiz roja (*A. rufa*) extendida por Portugal, España, Francia, Reino Unido y el centro y noroeste de Italia; la perdiz griega (*A. graeca*) que puebla regiones del centro y sur de Europa, abarcando Francia, Italia y los Balcanes; la perdiz chukar (*A. chukar*) con un área de distribución que engloba desde el este de los Balcanes hasta Asia central y el noreste de China (Johnsgard, 1988; Aebischer and Lucio, 1997); y la perdiz moruna (*A. Barbara*) que habita en el norte de África, Gibraltar y el Archipiélago Canario (González, 2004). Filogenética y morfológicamente están muy próximas entre sí, hasta el punto de que hibridan tanto de forma natural en las zonas de contacto de sus áreas de distribución como en cautividad, produciendo descendencia fértil en la mayoría de los casos. Se han detectado cruces naturales entre la perdiz roja y la griega en Francia (Bernard-Laurent, 1984) y entre la griega y la chukar en Bulgaria (Dragoev, 1974). Dado el rango de distribución de la perdiz roja y la chukar, la hibridación entre ellas no debería ocurrir. Sin embargo, diversos estudios han encontrado la existencia de una polución genética

artificial en *A. rufa* y *A. graeca* por *A. chukar* (Randi et al., 2003; Barbanera et al. 2005; Barilani et al., 2007).

Dentro de la especie *A. rufa* se describen tres subespecies principales localizadas en el norte y oeste peninsular (*A. r. hispanica*), en el sur y este de la península (*A. r. intercedens*) y en Francia, noroeste de Italia e islas de Elba y Córcega (*A. r. rufa*) (Del Hoyo, Elliott y Sargatal, 1994). En la Península Ibérica, la perdiz roja es mucho más abundante en el centro (Castilla La Mancha, Extremadura, Castilla y León y norte de Andalucía) debido a su tipo de alimentación principalmente granívoro, ocupando las estepas de cereales. En la zona de los Pirineos, Cordillera Cantábrica y Sistema Ibérico habita también una faisánida perteneciente a un género diferente al de la perdiz roja, la perdiz pardilla (*Perdix perdix*), pero dado que se extiende por áreas montañosas, no ha interferido en la bioecología de la perdiz roja (Lucio, Purroy y Sáenz de Buruaga, 1992).

La perdiz roja es la especie de caza menor más importante en España debido a sus características cinegéticas (Vargas et al., 2006), destacando su peculiar y atractivo lance (Delibes, 1975), lo que ha hecho de esta especie una pieza de caza codiciada, llevando a la realización de numerosos intentos por introducirla en lugares donde no existía (Alonso, 1994; González, 2004). Su manejo y gestión hasta el comienzo de la década de 1940 se limitó a la caza de ejemplares silvestres y a impedir capturas excesivas o reservar su caza a las clases dominantes de cada época.

1.2. Censos y repoblaciones

Entre 1940 y 1950 se produjo una alarmante disminución de las poblaciones de perdiz debido, entre otras causas, a la creciente afición a la caza, el incremento de su valor, la mayor facilidad de desplazamiento de los cazadores, la mejora de las armas, la captura de perdices vivas para introducirlas o repoblar otros hábitats, la deforestación, el furtivismo y las mínimas sanciones que por ello se imponían (Silos, 1953; Negro et al., 2001; Randi et al., 2003). A principios de los 50 se creó el Servicio Nacional de Caza que comenzaría a realizar repoblaciones cinegéticas con perdices silvestres capturadas en fincas donde abundaban.

Ya en la época de los 60 empieza a surgir la polémica en torno a las repoblaciones debido al riesgo que supone para el equilibrio y la supervivencia de las comunidades locales la introducción de perdices alóctonas, puesto que entre las perdices rojas de distintas procedencias geográficas existen diferencias anatómicas y etológicas sutiles que constituyen variaciones locales originadas por adaptación a las condiciones del entorno (Aroca, 1954).

Por otro lado, para solventar el problema de la escasez de perdices salvajes se inició la cría de ejemplares en cautividad destinados a sueltas y repoblaciones. Aunque inicialmente fue difícil, en la primera mitad de la década de 1960 se sientan las bases científicas en España para la producción de perdices rojas en cautividad. En la actualidad existen unos 500 criaderos o explotaciones de diferente envergadura y nivel técnico, distribuidos por toda España, la mayoría de los cuales compran los perdigones nacidos y los crían hasta su venta, no interviniendo en el proceso reproductivo (González, 2004). En 1992 Pérez y Pérez estimaba la producción de estas aves en torno a seis millones de perdices al año. Con estos datos se puede concluir que la importancia económica del sector de granjas cinegéticas es enorme, existiendo industrias que ofrecen productos específicos para la cría de la perdiz roja en cautividad.

Aun así, no hay que olvidar que su cría en cautividad es complicada, además de que la repoblación con perdiz roja de granja ha generado nuevos problemas relacionados con la conservación y la gestión cinegética de las poblaciones silvestres.

La perdiz roja es una especie sedentaria y monógama. Durante la época de reproducción (de enero a verano) es territorial y lleva a cabo la puesta desde abril hasta julio de uno o dos nidos de 14 a 18 huevos, de los que nacen pollos nidífugos. En otoño se torna gregaria, constituyéndose los bandos otoñales que no se separarán hasta la siguiente temporada de reproducción cuando se forman las nuevas parejas (González, 2004). Dadas sus peculiaridades reproductivas y su carácter silvestre, la cría en cautividad de esta ave es problemática, ocasionándoles un estrés que implica elevados niveles de fracaso en el apareamiento de reproductores, un menor tamaño de la puesta, una menor viabilidad de los huevos y una inferior tasa de supervivencia de los perdigones criados, en comparación con los valores de los mismos índices en especies domésticas, con lo que el coste de producción es elevado. Esto ha llevado a

algunos criadores a recurrir a los cruces con otras especies de perdiz foráneas, principalmente *A. chukar*, debido a que existen estirpes seleccionadas para la producción de carne cuyo manejo y productividad en cautividad supera en gran medida a los de la agreste perdiz roja (Baratti et al., 2004; Barbanera et al., 2005; Martínez-Fresno et al., 2007). La repoblación incontrolada de estos híbridos puede llevar a una amplia introgresión en la perdiz roja de especies foráneas (Allendorf et al., 2001; Randi et al., 2003; Barbanera et al. 2007) y a una reducción del éxito de reintroducción (Rhymer y Simberloff, 1996). El problema surge cuando se intenta controlar la liberación al medio de estos ejemplares híbridos ya que su identificación por caracteres fenotípicos (por ejemplo el plumaje) es muy complicada más allá de la primera generación híbrida, diluyéndose las diferencias morfológicas a medida que aumenta el porcentaje de genes de la perdiz autóctona en sucesivos retrocruzamientos con *A. rufa* (Barilani et al., 2007; Negro et al., 2001). Sin embargo, la detección de estos híbridos es crucial para prevenir una mayor introgresión en la perdiz roja salvaje con la eliminación de esos híbridos y un programa de cría en cautividad que permita el estricto control de las granjas y de la repoblación con individuos criados en cautividad (Allendorf et al., 2001).

Sin embargo, la repoblación con perdices criadas en cautividad ha acarreado otros problemas, entre los que cabría destacar los riesgos de transmisión de enfermedades a las poblaciones salvajes, la adaptación a la cautividad y la disminución de la variabilidad genética de las subespecies y ecotipos silvestres que se distribuyen por la geografía peninsular (Rhymer y Simberloff, 1996). La cría en cautividad implica que sea el hombre, y no la naturaleza por presiones selectivas de adaptación al medio o por deriva genética, el que seleccione los individuos que va a cruzar, eligiendo como es natural a aquellos ejemplares cuya adaptación a la cautividad ha sido más efectiva, mostrando un comportamiento más dócil y una mayor prolificidad y producción. Esta selección artificial puede acarrear la pérdida de caracteres cinegéticos deseados, traduciéndose en un menor éxito de reintroducción y un amansamiento de la especie que no son achacables a la hibridación. De hecho, hay una percepción general entre los cazadores de que los individuos procedentes de la cría en granjas son de inferior calidad que los silvestres (Negro et al., 2001).

Uno de los problemas que se deriva de la cría en cautividad de la perdiz roja es el riesgo de transmisión de enfermedades a las poblaciones salvajes ya que, por un lado, se incrementa el riesgo de aumento de la virulencia de los patógenos por pases sucesivos de un animal a otro, y por otro lado, a menudo esos agentes infecciosos son característicos de los animales criados en cautividad por las condiciones particulares que se reúnen en las granjas (densidades elevadas, estrés...), por lo que la fauna silvestre no se ha visto expuesta a ellos previamente. Estas circunstancias, unidas a la evidencia de que los tratamientos sanitarios utilizados en explotaciones de perdices para disminuir la carga parasitaria no son eficaces, podrían constituir factores de riesgo para las poblaciones salvajes tras la realización de sueltas y repoblaciones, al transmitir al medio cepas fortalecidas y frente a las cuales estos animales tienen menor resistencia al no haber tenido contacto previo.

Este interés sobre la Perdiz Roja se ve frenado por su creciente reducción, lo que ha forzado a la liberación cada año millones de perdices criadas en cautiverio, lo que, a su vez, ha planteado nuevas dudas acerca de su hibridación con especies más productivas en las explotaciones, como *Alectoris chukar* (Barbanera et al. 2010), así como las cuestiones sanitarias (Millán et al. 2009), enfoque de la forma de gestionar el enfoque de la caza de la población silvestre. Dentro de ella, las enfermedades infecciosas han sido citadas como los principales factores que impulsan la dinámica de la población (Redpath et al 2006; Strauss et al 2012) potenciadas por las fluctuaciones climáticas que pueden conducir a un aumento en la distribución y extensión de los procesos parasitarios e infecciosos y a la reducción de su control natural por las bajas temperaturas en invierno. Estudios recientes han demostrado que las perdices criadas en cautiverio son vectores de importantes patógenos aviares como *Campylobacter* spp humana y, *Salmonella* spp., *Escherichia coli* o *Cryptosporidium* spp. (Pagés-Mante et al 2007, Díaz-Fernández et al 2013;... Máca et al 2015), y también que las reintroducciones parecen fallar en ausencia de tratamientos médicos para disminuir parásitos, entre otras medidas de gestión (Díaz-Fernández et al., 2013). Por otro lado, las enfermedades entéricas frecuentes como la coccidiosis pueden limitar el rendimiento en perdices rojas y dificultar su manejo sanitario en las granjas. Sin embargo, el uso de antimicrobianos en la producción avícola, tanto para combatir las

enfermedades y como promotores del crecimiento, se ha asociado con la aparición de resistencias a los antimicrobianos (Gyles, 2008; Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, 2010), lo que resulta en su prohibición como promotores del crecimiento de la Unión Europea desde 2006 (Cogliani et al., 2011).

Por lo tanto, la capacidad de responder a un amplio espectro de patógenos y agresiones ambientales serán una importante fuerza de supervivencia evolutiva de las poblaciones de perdiz roja que se enfrentan a los desafíos provocados por los programas de reposición y a los cambiantes escenarios climáticos. Esto hace de los genes asociados a la inmunidad un objetivo útil para el estudio de la variación genómica, que refleja en su estructura genética actual la interacción entre los procesos ecológicos evolutivos del pasado y presente.

También hay evidencias que sugieren que los tratamientos médicos utilizados en las granjas de aves de corral para reducir la carga de parásitos son ineficaces (Villanúa D, 2007 y 2008). Estas circunstancias, junto con la prohibición de los antibióticos para la prevención de enfermedades y promoción de crecimiento de la Unión Europea desde el año 2006 (Cogliani C, 2011), pueden ser factores de riesgo para las poblaciones silvestres después de la repoblación con animales de granja.

1.3. Sistema inmunitario en las aves

En comparación con los mamíferos, las aves tienen diferente repertorio de receptores de tipo Toll, defensinas, citocinas, quimiocinas, anticuerpos y otras moléculas inmunes. Las diferencias de las aves también incluyen la presencia de heterófilos en lugar de los neutrófilos de mamíferos, la falta de los ganglios linfáticos, o la presencia de la bolsa de Fabricio. Sin embargo, los principios básicos de IRs se mantienen constantes para todas las especies de vertebrados estudiados hasta la fecha, incluyendo las aves (Cotter PF, 2005)(Traver D, 2003). Muchos estudios han puesto de manifiesto el gran número de genes implicados en el IR aviar, donde se identificaron 400 de los 500 genes humanos relacionados con el GO término "inmunidad innata" en el pollo (Kaiser P, 2008). Todos los enfoques al genoma ya han investigado las modificaciones al transcriptoma aviar después de cambios

inmunológicos inducidos experimentalmente (Stockhammer OW, Zakrzewska A, Hegedûs Z, Spaink HP, Meijer AH, 2009 // Webster LMI, Paterson S, Mougeot F, Martinez-Padilla J, Piertney SB, 2011 // Bonneaud C, Balenger SL, Russell AF, Zhang J, Hill GE, Edwards SV, 2011 // Long Y, Song G, Yan J, He X, Li Q, Cui Z, 2013 // Luo C, Qu H, Ma J, Wang J, Hu X, et al., 2014 // Luo J, Carrillo JA, Menendez KR, Tablante NL, Song J, 2014 // Meitern R, Andreson R, Hõrak P, 2014 // Smith J, Sadeyen JR, Butter C, Kaiser P, Burt DW, 2015 // Wang W, Zhang T, Zhang G, Wang J, Han K, et al., 2015), lo que permite la caracterización del perfil del transcrito completo en respuesta a patógenos y externos agresiones y abriendo la posibilidad de mejorar la resistencia a enfermedades usando la selección asistida genoma (GAS).

Por lo tanto, la selección dirigida para aumentar la inmunidad general y, en consecuencia, mejorando la adaptación de las perdices al estrés puede ser una buena estrategia para obtener líneas "robustas" que a su vez ayudan a prevenir enfermedades en las granjas sin el uso de los tratamientos médicos.

Todo ello conduce al desarrollo de este trabajo, en un primer paso con el ensamblado *de-novo* del transcrito de la perdiz roja que facilita el segundo paso de caracterización transcriptómica de las respuestas inmunes innata y adquirida como recurso para la selección de fortaleza inmunológica.

1.4. Desafíos infecciosos versus no infecciosos

El fundamento de este trabajo reside en la obtención de una herramienta molecular que permita seleccionar perdices con una mayor capacidad de reacción frente a patógenos y otras agresiones externas, lo que aumenta su resistencia a enfermedades infecciosas y minimiza de este modo el aumento de virulencia de los patógenos por pases sucesivos entre animales y la subsiguiente transmisión al medio de cepas fortalecidas.

Una parte importante del trabajo se centró en la cría de perdices, estandarizada y sincronizada semanalmente, para la posterior realización de desafíos no infecciosos, lo que permitió su clasificación en función de la magnitud de la

magnitud de su respuesta inmune (RI) ante dos desafíos no infecciosos. Esta fase proporcionó las muestras sobre las que se desarrolló posteriormente la búsqueda de marcadores moleculares necesarios para poder llevar a cabo la selección de genotipos resistentes a enfermedades infecciosas.

Los protocolos necesarios para llevar a cabo métodos inmunológicos (que necesitan cultivos celulares, citometría de flujo, ensayos ELISA) requieren de mucha experimentación y optimización para su adaptación a especies no domesticadas. Se han desarrollado en los últimos años una variedad de métodos que permiten estudiar la inmunotoxicidad e investigar los mecanismos inmunotóxicos en aves (Fairbrother A, Smits J, Grasman KA, 2004 // Grasman KA, 2002). Estos métodos son tests funcionales in vivo que se emplean en estudios de campo en un gran abanico de especies de aves. Estos ensayos se pueden utilizar de forma individual, pero si son usados en conjunto permiten detectar e identificar un rango grande de funciones inmunológicas. De esta manera son los tests de fitohemaglutinina (PHA) y SRBC que se caracterizan por ser no letales, mínimamente invasivos y sencillos de aplicar en poblaciones de aves como la perdiz. No requieren reactivos específicos de especie ni un equipamiento de laboratorio especial.

El test de respuesta en la piel al PHA es un método in vivo que mide la inmunidad mediada por linfocitos T. Mide la inflamación causada por leucocitos inflamatorios y la infiltración de fluidos después de una inyección intradérmica de PHA. Los mitógenos como el PHA son derivados de la lectina que es una proteína de plantas o bacterianas que se une a unos componentes específicos de azúcar de las glicoproteínas unidas a la superficie de las células. PHA se une específicamente a la superficie de los linfocitos T. En el test de respuesta de la piel, PHA estimula los linfocitos T para que suelten linfoquinas, resultando en un incremento en la permeabilidad vascular y en la generación de una gran variedad de leucocitos. of cells. Por lo tanto este test prueba funciones de célula T concretas. Un gran incremento en el grosor de la piel indica una respuesta inmune mediada por células T importante.

1.4.1. Inmunidad adquirida

Los tests de aglutinación miden la producción de anticuerpos específicos después de la inyección con antígenos extraños. El plasma sanguíneo recogido 6-7 días después de la inmunización se diluye de forma seriada y se incuba con una cantidad fija de antígeno. Los anticuerpos forman complejos visibles con antígenos grandes e insolubles. La recíproca de la mayor dilución con anticuerpo a la cual se forma un complejo visible entre el antígeno y el anticuerpo se define como el título. Un título alto indica una respuesta de anticuerpos a la inmunización original.

Estos tests hacen uso de las células de glóbulos rojos de otras especies, generalmente ovejas, como antígenos.

Es posible realizar una segunda inmunización después de la primera recogida de muestras para estimular una respuesta de anticuerpos secundaria o de memoria. La hemaglutinación aviar anti-SRBC es muy similar en principio al ensayo que genera placas anti-SRBC esplénicas y el anti-SRBC ELISA que se utiliza en roedores de laboratorio, que se consideran como unos métodos inmunotóxicos extremadamente sensibles.

Se pueden realizar pruebas de hemaglutinación con glóbulos rojos de oveja para medir la RI adquirida, que consisten en la inoculación intramuscular de una suspensión de eritrocitos de oveja que van a desencadenar una RI específica en las peridices mediada por anticuerpos. Para determinar el título de anticuerpos totales y de inmunoglobulinas G (IgG) generado por cada individuo se realiza una prueba de hemaglutinación con diluciones seriadas de plasma sanguíneo. El diferencial entre anticuerpos basales (antes de la inoculación de eritrocitos de oveja) y anticuerpos finales (después de la inoculación) varía de 0 a 12.

Las características de órganos inmunes primarios como es la bolsa de Fabricio (lugar de maduración de los linfocitos B en aves) y el timo (lugar de maduración de los linfocitos T) genera datos importantes sobre el desarrollo inmunológico. Lo mismo ocurre con el bazo, un órgano de inmunidad secundario que indica el estatus infectivo.

1.4.2. Inmunidad innata

Debido a los requisitos que conlleva la realización de desafíos con un agente infeccioso, como son el disponer de unas instalaciones con medidas de seguridad especiales y la petición de permisos oficiales, se optó por realizar un desafío no infeccioso aplicando dos metodologías ampliamente probadas en aves que miden, por un lado, la RI innata utilizando el test en piel con fitohemaglutinina (PHA, lectina de origen vegetal). Y por otro, la RI adquirida, basada en la producción de anticuerpos, mediante la prueba de hemaglutinación con glóbulos rojos de oveja. De este modo la realización de los desafíos no infecciosos no supuso ningún riesgo sanitario para la explotación y no fue necesario el sacrificio de los animales utilizados en estos experimentos al ser un tratamiento totalmente inocuo, siendo aptos para el consumo y la suelta en el medio. Estos desafíos permitieron seleccionar los animales que presentaban los dos extremos –alto y bajo- de RI innata y adquirida frente a todo tipo de infecciones, para su utilización en los estudios genómicos. Se realizaron sobre grupos de 300 individuos, sincronizando la eclosión de los para que estuvieran separados por un periodo de dos semanas del siguiente grupo, evitando así que se incrementara la edad de los animales experimentales a lo largo de los desafíos no infecciosos. De las 2.084 perdices que llegaron al final del proceso de clasificación, se seleccionaron los 168 animales con RI más extremas y se sacrificaron, conservando para etapas posteriores los órganos del sistema inmune (bazo, tonsilas cecales, timo y bolsa de Fabricio) y el tejido del área interdigital donde se inyectó PHA.

1.5. Estudio del Transcriptoma

Son posibles dos abordajes en el estudio del transcriptoma en una especie como la perdiz que carece de estudios genómicos previos: la utilización de información transcriptómica de una especie como el pollo, cuyo proyecto genoma se finalizó en el 2004) o la generación “de novo”.

1.5.1. RNA-seq

El transcriptoma es el conjunto completo de los transcritos de una célula y su cantidad en un estadio de desarrollo específico o una condición fisiológica. Su comprensión es fundamental para interpretar los elementos funcionales de un genoma e identificar los elementos moleculares que constituyen las células y los tejidos, además de entender el desarrollo y la enfermedad.

Las claves de la transcriptómica son:

- Catalogar todos los tipos de transcritos, incluyendo ARNm, ARN no codificantes y ARN de pequeño tamaño (small RNAs) para determinar la estructura transcripcional de los genes en términos de sitios de iniciación, terminaciones en 5' y 3', patrones de splicing y otras modificaciones post-transcripcionales.
- Cuantificar los cambios de expresión en cada transcrito durante el desarrollo y bajo diferentes condiciones

Son varias las tecnologías que se han desarrollado para deducir y cuantificar el transcriptoma incluyendo técnicas de hibridación o basadas en la secuencia de los transcritos.

Las técnicas basadas en la hibridación suelen utilizar cDNA marcado con fluorescencia con microarrays "caseros" o microarrays comerciales de oligos de alta densidad. Los microarrays con oligonucleótidos que representan el genoma a una densidad alta permiten el mapeo de regiones transcritas a una resolución muy alta desde algunas pares de bases hasta unos 100 pb. Estos métodos son relativamente baratos, pero tienen varias limitaciones que incluyen la necesidad de un conocimiento previo sobre la secuencia genómica, los niveles de hibridación cruzada que emiten ruido de fondo, un rango limitado de detección tanto por el ruido de fondo como por la saturación de las señales de hibridación (Okoniewski MJ, Miller CJ, 2006).

Además la comparación de los niveles de expresión entre diferentes experimentos se vuelve dificultosa y requiere de métodos de normalización complicados.

1.5.2. Utilización de microarrays de *Gallus gallus*

Hasta hace poco, la caracterización de genes se llevaba a cabo de forma individual, incorporando estudios estructurales (secuenciación) y funcionales (experimentación). Hoy en día es posible adscribir funciones provisionales a genes en base a comparaciones entre secuencias pertenecientes a distintas especies, géneros, familias, etc. Estos análisis, denominados in-silico, requieren la secuenciación de una parte importante del genoma de la especie lo que, hasta hace poco, limitaba su aplicación en pollo. En el artículo publicado en 2004 por Smith et al. se identifican por este método genes relacionados con la inmunidad en gallo que incluyen interleuquinas, factores de transcripción, quimioquinas, antígenos de diferenciación, receptores, genes involucrados en las rutas Toll y genes asociados con el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC). Asimismo, numerosos trabajos describen asociaciones de genes concretos con enfermedades infecciosas aviares como la coccidiosis (Hong et al., 2008), la influenza aviar (Sironi et al., 2008), la malaria (Bonneaud et al., 2006), la salmonelosis (Leveque et al., 2003; Iqbal et al., 2005; Higgs et al., 2006) o con la tasa de muerte embrionaria (Wu et al., 2008). Todas estas investigaciones proporcionan una valiosa fuente de información para la realización e interpretación de microarrays en pollo.

Los microarrays (chips de ADN) son utilizados para la cuantificación de los niveles de expresión de genes en diferentes individuos, tejidos, tratamientos, etc. que pueden venir dados por diferencias genéticas o ambientales. Con esta tecnología podemos observar de forma simultánea y casi instantánea la expresión de todos los genes de un organismo, consiguiendo identificar aquellos asociados a determinadas enfermedades por comparación de los niveles de expresión entre animales susceptibles a esa enfermedad y animales que, a pesar de haber compartido el mismo manejo y condiciones de cría, no se han visto afectados por el proceso morboso.

Affymetrix y Agilent Technologies han desarrollado chips de ADN basados en el genoma de gallo, los cuales usaremos para la localización en el genoma de perdiz de genes candidatos para la búsqueda de SNPs asociados con resistencia a distintas enfermedades. Esta propuesta viene avalada por el éxito obtenido en el diseño de

cebadores a partir de genoma de gallo durante el proyecto CDTI de 2006-2009, consiguiendo amplificación en el 72 % de los casos en el género *Alectoris* (Sevane et al., 2010), por trabajos de otros autores como Backstöm et al. (2008) en el que se consiguió un éxito de amplificación a partir del genoma de gallo del 83% en el herrerillo común, del 79% en el carricero común (*Acrocephalus arundinaceus*) y del 78% en el halcón peregrino, y por la exitosa utilización de chips en especies distintas para la que estaba diseñado (chip humano utilizado en mono rhesus) como refleja el trabajo de Kayo et al. (2001).

La utilización de microarrays de *G.gallus* se puede realizar mediante los chips de Affymetrix o de Illumina. Los resultados obtenidos con esta técnica no fueron satisfactorios, con una especificidad y sensibilidad en la hibridación del ARN de perdiz al chip de pollo insuficientes para la obtención de resultados con una calidad mínima que permitiera llevar a cabo el análisis de diferencias de expresión génica, por lo que se optó por realizar la secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (*RNA-Seq*).

En cambio frente a los métodos de microarrays, las técnicas basadas en la secuencia determinan directamente la secuencia de ADNc. En un principio se utilizaba la técnica de secuenciación de Sanger para secuenciar el ADNc o las genotecas de EST (Boguski MS, Tolstoshev CM, Bassett DE Jr, 1994) pero esta técnica no admite un alto throughput, es cara y no permite cuantificar los transcritos lo que llevó a que se fuesen desarrollando otros métodos que incluyen el *serial analysis of gene expression* (SAGE) (Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW, 1995), o la *massively parallel signature sequencing* (MPSS) (Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridge RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K, 2000). Estos métodos de secuenciación son de alto throughput y pueden generar unos niveles de expresión génica precisa y “digital”. Sin embargo todas se basan en la tecnología Sanger y una porción significativa de etiquetas cortas no se puede mapear de forma única en el genoma de referencia. Además, hay que señalar que solamente se analiza una parte de los transcritos y las isoformas no se pueden distinguir unas de otras. Estas desventajas limitan el uso de la tecnología de secuenciación tradicional para anotar la estructura de los transcriptomas.

Sin embargo, en los últimos años el desarrollo de métodos de secuenciación de ADN de alto throughput han permitido que se genere también un método para mapear y a la vez cuantificar los transcriptomas. Este método llamado RNA-Seq (Secuenciación de ARN) tiene unas ventajas claras sobre otras técnicas. En primer lugar, el RNA-Seq no se limita como los métodos basados en la hibridación, a la detección de transcritos que corresponden a secuencias genómicas existentes. Este hecho, hace especialmente atractiva la metodología RNA-Seq para la secuenciación de especies cuyo genoma es desconocido como en el caso de la perdiz. Además, RNA-Seq puede detectar la variación de secuencias (como por ejemplo SNPs) en las regiones transcritas.

Una segunda ventaja de RNA-Seq sobre los microarrays de ADN es la muy baja señal de ruido de fondo, debido a que las secuencias de ADN se mapean sin ambigüedades a regiones únicas del genoma. La técnica de RNA-Seq no tiene un límite superior de cuantificación, que está correlacionado con el número de secuencias obtenidas. Por lo tanto tiene un gran rango dinámico de niveles de expresión por encima del cual se pueden detectar los transcritos. Así, por ej. se detectó en *Saccharomyces cerevisiae* una expresión de 9000 en un estudio que analizó 16 millones de reads (Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M, 2008) y en el ratón se estimó un rango que suponía cinco ordenes de magnitud en 40 millones de reads (Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, 2008).

RNA-Seq es además muy preciso para cuantificar niveles de expresión, tal y como se determinó en comparación con la utilización de qPCR y con RNAs de concentración conocida (Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, 2008). Finalmente, los resultados de RNA-Seq muestran niveles altos de reproducibilidad, y no requiere de cantidades grandes de ARN (Wang Z, Gerstein M, Snyder M, 2009).

1.6. Ontología

La secuenciación genómica ha permitido ver que una fracción amplia de los genes responsables de las funciones biológicas centrales es compartida por todos los

eucariotas. El conocimiento del papel biológico de estas proteínas compartidas en un organismo se puede generalmente transferir a otros organismos. Con el objetivo de compartir esta información aparece el Consorcio de Ontología Génica (GO) buscando generar un vocabulario que se pueda aplicar a todos los eucariotas aunque el conocimiento de los genes y las acciones de las proteínas se acumule y cambie. Si bien esta ontología se puede descomponer en tres ontologías, cada cual representando un concepto clave en biología molecular: la función molecular de los productos génicos, su rol en los procesos biológicos de múltiples direcciones, y su localización en componentes celulares (The Gene Ontology Consortium, Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G, 2000).

Cada término GO consiste en un único identificador alfanumérico, un nombre común, sinónimos (si son de aplicación), y una definición. Los términos son clasificados en solo una de las tres ontologías, las cuales están estructuradas, cada una de ellas, como un grafo dirigido acíclico (Figura 2). Las ontologías se actualizan continuamente en un intento de mejorar su utilización.

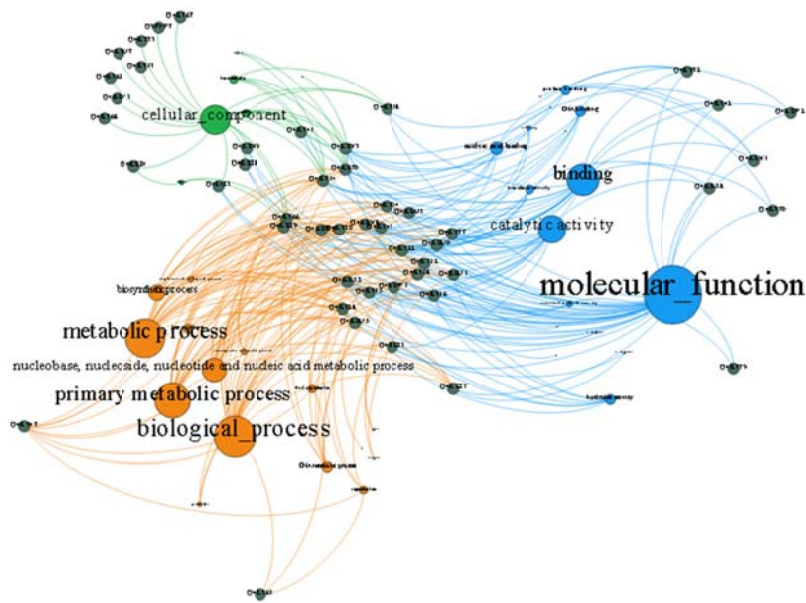


Figura 2: Ontologías

En los últimos años ha habido varios intentos de desarrollo de software de ontología:

- GO::TermFinder que contiene unos módulos Perl para acceder a la información de GO y que evalúa y visualiza la anotación colectiva de una lista de genes en términos GO. (Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G, 2011).
- DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery), un recurso bioinformático que consta de una base de datos de conocimiento biológico integrado y de herramientas analíticas que tiene el objetivo de extraer sistemáticamente un conocimiento biológico de listas grandes de genes o proteínas. El procedimiento analiza una lista de genes que contiene un número de identificadores comunes y la analiza utilizando uno o más herramientas de texto o búsqueda de rutas metabólicas como una clasificación funcional del gen, De esta manera se puede llevar a cabo un entendimiento profundo de los temas biológicos en las listas de genes que están enriquecidas en los estudios realizados a escala genómica. (Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA, 2008).
- AgBase es una colección de recursos *'open-source'* accesibles vía web destinados al análisis funcional en procesos génicos biológicos que empleen modelos biomédicos. Permite la normalización de contenidos al emplear vocabulario desarrollado por GO. Permitiendo recuperar con Genome2Seq archivos FASTA (formato de fichero de texto plano muy utilizado en bioinformática para representar secuencias de ácidos nucleicos en el que los aminoácidos se representan en códigos de letras únicas con admisión de comentarios y etiquetados precediendo a las secuencias, que está orientado a su tratamiento por lenguajes de scripting como Perl) de secuencias a partir de fragmentos RNA-Seq.
- EasyGo (Universidad Agrícola de China) está diseñado para facilitar los análisis de biología experimental identificando términos GO en listas de

microarray. Siendo al mismo tiempo una base de datos GO enfocada en especies agrícolas de las que soporta 30.

- GOAT (Universidad de Manchester) es una herramienta que presenta la particularidad de usar directamente la versión DAML+OIL de GO. Empleando para su definición un 'schema' RDF (lenguaje primitivo de ontologías que proporciona los elementos básicos para la descripción de términos).
- Gorila (Technion - Laboratorio de Biología Computacional, Israel Institute of Technology) es una herramienta GO para la visualización de términos en listas clasificadas de genes. Utiliza dos enfoques, primero mediante la búsqueda de los términos GO enriquecidos que aparecen densamente en la parte superior de una lista clasificada de genes y segundo, mediante la búsqueda de los términos de GO enriquecido en una lista principal de genes en comparación con una lista secundaria de genes. Otro aspecto diferencial de Gorila es su solución gráfica (Figura 3)

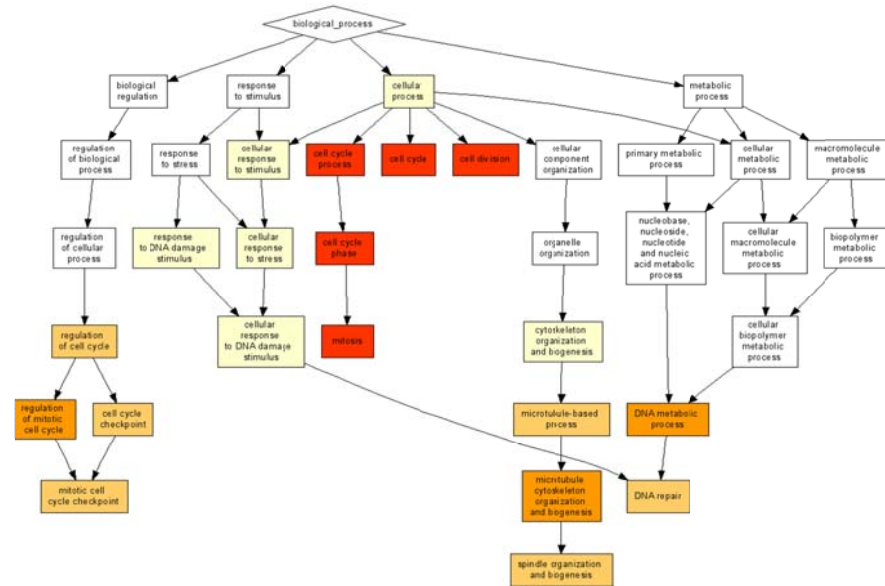


Figura 3: Ejemplo de salida de Gorila

2. OBJETIVOS

El objetivo general es la selección de genotipos resistentes a enfermedades infecciosas, minimizando de este modo el aumento de virulencia de los patógenos por pases sucesivos entre animales y la subsiguiente transmisión al medio de cepas fortalecidas.

Para la consecución del objetivo es necesario abordar los siguientes objetivos parciales:

1. Obtención de ejemplares que presentan diferencias en la intensidad de la respuesta inmune (RI) frente a un agente infeccioso.
2. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (*RNA-Seq*): obtención de un transcriptoma de referencia en perdiz.
3. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (*RNA-Seq*): medida de la expresión génica diferencial en bazo y área de inyección de PHA.
4. Análisis de la Ontología Génica.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Material animal

Se partieron de 2100 perdices de las que se seleccionaron 700 (350 hembras y 350 machos). Este alto número de animales se utilizó para asegurar la obtención de 300 parejas después del periodo reproductivo y poder establecer parejas monógamas estables. Se llevó a cabo la cría quincenal de 300 perdices hasta alcanzar las 700 incluidas en los desafíos no infecciosos. La consecución de este objetivo fue posible gracias al tipo de producción de ciclo cerrado que aplica Agrocinegética Perdices Altube S.A. (empresa con la que se colaboró en este proyecto) en su producción de perdices rojas. Es decir, en sus instalaciones se realizó la reproducción de los animales, la incubación de sus huevos, y la cría y recría de las perdices durante todo el periodo del experimento. No solo se cubrieron todas estas etapas, sino que la empresa también fabricó el alimento que las aves recibieron, de manera que se controló todo el proceso productivo. Con la elaboración en la propia explotación del alimento consumido por las perdices, se consiguió controlar y estandarizar de forma precisa la dieta de los animales incluidos en el experimento. Los distintos análisis tanto de las materias primas como en el pienso que alimentó a las perdices fue realizado por Galeno & Vidal. Se realizaron análisis básicos como el contenido en humedad, proteína, grasa, fibra bruta, cenizas, impurezas, materias extrañas, etc. También se llevaron a cabo análisis complementarios como el contenido en calcio, fósforo, aminoácidos, etc. Finalmente, se realizó el análisis de contaminantes para asegurar que el pienso proporcionado a las perdices carecía de micotoxinas, plaguicidas, metales pesados, etc., así como los análisis necesarios para asegurar la correcta potabilidad del agua de bebida utilizada en la hidratación de las perdices. De esta forma se consiguió minimizar la exposición de los animales a cualquier tipo de patógeno que pudiera introducir un sesgo en la magnitud de la RI de las perdices a los desafíos no infecciosos.

De estas 2100 perdices se utilizaron 600 individuos para los desafíos no infecciosos con PHA y SRBC. Carecemos de estudios previos en la perdiz roja que permitan fijar un número suficiente de individuos para realizar estos desafíos y para realizar un análisis de expresión diferencial en tejidos inmunológicos, por lo que optamos por utilizar 600 individuos como un número razonable de muestras para la detección de asociaciones y diferencias biológicamente significativas entre animales que presentan resistencias inmunes extremas. Nos basamos en diseños experimentales realizados en el pollo (Biscarini F, Bovenhuis H, van Arendonk JA, Parmentier HK, Jungerius AP, van der Poel JJ, 2010 // Bovenhuis H, Bralten H, Nieuwland MG, Parmentier HK, 2002) para obtener asociaciones entre marcadores moleculares e IR innatas y adaptativa para los cuales se utilizaron 583 gallinas y líneas seleccionadas de forma divergente en relación a la titulación de anticuerpos en incremento y descenso basándose en poblaciones con 614 pájaros.

Para sincronizar y estandarizar la cría de las perdices incluidas en el experimento, se han seleccionado dos eclosiones separadas por una semana. Todos los individuos estuvieron sometidos a las mismas condiciones ambientales y a la misma alimentación. Los individuos se estudiaron a una edad de siete meses, edad a la cual se sometieron a los desafíos no infecciosos durante tres días consecutivos por semana para permitir un manejo correcto teniendo en cuenta el número de animales y el personal disponible para realizar estas tareas.

La producción de pollitos sanos y vigorosos quedó garantizada por una moderna sala de incubación dedicada exclusivamente a la incubación de huevos de perdiz roja. Esta sala cuenta con 10 máquinas incubadoras y 10 nacedoras, pudiendo ampliarse hasta lograr un total de 12 incubadoras y 12 nacedoras (Figura 4). Cada incubadora tiene capacidad para incubar 96.000 huevos de perdiz, lo que da una idea de las dimensiones de la sala de incubación. Con la coordinación de la eclosión de los huevos de acuerdo al plan de trabajo fijado en el proyecto, se consiguió el nacimiento quincenal de 400 pollitos (100 más de los necesarios por grupo) durante un periodo de tres meses y medio. El objetivo era garantizar un número suficiente de machos y hembras que sobrevivieran a la etapa de recría y se emparejaran adecuadamente a su entrada a los núcleos de reproducción. De esta forma se consiguió la formación de las

parejas incluidas en el experimento y permitió la posterior realización de los desafíos no infecciosos siguiendo un cronograma quincenal.



Figura 4: Sala de incubación

Los reproductores utilizados en este proyecto se criaron hasta el momento de su emparejamiento en el centro de cría de Vizmallo (Burgos) (Figura 5).



Figura 5: Centro de cría de Vizmallo (Burgos)

Todos los animales que murieron desde la eclosión de los huevos hasta el final del proyecto, fueron sometidos a análisis anatomopatológicos, realizados por el

Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, e higiénico-sanitarios, realizados por el Laboratorio LABDIAL, para descartar la presencia de enfermedades u otros problemas higiénico-sanitarios. Se determinó la presencia de *E. coli*, *Salmonella* spp., Micoplasmosis, etc. Se realizaron los recuentos de microorganismos analizados y la serología necesaria.

La empresa GALENO & VIDAL realizó distintos análisis tanto en las materias primas como en el pienso que alimentó a las perdices. Realizó análisis básicos como el contenido en humedad, proteína, grasa, fibra bruta, cenizas, impurezas, materias extrañas, etc. También llevó a cabo análisis complementarios como el contenido en calcio, fósforo, aminoácidos, etc. Finalmente, realizó análisis de contaminantes para asegurar que el pienso proporcionado a las perdices carecía de micotoxinas, plaguicidas, metales pesados, etc. En estos laboratorios también se realizaron los análisis necesarios para asegurar la correcta potabilidad del agua de bebida utilizada en la hidratación de las perdices.

El Hospital Clínico Veterinario de la Facultad de Veterinaria de la UCM realizó principalmente la analítica sanitaria, concretamente llevó a cabo los análisis anatómicos y patológicos en las perdices que se remitieron al Hospital Clínico.

Tanto al laboratorio Regional de Castilla-León, ubicado en León, como a Cesfac, ubicado en Reus, analizaron muestras oficiales de control. Las muestras fueron tomadas por el personal propio de la empresa y por técnicos de la Administración. Estos análisis se realizaron para cumplir el Plan Sanitario Avícola, que obliga a demostrar que los huevos, los pollitos de un día, las aves de recría y las reproductoras están libres de *Salmonella* spp., micoplasmosis, enfermedad de Newcastle e Influenza aviar.

3.2. Desafíos no infecciosos

Se inyectó 0,2 ml de una suspensión de glóbulos rojos de oveja (SRBC) en el muslo. El plasma sanguíneo se recogió el día 0 previo a la inoculación con la suspensión SRBC y seis días después de la inmunización, y fue diluido de forma seriada por

duplicado e incubado con SRBC 0,25% para medir la titulación de anticuerpos total (AbTot). Para medir la actividad IgG, se añadió al plasma sanguíneo 25 ml de 0.20 M 2-mercaptoethanol en un tampón salino normal, diluido de forma seriada por duplicado e incubado con SRBC al 0.25%. En ambos casos se definió como el título, al \log_2 de la recíproca de la mayor dilución de anticuerpos para la cual se genera un complejo visible entre el antígeno y el anticuerpo. Un título alto indica una respuesta fuerte de anticuerpos a la inmunización original. El día 5 del experimento, se inoculó 0.1 ml de 1.6 mg/ml PHA disuelto en phosphate buffer saline (PBS) en la piel interdigital de una pata y 0.1 ml de PBS en la otra pata. Tanto previamente como 24 horas (± 2 h) después de la inyección, se midió el grosor de la piel interdigital de cada pata y se calculó el índice de estimulación mitógena (MSI) como el incremento del grosor interdigital de la piel causado por PHA menos el incremento generado por el PBS. Un incremento importante en el grosor de la piel indica una gran IR mediada por células T.

Se seleccionaron las veinticuatro perdices de cada grupo de eclosión que mostraron los valores más altos y las veinticuatro que mostraron los valores más bajos para IR innata y adquirida. Se sacrificaron por dislocación cervical un total de 96 animales el día 7 del experimento. Se muestrearon los tejidos linfoides más relevantes de cada uno de estos animales: el bazo, el timo, la bolsa de Fabricio y las tonsilas cecales, y la piel del área de inyección de PHA.

Estas muestras se conservaron en RNAlater (Life Technologies) para mantener el ARN sin dañar. Concretamente, los tejidos linfoides y la piel se tomaron en el momento del sacrificio y se introdujeron en RNAlater. Después de 24h a 10°C, las muestras se sacaron de este conservante y se congelaron a -80°C.

El resto de los animales (504) se mantuvieron en producción al no representar ni para los propios animales ni para los demás individuos de la granja ningún riesgo los desafíos no infecciosos a los que fueron sometidos (Grasman KA, 2010). Por lo tanto, los 504 animales no sacrificados se devolvieron a la rutina de la granja después de los desafíos no infecciosos.

El protocolo empleado para los animales fue aprobado por el Comité de Ética y de bienestar animal de la Universidad Complutense de Madrid (CEA-UCM/32). Los

pájaros fueron manipulados de acuerdo a los principios de cuidado de los animales de experimentación establecidos en el Real Decreto 1201/2005 (Boletín Oficial del Estado (BOE), 2005).

3.3. Extracción de ARN y RNAseq

Después de realizar los desafíos no infecciosos, se seleccionaron del grupo de 96 individuos, los 16 animales que mostraban los IR tanto innata como adquiridas más bajos y más altos.

El ARN total se extrajo a partir de 25 mg de tejido de bazo utilizando RNeasy Tissue Mini Kit, y de 100 mg de piel del área de inyección de PHA RNeasy Fibrous Tissue Kit (QIAGEN, Izasa, Spain) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El ARN total extraído se mantuvo a -80 °C hasta su secuenciación. Se midió tanto la pureza del ARN como su integridad por nanoelectroforesis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies) obteniendo valores de optimal RNA Integrity Number (RIN) que mostraron un rango entre 8.8 and 10.

Se realizaron cuatro grupos (pooles) que estaban formadas por cantidades equivalentes de muestras de bazo pertenecientes a cuatro individuos que mostraban IR más alta (un pool más una replicación) e IR más baja (un pool más una replicación) en los grupos de IR. Se utilizó el mismo procedimiento para conseguir cuatro pooles a partir de muestras de piel.

Las genotecas de mRNA se prepararon siguiendo los protocolos estándar de Illumina (Illumina, San Diego, USA). Las muestras de ARN total (1-4 µg) se trataron con DNasea y fueron enriquecidas usando etiquetas oligo(dT), y se fragmentaron. Cada muestra de poly(A) ARN (0.2–1 µg) se fragmentó en fragmentos de 200–500 pb y se prepararon genotecas de secuenciación de nueva generación (next-generation sequencing (NGS) libraries), siguiendo estrictamente los procedimientos TruSeq de Illumina.

Después de controlar el tamaño de los fragmentos (media para cada genoteca ~280 pb) y de cuantificarlos, se mezclaron las genotecas y se establecieron a una concentración final de cerca de 10 pM en un Illumina SR-flowcell usando un Cluster Station (Illumina). La secuenciación se llevó a cabo en una carrera de un solo extremo (single-end-read), 1 x 76-base mode en un GAIIx Sequencer (Illumina, Unidad de Genómica, Parque Científico de Madrid) mediante química de sequencing-by-synthesis (SBS) y corriendo cuatro muestras etiquetadas con códigos en una carrera es decir que se realizó una secuenciación por multiplex. Siguió un filtrado de calidad de forma automática de acuerdo a las especificaciones de Illumina, y las lecturas individuales se aislaron de la multiplex mediante el CASAVA pipeline (Illumina v1.8.2), obteniéndose archivos FASTQ que se utilizaron en análisis bioinformáticos subsiguientes. Todos los archivos FASTQ files se enviaron a NCBI Sequence Read Archive (SRA) con un número de acceso PRJNA268542.

3.4. Análisis bioinformático de los datos RNA-seq

Para cada muestra, se realizó un filtrado con PRINSEQ (versión 0.20.4) (Schmieder R, Edwards R, 2011) a las lecturas (reads) con un índice de calidad de Q > 20 para generar un archivo FASTQ completo. Los reads pre-procesados se mapearon a la secuencia referencia del genoma de pollo (Galgal4.74) usando Bowtie 2 (versión 2.2.1) (Langmead B, Salzberg S, 2012) con los parámetros --local -D 20 -R 3 -N 1 -L 20 -i S,1,0.50. Los archivos SAM generados por Bowtie 2, que contienen los reads por base alineados a cada sitio a lo largo del genoma, se convirtieron en formato binary alignment/map (BAM) y se ordenaron mediante SAMTools (versión 0.1.18) (Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al., 2010). Los reads alineados se ensamblaron en transcritos y su abundancia relativa se midió con Cufflinks (versión 2.1.1) (Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, et al., 2010) con el parámetro--multi-read-correct. Los transcritos ensamblados se juntaron con la anotación de referencia (Gallus_gallus.Galgal4.74.gtf, a partir de Ensembl) utilizando cuffmerge. El análisis de expresión diferencial se realizó con cuffdiff con el parámetro -upper-quartile-norm. Tanto el ensamblaje unido como los alineamientos de

fragmentos generados por Bowtie 2 y convertidos a un formato sorted.bam con SAMTools se usaron como archivos input. Cuffdiff calcula, después de estimar como varían los contajes de reads para cada gen a lo largo de las réplicas, la significación de los cambios observados en la expresión: P valores (los P value no corregidos del test estadístico), y los valores q (que representa el false discovery rate (FDR)-adjusted P value del test estadístico). Esta significación depende de si P es mayor que FDR después de una corrección para tests múltiples de Benjamini-Hochberg correction (los valores q entre 0 and 0.5 indican cambios significativos). La aplicación de software R CummeRbund (version 2.6.1) (R Core Team, 2014 // Goff L, Trapnell C, Kelley D, 2012) se usó para visualizar los resultados del análisis de RNA-seq.

3.5. Ontología de genes (GO) y análisis de enriquecimiento KEGG pathway

Los sistemas de clasificación GO se usan para asignar una función putativa a cada clon mediante un proceso biológico, una función molecular y sus componentes celulares. Todos los análisis se llevaron a cabo sobre dos listas de genes independientes que contenían genes significativamente ($0 \leq q \leq 0.5$) regulados o inhibidos.

Utilizamos la Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) v6.7b (Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA, 2009) para determinar las rutas metabólicas y los procesos de mayor significación biológica a través de la herramienta Functional Annotation Cluster (FAC) que se basa en la función de anotación de GO. Se seleccionaron parámetros con valores de stringency ease altos para obtener unos valores de enriquecimiento suficientemente precisos.

El algoritmo para la reconstrucción del método de redes celulares (accurate cellular networks (ARACNE)) también sirvió para identificar parejas de genes co-regulados con una significación estadística alta usando información mutua y data processing inequality (DPI) para eliminar relaciones indirectas (Margolin AA, Nemenman I, Basso K, Wiggins C, Stolovitzky G, et al., 2006). Después de la

construcción de las redes reguladoras con ARACNE, usamos Cytoscape's (version 3.1.1) (Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, et al., 2003) plugin BiNGO (v.2.44) (Maere S, Heymans K, Kuiper M, 2005) para realizar los análisis de enriquecimiento de rutas GO. Se utilizó el test hipergeométrico para identificar los términos de rutas GO sobre-representados con un nivel de significación de 0.05 y se corrigieron los p-valores con el método de Benjamini-Hochberg.

La herramienta Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway se utilizó online mediante la herramienta DAVID para visualizar los clusters de mapas de los genes de perdis incluidos en las rutas más comunes y los procesos tanto para entender rutas específicas como para tener una visión molecular global.

3.6. Validación con PCR a tiempo real (qPCR)

Para confirmar los datos RNA-seq, se seleccionaron cinco genes regulados en el bazo (*AVD*, *CTSD*, *NOV*, *SOX13*, and *SPTSSA*) y 9 en el área de inyección de PHA (*ADAMTSL1*, *ATP12A*, *AVD*, *CD3E*, *CD7*, *CTSD*, *GSAP*, *MAD2L1*, and *UBASH3A*) para su validación por qRT-PCR. Se usaron un total de 10 muestras por tejido, 5 réplicas biológicas correspondientes a individuos que mostraban un IR alto y 5 correspondientes a un IR bajo (todos incluidos en los pools de RNA-seq). El ARN total se utilizó para realizar una síntesis RT-cDNA mediante el kit Superscript II First Strand cDNA Synthesis (Invitrogen, Spain). El molde de cDNA resultante sirvió para los ensayos de PCR a tiempo real para todos los genes candidatos y además también para tres genes de referencia –*ACTB*, *GAPDH*, *G6PDH*–, mediante un termociclador Real-Time PCR System (Illumina, Cultiex, Spain). Se preparó una master mix mediante Dynamo™ HS SYBR Green qPCR Kit (Finnzymes, Fisher Scientific, Spain). El nivel de expresión y la estabilidad de los genes de referencia se midieron con NormFinder (Andersen C, Jensen J, Orntoft T, 2004). Los cebadores de PCR fueron diseñados con primer 3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) (Tabla 1).

Tabla 1: Genes Housekeeping y target usados en el ensayo PCR en tiempo real indicando locus symbol, GenBank accession number y primer sequence.

	Locus Symbol	GenBank AccessionN ^o	Forward primer (5' → 3')	Reverse primer (5' → 3')
House-keeping	<i>ACTB</i>	L08165	CACAGATCATGTTTGAGACCTT	CATCACAATACCAGTGGTACG
	<i>GAPDH</i>	K01458	GGGAAGCTTACTGGAATGGCT	GGCAGGTGAGTCAACAACA
	<i>G6PDH</i>	A1981686	CGGGAACCAAATGCACTTCGT	GGCTGCCGTAGAGGTATGGGA
Target genes	<i>ADAMTSL1</i>		GGTGTCTGAGAAAGTTGAGCA	AGGCAACTCTTAGCTCCA
	<i>ATP12A</i>		GCCACAATGATGCCAATG	CATCGGTGTGCTCTTCTTCA
	<i>AVD</i>		GACCATCGGGACTGTGAAC	GCTGTTACGGCTGTGAGGTA
	<i>CD3E</i>		GCTCCATTGCTGCCATAC	GCTGCGAAGGAAGAAAGAAC
	<i>CD7</i>		ACAGTTGTCCCCAGGAGTGT	AAATGACCTCTCCCAAGCAG
	<i>CTSD</i>		GTCCTGGGCTGAAGCAGTA	GCCCCTCAACTCCAAAAC
	<i>GSAP</i>		GCAGTTTTGAGTAGCCACCAT	GTGTTGGAAACCCAGGTCTGT
	<i>MAD2L1</i>		CCATGCCTAATCCCAAGACT	GTTCAAGCCTTTTCTGCTC
	<i>NOV</i>		CCCCACACAACACCAAAAC	TCTAACGGCTGGAAGAAAGC
	<i>SOX13</i>		CGAAGGATGAGAGGAGGAAG	CTTGCTGATGCTGGAGTTGT
	<i>SPTSSA</i>		ACCATCACCAACGGAACA	GCTGACATAGGCCACATAA
	<i>UBASH3A</i>		CGAGGTGAAGATAGCTTGTGG	CAGCGAACTGCTTCTGTGT

Las reacciones de Real-time PCR reactions se llevaron a cabo en volúmenes de reacción de 5 µl con 10 mM de cada cebador y 0.5 µl de diluciones 10X de cDN. Las reacciones para realizar las curvas estándar, los ensayos de las muestras y los controles sin molde se hicieron por triplicado. El programa de cuantificación consistió en 40 ciclos de 95°C durante 10 s y 30 s de temperatura de hibridación, terminando con una curva de melting de 15 s a 95°C, 15 s a 55°C y 15 s a 95°C, con medidas de fluorescencia continua. Los resultados se exportaron en el EcoStudy Software v4.0 (Illumina) para calcular y normalizar la expresión de cada gen.

Los datos de los genes candidatos se analizaron con Relative Expression Software (REST), que sigue la metodología Pfaffl (Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L, 2002), normalizando los niveles de expresión de los tres genes de referencia (*GAPDH*, *G6PDH*, and *ACTB*). Cuando las diferencias entre muestras de cualquier magnitud de RI (alta o baja) se sometieron al azar, se llevó a cabo un test para comprobar la hipótesis alternativa que se acepta para un P value menor de 0.09.

3.7. Análisis estadístico

Las diferencias de género se determinaron por análisis de varianza, mediante el procedimiento GLM, considerando el sexo como efecto único y el procedimiento de comparación múltiple de Scheffe a $\alpha = 0.005$. Las correlaciones entre MSI, AbTot e IgG, y entre los datos de RNA-seq y qPCR se analizaron con el test de Spearman utilizando el procedimiento CORR de SAS. Todos los análisis estadísticos se llevaron a cabo con el paquete estadístico SAS v. 9.1.3 (SAS, Statistical Analysis with SAS/STAT® Software V9.1., 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Estandarización de las condiciones de cría y manejo de las perdices para poder separar el componente genético del ambiental dentro de la variabilidad individual en la respuesta ante un mismo estímulo patógeno.

Identificación individual de las 700 perdices incluidas en los desafíos no infecciosos. Los principales resultados de la tarea han consistido en la minuciosa estandarización de las condiciones de cría, y la identificación de las perdices mediante el anillado por túnel y número de jaula. La alimentación de las perdices corrió a cargo de Agrocinegética Perdices Altube S.A. que dispone de una moderna fábrica de alimentos para aves de caza que utiliza tanto para consumo de las perdices producidas en los centros de recría y de reproducción, como para la venta a clientes de perdices. Esta alimentación y su análisis para descartar contaminantes y posibles fuentes de infección han contribuido a mantener un ambiente estable que permita detectar la componente genética dentro de la variabilidad individual en la respuesta ante un mismo estímulo patógeno.

4.2. Realización de desafíos no infecciosos para la clasificación de las perdices según su respuesta inmune

El objetivo era el de obtener ejemplares que presenten diferencias en la intensidad de la RI frente a un agente externo. La realización de los desafíos no infecciosos fue desarrollada íntegramente en el Grupo Altube. Se utilizaron un total de 2.084 perdices de campo, las cuales fueron identificadas de forma individual mediante el anillado de los animales y el marcaje de los túneles y jaulas. Todas las aves fueron criadas en las mismas condiciones de manejo y alimentación para evitar sesgos en la magnitud de la RI. Era necesario que todas las perdices que participaban en el

experimento tuvieron una edad similar (7 meses \pm 1 semana), para lo cual se seleccionaron grupos iniciales de 400 individuos que eclosionaron simultáneamente, separados por un periodo de dos semanas del siguiente grupo. Esto permitió que los desafíos no infecciosos se realizaran sobre grupos finales de 300 individuos cada dos semanas sin que la edad de los animales fuera incrementando. En el ANEXO I se detalla su cronología

Se llevaron a cabo, por un lado, pruebas de hemaglutinación con glóbulos rojos de oveja para medir la RI adquirida, que consisten en la inoculación intramuscular de una suspensión de eritrocitos de oveja que van a desencadenar una RI específica en las perdices mediada por anticuerpos. Para determinar el título de anticuerpos totales y de inmunoglobulinas G (IgG) generado por cada individuo se realizó una prueba de hemaglutinación con diluciones seriadas de plasma sanguíneo (Figura 6). El diferencial entre anticuerpos basales (antes de la inoculación de eritrocitos de oveja) y anticuerpos finales (después de la inoculación) varió de 0 a 12.

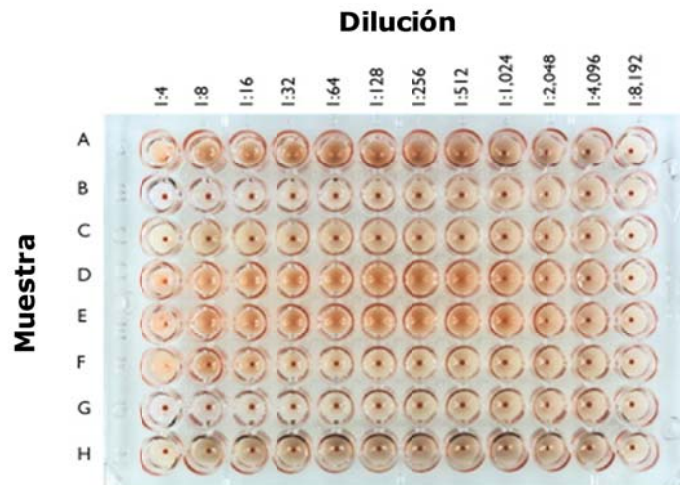


Figura 6: Placa de hemoaglutinación en la que se pueden ver diferencias en la dilución más alta que muestra hemoaglutinación entre muestras

Sobre las mismas perdices y 5 días después de la administración de eritrocitos de oveja, se midió la RI innata con la aplicación del test en piel con fitohemaglutinina (PHA), una lectina de origen vegetal con capacidad para estimular inespecíficamente la proliferación de células T. Se inyectó intradérmicamente una solución de PHA y PBS

(Phosphate Buffer Saline) en el espacio interdigital de una pata, mientras en la otra pata se inyectó únicamente PBS. Antes de las inyecciones y trascurridas 24 horas, se midió la anchura de la zona con un calibre sensible a la presión y con esos datos se calculó el índice de estimulación mitogénica (MSI, incremento en la anchura de la pata tratada con PHA menos el incremento causado por PBS). El IEM varió de 0 a 1,07 entre las distintas perdices sometidas a la estimulación con PHA.

Los resultados obtenidos permitieron la clasificación de las perdices según su RI. De cada grupo de 300 perdices sometidas a los desafíos no infecciosos, se seleccionaron 24, 12 con la mayor RI y otras 12 con la menor RI, obteniendo un total de 168 animales con RI extremas sacrificados el día 7 del experimento. De estas perdices se conservaron para la extracción de ARN los órganos del sistema inmune (bazo, tonsilas cecales, timo y bolsa de Fabricio) y el tejido del área interdigital donde se inyectó PHA. La calidad del ARN inicial es clave para generar resultados fiables y reproducibles y, para garantizarla, se conservaron los tejidos procedentes de la disección en solución RNAlater® (Life Technologies), ya que se introduce rápidamente en los tejidos y estabiliza y protege en ARN celular, permitiendo el almacenamiento a -20°C de las muestras durante largos periodos de tiempo sin que disminuya la calidad ni cantidad del ARN obtenido.

4.3. Localización de genes candidatos asociados con diferencias en la respuesta inmune mediante microarrays de pollo.

El objetivo era el de la búsqueda de genes candidatos asociados con diferencias en la RI mediante la utilización de microarrays de gallo. Una vez finalizados los desafíos no infecciosos, llevamos a cabo la comparación de la expresión génica entre los dos grupos de perdices obtenidos (alta y baja RI) empleando microarrays de gallo.

Se realizó una nueva selección comparando las RIs de los 168 animales y se utilizaron las 48 perdices que presentaron los valores más extremos para alta RI y las 48 para baja RI. En el laboratorio se llevó a cabo la extracción y conformación de grupos o pools de ARN, cada uno de los pools siendo la mezcla equimolar de cuatro

muestras de ARN del mismo tejido. Para el aislamiento de ARN total se utilizaron distintos kits comerciales, basados en columnas con membrana de sílice, según la composición del tejido extraído y el rendimiento esperado (RNeasy® Tissue Mini Kit, RNeasy® Tissue Midi, Kit RNeasy® Fibrous Tissue Midi Kit, QIAGEN). La calidad del ARN total extraído se analizó mediante nano-electroforesis (Bioanalyzer 2100, Agilent Technologies). Se obtuvieron ARNs de gran calidad (Figura 7), con valores de RIN (RNA Integrity Number) por encima del mínimo requerido por las técnicas de análisis de expresión genética diferencial para todas las muestras.

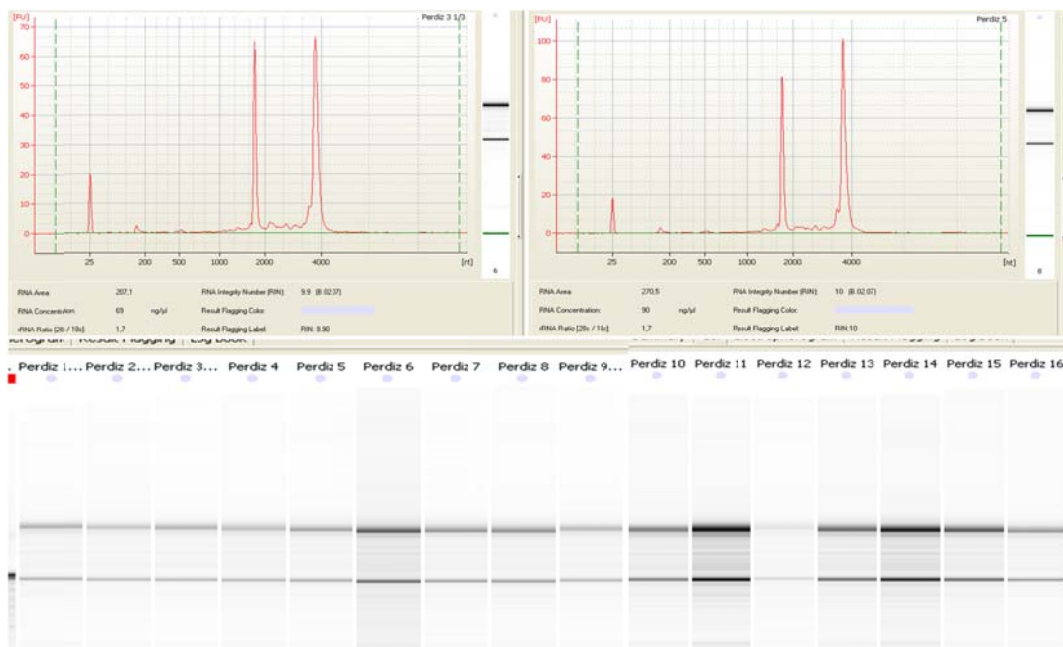


Figura 7: Ejemplo de los resultados de la cuantificación y análisis de calidad del ARN con Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies)

Las muestras se enviaron a un servicio de genética externo para la hibridación con el microarray de pollo de Affymetrix, GeneChip® Chicken Genome Array. Para evaluar el rendimiento del chip de pollo al utilizar ARN de perdiz, inicialmente se utilizaron dos réplicas de los pools de los dos grupos (alta y baja RI) de bazo. Los resultados obtenidos no fueron satisfactorios, con una especificidad y sensibilidad en la hibridación del ARN de perdiz al chip de pollo insuficientes para la obtención de

resultados con una calidad mínima que permitiera llevar a cabo el análisis de diferencias de expresión génica.

A pesar de que la elección de esta técnica estaba avalada por trabajos anteriores en los que se consiguió amplificación en el 72 % de los casos en el género *Aléctoris* (Sevane y col., 2010), como por diversas publicaciones científicas (Backstöm y col., 2008; Kayo y col., 2001), los resultados obtenidos en perdiz no permitieron continuar utilizando esta estrategia para el análisis de diferencias de expresión génica optándose por la secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (RNA-Seq) (McGettigan, 2013).

4.4. Valoración de la expresión génica diferencial en los distintos tejidos inmunes mediante Differential Display.

El gasto económico que supuso el análisis infructuoso de los microarrays de pollo, así como el mayor coste de la RNA-Seq, nos obligó a priorizar los análisis sobre aquellos tejidos que mostraran las mayores diferencias de expresión entre los animales con alta y baja RI.

Para la consecución de este objetivo se realizó un sondeo previo con la técnica de Differential Display que permite valorar cuáles son los tejidos inmunes que tienen una mayor participación en la orquestación de la RI adquirida en perdices. En esta técnica, el ARNm de cada muestra es transformado en ADN complementario a la hebra inicial de ARNm (ADNc) y es amplificado por PCR utilizando cebadores arbitrarios degenerados combinados con cebadores de anclaje poli-T. El proceso de retrotranscripción (RT) es crítico para conseguir una cuantificación sensible y precisa, y la cantidad de ADN complementario (ADNc) producida debe representar con fiabilidad la cantidad de ARN total utilizado (Bustin, 2002). Para la síntesis de ADNc se empleó el Kit iScript™ cDNA Synthesis (BioRad, USA).

El cebador inverso o anti-sentido de la PCR consiste en una cola poliT, que se unirá específicamente a las colas de poliadenilación (poliA) presentes en todos los ARNm. Esos cebadores presentan en el extremo 3' un nucleótido de los otros tres

posibles (A, G o C), de manera que divide el ARNm en subpoblaciones, dependiendo del nucleótido que precede a la cola de poliA, generando así un número manejable de cDNAs (Tabla 2). El cebador tiene además incorporada una secuencia en el extremo 5' de 17 nucleótidos derivada del promotor de T7, un bacteriófago de ciclo lítico y de genoma conocido que se utiliza habitualmente como sistema de clonado, y que va a permitir la secuenciación posterior sin necesidad de subclonar.

Tabla 2: Los tres posibles cebadores inversos compuestos por una secuencia T7, seguida de la cola poliT y un nucleótido más que permite subdividir el ADNc en 3 subpoblaciones.

NOMBRE	SECUENCIA
T7(dT12)A	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTA-3'
T7(dT12)C	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTC-3'
T7(dT12)G	5'-ACG ACT CAC TAT AGG GCT TTT TTT TTT TTG-3'

Los cebadores directos utilizados se muestran en la Tabla 3. Estos cebadores son aleatorios, cada uno tiene 10 nucleótidos para unirse al ADNc e incorporan 16 nucleótidos en 5' que corresponden al cebador universal M13 inverso para permitir la secuenciación del fragmento obtenido sin necesidad de subclonar. M13 es otro bacteriófago utilizado como sistema de clonado. De esta forma se realizaron un total de 60 PCRs para cada muestra estudiada por combinación de los tres cebadores inversos con cada uno de los 20 cebadores aleatorios.

Tabla 3: Los 20 cebadores directos aleatorios se componen de una cola M13 seguidos de una secuencia arbitraria de 10 nucleótidos (naranja)

NOMBRE	SECUENCIA
M13-ARP1	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACG ACT CCA AG-3'
M13-ARP2	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAT GG-3'
M13-ARP3	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGA CCA TTG CA-3'

M13-ARP4	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGC TAG CAG AC -3'
M13-ARP5	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAT GGT CGT CT -3'
M13-ARP6	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA CAA CGA GG -3'
M13-ARP7	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GAT TGG TC -3'
M13-ARP8	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG GTA AAG GG -3'
M13-ARP9	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATA AGC CTA GC -3'
M13-ARP10	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACA GTG TGT GA -3'
M13-ARP11	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AAC GCT AGT GT -3'
M13-ARP12	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGG TAC TAA GG -3'
M13-ARP13	5'-ACA ATT TCA CAC AGG AGT TGC ACC AT -3'
M13-ARP14	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC CAT GAC TC -3'
M13-ARP15	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT TTC TAC CC -3'
M13-ARP16	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GGT CAT AG -3'
M13-ARP17	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ACT GCT AGG TA -3'
M13-ARP18	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATG ATG CTA CC -3'
M13-ARP19	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATT TTG GCT CC -3'
M13-ARP20	5'-ACA ATT TCA CAC AGG ATC GAT ACA GG -3'

A continuación se realizó la separación de los productos de la RT-PCR mediante electroforesis vertical en gel de poliacrilamida y en condiciones desnaturalizantes. Se puede caracterizar tanto la ausencia y presencia diferencial de bandas, como las variaciones de intensidad entre los grupos de alta y baja RI (Figura 8).

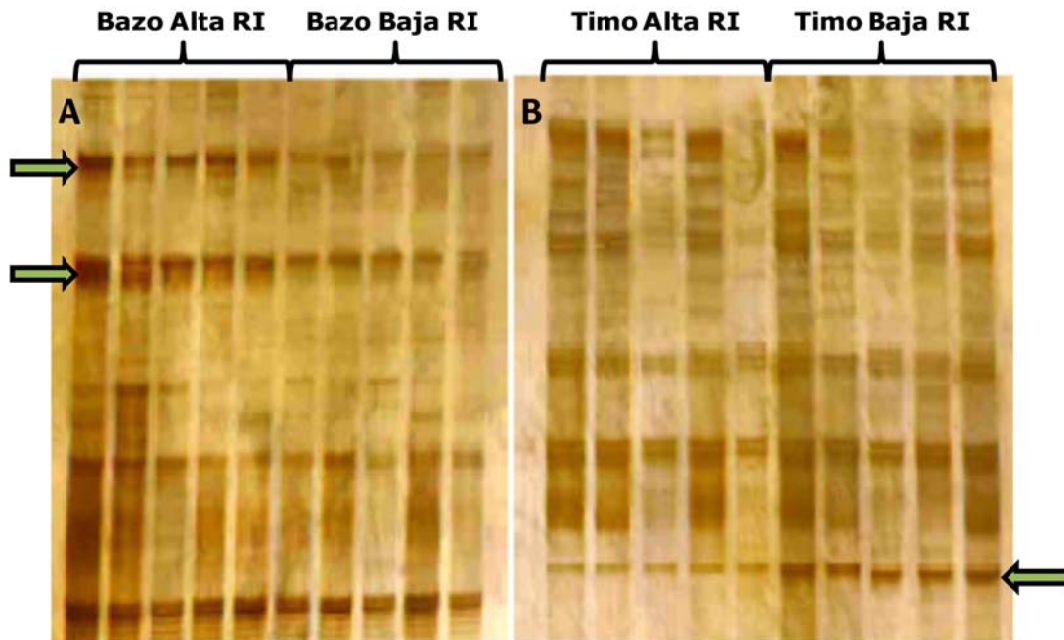


Figura 8: Ejemplo de gel de Differential Display: A) las flechas señalan bandas con mayor intensidad en el grupo de muestras de bazo con alta RI en comparación con las de baja RI; B) la flecha señala bandas con mayor intensidad en el grupo de muestras de timo con baja RI en comparación con las de alta RI.

Los resultados obtenidos con esta técnica permitieron determinar que, de los cuatro tejidos implicados en la RI adquirida (bazo, tonsilas cecales, timo y bolsa de Fabricio), el que parecía mostrar mayores diferencias de expresión entre individuos con alta y baja RI era el bazo. De manera que los tejidos que se utilizaron para el análisis de la expresión génica diferencial con RNA-Seq fueron el bazo, para la valoración de la RI adquirida, y el tejido del área interdigital donde se inyectó PHA, para la valoración de la inmunidad innata.

4.5. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (RNA-Seq): obtención de un transcriptoma de referencia en perdiz

El objetivo era realizar el ensamblaje de novo del transcriptoma de la perdiz mediante la técnica de secuenciación masiva RNA-Seq para obtener un transcriptoma de referencia específico con el que alinear los transcriptomas obtenidos para cada tejido de forma individual.

La secuenciación masiva del transcriptoma completo de perdiz tiene, frente a los microarrays, las ventajas de no requerir un conocimiento previo del genoma, obteniéndose resultados de mejor calidad. Mientras con microarrays de pollo sólo se habría obtenido la medida de la expresión diferencial de los genes y estaba sujeta al éxito en la hibridación del ARN de perdiz con el microarray de pollo, que demostró ser insuficiente, con RNA-Seq se obtuvo la secuencia completa y específica del transcriptoma de la perdiz, lo que facilitó la validación de genes candidatos y la búsqueda de marcadores moleculares.

En una primera fase, se secuenció a gran profundidad un pool de 16 muestras normalizadas que representan todos los tejidos estudiados en ambos sexos y que constituirá el transcriptoma de referencia con el que alinear los transcriptomas obtenidos para cada tejido y muestra de forma individual. Para el proceso de normalización se utilizó Mint2 (Evrogen), lo que permitió obtener una muestra representativa de todos los transcritos presentes en el pool. La secuenciación se llevó a cabo en un Genome Analyzer GAIIx (Illumina Inc) utilizando el protocolo pair-end 2x100. Este protocolo genera un gran número de copias de cada secuencia (160) con una longitud de 100 pares de bases (pb) por cada extremo, lo que posibilita el ensamblaje del transcriptoma de perdiz tomando como referencia la información de las bases de datos genómicas de la red y garantiza una mayor fiabilidad en la detección de SNPs.

Con este análisis se obtuvieron un total de 21.867.176 y 25.209.397 lecturas de 101 pb en dos carreras consecutivas. Los objetivos de esta fase eran la obtención del catálogo de genes de referencia y la detección de SNPs. Debido a la falta de un genoma de referencia para la perdiz, se empleó una estrategia de análisis basada en ensamblaje de novo de los transcritos en vez de mapear con un genoma externo, lo que requirió la realización de un extenso filtrado y recortado de las lecturas para garantizar la mayor calidad posible y evitar ensamblajes espurios. Para ello se utilizó el programa PRINSEQ (Schmieder y Edwards, 2011), con el que se recortaron las lecturas por el extremo derecho cuando la calidad de los nucleótidos fue inferior a Q30, se eliminaron las lecturas que contenían nucleótidos sin determinar (N) y se limpiaron las colas de anclaje (Figura 9). En la Figura 10 se puede ver un ejemplo de la calidad inicial

de los transcritos y el resultado tras el filtrado y recortado de las lecturas de baja calidad.

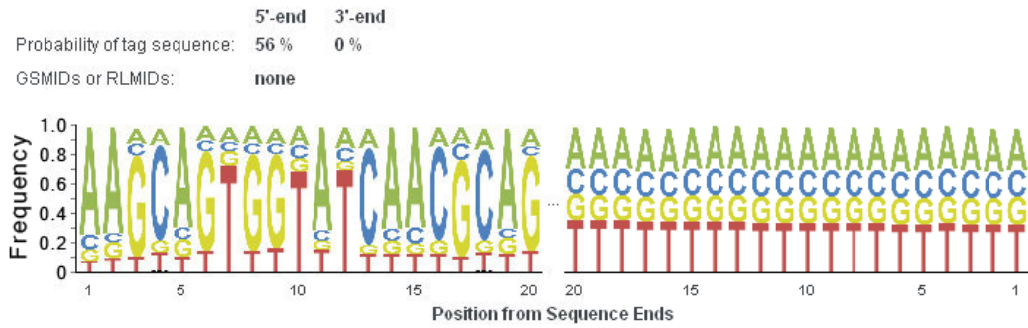


Figura 9: Análisis de la presencia de colas de anclaje en las lecturas obtenidas con RNA-seq para el pool de muestras normalizadas (PRINSEQ)

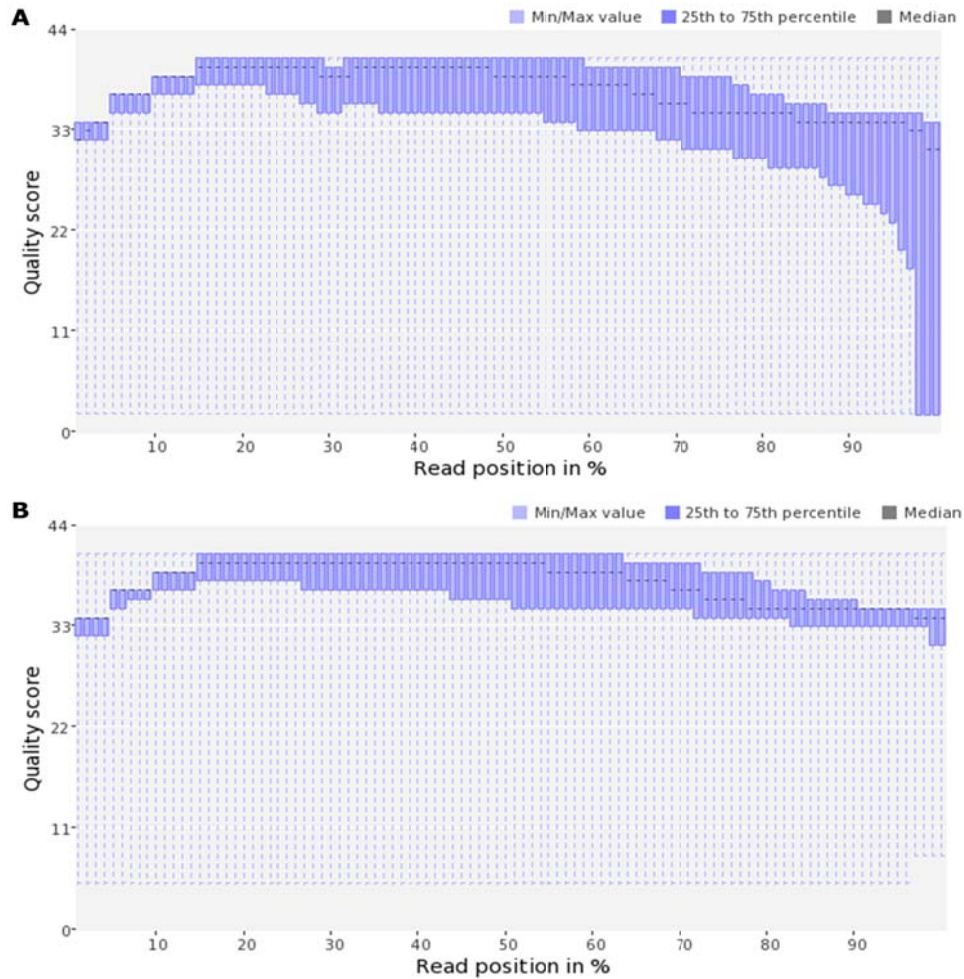


Figura 10: Ejemplo de la calidad de las lecturas obtenidas con RNA-seq para el pool de muestras normalizadas antes (A) y después (B) de eliminar las secuencias de baja calidad con PRINSEQ

A continuación se empleó el programa Oases (Schulz y col., 2012) para realizar el ensamblaje de novo. Se utilizó un k alto para evitar ensamblajes espurios ya que el valor de k define el tamaño de solapamiento requerido para unir dos fragmentos secuenciados. Se probaron varios valores de k y, finalmente, el que obtuvo mejores resultados fue el ensamblaje con k = 79.

Para la anotación del transcriptoma y la reconstrucción del catálogo de genes de referencia se utilizó BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), infiriendo las anotaciones funcionales de los transcritos mediante su similitud al catálogo de proteínas de referencia Uniprot. Se seleccionó un grupo de 49.102 proteínas de referencia que incluían todas las proteínas representativas de los grupos Uniref90 publicadas hasta la fecha y que pertenecían al nodo taxonómico Aves. Se seleccionaron sólo proteínas pertenecientes a los grupos Uniref90 porque cada proteína pertenecía sólo a un grupo y había una similitud del 90% con la proteína representativa para todos los miembros del grupo. Esto proporcionó una distancia más homogénea y uniforme entre las proteínas de referencia.

Las proteínas de referencia fueron utilizadas para realizar la agrupación de transcritos, de manera que se pudo hacer un análisis de reconstrucción de los genes secuenciados en perdiz. El umbral mínimo requerido para la anotación de un transcrito fue un e valor en BLAST inferior a 10⁻¹⁰. También se realizó un análisis funcional de cada gen/proteína obtenido a partir de Uniprot, obteniendo anotaciones de la ontología génica, número EC (Enzyme Commission number) y motivos InterPro, que proporcionan el análisis funcional de las proteínas mediante su clasificación dentro de familias y la predicción de dominios y sitios de importancia. Partiendo de un número inicial de 51.403 transcritos obtenidos con el ensamblaje de novo de Oases, el número final de transcritos anotados fue de 11.699 (23%), cifra que se sitúa entre los porcentajes que normalmente se obtienen en proyectos de ensamblaje de novo de transcriptomas sin genomas de especies cercanas completamente secuenciados. Esto se puede deber a distintas causas, entre las que destacan: las diferencias en la secuencia de los genes entre distintas especies y la longitud insuficiente de muchos

transcritos, lo que hace que muchos de ellos no muestren una similitud significativa con ninguna de las secuencias publicadas que permita su anotación; la gran proporción que se obtuvo de transcritos con colas poli-A y poli-T, que no se pueden considerar transcritos reales; algunos de los transcritos no anotados corresponden a ARN no codificante, por lo que no se encuentran en las bases de datos de proteínas; la baja disponibilidad de proteínas dentro de la clase Aves; y finalmente, los errores de secuenciación inherentes al proceso. A pesar de todos estos factores, los 11.699 transcritos obtenidos permitieron alcanzar ampliamente los objetivos.

A continuación se realizó la construcción del catálogo de genes anotados presentes en las muestras analizadas (Unigene). Este catálogo Unigene consiste en el grupo de transcritos que fueron anotados con la misma proteína de referencia. Una vez que todos los transcritos fueron anotados, obtuvimos la secuencia nucleotídica representativa de cada Unigene, seleccionando la secuencia más larga del grupo y orientándola para codificar, en un marco de lectura positivo, la proteína similar a la proteína de Uniprot responsable de la formación del grupo. Finalmente, se obtuvieron un total de 6.623 proteínas a partir de los transcritos agrupados de *A. rufa* con la herramienta BLASTX y umbrales de similitud con un *e* valor inferior a 10⁻⁹.

4.6. Identificación de SNPs

Por último, se llevó a cabo la identificación de los SNPs presentes entre las 16 muestras incluidas en el pool, para lo cual se alinearon las lecturas filtradas con los transcritos mediante la utilización de las opciones por defecto de la herramienta Bowtie 2 (Langmead y col., 2009), y posteriormente se localizaron los SNPs con las herramientas SAMtools, bcftools y vcftools (Li y col., 2009). Se aplicaron distintos filtros de calidad:

- Número mínimo de bases alternativas: 2.
- Eliminación de los SNPs situados 3 pb alrededor de un hueco.
- Ventana para filtrar huecos adyacentes: 10 pb.

- Eliminación de aquellos SNPs obtenidos con más del doble de profundidad (DP) de la media o menos de 6 de profundidad mínima ($6 < DP < 121$).
- Valor mínimo de GT (Genotype Quality): 30

Se anotaron un total de 11.699 transcritos, se obtuvieron 6.623 proteínas y se identificaron 33.857 SNPs, de los cuales 8.299 se encontraron en transcritos anotados.

4.7. Secuenciación masiva del transcriptoma de perdiz (RNA-Seq): medida de la expresión génica diferencial en bazo y área de inyección de PHA

El objetivo era la medida de la expresión génica diferencial en bazo y área de inyección de PHA para la detección de genes candidatos asociados con diferencias en la RI adquirida e innata.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos con Differential Display, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica diferencial con RNA-Seq en 16 muestras procedentes de bazo, para la valoración de la RI adquirida, y en 16 muestras del área de inyección de PHA, para la valoración de la inmunidad innata. Las muestras se agruparon en 2 pooles de alta RI y baja RI para ambos tejidos, cada uno de los pooles siendo la mezcla equimolar de cuatro muestras de ARN del mismo tejido.

En este caso no se realizó proceso de normalización porque el objetivo era determinar las diferencias de expresión en función de la RI, y se secuenció a menor profundidad y longitud de lecturas, ya que era suficiente para poder realizar el alineamiento con el transcriptoma de referencia de perdiz obtenido en la fase anterior. La secuenciación se llevó a cabo en un Genome Analyzer GAIIx (Illumina Inc) utilizando el protocolo single-end 1x75. El número de lecturas obtenidas con este análisis se puede ver en la Tabla 4.

Tabla 4: Número de transcritos obtenidos con el protocolo de RNA-seq single-end 1x75 sin normalizar por tipo de muestra

Tejido	Magnitud de la RI	
	Alta RI	Baja RI
Bazo	29.660.484	28.748.332
Área inyección PHA	27.514.496	29.082.456

Aunque la calidad de los transcritos obtenidos en esta fase fue mejor que la de las muestras normalizadas (Figuras 11 y 12), se realizó también el filtrado y recortado de las lecturas con el programa PRINSEQ para garantizar la mayor calidad posible y evitar alineamientos espurios. En este caso, no había nucleótidos con una calidad inferior a Q30 (Figura 11), ni presencia de colas de anclaje (Figura 12). Los filtros de calidad que se aplicaron fueron:

- Eliminación de secuencias con un porcentaje de Ns superior al 1%.
- Aplicación de un valor de 7 en el filtro DUST para eliminar las secuencias de baja complejidad que dan problemas de alineamiento al pegarse en múltiples regiones y generar falsos positivos.
- Eliminación de los extremos con más de 5 poli-A o poli-T y con más de una N.

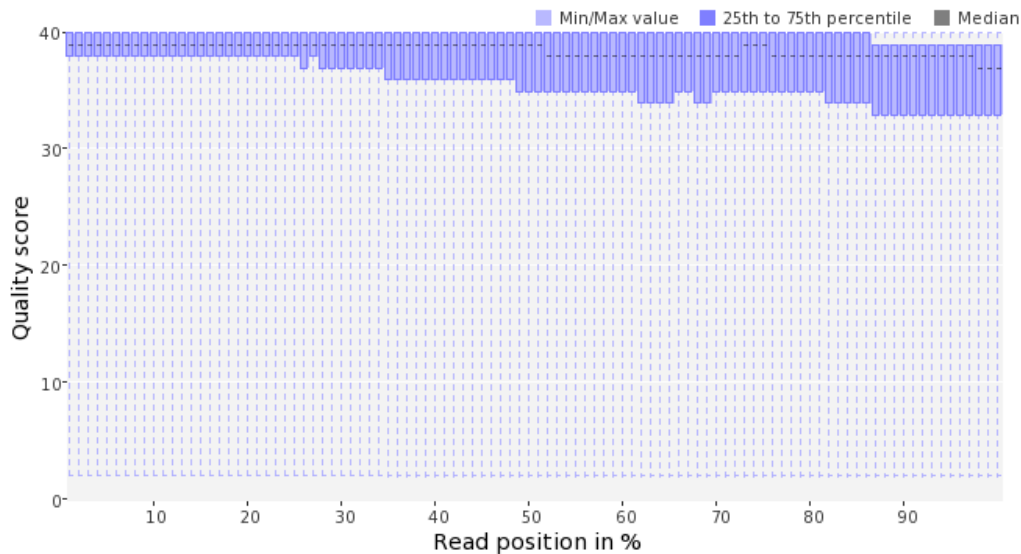


Figura 11: Ejemplo de la calidad de las lecturas obtenidas con RNA-seq para un pool de muestras sin normalizar analizadas con PRINSEQ

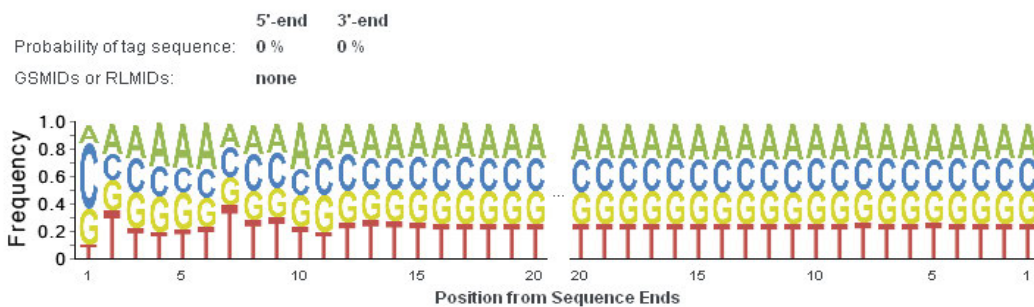


Figura 12: Análisis de la presencia de colas de anclaje en las lecturas obtenidas con RNA-seq para un pool de muestras sin normalizar (PRINSEQ)

A continuación se alinearon las lecturas filtradas mediante la herramienta Bowtie 2 (Langmead y col., 2009). Se alinearon tanto con el transcriptoma de referencia de perdiz obtenido en la etapa anterior, como con el genoma completo del gallo disponible en la base de datos pública Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>). Las dos fuentes de datos empleadas se complementaron, ya que por un lado, con el transcriptoma de perdiz obtenido en este proyecto se pudieron detectar genes diferencialmente expresados cuya homología con otras especies con genomas secuenciados era baja. Por otro lado, la utilización de la

amplia información disponible en gallo permitió anotar un mayor número de genes en los distintos tejidos analizados.

En este caso, se utilizaron las opciones de Bowtie 2 --local -D 20 -R 3 -N 1 -L 20 -i S,1,0.50, donde:

--local: aumenta el número de transcritos anotados en comparación con la opción que aplica el programa por defecto (end-to-end) porque ignora o corta algunos de los nucleótidos por ambos extremos del alineamiento.

-D: fija un límite superior para el número de problemas dinámicos de programación que pueden fallar en una fila antes de que Bowtie 2 pare de buscar alineamientos. Aumentarlo incrementa la probabilidad de que encuentre el alineamiento correcto para una lectura que se pega en más de una región. Por defecto está fijado en 15.

-R: fija el número máximo de veces que Bowtie 2 va a intentar reclasificar una lectura con clasificaciones repetitivas. Aumentarlo incrementa la probabilidad de que encuentre el alineamiento correcto para una lectura que se pega en más de una región. Por defecto está fijado en 2.

-L, -i, -N: el término medio entre velocidad y sensibilidad/precisión se puede ajustar fijando la longitud del fragmento a alinear (-L), el intervalo entre fragmentos alineados (-i) y el número de errores de alineación que se permiten por fragmento (-N). El alineamiento es más sensible cuanto más corto sea el fragmento, más cerca estén unas alineaciones de otras y mayor sea el número de errores permitidos.

Los resultados obtenidos para los distintos tejidos y RIs se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5: Número de lecturas después del filtrado con PRINSEQ y porcentajes de alineamiento con el transcriptoma de referencia de perdis para los distintos tejidos y magnitudes de RI obtenidos con Bowtie 2

Tejido	Magnitud RI	Lecturas filtradas totales	Lecturas no alineadas	Lecturas alineadas 1 vez	Lecturas alineadas >1 vez	% alineamiento global
Bazo	Alta	25.116.146	12.739.912 (51%)	7.146.308 (28%)	5.229.926 (21%)	49%
	Baja	24.409.166	12.333.264 (51%)	6.936.706 (28%)	5.139.196 (21%)	49%
Área inyección PHA	Alta	23.186.218	10.648.794 (46%)	6.737.872 (29%)	5.799.552 (25%)	54%
	Baja	24.825.762	11.346.318 (46%)	7.022.640 (28%)	6.456.804 (26%)	54%

Tabla 6: Número de lecturas después del filtrado con PRINSEQ y porcentajes de alineamiento con el genoma de gallo para los distintos tejidos y magnitudes de RI obtenidos con Bowtie 2

Tejido	Magnitud RI	Lecturas filtradas totales	Lecturas no alineadas	Lecturas alineadas 1 vez	Lecturas alineadas >1 vez	% alineamiento global
Bazo	Alta	25.116.146	1.758.130 (7%)	16.325.494 (65%)	7.032.522 (28%)	93%
	Baja	24.409.166	1.941.996 (8%)	16.533.146 (68%)	5.934.024 (24%)	92%
Área inyección PHA	Alta	23.186.218	1.348.768 (6%)	15.424.668 (66%)	6.412.582 (28%)	94%
	Baja	24.825.762	1.310.144 (5%)	15.849.956 (64%)	7.665.678 (31%)	95%

Finalmente, se realizó la medida de la expresión diferencial entre los distintos tejidos y magnitudes de RI mediante la utilización de las herramientas de análisis de datos de RNA-seq Cufflinks/Cuffdiff (Trapnell y col., 2010). Este programa realiza el ensamblado de las lecturas alineadas en transcritos, estima su abundancia y analiza la expresión diferencial y la regulación del transcriptoma. En los experimentos de RNA-seq, los fragmentos de cDNA son secuenciados y mapeados a un transcriptoma o

genoma de referencia, e idealmente cada secuencia mapearía únicamente a un transcrito. Uno de los factores que juega un papel importante en el análisis de datos de RNA-seq, es la probabilidad de distribución de las lecturas en función de la longitud de los genes. Es decir, que un mayor número de lecturas van a mapear a genes largos en comparación con los cortos, a pesar de que ambos tengan el mismo nivel de expresión. En los análisis de expresión diferencial, donde la expresión de los genes se va a considerar de forma individual para detectar diferencias de expresión entre distintas condiciones, ese sesgo suele ser ignorado ya que se asume que afecta a todas las muestras de forma similar (Soneson y Delorenzi, 2013). Sin embargo, para hacer que el conteo sea comparable entre muestras, se han propuesto esquemas de normalización más complejos. Empleando una normalización adecuada, el conteo de fragmentos de RNA-seq se puede utilizar como una medida de la abundancia relativa de transcritos, y Cufflinks/Cuffdiff mide la abundancia de transcritos en Fragmentos Por Kilobase de exón por Millón de fragmentos mapeados (FPKM), análogo al método descrito por Mortazavi y col. (2008). El objetivo de representar los datos de RNA-seq mediante cantidades transformadas como FPKM es normalizar el conteo con respecto a los diferentes tamaños de las librerías y con respecto a la longitud de los genes.

Otro problema inherente a la propia técnica de RNA-seq es causado por las lecturas que mapean a múltiples posiciones del genoma. Para tratar de minimizarlo, hemos empleado la corrección para secuencias con múltiples alineamientos (-u) presente en Cufflinks. Sin la aplicación de esta corrección, Cufflinks va a dividir de forma uniforme cada secuencia mapeada con más de una posición entre todas las posiciones con las que se pega (por ejemplo, a una lectura que se pega en 10 sitios distintos del genoma, Cufflinks le asignará el 10% de las lecturas a cada posición). Al utilizar la corrección para secuencias con múltiples alineamientos, Cufflinks mejoró su estimación de forma similar a la publicada por Mortazavi y col. (2008).

Para identificar los genes o transcritos diferencialmente expresados, se analizó con la herramienta Cuffdiff los cambios logarítmicos en su expresión frente a la hipótesis nula de “no cambio”. Debido a que errores de medición, variabilidad técnica y variabilidad biológica entre réplicas pueden resultar en un cambio de expresión logarítmico distinto de cero, Cuffdiff asigna valores de significación utilizando un

modelo de variabilidad en el cambio de expresión logarítmico bajo la hipótesis nula descrito en detalle en Trapnell y col. (2010).

El número de genes sobre e infraexpresados en las muestras con alta RI de bazo y área de inyección de PHA se muestra en la Tabla 7.

Tabla 7: Número de genes diferencialmente expresados obtenido con Cufflinks en los distintos tejidos al comparar la expresión génica entre muestras con alta y baja RI

Referencia	Tejido	Nº Genes Sobreexpresados en alta RI	Nº Genes Infraexpresados en alta RI	Nº Total Genes	Nº Genes Anotados
Perdiz	Bazo	109	95	204	52
	Área inyección PHA	752	182	934	239
Gallo	Bazo	295	327	622	198
	Área inyección PHA	1.424	502	1.926	736

Del total de genes anotados diferencialmente expresados en ambos tejidos, había 10 coincidencias entre los resultados obtenidos utilizando como referencia la perdiz y los obtenidos con gallo en las muestras de bazo, y 107 en las muestras del área de inyección de PHA.

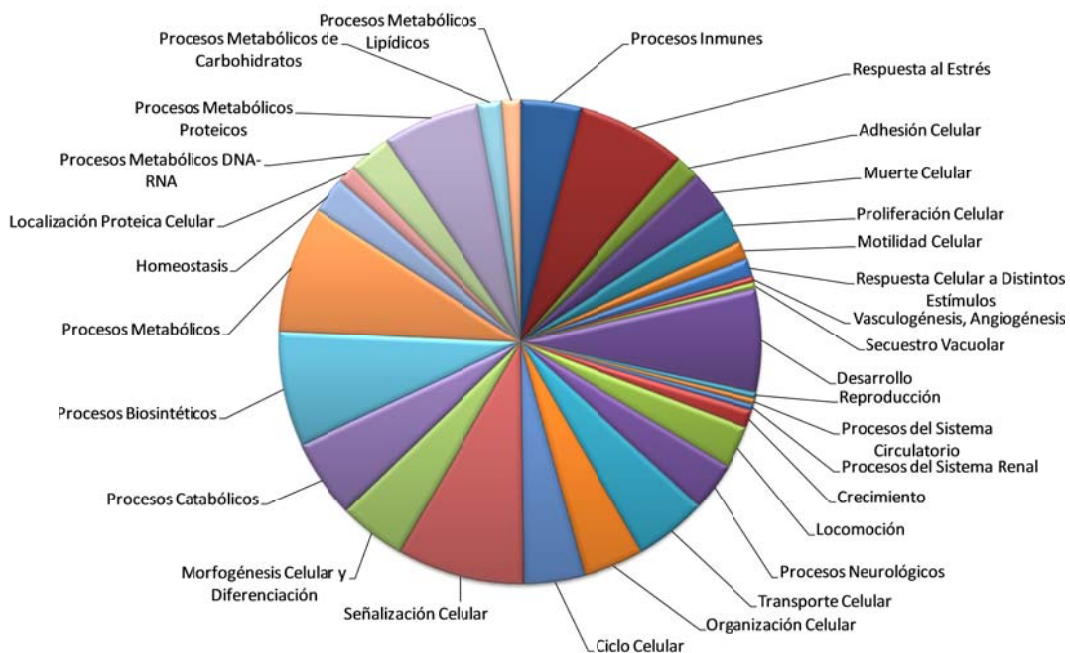
El número final de genes anotados diferencialmente expresados en las muestras de bazo fue de 240, y en las muestras de PHA de 868.

4.8. Análisis de la Ontología Génica

Se trata de clasificar los genes en función de su intervención en distintos procesos biológicos para seleccionar aquellos que participan en la orquestación de la RI innata y adquirida en perdiz.

Se utilizó la herramienta AgBase (<http://www.agbase.msstate.edu/>) para realizar la anotación funcional de los genes sobre e infraexpresados en perdiz. Esta web proporciona recursos que facilitan el modelado de los datos de genómica funcional y estructural, así como la anotación funcional utilizando vocabulario controlado desarrollado por el consorcio Gene Ontology (GO) para describir la Función Molecular, el Proceso Biológico y el Componente Celular de genes y productos génicos en especies de producción (McCarthy y col., 2010).

Del total de 790 genes sobreexpresados y 318 infraexpresados en bazo y área de inyección de PHA en los animales que mostraron una alta RI, para 698 y 301, respectivamente, estaba disponible información acerca de su anotación para la clase Proceso Biológico de la Ontología Génica en AgBase. En la Figura 13 se muestra la distribución de estos genes de acuerdo al Proceso Biológico. Tienen especial importancia para los objetivos de este proyecto los grupos de genes sobreexpresados referidos a Procesos Inmunes (35) y Respuesta al Estrés (63).



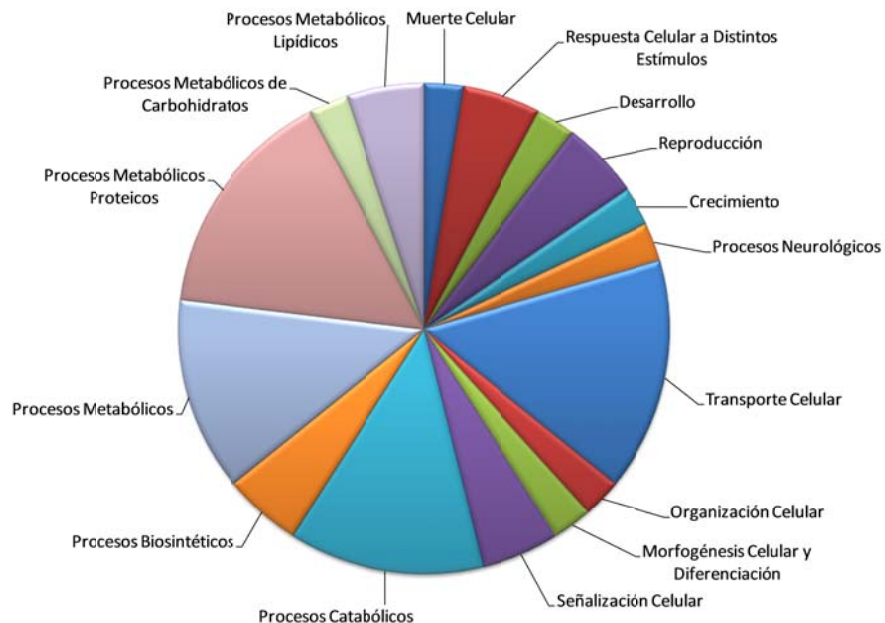


Figura 13: Distribución de los genes de acuerdo al Proceso Biológico para los 698 genes sobreexpresados (A) y los 301 infraexpresados (B) para los cuales estaba disponible información acerca de su anotación para la clase Proceso Biológico de la Ontología Génica en AgBase.

Se obtuvieron un total de 98 genes sobreexpresados referidos a Procesos Inmunes (35) y de Respuesta al Estrés (63) en las muestras con alta RI en comparación con las de baja RI.

4.9. Localización y caracterización de SNPs en alta y baja RI

Se trata de localizar los polimorfismos específicos de alta y baja RI en genes anotados referidos a procesos inmunes y de respuesta al estrés, seleccionando aquellos comunes a ambos tejidos (bazo y área de inyección de PHA), y por lo tanto útiles para la selección simultánea de individuos con una mejor respuesta inmune tanto innata como adquirida.

La localización de los SNPs en las muestras de bazo y área de inyección de PHA se realizó con las herramientas SAMtools, bcftools y vcftools (Li y col., 2009), y se

compararon con los polimorfismos obtenidos con el ensamblaje de novo del transcriptoma de perdiz. La Tabla 8 muestra el número de SNPs obtenido por tejido y RI, después de aplicar los filtros de calidad descritos en el apartado 4.5, con la diferencia de que en este caso la profundidad media fue menor y se eliminaron las variaciones con profundidades mayores de 61. También muestra el número de genes anotados en los que se ha localizado algún SNP.

Tabla 8: Número de SNPs filtrados obtenidos con SAMtools, bcftools y vcftools en los distintos tejidos y magnitudes de RI, y número de genes en los que se ha descrito algún SNP

Tejido	Magnitud RI	Nº SNPs filtrados	Nº Genes con SNPs
Bazo	Alta	21.449	6.316
	Baja	22.090	6.437
Área inyección PHA	Alta	19.030	6.022
	Baja	18.611	5.906

A continuación se llevó a cabo la comparativa entre los SNPs presentes en los distintos tejidos y RIs (Tabla 9).

Tabla 9: Comparativa de SNPs diferenciales entre baja y alta RI

Tejido	Magnitud RI	Nº SNPs no presentes en RI contraria	Nº Genes con SNPs no presentes en RI contraria	Nº SNPs coincidentes entre RIs	Nº Genes con SNPs coincidentes entre RIs
Bazo	Alta	11.630	5.078		
	Baja	11.945	5.173		
Área inyección PHA	Alta	11.045	4.950		
	Baja	10.624	4.703		
Bazo + PHA	Alta			1.554	1.210
	Baja			1.318	1.055

Del total de 98 genes sobreexpresados referidos a procesos inmunes y de respuesta al estrés en las muestras con alta RI, en 97 de ellos se localizaron polimorfismos específicos de alta RI o baja RI.

5. DISCUSIÓN

Dada la reducción de las poblaciones de perdiz roja y los millones de perdices que cada año son soltadas en países del sur de Europa, resulta importante incluir en los objetivos de mejora de las especies salvajes, la mejora de la resistencia frente a la transmisión de enfermedades y la necesidad de la adaptación al estrés generado por la introducción del individuo en un nuevo hábitat con cambios climáticos. Una estrategia para permitir que los individuos de poblaciones salvajes puedan hacer frente a este reto y se adapten a unos escenarios dinámicos, es el de mejorar la inmunidad general seleccionando los individuos a soltar con la mejor función inmune para obtener líneas “robustas” que ayuden además a prevenir la aparición de enfermedades en las granjas sin necesidad de usar tratamientos médicos. Se cree que la resistencia a las enfermedades es un carácter multigénico, regulado por el sistema inmune e influenciado por interacciones con factores fisiológicos y ambientales (Owen *et al.* 2008). La interacción entre los sistemas neuroendocrino e inmune es bien conocida y se refleja en la covariación entre estrés y inmunidad asociada a enfermedades (McEwen & Gianaros 2010; Sild *et al.* 2011). Además, Hangalapura *et al.* (2004) encontró que las líneas de pollo seleccionadas por su respuesta de anticuerpos primarios a SRBC mostraban unas diferencias neuroendocrinas en respuesta al estrés al frío, sugiriendo una diferencia en la reactividad del eje hipotálamo-pituitario-adrenal (HPA). Adriaansen-Tennekes *et al.* (2009) también detectaron que esas líneas seleccionadas de pollos mostraban una respuesta del eje HPA diferencial cuando se sometían a estresantes suaves, y los individuos con bajo IR tenían niveles de corticosterona más altos. Los estudios de la asociación entre comportamiento y caracteres de inmunidad en animales salvajes también describen esta interacción, por ejemplo Sild *et al.* (2011) encontró que los escribanos (*Carduelis chloris*) eran capaces de generar respuestas de anticuerpos más fuertes y generar una fuerte oxidación mediante fagocitos circulantes.

La base genética de un individuo es un factor importante en la orquestación de la IR (Biscarini *et al.* 2010), lo que abre la posibilidad de mejorar la resistencia a

enfermedades mediante selección asistida por el genoma (GAS). Casi todos los parámetros inmunológicos de líneas de pollos seleccionados para IR alto y bajo a SRBC difieren, incluidos varios parámetros de los sistemas inmunes innatos y adaptativos así como los parámetros inmunes celulares (Parmentier *et al.* 2004).

La IR innata tiene un papel crucial en el control de la capacidad para resistir una infección. Permite generar una respuesta inicial a los patógenos, que pueden limitar o prevenir la infección y también determina la aparición de la IR adaptativa y por lo tanto la memoria inmunológica. La integración de ambos sistemas natural y adquirido permite que la selección de uno afecte al otro (Cotter *et al.* 2005). Sin embargo, la selección por un IR adaptativo mejorado frente a enfermedades específicas puede comprometer la capacidad para generar una respuesta apropiada frente a diferentes patógenos (Kaiser 2010), y las interacciones entre el huésped y el patógeno pueden conducir a una continua adaptación en ambos sentidos que puede hacer peligrar el éxito de la selección de una IR adaptativa (Minozzi 2008). Por ello, una estrategia basada en la selección de una IR innata puede mejorar la robustez inmune general, y refuerza la capacidad para resistir infecciones a un espectro grande de patógenos.

Aunque los órganos inmunitarios primarios como la bolsa de Fabricio (el lugar de la maduración de los linfocitos B en las aves) y el timo (el lugar de la maduración de linfocitos T) nos proporcionan datos importantes en cuanto al desarrollo inmunológico, estos órganos habían involucionado cuando realizamos el experimento y no estaban disponibles en todos los individuos. Por lo tanto hemos optado por analizar el bazo con RNA-seq, que es un órgano linfoide secundario que combina el sistema innato y adaptativo a la vez (Bronte & Pittet 2013) generando una reacción innata inmediata a la penetración microbiana, pero también una IR adaptativa que incluye la interacción de células que reconoce un antígeno específico. Sin embargo, el perfil de expresión diferencial de genes obtenido de las muestras de bazo fue más pobre comparado con el de tejido de piel, lo que se puede explicar por el sesgo introducido por las diferencias en la involución de la bolsa de Fabricio y del timo entre individuos. Dada la implicación del bazo tanto en IR innata como adaptativa, hemos incluido en el análisis GO los pocos genes anotados que muestran expresión diferencial en este tejido además de los resultados obtenidos para la piel. Solamente un gen inhibido (SRY) y 8 sobre expresados en el bazo (*TMEM37*, *GPR156*, *TPT1*, *ZDHC8*, *MADCAM1*, *NOV*,

TIMD4, *TGFBR3*) produjeron clústeres funcionales bajo condiciones de high stringency con el análisis DAVID FAC.

Análisis de secuencias y ensamblaje “de novo”

El objetivo de obtener un transcriptoma *de novo* era el de investigar la arquitectura genética que subyace las resistencias inmunitarias en la perdiz roja. Se obtuvo a partir de la mezcla de ARN de diferentes tejidos implicados en el desarrollo tanto de IR innata como IR adquirida.

Secuenciamos una genoteca de cDNA que incluye timo, bolsa de fabricio, bazo y piel del área de inyección de PHA, mediante un protocolo de pair-end 2x100 pb obteniendo un total de 47.1 millones de lecturas raw pair-end. Después de eliminar las secuencias de los adaptadores, los nucleótidos ambiguos y las secuencias de baja calidad, se quedaron 38.3 millones de lecturas limpias (81%), con un contenido GC de 36% y una longitud media de 76 pb. El ensamblaje de estas secuencias dio como resultado 51,403 transcritos con una longitud de 100 pb a 5,464 pb, un tamaño medio de 503 pb y una longitud total de 25.8 Mb (Tabla 10, Figura 14).

Tabla 10: Resumen de los transcritos del ensamblaje de novo de tejidos inmunes en la perdiz roja.

Category	Quantity
All (> = 100bp)	51,403
> = 500bp	15,831
> = 1000bp	4,256
N50 (bp)	542
N90 (bp)	239
Max Length (bp)	5,464
Min Length (bp)	100
Average Length (bp)	503
Total Length (Mb)	25.8

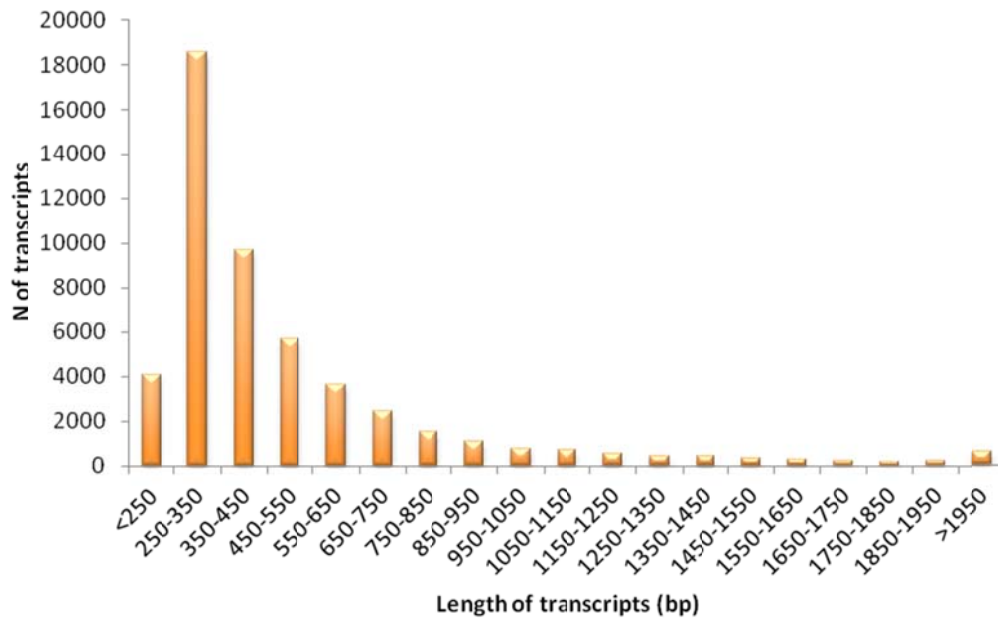


Figura 14: Distribución de los transcritos del ensamblaje de novo de tejidos inmunes de la perdiz roja.

La longitud N50 fue de 542 pb y la N90 de 239 pb. Otros ensamblajes como el utilizado aquí a k-mers elevados (79) tienen longitudes medias menores y N50 de ensamblajes a k-mers menores (Surget-Groba y Montoya-Burgos 2010; Mehr et al. 2015). La longitud de la distribución del ensamblaje de transcritos en la genoteca de cDNA se muestra en la figura 1. Más del 45 % de estos transcritos ensamblados están entre 100 y 349 pb.

Anotación del Transcriptoma

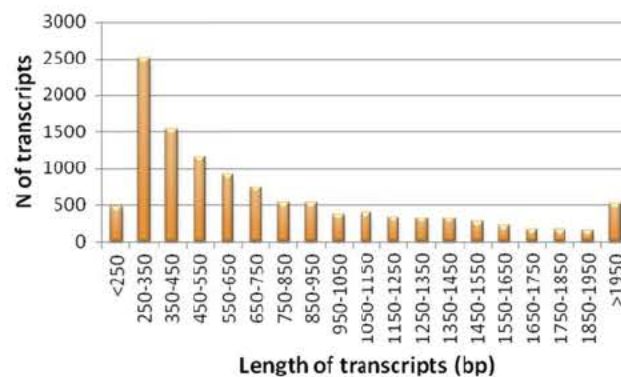
Una vez obtenidos los transcritos, estos fueron anotados funcionalmente basándonos en la similitud con proteínas de referencia Uniprot mediante un umbral de mínima similitud BLAST de $e < 10^{-10}$. El set de proteínas incluyó los Uniref90 clusters perteneciente al nodo taxonómico Aves. Seleccionamos solamente proteínas representativas de los clusters Uniref90 porque cada proteína pertenece solo a un cluster con una similitud del 90% con la proteína representativa de todos los miembros de ese cluster. Esto permitió conseguir una distancia más homogénea e uniforme entre las proteínas de referencia usadas para realizar los cluster de transcritos. Se pudieron anotar un total de 11,699 transcritos del transcriptoma de la perdiz roja (Tabla 11), con

una longitud entre 157 pb hasta 4,092 pb (longitud media de 764 bp (Figura 15A). la distribución del valor E mostró que 5,442 (47%) transcritos son significativamente homólogos con una significación de 1E-5 a 1E-50, y 3,537 (30%) transcritos están en un rango entre 1E-50 a 1E-100 (Figura 15B).

Tabla 11: Resumen de los resultados de anotación de los transcritos de tejido inmune de perdiz roja

Category	Quantity
Number of transcripts analysed	51,403
Number of transcripts annotated	11,699 (22.76%)
Number of transcripts not annotated	39,704 (77.24%)

A



B

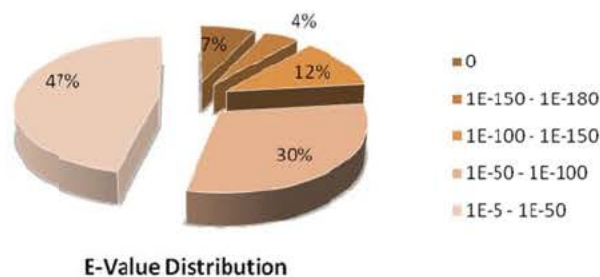


Figura 15: Resumen de los transcritos anotados. A) Distribución de la longitud. B) Distribución de los E-value.

El porcentaje de los transcritos anotados en este estudio (23%) es comparable con otros que también se han realizado sin un genoma relacionado completamente secuenciado (ej. 17% Clark et al. 2010 // 17% Franchini et al. 2011 // 17% Tariq et al. 2015), pero menor que en otros estudios (ej. 40% Meitern et al. 2014 // 40% Darris et al. 2015). Después de realizar algunos análisis manuales suplementarios de las secuencias de los transcritos y analizando algunos resultados BLASTN versus la base de datos nt (nt incluye todas las secuencias nucleotídicas de NCBI) las posibles causas de estos valores bajos pueden ser:

- 1) Que los transcritos más cortos no tengan longitud suficiente para obtener similitudes significativas para poder ser anotados.
- 2) El ensamblaje se ve impedido por repeticiones y transcritos alternativos.
- 3) Existen transcritos con una proporción de fragmentos polyA y polyT que no son transcritos reales.
- 4) La variación alélica entre las 16 muestras mezcladas (pool) puede tener una importancia significativa en el ensamblaje del transcriptoma.
- 5) Algunos transcritos no anotados corresponden a RNA no codificante.
- 6) La disponibilidad de proteínas de Aves no es muy alta en las bases de datos y algunos de los transcritos no anotados corresponde a nuevas proteínas actualmente ausentes de las bases de datos.
- 7) Los transcritos sin secuencia codificante predicha (CDSs) muestran longitudes más cortas, con una media de 426pb, por lo que una proporción de transcritos no anotados pueden ser transcritos fragmentados de genes poco expresados o de errores de ensamblaje.

Es importante resaltar que los genes del sistema inmune están sometidos a unas presiones selectivas muy fuertes con el objetivo de resistir a las agresiones de patógenos y por lo tanto sufren varias modificaciones en sus secuencias proteicas, lo que lleva a una menor conservación de secuencia y una mayor diversidad en sitios no sinónimos comparado con sitios sinónimos, (International Chicken Genome Sequencing Consortium 2004, Hughes et al. 2005). Todos estos factores pueden haber disminuido el éxito del ensamblaje de novo.

El grupo de transcritos anotado con la misma proteína de referencia se define como unigene, y se seleccionó la secuencia nucleotídica del transcrito consenso más larga representativa de cada unigene. Esta secuencia nucleotídica se leyó, en un marco de lectura positiva, como una proteína similar a la proteína Uniprot responsable de la formación del cluster. Las 6,623 proteínas incluidas en ese archive son proteínas que se representan transcritos de *A.rufa* con una similitud BLASTX con un umbral de $e < 10^{-9}$. Las anotaciones de esas proteínas se pueden considerar como anotaciones de cada unigene del catálogo de genes. Entre estos unigenes anotados, unos 3,312 (50%) se encuentran en el pollo (*Gallus gallus*), 1,470 (22%) en pavo (*Meleagris gallopavo*), 775 (12%) en humana (*Homo sapiens*), 620 (9%) el diamante cebrá (*Taeniopygia guttata*), y un número pequeño en otras especies.

Anotación funcional y clasificación de rutas KEGG

La anotación funcional permite asignar una función a cada transcrito y categorizarlo, ayudando a entender el significado fisiológico de grandes bases de datos de transcriptoma, y surtiendo de herramientas para diseñar ensayos futuros relacionados con funciones anotadas y genes candidatos.

Obtuvimos datos funcionales para cada gen/proteína en Uniprot, incluyendo anotaciones GO funcionales y anotaciones de caracterización, así como identificación de dominios, funciones enzimáticas potenciales (EC number) y motivos Interpro. En total, se asignaron 31,521 terminus GO a 5,344 de los unigenes anotados. Además se asignaron dominios a 1,461 unigenes, anotaciones enzimáticas a 428, y motivos Interpro a 6,128. Usamos el servidor REViGO para resumir los terminus GO y visualizar los datos para los procesos biológicos. (Figure 16).

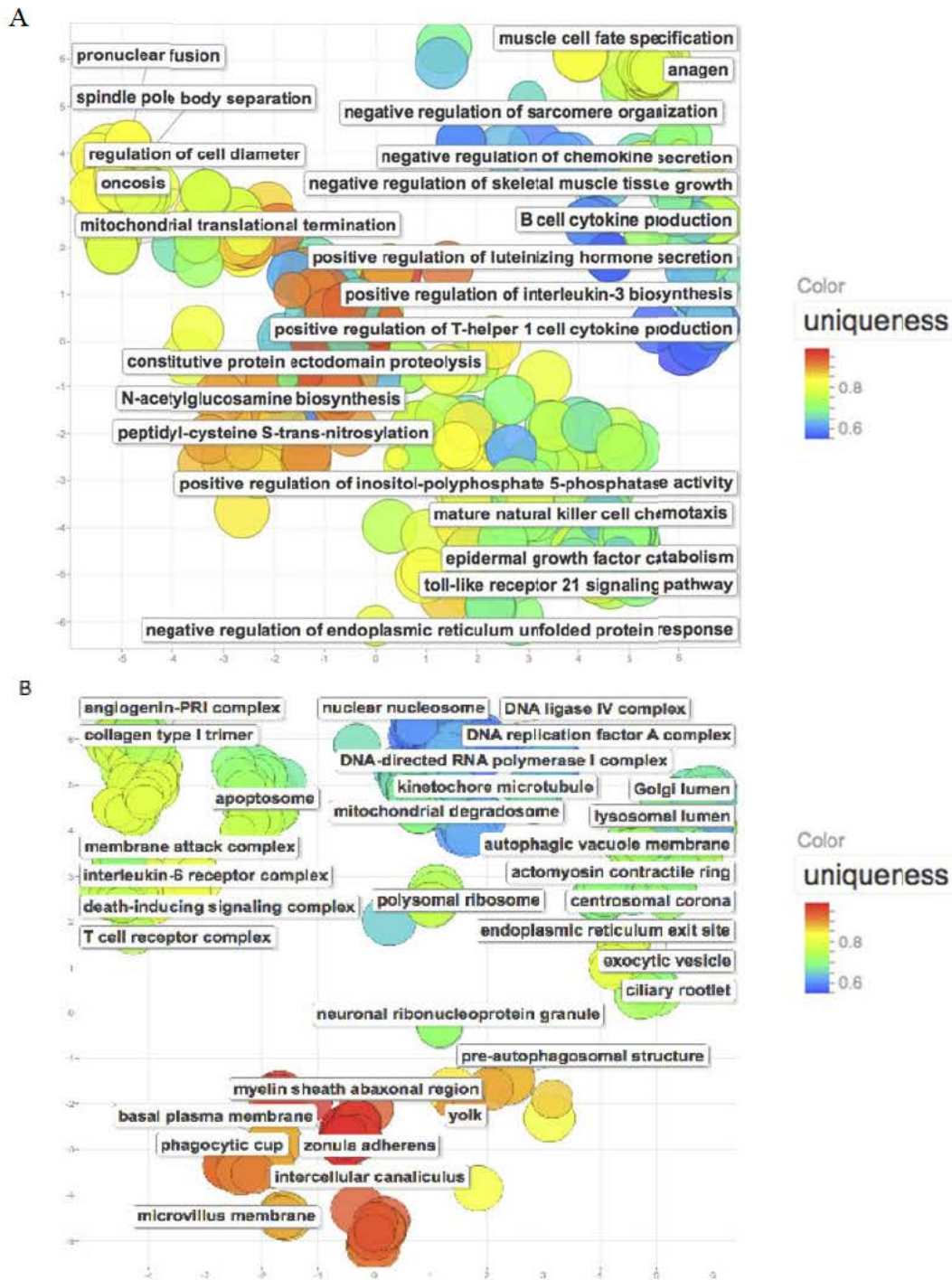


Figura 16: Gráfico REViGO de las clases GO categorizadas contra terminus "GO_ROOT" obtenidos con CateGORizer. A) Procesos biológicos B) Componente celular. Los terminus GO se representan con círculos y se muestran de acuerdo a las similitudes semánticas con otros terminus GO (los terminus GO más similares semánticamente están más cerca en la gráfica). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del término GO. El color indica la unicidad (rojo mayor, azul menor). Se muestran los terminus GO representativos de cada cluster

La gráfica de los procesos biológicos de la clasificación "GO_ROOT" muestra una gran cantidad de terminus que cubren procesos muy generales como era de esperar en la secuenciación de genes que se expresan de forma simultánea en diferentes tejidos. Los términos más abundantes se muestran en colores azules, por ejemplo la "regulación positiva de la producción de citoquinas de células T-helper 1", "la regulación positiva de biosíntesis de interleuquina 3", o "regulación positiva de la secreción de hormona luteinizante". Los colores que tienden hacia colores rojos serían los términos outlier, como por ejemplo los procesos que tienen baja similitud de media con otros términos, como "peptidyl-cysteine S-trans-nitrosylation", "N-acetylglucosamine biosíntesis" o "constitutive protein ectodomain proteolysis". Los componentes celulares implicados en estos procesos incluyeron también varios tipos celulares y organelas, desde el aparato de Golgi y lisosomas hasta neuronas.

Como nuestro mayor objetivo es el de caracterizar genes implicados en la orquestación de la IR en la perdiz, los terminus GO relacionados con "immune_class" se investigaron a fondo y se muestran en la tabla 12. En este caso se encontraron 1,870 términos GO únicos que pertenecen al menos a una de las 76 clases "immune_class". Se sabe que los sistemas neuroendocrino e inmune están integrados (Hangalapura et al. 2004; Adriaansen-Tennekes et al. 2009; Sild et al. 2011), que varios genes relacionados con la inmunidad están implicados en la respuesta al estrés como vemos aquí en el 12% de los términos GO está representada dentro de la "immune_class" (Tabla 12). El análisis REViGO asignó 1,804 terminus GO terms a procesos biológicos (Figura 17A), 63 a componente celular (Figure 4B) y 3 a función molecular. Algunos clusters de procesos biológicos muy representados muestran una asociación con respuestas de defensa, por ejemplo la regulación de diferentes células inmunes como células T y B, macrófagos, monocitos o eosinófilos, la regulación de la proliferación celular y de muerte celular, o la adhesión endotelial célula-célula, y también una regulación positiva de respuesta de comportamiento de miedo. En cuanto a componentes celulares, las estructuras implicadas en estos procesos inmune sobre todo incluye la mitocondrial, los lisosomas, vacuolas y vesículas y en menor medida los complejos de proteínas MHC (Figura 17B).

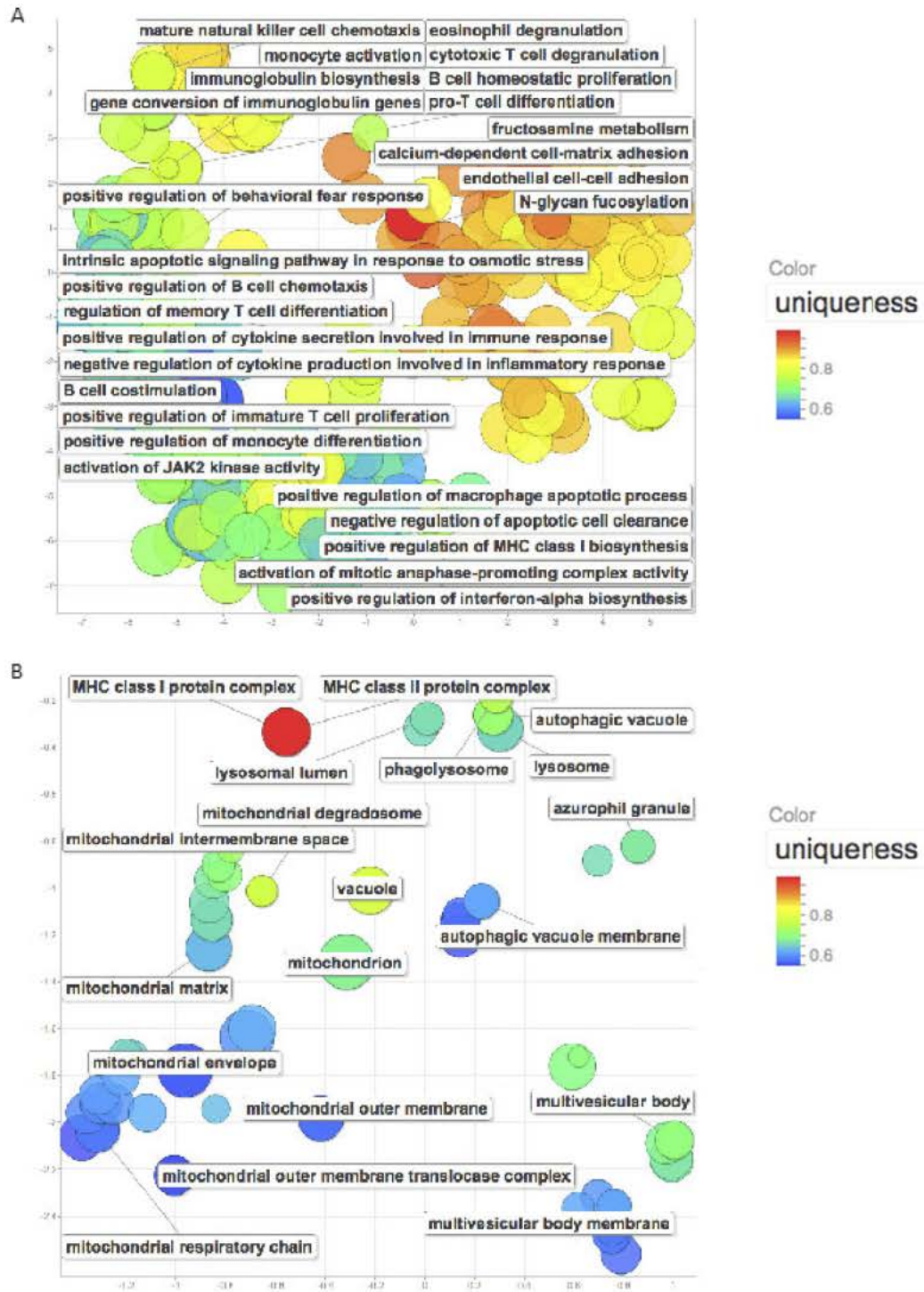


Figura 17: Gráfico REViGO de las clases GO categorizadas contra terminus "GO_ROOT" obtenidos con CateGORizer. A) Procesos biológicos B) Componente celular. Los terminus GO se representan con círculos y se muestran de acuerdo a las similitudes semánticas con otros terminus GO (los terminus GO más similares semánticamente están más cerca en la gráfica). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia del término GO. El color indica la unicidad (rojo mayor, azul menor). Se muestran los terminos GO representativos de cada cluster

Tabla 12: Mapeo de 1,870 términos únicos GO de 76 "immune_class"

GO Class ID	Definitions	Counts	Fractions
GO:0008152	metabolism	1,177	32.32%
GO:0006950	stress response	426	11.70%
GO:0019538	protein metabolism	370	10.16%
GO:0009056	catabolism	149	4.09%
GO:0006629	lipid metabolism	129	3.54%
GO:0006915	apoptosis	116	3.19%
GO:0006955	immunology, immune response	99	2.72%
GO:0007155	cell adhesion	88	2.42%
GO:0009605	response to external stimulus	87	2.39%
GO:0016265	death	73	2.00%
GO:0001816	cytokine production	71	1.95%
GO:0005975	carbohydrate metabolism	69	1.89%
GO:0046649	lymphocyte activation	66	1.81%
GO:0009719	response to endogenous stimulus	65	1.78%
GO:0009628	response to abiotic stimulus	42	1.15%
GO:0051249	regulation of lymphocyte activation	39	1.07%
GO:0042110	T cell activation	39	1.07%
GO:0042981	regulation of apoptosis	35	0.96%
GO:0005739	mitochondrion	32	0.88%
GO:0000165	MAPKKK cascade	28	0.77%
GO:0006897	endocytosis	28	0.77%
GO:0030098	lymphocyte differentiation	27	0.74%
GO:0043408	regulation of MAPKKK cascade	23	0.63%
GO:0042445	hormone metabolism	21	0.58%
GO:0046651	lymphocyte proliferation	21	0.58%
GO:0009607	response to biotic stimulus	18	0.49%
GO:0042113	B cell activation	17	0.47%
GO:0046879	hormone secretion	15	0.41%
GO:0005773	vacuole	15	0.41%
GO:0016032	viral life cycle	15	0.41%
GO:0045619	regulation of lymphocyte differentiation	15	0.41%
GO:0050670	regulation of lymphocyte proliferation	14	0.38%
GO:0005768	endosome	14	0.38%
GO:0050663	cytokine secretion	14	0.38%
GO:0019724	B cell mediated immunity	13	0.36%
GO:0006909	phagocytosis	12	0.33%
GO:0042107	cytokine metabolism	12	0.33%
GO:0042089	cytokine biosynthesis	12	0.33%
GO:0051403	stress-activated MAPK cascade	12	0.33%
GO:0016064	humoral defense mechanism (sensu Vertebrata)	11	0.30%
GO:0007259	JAK-STAT cascade	9	0.25%
GO:0007254	JNK cascade	8	0.22%
GO:0046425	regulation of JAK-STAT cascade	8	0.22%
GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	8	0.22%
GO:0046328	regulation of JNK cascade	7	0.19%
GO:0042446	hormone biosynthesis	6	0.16%
GO:0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB cascade	6	0.16%
GO:0006119	oxidative phosphorylation	6	0.16%
GO:0005764	lysosome	5	0.14%
GO:0006959	humoral immune response	5	0.14%
GO:0042088	T-helper 1 type immune response	5	0.14%
GO:0014065	phosphoinositide 3-kinase cascade	4	0.11%

GO:0042092	T-helper 2 type immune response	4	0.11%
GO:0000910	cytokinesis	3	0.08%
GO:0030224	monocyte differentiation	3	0.08%
GO:0045655	regulation of monocyte differentiation	2	0.05%
GO:0006693	prostaglandin metabolism	2	0.05%
GO:0042611	MHC protein complex	2	0.05%
GO:0046677	response to antibiotic	2	0.05%
GO:0042742	defense response to bacteria	2	0.05%
GO:0042562	hormone binding	1	0.03%
GO:0006956	complement activation	1	0.03%
GO:0042590	antigen presentation, exogenous antigen via MHC class I	1	0.03%
GO:0008210	estrogen metabolism	1	0.03%
GO:0046718	entry of virus into host cell	1	0.03%
GO:0006121	mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone	1	0.03%
GO:0006120	mitochondrial electron transport, NADH to ubiquinone	1	0.03%
GO:0030260	entry into host cell	1	0.03%
GO:0008627	induction of apoptosis by ionic changes	1	0.03%
GO:0042117	monocyte activation	1	0.03%
GO:0008625	induction of apoptosis via death domain receptors	1	0.03%
GO:0042288	MHC class I protein binding	1	0.03%
GO:0005125	cytokine activity	1	0.03%
GO:0042287	MHC protein binding	1	0.03%
GO:0017144	drug metabolism	1	0.03%
GO:0008631	induction of apoptosis by oxidative stress	1	0.03%
Total		3,642	100%

Identificación de genes relacionados con la inmunidad

Los genes implicados en el sistema inmune aviar tienen un patrón de expresión tejido específico mayor que otros genes (Ekblom et al. 2010). El transcriptoma de perdiz anotado final comprende los genes expresados después de un desafío no-infeccioso y permite entender tanto las IR innata como adquirida, así como decidir los tejidos inmunes más importantes en las aves implicados en el desarrollo de esas respuestas inmunes—timo, bolsa de Fabrico, bazo y piel. Para obtener una imagen completa de los genes y las redes reguladoras implicadas en la orquestación de las IR en las perdices, los transcritos anotados se analizaron utilizando la herramienta DAVID. De los 6,623 unigenes anotados, el análisis DAVID FAC produjo 187 clusters funcionales enriquecidos bajo unas condiciones concretas para 289 unigenes de perdiz implicados en procesos de resistencia inmunitaria. Los clusters más enriquecidos fueron “desarrollo del sistema inmune” con 97 de 289 genes y mostrando un enrichment score (ES) de 91.4, “activación de leucocitos” incluyendo 82 genes y 66 ES, y “regulación de la activación leucocitaria” ‘con 52 genes y 40.8 ES.

El análisis de enriquecimiento de KEGG pathway usando tanto *Gallus gallus* y *Homo sapiens* como referencia permite detectar un total de 32 rutas para los 289 unigenes. “interacción citoquina-citoquina” fue la ruta enriquecida más significativa e incluye 32 genes y muestra un p-valor de $9,3 \times 10^{-10}$.

Finalmente, la distribución en los cromosomas de los genes relacionados con inmunidad se hizo utilizando la información del pollo. Hay cuatro regiones genómicas enriquecidas en los cromosomas 1, 7, 13, and 21 (Figure 18). Los clusters funcionales que se identificaron con el análisis FAC DAVID de los grupos de genes en los cromosomas 1, 7 y 13 están implicados sobre todo en la regulación de la IR y la hemopoyesis, pero también en procesos más generales como la regulación de los procesos metabólicos de proteínas celulares, organización de célula y organela, homeostasis celular, procesos neuronales, procesos metabólicos de DNA o regulación negativa de la apoptosis. Entre ellos, el cromosoma 1 que es más grande, reúne el mayor número de genes (45), con varias concentraciones de genes como una familia de interleuquinas en una región que abarca 174pb (Figure 18).

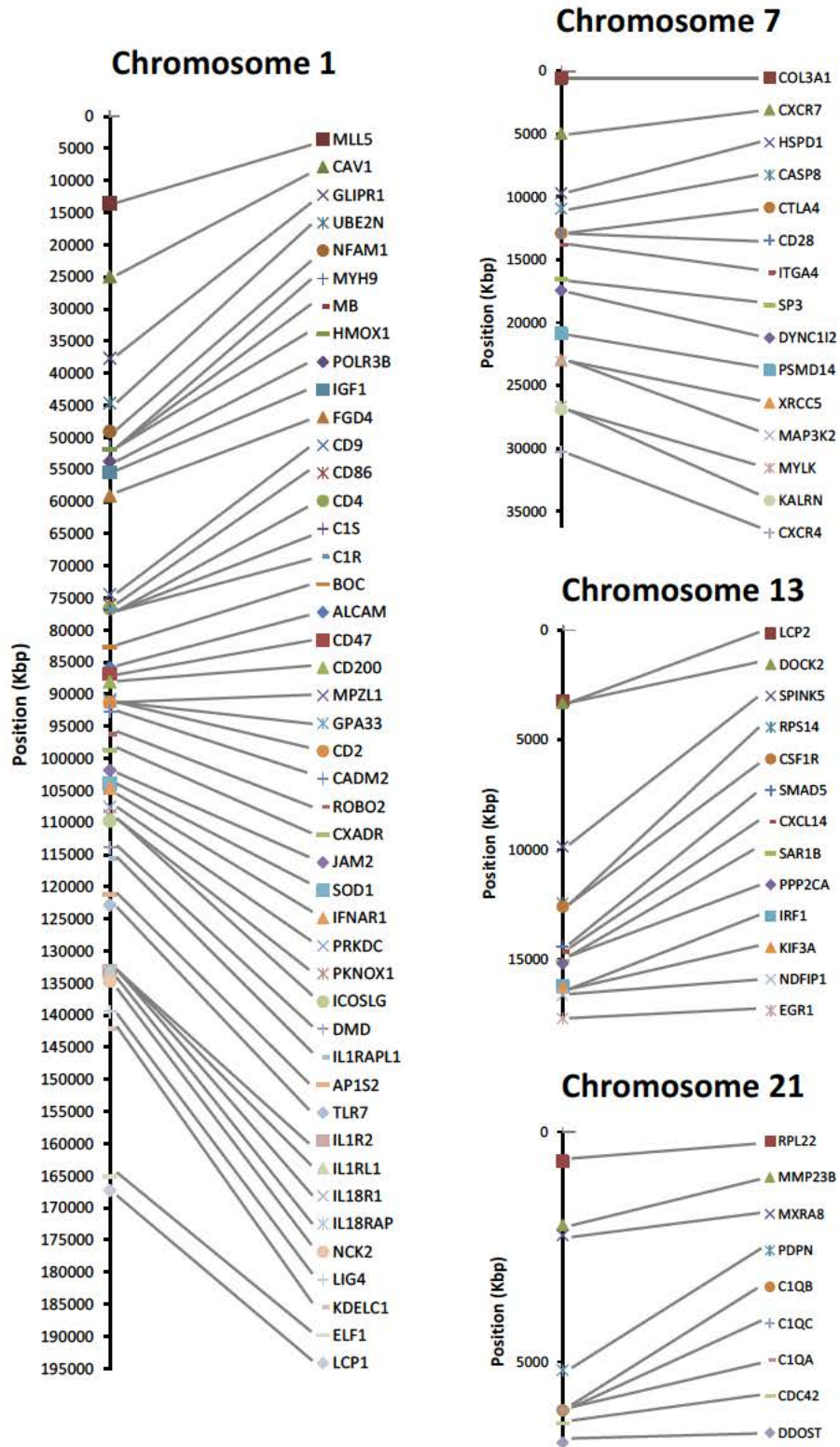


Figura 18: Distribución de los genes enriquecidos relacionados con la inmunidad en los cromosomas de pollo 1, 7, 13, and 21

Identificación de marcadores asociados a genes: microsatellites y SNPs

Los microsatélites son marcadores útiles para realizar estudios de diversidad genética y de detección de la introgresión de especies foráneas en poblaciones de perdices. En este estudio hemos identificado un total de 12,828 microsatélites en el transcriptoma de la perdiz roja (Tabla 13). Las repeticiones de tipo tri y hexanucleótidos son los menos comunes (3%), como se podía esperar ya que este tipo de repeticiones están ubicados en regiones no traducidas por causar interrupciones en el marco de lectura (Primmer 2009). La repetición más común era de di-nucleótidos y representa el 73% de los microsatélites detectados.

Tabla 13: Resumen de secuencias de repetición simples (SSRs) identificadas en la perdiz roja

SSR information	Number
Di-nucleotide repeats	9,412 (73%)
Trinucleotide repeats	433(3%)
Tetranucleotide repeats	1,290 (10%)
Pentanucleotide repeats	1,291 (10%)
Hexanucleotide repeats	402 (3%)
Total number of identified SSRs	12,828

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) son ahora mismo los marcadores más útiles para muchos estudios genéticos y genómicos gracias a su gran eficiencia de genotipado. Los SNPs incluidos en regiones codificantes se pueden utilizar para explicar la influencia de la selección natural en el nivel del gen y la proteína (Ellegren 2008), y permiten además encontrar asociaciones entre marcadores en genes candidatos y caracteres económicos de importancia. Hemos identificado 33,857 SNPs situados en 18,371 transcritos (Tabla 14). Entre estos, 8,299 (25%) están en 3,025 secuencias anotadas. 145 loci de los 289 unigenes relacionados con inmunidad en la perdiz contienen un total de 548 SNPs. Es necesaria más investigación en estos SNPs para detectar la variabilidad individual en la Resistencia a infecciones y otras agresiones externas en las perdices.

Tabla 14: Resumen de los SNPs identificados en el transcriptoma de la perdiz roja

SNP information	Number
Transitions	25,729 (76%)
A/G	12,861 (38%)
C/T	12,868 (38%)
Transversions	8,128 (24%)
A/C	1,928 (6%)
A/T	3,050 (9%)
C/G	1,149 (3%)
G/T	2,001 (6%)
Total number of identified SNPs	33,857
Number of transcripts with SNPs	18,371
Number of annotated unigenes with SNPs	3,025

El número de transiciones y transversiones en los sitios SNP fue de 25,729 y 8,128 (Tabla 14), respectivamente, dando una relación transición/transversion (Ts/Tv) de 3.17. Aunque este cociente Ts/Tv observado en este estudio es mayor que lo observado en el gorrión (1.95) (Ekblom et al. 2014), otros estudios han fijado una relación Ts/Tv de 3-4 para regiones codificantes (Marth et al. 2011), y un cociente Ts/Tv alto, suele ser una buena medida para obtener una frecuencia baja de falsos positivos en el desarrollo de SNPs, manteniendo una buena tasa de validación para los SNPs seleccionados en este estudio (Shen et al. 2005; Liu et al. 2012). La ratio GC ratio en los sitios SNP es de 47.2%, similar a los descritos en el gorrión (Ekblom et al. 2014). El tipo de marcador (haplotipo SNP o microsatélite) y su localización (génica o no génica) afecta significativamente los estimadores de diversidad en la población y de divergencia, mostrando la importancia de seleccionar los mejores métodos para realizar preguntas evolutivas y ecológicas (Defaveri et al. 2013). Por lo tanto y a pesar de una tendencia mayor para el uso del SNP sobre el microsatellite, ambos marcadores detectados serán útiles en estudios genéticos o genómicos en ecología y en evolución en poblaciones de perdiz roja.

Análisis de los genes diferencialmente expresados

Mientras que los procesos mayoritarios de inhibición tienen que ver con categorías funcionales en el análisis DAVID-FAC de tipo basal o general, por ejemplo 'organic acid catabolic processes', or 'carboxylic acid catabolic process', los resultados

del análisis de enriquecimiento GO permiten agrupar los genes sobre-expresados en cuatro clases principales (Figura 19):

- a) Proliferación celular y muerte celular.
- b) Cicatrización de heridas.
- c) Procesos de respuesta inmune.
- d) Actividad lítica.

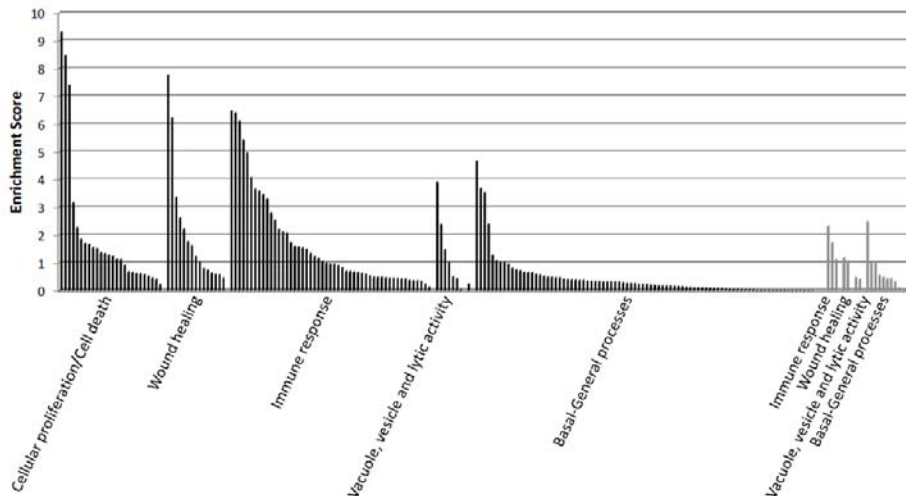


Figura 19: Agrupación de genes sobre-expresados

Proliferación y muerte celular

Los procesos de proliferación celular muestran unos valores de enriquecimiento en el análisis FAC de los genes sobre-expresados (Fig. 19). DAVID identifica 145 genes con expresión de genes que van de 0,46 a 4,63 y que se agrupan funcionalmente en términos GO relacionados con procesos de proliferación celular, como fases del ciclo celular, ciclo mitótico, quinetocoro, empaquetamiento de ADN etc, pero también con regulación de muerte celular programada.

La sobre-expresión importante de procesos de proliferación celular es esperada dado su papel clave en la progresión de la IR frente a agresiones externas o patógenos. De hecho, el 40% de los genes incluidos en rutas relacionadas con proliferación celular juegan también un papel en diferentes procesos de IR, algunos de ellos directamente implicados en la proliferación de leucocitos como por ejemplo 1) CD3E, esencial para la

maduración temprana de timocitos, diferenciación y proliferación de linfocitos T (Brodeur *et al.* 2009); 2) la proteína de membrana linfocitaria CD5 (CD5) que juega un papel clave en la fisiología de células B1 (Garaud *et al.* 2008); 3) las proteín-quinazas *PRKCQ* and *SYK*, que median la fosforilación proteica, un componente fundamental en la señalización celular con varias actividades cruciales, desde controlar el crecimiento celular y la proliferación hasta la iniciación y regulación de respuestas inmunológicas (Patterson *et al.* 2014); o 4) *TNFSF4v* también conocido como *OX40L* que permite la proliferación, la supervivencia y diferenciación de células T y regula su producción de citoquinas (Lei *et al.* 2014).

Por otro lado el sistema inmune es altamente dependiente de la muerte celular para realizar una respuesta eficiente de muchos tipos inmunes celulares durante las IRs innata, humoral y celular, así como para una correcta tolerancia inmune adaptativa y homeostasis (Lu *et al.* 2014). Por lo tanto, la sobre-expresión de genes implicados en la regulación de la muerte celular como el factor nuclear inductor de la apoptosis 1 (*NAIF1*), o la detección en las perdicés con alta IR de la quinasa asociada a muerte 1 (*DAPK1*), un mediador positivo de muerte celular programada inducida por gamma-interferon (Bialik & Kimchi 2006).

Cicatrización de heridas

Los procesos de cicatrización de heridas de la piel comprenden tres fases parcialmente solapantes (Haertel *et al.* 2014): 1) coagulación de la sangre e inflamación; 2) formación de nuevo tejido a través de la formación de tejido reepitelial y de granulación; y 3) remodelación de tejidos.

El análisis DAVID identificó 68 genes sobre-expresados con cambios de expresión que van de 0.43 to 3.75 y que se agrupan funcionalmente en términos GO comunes relacionados con esta categoría como es la organización de matriz extracelular, la formación de colágeno, el desarrollo de la piel, y la regeneración de tejidos (Figura 19). Sin embargo los valores de enriquecimiento GO no revelan ninguna ruta sobrerrepresentada para coagulación de la sangre, probablemente porque los vasos sanguíneos no se ven alterados en este ensayo.

En cuanto a la inflamación, las células inmunes modulan la cicatrización de heridas y la formación de cicatriz promocionando las interacciones celulares,

secretando moléculas de señalización como las citoquinas y las quemoquinas y los factores de crecimiento como vemos en el párrafo siguiente (Strbo *et al.* 2014). Como también ocurre para la proliferación celular, muchos genes (63%) incluidos en rutas relacionadas con la cicatrización de heridas, juegan también un papel en diferentes procesos IR. Un ejemplo es un factor de transcripción sobre-expresado después de la herida e implicado en la fase de re-epitelización: factor de crecimiento c-Fos inducido (*FIGF*) (Li *et al.* 2003). Otro ejemplo es la familia de factores de transcripción E2F, que son reguladores importantes de la proliferación celular a través de sus efectos en la expresión de genes implicados en la progresión del ciclo celular (Fang & Han 2006): *E2F1*, que está sobre-expresado en nuestro estudio se ha implicado en la correcta re-epitelización y la respuesta inflamatoria (D'Souza *et al.* 2002); *E2F5*, también sobre-expresado en grupo de perdices “robustas”, parece jugar un papel importante durante la maduración de queratinocitos y promueve la entrada en quiescencia (Apostolova *et al.* 2002). Uno de los mayores reguladores de reparación de heridas es el factor de crecimiento b (*TGF-β*), que afecta a diferentes tipos celulares en la cicatrización wound (Werner & Grose 2003), en parte a través de sus receptores *TGFBR2* and *TGFBR3*, ambos sobre-expresados en el grupo de perdices con mayor IR.

Finalmente, el tejido dérmico resultante se compone mayoritariamente de una matriz extracelular que sufre una remodelación significativa, como se puede ver en los valores de enriquecimiento de los términos GO sobre-representados ‘extracellular matrix’, que incluye genes relacionados con la producción y organización de colágeno (*COL6A3*, *COL6A2*, *COL6A1*, etc.), o las metaloproteinasas de matriz (MMP) implicadas en la remodelación de la matriz extracelular (*MMP7*, *MMP23B*).

Respuesta inmune

En comparación con los mamíferos, las aves tienen diferentes repertorios de receptores Toll-like, defensinas, citoquinas, quemoquinas, anticuerpos y otras moléculas inmunes. Las diferencias en las aves también incluyen los heterófilos en vez de los neutrófilos de los mamíferos, la falta de nódulos linfáticos o la presencia de la bolsa de Fabricio. Sin embargo, los principios de la IR innata se mantiene constante para las especies de vertebrados estudiados hasta la fecha incluyendo el pollo (Kaiser 2010).

Los análisis DAVID identificaron 198 genes sobre-expresados con unos cambios en la expresión de genes que van de 0.34 a 4.63 y que se agrupan funcionalmente en términos GO relacionados con procesos del sistema inmune, incluyendo regulación general de proliferación de leucocitos, diferenciación y activación, desarrollo de órganos linfoides, selección de células T del timo o transducción de señales activadoras de la IR.

En cuanto a la primera línea de defensa de la inmunidad innata aviar, el gen lisozima (*LYZ*), expresado por macrófagos maduros y el gen del receptor de la transferrina (*TFRC*) están sobre-expresados en el grupo de muestras de alta IR. Collectin (*COLEC12*), que también está sobre-expresado y actúa como un opsonin que mejora la fagocitosis, avidin (*AVN*) sobre-expresado tanto en bazo como en la piel y cuya inducción independiente de la progesterona se ha visto que ocurre en todos los tejidos excepto en el cerebro como respuesta a la formación de heridas o a la inflamación (Kunns *et al.* 1992). Los heterófilos se pueden activar por citoquinas y chemoquinas, llevando a un incremento de la fagocitosis y de las actividades antimicrobianas, pero también genera unos efectos reguladores tanto en células hematopoiéticas y otras células del sistema inmunitario implicadas en la defensa del individuo y en la homeostasis (Kaiser 2010). La sobre-expresión de genes relacionados con citoquinas en perdices con mayor IR incluyen: 1) varios genes reguladores de interferones (*IFNAR1*, *IFNAR2*, *IRF2BP2*, *IFI30*, *IRF-4*, *STAT4*, *JAK3*, *JAKMIP1*, *SOCS5*, *TRIM59*); 2) receptores de interleuquinas (*IL2RA*, *IL9R*, *IL21R*, *IL7R*, *IL2RG*) con actividad funcional que implica a los linfocitos; 3) el receptor del factor estimulador de colonias (CSF1) *CSF1R*; 4) los receptores de factor de crecimiento (TGFs) (*TGFBR2*, *TGFBR3*) que tienen un papel importante en la regulación de la respuesta inflamatoria; 5) los miembros de la superfamilia de factores de necrosis de tumores (TNFs) (*TNFRSF13C*, *TNFAIP8L1*, *C1QTNFG*, *TNFSF4*, *TNFRSF18*, *TNFRSF1B*, *TNFRSF9*, *TNFRSF25*), que muestran un amplio abanico de actividades que incluyen tanto la regulación de IR como el desarrollo de la arquitectura del sistema inmune y otros órganos; y 6) las chemoquinas (*CCR4*, *CCL19*, *CCR8*, *CXCR5*, *CXCL14*).

Las IR innatas mediadas por IFN generan una primera línea de defensa robusta frente a patógenos invasores. Después de la detección del patógeno y la producción de IFN, las moléculas IFN se unen a la superficie de la célula e inician una cascada de

señalización a través del transductor de señal Janus kinasa y la ruta del activador de transcripción (JAK-STAT), llevando a la regulación transcripcional de cientos de IRGs (Schneider *et al.* 2014). La señalización IFN también juega un papel importante en la formación de la IR adaptativa. Se detectó la expresión incrementada de los receptores IFN- α de tipo 1 (*IFNAR1*) y 2 (*IFNAR2*) en las perdicas con Ir alta, lo que incluye el única ruta de señalización de tipo I (Schneider *et al.* 2014). Otros genes sobre-expresados son *JAK3* un miembro de los JAKs que juega un papel importante en la diferenciación de células hematopoiéticas (Rane & Reddy 1994), y *STAT4*, que pertenece a una familia de activadores transcripcionales que dirigen la expresión de IRG (Schneider *et al.* 2014).

Los receptores de reconocimiento de patrón (PRRs) refuerzan la señalización IFN y permiten la generación de células para una detección mejorada de los patógenos. De la variedad de PRRs expresados en las células inmunitarias aviares, hay una expresión incrementada de la isoforma de tipo 1 de *TLR2* (*TLR2-1*), *TLR6*, y la específica de aves *TLR21* receptor Toll-like (TLRs). Los TLRs actúan como un mecanismo de conexión entre los sistemas innato y adaptativo. Durante la unión, estos receptores activan una serie de eventos intracelulares que llevan a la muerte de las células infectadas por bacterias o virus así como el reclutamiento y activación última de linfocitos T y B específicos de antígenos (Keestra *et al.* 2010).

Entre las chemoquinas, el patrón de expresión del ligando 14 de la chemoquina (C-X-C motif) es especialmente interesante porque se conoce su papel en las respuestas inflamatorias. Esta chemoquina tiene su papel antimicrobiano a través de una actividad selectiva en los monocitos, células dendríticas y células natural killer (Starnes *et al.* 2006). Se ha propuesto que niveles altos de CXCL14 en la epidermis neutralizan los microbios que entran en la piel cuando hay pequeñas heridas y permiten un Sistema anti-microbiano instantáneo que protege la piel de IRs celulares excesivos (Wolf & Moser 2012).

La sobre-expresión del gen *CD4* también fue detectada en este estudio. Este gen codifica una glicoproteína de membrana de linfocitos T, células B, macrófagos y granulocitos que interactúan con antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). La proteína funciona iniciando o aumentando la activación de células T en las fases iniciales. Otros genes relacionados con MHC clase I (*CD74*, *BLB1*, *DMB2*) y clase II (*BFIV21*) están sobre-expresados en nuestro estudio. El MHC

está implicado en el procesamiento de antígenos y la presentación de linfocitos T y de células natural killer.

Las inmunoglobulinas reconocen antígenos extraños e inician IRs como los fagocitos y los sistemas complementarios. Se han detectado varios genes de inmunoglobulinas sobre-expresados en el grupo de perdices robustas, incluyendo *TIMD4*, *CD79B*, *IGJ*, *IGSF10*, *VSIG4*, and *IGSF6*. La sobre-expresión de varios miembros de la familia DOCK (*DOCK2*, *DOCK8*, *DOCK10*, and *DOCK11*), implicados en la regulación de la actina del citoesqueleto, adhesión celular y migración. Entre ellos, *DOCK2* se expresa mayoritariamente en células hematopoiéticas y regula la migración y activación de leucocitos mientras las mutaciones en *DOCK8* están implicadas en la especie humana al síndrome de inmunodeficiencia combinada (Nishikimi *et al.* 2013). Además de esta regulación positiva de procesos relacionados con la inmunidad, también se necesitan reguladores negativos para resolver el estado inducido por IFN y facilitar el retorno a una homeostasis celular. Por lo tanto, la inhibición de algunos genes inmunes y la sobre-expresión de elementos supresores ayudan a mantener controlada la IR citotóxica como *JAKMIP1*, incluido en la familia JAK, *TYK2* que se ha descrito como un gen de memoria efector para reducir la citotoxicidad mediada por las células T cytotoxicity (Libri *et al.* 2008), *SOCS5*, un supresor de la señalización de citoquinas inducida tempranamente en la respuesta IFN (Schneider *et al.* 2014), o *TRIM59* que regula negativamente las quinasas para IRGs (Kondo *et al.* 2012),

Actividad lítica

Finalmente, los análisis DAVID han identificado 82 genes sobre-expresados con cambios que van de 0.52 a 3.74 y que se agrupan funcionalmente en términos comunes GO relacionados con procesos como la actividad de la peptidasa, lisosoma, vacuola lítica, o vesícula citoplásmica. La actividad lítica de los macrófagos, heterófilos y células natural killer durante la IR innata se traduce en la actividad doble de un 40% de los genes incluidos tanto en esta sección en procesos inmunes y líticos.

Este estudio ha revelado que la capacidad del sistema inmune para responder a patógenos y a agresiones ambientales implica de forma importante regulaciones transcripcionales y post-transcripcionales en la perdiz roja. Los análisis de las rutas

metabólicas y de los procesos biológicos que están activados o desactivados a medida que la respuesta inmunitaria se va generando han mostrado el papel clave del sistema inmune mediante el cual los procesos de proliferación celular, muerte celular, cicatrización y actividad lítica se orquestan en las diferentes fases de la IR innata, expandiendo nuestro entendimiento de los mecanismos moleculares implicados en el sistema inmunitario de las aves.

La imagen comprensiva de los perfiles transcripcionales que se generan en los desafíos no infecciosos con PHA y SRBC indican además que las perdices que muestran mayor respuesta inmunitarias tienen una mejor activación de rutas de genes de defensa del individuo complementada con una fuerte desensibilización controlada que facilita el retorno a la homeostasis celular. Estos datos abren la posibilidad de mejorar la resistencia a las enfermedades o la robustez mediante el uso de selección asistida por genoma para incrementar la IR innata en las perdices, reforzando la capacidad de resistir infecciones por parte de un amplio espectro de patógenos y de impedir el estrés generado por diferentes escenarios dinámicos que son un reto como es el cambio climático.

6. CONCLUSIONES

Los hitos conseguidos en este proyecto son:

1. La constitución de grupos de animales con RI diferenciada mediante la realización de dos desafíos no infecciosos, que evalúan tanto la inmunidad innata como la adquirida.
2. La secuenciación y ensamblaje de novo del transcriptoma completo de la perdiz, lo que representa un resultado de gran relevancia científica ya que proporciona una valiosa información genética para el estudio de mecanismos moleculares en la perdiz y en especies próximas filogenéticamente.
3. La obtención de 33.857 SNPs en *Alectoris rufa*, de los cuales 8.299 se encuentran en genes conocidos, lo que, junto con el transcriptoma completo de la perdiz, facilitará el abordaje de futuros proyectos de mejora al incrementar notablemente la información genética disponible en esta especie.
4. La localización de genes candidatos vinculados a diferencias en la magnitud de la RI en perdiz, así como genes relacionados con otros procesos biológicos.
5. La selección, a través de la población experimental, de un sub-conjunto de SNPs con diferentes niveles de significación en su asociación con la magnitud de las RIs innata y adquirida.
6. La puesta a punto de un sistema de genotipado simultáneo, rápido y a bajo coste del subconjunto óptimo de marcadores para la selección rutinaria en la explotación de las perdices con mayor resistencia a enfermedades infecciosas.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Adriaansen-Tennekes R, Decuypere E, Parmentier HK, Savelkoul HF (2009) Chicken lines selected for their primary antibody response to sheep red blood cells show differential hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness to mild stressors. *Poultry Sci.* 2009; 88: 1879-82.
- Aebischer, N. & Lucio, A. (1997), Red-legged partridge (*Alectoris rufa*). - In: Hagemeyer, E.J.M. and Blair, M.J. (Eds.); *The EBBC Atlas of European Breeding Birds: Their Distribution and Abundance*. - T & AD Poyser, London, pp. 208–209
- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg JK (2001). The problems with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*. 16:613-622
- Alonso FJ. (1994) *Vida y caza de la perdiz*. Alianza Editorial, Madrid.
- Andersen C, Jensen J, Orntoft T (2004) Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.* 2004; 64: 5245–5250.
- Apostolova MD, Ivanova IA, Dagnino C, D'Souza SJA, Dagnino (2002) L. Active import and export mechanisms regulate E2F-5 subcellular localization. *J Biol Chem.* 2002; 277: 34471-34479.
- Aroca J (1964) La perdiz roja. *Montes* 58, 276-278
- Backström N, Fagerberg S, Ellegren H (2008) Genomics of natural bird populations: a gene-based set of reference markers evenly spread across the avian genome. *Molecular Ecology*, 17, 964-980.
- Barbanera F, Guerrini M, Hadjigerou P, Panayides P, Sokos C, Wilkinson P, Khan AA, Khan BY, Cappelli F, Dini F (2007) Genetic insight into Mediterranean chukar (*Alectoris chukar*, Galliformes) populations inferred from mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetica, Springer Netherlands* 131, 287-298.

- Barbanera F, Negro JJ, Di Giuseppe G, Bertoncini F, Cappelli F, Dini F (2005) Analysis of the genetic structure of red-legged partridge (*Alectoris rufa*, Galliformes) populations by means of mitochondrial DNA and RAPD markers: a study from central Italy, *Biological Conservation* 122, 275-287
- Barbanera F, Pergams ORW, Guerrini M, Forcina G, Panayides P, Dini F. (2010) Genetic consequences of intensive management in game birds. *Biol Conserv.* ;143:1259–68
- Barilani M, Bernard-Laurent A, Mucci N, Tabarroni C, Randi E (2007) Hybridization with introduced chukars (*Alectoris chukar*) threatens the gene pool integrity of native rock (*A. graeca*) and red-legged (*A.rufa*) partridge populations. *Biological conservation*, 137, 57–69.
- Barilani M, Sfougaris A, Giannakopoulos A, Mucci N, Tabarroni C, Randi E (2007) Detecting introgressive hybridisation in rock partridge populations (*Alectoris graeca*) in Greece through Bayesian admixture analyses of multilocus genotypes. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-006-9174-1
- Bernard-Laurent A (1984) Hybridation naturelle entre Perdix bartavelle (*Alectoris graeca saxatilis*) et Perdix rouge (*Alectoris rufa rufa*) dans les Alpes Maritimes. *Gibier Faune Sauvage*, 2, 79–96.
- Bialik S, Kimchi A (2006) The death-associated protein kinases: Structure, function, and beyond. *Annu. Rev. Biochem.*, 75 (2006), pp. 189–210.
- BirdLife International (2015) Species factsheet: *Alectoris rufa*. <http://www.birdlife.org>. Accessed 3 June 2015.
- Biscarini F, Bovenhuis H, van Arendonk JA, Parmentier HK, Jungerius AP, van der Poel JJ (2010) Across-line SNP association study of innate and adaptive immune response in laying hens. *Anim Genet.* 2010;41:26–38. doi: 10.1111/j.1365-2052.2009.01960.x. pmid:19781038
- Blanco-Aguilar JA, Virgós E, Villafuerte R (2004). Perdiz Roja (*Alectoris rufa*). In: Madroño A, González C, Atienza JC, editors. Libro Rojo de las Aves de España. Madrid: Dirección General para la Biodiversidad-SEO/BirdLife; p. 182-185.

- Boguski MS, Tolstoshev CM, Bassett DE Jr. (1994) Gene discovery in dbEST. *Science*. Sep 30, 265(5181):1993-4.
- Boletín Oficial del Estado (BOE) (2005) Real Decreto 1201/2005 sobre protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos. 2005; 252: 34367–34391
- Bonneaud C, Balenger SL, Russell AF, Zhang J, Hill GE, Edwards SV (2011) Rapid evolution of disease resistance is accompanied by functional changes in gene expression in a wild bird. *Proc Natl Acad Sci*. 108, 7866–7871.
- Bonneaud C, Pérez-Tris J, Federici P, Chastel O, Sorci G (2006) Major histocompatibility alleles associated with local resistance to malaria in a passerine. *Evolution*. 2006 Feb;60(2):383-9.
- Bovenhuis H, Bralten H, Nieuwland MG, Parmentier HK. (2002) Genetic parameters for antibody response of chickens to sheep red blood cells based on a selection experiment *Poult Sci*. 2002;81:309–315. pmid:11905446 doi: 10.1093/ps/81.3.309
- Boyle EI, Weng S, Gollub J, Jin H, Botstein D, Cherry JM, Sherlock G (2011) GO::TermFinder—open source software for accessing Gene Ontology information and finding significantly enriched Gene Ontology terms associated with a list of genes. *PMC* 2011 Feb 11.
- Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, Luo S, McCurdy S, Foy M, Ewan M, Roth R, George D, Eletr S, Albrecht G, Vermaas E, Williams SR, Moon K, Burcham T, Pallas M, DuBridgde RB, Kirchner J, Fearon K, Mao J, Corcoran K (2000) Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nat Biotechnol*. 2000 Jun; 18(6):630-4.
- Brodeur JF, Li S, da Silva Martins M, Larose L, Dave VP (2009) Critical and multiple roles for the CD3epsilon intracytoplasmic tail in double negative to double positive thymocyte differentiation. *J Immunol*. 2009; 182: 4844-4853.
- Bronte V, Pittet MJ (2013) The spleen in local and systemic regulation of immunity. *Immunity*. 2013; 39:806-18.

- Clark MS, Thorne MAS, Vieira FA, Cardoso JC, Power DM, Peck LS (2010) Insights into shell deposition in the Antarctic bivalve *Laternula elliptica*: gene discovery in the mantle transcriptome using 454 pyrosequencing. *BMC Genomics*. 2010;11:362.
- Cogliani C, Goossens H, Greko C (2011) Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*. 6, 274-279.
- Cotter PF, Ayoub J, Parmentier HK (2005) Directional selection for specific sheep cell antibody responses affects natural rabbit agglutinins of chickens. *Poultry Sci*. 2005; 84: 220-225.
- Defaveri J, Viitaniemi H, Leder E, Merilä J (2013) Characterization genic and nongenic molecular markers: comparison of microsatellites and SNPs. *Molecul Ecol Resour*. 2013;13:377–92.
- Del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (1994) *Handbook of the Birds of the World, Vol 2*, Lynx Edicions
- Delibes M. (1975) *La caza de la perdiz roja*. Segunda edición. Lumen, Barcelona.
- Dragoev V (1974) On the population of the rock partridge (*Alectoris graeca* Meisner) in Bulgaria and methods of census. *Acta Ornithologica*, 14, 251–255.
- Duarte J, Farfán MA, Vargas JM. New data on mortality, home range and dispersal of red-legged partridge (*Alectoris rufa*) released in a mountain range. *Eur J Wildlife Res*. 2010;57:675–78.
- Díaz-Fernández S, Arroyo B, Casas F, Martínez-Haro M, Viñuela J (2013) Effect of game management on wild red-legged partridge abundance. *PLoS One*. 8, e66671.
- D'Souza SJ, Vespa A, Murkherjee S, Maher A, Pajak A, et al. (2002) E2F-1 is essential for normal epidermal wound repair. *J Biol Chem*. 2002; 277: 10626–10632.
- Ekblom R, French L, Slate J, Burke T (2010) Evolutionary analysis and expression profiling of zebra finch immune genes. *Genome Biol Evol*. 2010;2:781–90.
- Ekblom R, Wennekes P, Horsburgh GJ, Burke T (2014) Characterization of the house sparrow (*Passer domesticus*) transcriptome: a resource for molecular ecology and immunogenetics. *Mol Ecol Resour*. 2014;14:636-46.

- Ellegren H (2008) Comparative genomics and the study of evolution by natural selection. *Mol Ecol.* 2008;17:4586–96.
- Fairbrother A, Smits JEG, Grasman KA (2004) Avian immunotoxicology. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B.* 7, 1-33
- Fang ZH, Han ZC (2006) The transcription factor E2F: a crucial switch in the control of homeostasis and tumorigenesis. *Histol Histopathol.* 2006; 21: 403–413.
- Franchini P, Merwe M, Roodt-Wilding R (2010) Transcriptome characterization of the South African abalone *Haliotis midae* using sequencing-by-synthesis. *BMC Res Notes.* 2010;4:59.
- Garaud S, Le Dantec C, Berthou C, Lydyard PM, Youinou P, et al. (2008) Selection of the alternative exon 1 from the *cd5* gene down-regulates membrane level of the protein in B lymphocytes. *J Immunol.* 2008; 181: 2010-2018.
- Goff L, Trapnell C, Kelley D (2012) *cummeRbund*: Analysis, exploration, manipulation, and visualization of Cufflinks high-throughput sequencing data. R package version 2.6.1.
- González Redondo, P. (2004) Un caso de cambio en el manejo de recursos cinegéticos: la historia de la cría en cautividad de la perdiz roja en España. *Revista Española de Estudios Agrosociales y Pesqueros*, 204:179-203.
- Grasman KA (2002) Assessing immunological function in toxicological studies of avian wildlife. *Integrative Comp Biol.* 42, 34–42.
- Grasman KA (2010) In vivo functional tests for assessing immunotoxicity in birds. *Methods Mol Biol.* 598: 387-398.
- Gyles CL (2008) Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim Health Res Rev.* 9, 149-58.
- Haertel E, Werner S, Schäfer M (2014) Transcriptional regulation of wound inflammation. *Semin Immunol.* 2014; 26: 321-328.
- Hangalapura BN, Nieuwland MG, de Vries Reilingh G, van den Brand H, Kemp B, Parmentier HK (2004) Durations of cold stress modulates overall immunity of

- chicken lines divergently selected for antibody responses. *Poultry Sci.* 2004; 83: 765-775.
- Higgs R, Cormican P, Cahalane S, Allan B, Lloyd AT, Meade K, James T, Lynn DJ, Babiuk LA, O'farrelly C (2006) Induction of a novel chicken Toll-like receptor following *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun.* 2006 Mar;74(3):1692-8
- Hong YH, Lillehoj HS, Lee SH, Dalloul RA, Lillehoj EP (2006) Analysis of chicken cytokine and chemokine gene expression following *Eimeria acervulina* and *Eimeria tenella* infections. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 114 (2006) 209–223
- Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID Bioinformatics Resources. *Nat Protoc.* 2009; 4: 44–57.
- Huang da W, Sherman BT, Lempicki RA (2008) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols* 4, 44 - 57
- Hughes AL, Packer B, Welch R, Chanock SJ, Yeager M (2005) High level of functional polymorphism indicates a unique role of natural selection at human immune system loci. *Immunogenetics.* 2005;57:821-27.
- Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS, Wigley P, Beal RK, Goodchild MJ, Barrow P, McConnell I, Maskell DJ, Young J, Bumstead N, Boyd Y, Smith AL (2005) Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun.* 2005 Apr;73(4):2344-50.
- Johnsgard AP (1988), *The Quails, Partridges and Francolins of the World*, Oxford University Press, UK, pp. 111-21.
- Kaiser P (2010) Advances in avian immunology--prospects for disease control: a review. *Avian Pathol.* 2010; 39: 309-324.

- Kaiser P, Howell J, Fife M, Sadeyen JR, Salmon N, et al. (2008) Integrated immunogenomics in the chicken: deciphering the immune response to identify disease resistance genes. *Dev Biol (Basel)*. 132, 57-66.
- Kayo T, Allison DB, Weindruch R, Prolla TA (2001) Influences of aging and caloric restriction on the transcriptional profile of skeletal muscle from rhesus monkeys. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 98, 5093-5098.
- Keestra AM, de Zoete MR, Bouwman LI, van Putten JP (2010) Chicken TLR21 is an innate CpG DNA receptor distinct from mammalian TLR9. *J Immunol*. 2010; 185, 460–467.
- Kunnas TA, Joensuu TK, Viitala KK, Sopanen P, Tuohimaa P, et al. (1992) Induction of avidin messenger ribonucleic acid in the chick oviduct by progesterone and other steroids. *Endocrinology*. 1992; 130: 3421–3426.
- Langmead B, Salzberg S (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012; 9: 357-359.
- Langmead B, Trapnell C, Pop M, Salzberg SL (2009) Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009;10:R25.
- Lei W, Zeng DX, Zhu CH, Liu GQ, Zhang XQ, et al (2014) The upregulated expression of OX40/OX40L and their promotion of T cells proliferation in the murine model of asthma. *J Thorac Dis*. 2014; 6: 979-987.
- Leveque G, Forgetta V, Morroll S, Smith AL, Bumstead N, Barrow P, Loredó-Osti JC, Morgan K, Malo D (2003) Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun*. 2003 Mar;71(3):1116-24.
- Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, et al. (2003) c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell*. 2003; 4: 865–877.

- Li H, Handsaker B, Wysoker A, Fennell T, Ruan J, et al. (2010) 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. (2009) The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*. 2010; 25: 2078-2079.
- Long Y, Song G, Yan J, He X, Li Q, Cui Z (2013) Transcriptomic characterization of cold acclimation in larval zebrafish. *BMC Genomics*. 14, 612.
- Lu JV, Chen HC, Walsh CM (2014) Necroptotic signaling in adaptive and innate immunity. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 35C: 33-39.
- Lucio AJ, Purroy FJ, Sáez de Buruaga M. (1992) La perdiz pardilla (*Perdix perdix*) en España. ICONA, Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Madrid.
- Luo C, Qu H, Ma J, Wang J, Hu X, et al. (2014) A genome-wide association study identifies major loci affecting the immune response against infectious bronchitis virus in chicken. *Infect Genet Evol*. 21, 351-358.
- Luo J, Carrillo JA, Menendez KR, Tablante NL, Song J (2014) Transcriptome analysis reveals an activation of major histocompatibility complex 1 and 2 pathways in chicken trachea immunized with infectious laryngotracheitis virus vaccine. *Poult Sci*. 93, 848-855.
- Maere S, Heymans K, Kuiper M. (2005) BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. 2005; 16: 3448-3449.
- Margolin AA, Nemenman I, Basso K, Wiggins C, Stolovitzky G, et al. (2006) ARACNE: an algorithm for the reconstruction of gene regulatory networks in a mammalian cellular context. *BMC Bioinformatics*. 2006; 7: S7.
- Marth GT, Yu F, Indap AM, Garimella K, Gravel S, Leong WF, et al. (2011) The functional spectrum of low-frequency coding variation. *Genome Biol*. 2011;12:R84.
- Martínez-Fresno M, Henriques-Gil N, Arana P (2008). Mitochondrial DNA sequence variability in red-legged partridge, *Alectoris rufa*, Spanish populations and the origins of genetic contamination from *A. chukar*. *Conservation Genetics* 9:1223–1231.

- McCarthy FM, Gresham CR, Buza TJ, Chouvarine P, Pillai LR, Kumar R, Ozkan S, Wang H, Manda P, Arick T, Bridges SM, Burgess SC (2010) AgBase: supporting functional modeling in agricultural organisms. *Nucleic Acids Research* 39, D497-506.
- McEwen BS, Gianaros PJ (2010) Central role of the brain in stress and adaptation: links to socioeconomic status, health, and disease. *Ann NY Acad Sci.* 2010; 1186: 190–222.
- McGettigan, PA (2013) Transcriptomics in the RNA-seq era. *Current Opinion in Chemical Biology* 17, 4-11.
- Mehr S, Verdes A, DeSalle R, Sparks J, Pieribone V, Gruber DF (2015) Transcriptome sequencing and annotation of the polychaete *Hermodice carunculata* (Annelida, Amphinomidae). *BMC Genomics.* 2015;16:445.
- Meitern R, Andreson R, Hůrak P (2014) Profile of whole blood gene expression following immune stimulation in a wild passerine. *BMC Genomics.* 2014; 15: 533.
- Millán J (2009) Diseases of the red-legged partridge (*Alectoris rufa* L.): a review. *Wildl Biol Pract.* 5, 70-88.
- Minozzi G, Parmentier HK, Mignon-Grasteau S, Nieuwland MG, Bed'hom B, Gourichon D, Minvielle F, der Laan MH P-v (2008) Correlated effects of selection for immunity in White Leghorn chicken lines on natural antibodies and specific antibody responses to KLH and *M. butyricum*. *BMC Genet* 9:5
- Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Wold BNat Methods.* 2008 Jul; 5(7):621-8.
- Máca O, Pavlásek I (2015) First finding of spontaneous infections with *Cryptosporidium baileyi* and *C. meleagridis* in the red-legged partridge *Alectoris rufa* from an aviary in the Czech Republic. *Vet Parasitol.* 209, 164-68
- Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, Snyder M (2008) The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science.* 2008 Jun 6; 320(5881):1344-9.

- Negro JJ, Torres MJ, Godoy JA (2001) RAPD analysis for detection and eradication of hybrid partridges (*Alectoris rufa* × *Alectoris graeca*) in Spain. *Biology Conserv*, 98, 19–24.
- Nishikimia A, Kukimoto-Niinoc M, Yokoyamac S, Fukui Y (2013) Immune regulatory functions of DOCK family proteins in health and disease. doi:10.1016/j.yexcr.2013.07.024.
- Okoniewski MJ, Miller CJ (2006) Hybridization interactions between probesets in short oligo microarrays lead to spurious correlations. *BMC Bioinformatics*. Jun 2, 7():276.
- Owen JP, Delany ME, Mullens BA (2008) MHC haplotype involvement in avian resistance to an ectoparasite. *Immunogenetics*. 2008; 60: 621–631.
- Page's-Mante A, Page's-Bosch M, Majo-Masferrer M, Gomez-Couso H, Ares-Mazas E (2007) An outbreak of disease associated with cryptosporidia on a red-legged partridge (*Alectoris rufa*) game farm. *Avian Pathol*. 36, 275–78.
- Parmentier HK, Reilingh G and Lammers A (2008) Decreased specific antibody responses to a-Gal-conjugated antigen in animals with pre-existing high levels of natural antibodies binding a-Gal residues. *Poult. Sci*. 87:918–926.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*. 2002; 30: 36.
- Pérez y Pérez F. (1992) La perdiz roja, factor de revalorización de las tierras más pobres y deprimidas de España. *Nuestra Cabaña* 233, 50-55.
- Primmer CR (2009) From conservation genetics to conservation genomics. *Ann N Y Acad Sci*. 2009:1162;357–68.
- R Core Team (2014) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Randi E, Tabarroni C, Rimondi S, Lucchini V, Sfougaris A (2003) Phylogeography of the rock partridge (*Alectoris graeca*). *Molecular Ecology*, 12, 2201–2214.

- Rane SG, Reddy EP (1994) JAK3: a novel JAK kinase associated with terminal differentiation of hematopoietic cells. *Oncogene*. 1994; 9: 2415-2423.
- Redpath SM, Mougeot F, Leckie FM, Hudson PJ (2006) Testing the role of parasites in driving the cyclic population dynamics of a gamebird. *Ecol Lett*. 9, 410-18.
- Rhymer JM, Simberloff D. (1996) Extinction by hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics* 27, 83-109.
- SAS, Statistical Analysis with SAS/STAT® Software V9.1. (2009) SAS Institute Inc.
- Schmieder R, Edwards R (2011) Quality control and preprocessing of metagenomic datasets. *Bioinformatics*. 2011; 27: 863-864.
- Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM (2014) Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu Rev Immunol*. 2014; 32: 513-545.
- Schulz MH, Zerbino DR, Vingron M, Birney E. (2012) Oases: robust de novo RNA-seq assembly across the dynamic range of expression levels. *Bioinformatics*. 2012;28:1086-92.
- Sevane N, Cortés O, García D, Cañón J, Dunner S (2010) New Single Nucleotide Polymorphisms in *Alectoris* identified using chicken genome information allow *Alectoris* introgression detection. *Molecular Ecology Resources* 10, 205–213.
- Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, et al. (2003) Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res*. 2003; 11: 2498-2504.
- Shen R, Fan JB, Campbell D, Chang W, Chen J, Doucet D, et al. (2005) High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat Res*. 2005;573:70–82.
- Sild E, Sepp T, Hõrak P (2011) Behavioural trait covaries with immune responsiveness in a wild passerine. *Brain Behav Immun*. 2011; 25: 1349-1354.
- Silos F. (1953) Repoblaciones cinegéticas en España. *Montes*, 50:pp.14-15
- Sironi L, Williams JL, Moreno-Martin AM, Ramelli P, Stella A, Jianlin H, Weigend S, Lombardi G, Cordioli P, Mariani P (2008) Susceptibility of different chicken lines to H7N1 highly pathogenic avian influenza virus and the role of Mx gene

polymorphism coding amino acid position 631. *Virology*. 2008 Oct 10;380(1):152-6. doi: 10.1016/j.

Smith J, Sadeyen JR, Butter C, Kaiser P, Burt DW (2015) Analysis of the early immune response to infection by infectious bursal disease virus in chickens differing in their resistance to the disease. *J Virol*. 89, 2469-2482.

Soneson C, Delorenzi M (2013) A comparison of methods for differential expression analysis of RNA-seq data. *BMC Bioinformatics* 9, 14:91.

Starnes T, Rasila KK, Robertson MJ, Brahmi Z, Dahl R, et al. (2006) The chemokine CXCL14 (BRAK) stimulates activated NK cell migration: Implications for the downregulation of CXCL14 in malignancy. *Exp Hematol*. 2006; 34: 1101–1105.

Stockhammer OW, Zakrzewska A, Hegedûs Z, Spaink HP, Meijer AH (2009) Transcriptome profiling and functional analyses of the zebrafish embryonic innate immune response to salmonella infection. *J Immunol*. 182, 5641–5653.

Strauss A, White A, Boots M (2012) Invading with biological weapons: the importance of disease-mediated invasions. *Funct Ecol*. 26, 1249–61.

Strbo N, Yin N, Stojadinovic O (2014) Innate and Adaptive Immune Responses in Wound Epithelialization. *Adv Wound Care (New Rochelle)*. 2014; 3: 492-501.

Surget-Groba Y, Montoya-Burgos JI (2010) Optimization of de novo transcriptome assembly from next-generation sequencing data. *Genome Res*. 2010;20:1432–40.

Tariq M, Chen R, Yuan H, Liu Y, Wu Y, Wang J, et al. (2015) De novo transcriptomic analysis of peripheral blood lymphocytes from the Chinese goose: gene discovery and immune system pathway description. *PLoS One*. 2015;10:e0121015.

The Gene Ontology Consortium, Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT, Harris MA, Hill DP, Issel-Tarver L, Kasarskis A, Lewis S, Matese JC, Richardson JE, Ringwald M, Rubin GM, Sherlock G (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics* 25, 25-29

- Trapnell C, Williams BA, Pertea G, Mortazavi A, Kwan G, et al. (2010) Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. *Nat Biotechnol.* 2010; 28: 511-515.
- Traver D, Herbomel P, Patton EE, Murphey RD, Yoder JA, et al. (2003) The zebrafish as a model organism to study development of the immune system. *Adv Immunol.* 81, 253–330
- Vargas JM, Guerrero JC, Farfán MA, Barbosa AM, Real R. (2006) Land use and environmental factors affecting Red-legged Partridge (*Alectoris rufa*) hunting yields in southern Spain. *Eur J Wildl Res.* 2006;52:188–95.
- Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science.* 1995 Oct 20; 270(5235):484-7.10,11.
- Villanúa D, Pérez-Rodríguez L, Casas F, Alzaga V, Acevedo P, Viñuela J, Gortázar C (2008) Sanitary risks of red-legged partridge releases: introduction of parasites. *European Journal of Wildlife Research*, 54, 199-204.
- Villanúa D, Pérez-Rodríguez L, Rodríguez O, Viñuela J, Gortazar C (2007) How effective is pre-release nematode control in farm reared red-legged partridges (*Alectoris rufa*)? *J Helmithol.* 81, 101–103.
- Wang W, Zhang T, Zhang G, Wang J, Han K, et al. (2015) Genome-wide association study of antibody level response to NDV and IBV in Jinghai yellow chicken based on SLAF-seq technology. *J Appl Genet.* 10.1007/s13353-014-0269-y.
- Wang Z, Gerstein M, Snyder M (2009) RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet.* 2009 Jan; 10(1): 57–63.
- Watson G (1962). *Sympatry in palearctic Alectoris partridges.* *Evolution.* 16:11-19.
- Webster LMI, Paterson S, Mougeot F, Martinez-Padilla J, Piertney SB (2011) Transcriptomic response of red grouse to gastro-intestinal nematode parasites and testosterone: implications for population dynamics. *Mol Ecol.* 20, 920–931.
- Werner S, Grose R (2003) Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev.* 2003; 83: 835–870.

Wolf M, Moser B (2012) Antimicrobial activities of chemokines: not just a side-effect?
Front Immunol. 2012; 23, 3: 213.

Wu CJ, Ding DC, Ren SS, Chang CC, Weng JT, Hwang KS (2008) Prenatal diagnosis and management of twin reversed arterial perfusion (TRAP) syndrome. Taiwan J Obstet Gynecol. 2008 Mar;47(1):126-8.

8. ANEXOS

ANEXO I. Cronología de los desafíos no infecciosos

(ejemplo de la actividad de una semana)

CAMPO		
MIÉRCOLES		
Actividad	Horario	Perdices
Extracción sangre EDTA + Magic Buffer / Inyección eritrocitos	9:30 a 12:30	100
Jaulas: 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28, 31, 34, 37, 40, 43, 46, 49, 52, 55, 58, 61, 64, 67, 70, 73, 76, 79, 82, 85, 88, 91, 94, 97, 100, 103, 106, 109, 112, 115, 118, 121, 124, 127, 130, 133, 136, 139, 142, 145, 148		
JUEVES		
Actividad	Horario	Perdices
Extracción sangre EDTA + Magic Buffer / Inyección eritrocitos	9:30 a 12:30	100
Jaulas: 2, 5, 8, 11, 14, 17, 20, 23, 26, 29, 32, 35, 38, 41, 44, 47, 50, 53, 56, 59, 62, 65, 68, 71, 74, 77, 80, 83, 86, 89, 92, 95, 98, 101, 104, 107, 110, 113, 116, 119, 122, 125, 128, 131, 134, 137, 140, 143, 146, 149		
VIERNES		
Actividad	Horario	Perdices
Extracción sangre EDTA + Magic Buffer / Inyección eritrocitos	9:30 a 12:30	100
Jaulas: 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27, 30, 33, 36, 39, 42, 45, 48, 51, 54, 57, 60, 63, 66, 69, 72, 75, 78, 81, 84, 87, 90, 93, 96, 99, 102, 105, 108, 111, 114, 117, 120, 123, 126, 129, 132, 135, 138, 141, 144, 147, 150		
LUNES		
Actividad	Horario	Perdices
Medición patas / Inyecciones PBS y PHA	9:00 a 12:00	100 del miércoles
MARTES		
Actividad	Horario	Perdices
Medición patas / Extracción sangre EDTA	9:00 a 12:00	100 del miércoles
Medición patas / Inyección PBS y PHA	9:00 a 12:00	100 del jueves
MIÉRCOLES		
Actividad	Horario	Perdices
Sacrificio y disección perdices inmunidad extrema	9:00 a 11:00	8 del miércoles
Medición patas / Extracción sangre EDTA	9:00 a 12:00	100 del jueves
Medición patas / Inyección PBS y PHA	9:00 a 12:00	100 del viernes
JUEVES		
Actividad	Horario	Perdices
Sacrificio y disección perdices inmunidad extrema	9:00 a 11:00	8 del jueves
Medición patas / Extracción sangre EDTA	9:00 a 12:00	100 del viernes
VIERNES		
Actividad	Horario	Perdices
Sacrificio y disección perdices inmunidad extrema	9:00 a 14:00	8 del viernes

LABORATORIO	
MIÉRCOLES	
Actividad	Horario
Preparación glóbulos rojos de oveja	9:00 a 9:30
Preparación reactivos y material	9:30 a 12:30
Hemaglutinación	12:30 a 16:00
Lectura hemaglutinaciones	19:00
JUEVES	
Actividad	Horario
Preparación glóbulos rojos de oveja	9:00 a 9:30
Preparación reactivos y material	9:30 a 12:30
Hemaglutinación	12:30 a 16:00
Lectura hemaglutinaciones	19:00
VIERNES	
Actividad	Horario
Preparación glóbulos rojos de oveja	9:00 a 9:30
Preparación reactivos y material	9:30 a 12:30
Hemaglutinación	12:30 a 16:00
Lectura hemaglutinaciones	17:15 a 18:45
MARTES	
Actividad	Horario
Viaje desde Madrid	8:00 a 11:00
Preparación reactivos y material	11:00 a 12:00
Hemaglutinación	12:00 a 15:30
Lectura hemaglutinaciones	19:00
Valoración prueba PHA perdicés del miércoles	
MIÉRCOLES	
Actividad	Horario
Preparación reactivos y material	11:00 a 12:00
Hemaglutinación	12:00 a 15:30
Lectura hemaglutinaciones	19:00
Valoración prueba PHA perdicés del jueves	
JUEVES	
Actividad	Horario
Preparación reactivos y material	11:00 a 12:00
Hemaglutinación	12:00 a 15:30
Lectura hemaglutinaciones	19:00
Valoración prueba PHA perdicés del viernes	

9. RESUMEN

La perdiz roja - *Alectoris rufa* - es la especie de caza menor más importante en España debido a sus características cinegéticas, lo que ha hecho de esta especie una pieza de caza codiciada y ha llevado a la realización de numerosos intentos por introducirla en lugares donde no existía. Uno de los problemas que se deriva de la cría en cautividad de la perdiz roja es el riesgo de transmisión de enfermedades a las poblaciones salvajes ya que, por un lado, se incrementa el riesgo de aumento de la virulencia de los patógenos por pases sucesivos de un animal a otro, y por otro lado, a menudo esos agentes infecciosos son característicos de los animales criados en cautividad por las condiciones particulares que se reúnen en las granjas - densidades elevadas, estrés, etc - por lo que la fauna silvestre no se ha visto expuesta a ellos previamente. El fundamento de la tesis reside en la obtención de una herramienta molecular que permita seleccionar perdices con una mayor capacidad de reacción frente a patógenos y otras agresiones externas, lo que aumenta su resistencia a enfermedades infecciosas y minimiza de este modo el aumento de virulencia de los patógenos por pases sucesivos entre animales y la subsiguiente transmisión al medio de cepas fortalecidas. Para ello, se han sometido perdices a desafíos no infecciosos, lo que permitió su clasificación en función de la magnitud de la magnitud de su respuesta inmune - RI - ante dos desafíos no infecciosos que miden, por un lado, la RI innata utilizando el test en piel con fitohemaglutinina - PHA, lectina de origen vegetal - y por otro, la RI adquirida, basada en la producción de anticuerpos, mediante la prueba de hemaglutinación con glóbulos rojos de oveja. Esta fase proporcionó las muestras sobre las que se desarrolló posteriormente la búsqueda de marcadores moleculares necesarios para poder llevar a cabo la selección de genotipos resistentes a enfermedades infecciosas. De las 2.084 perdices que llegaron al final del proceso de clasificación, se seleccionaron los 168 animales con RI más extremas y se sacrificaron, conservando para etapas posteriores los órganos del sistema inmune - bazo, tonsilas cecales, timo y bolsa de Fabricio - y el tejido del área interdigital donde se inyectó PHA. Se llevó a cabo un estudio del transcriptoma de la perdiz para la detección de los genes

que participan en la orquestación de la RI en perdices mediante la comparación de la expresión génica entre los dos grupos de perdices obtenidos con alta y baja RI, empleando la técnica de secuenciación masiva o RNA-Seq en el bazo y la piel. En una primera fase, se secuenció a gran profundidad un pool de 16 muestras normalizadas que representaban todos los tejidos estudiados en ambos sexos y que constituyó el transcriptoma de referencia con el que alinear los transcriptomas obtenidos para cada tejido de forma individual. Los objetivos de esta fase eran la obtención del catálogo de genes de referencia y la detección de SNPs o Single Nucleotide Polymorphisms, mediante el ensamblaje de novo de los transcritos de perdiz. Se anotaron cerca de 12.000 transcritos y se identificaron 34.000 SNPs, de los cuales 8.000 se encontraban en transcritos anotados. A continuación, se llevó a cabo el análisis de la expresión génica diferencial con RNA-Seq en 16 muestras procedentes de bazo, para la valoración de la RI adquirida, y en 16 muestras del área de inyección de PHA, para la valoración de la inmunidad innata. Con este análisis se obtuvieron 790 genes que mostraban sobreexpresión en las perdices con alta RI, y 318 que se mostraban inhibidos. Con el análisis de ontología génica se obtuvieron un total de 98 genes sobreexpresados referidos a Proliferación y muerte celular, Cicatrización de heridas, Procesos Inmunes y Actividad Lítica. Estos datos abren la posibilidad de mejorar la resistencia a las enfermedades o la robustez mediante el uso de selección asistida para incrementar la IR innata en las perdices.

10. ABSTRACT

The partridge – *Alectoris rufa* – is an important cynegetic species in Spain and other European countries. Present and future challenges for wild partridge populations include the resistance against possible disease transmission after restocking with captive-reared individuals, and the need to cope with the stress prompted by new dynamic and challenging scenarios, including consequences of climate change. Selection of individuals with the best immune function may be a good strategy to improve general immunity, and hence adaptation to stress. The objectives of this study include non-infectious challenges with phytohemagglutinin (PHA) and sheep red blood cells which allow the classification of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) according to their overall immune responses (IR). The second objective is the *de novo* transcriptome (RNAseq) of the partridge, followed by the genic differential expression in spleen and skin surrounding PHA injection and their ontology. For these purposes, skin from the area of injection of PHA and spleen, both from animals showing extreme high and low IR, were selected to investigate the transcriptional profiles underlying the different ability to cope with pathogens and external aggressions. RNA-seq yielded 97 million raw reads from eight sequencing libraries and about 84% of the processed reads were mapped to the reference chicken genome. Differential expression analysis identified 1488 up- and 107 down-regulated loci in individuals with high IR versus low IR. Partridges displaying higher innate IR show an enhanced activation of host defence gene pathways complemented with a tightly controlled desensitization that facilitates the return to cellular homeostasis. These findings indicate that the immune system's ability to respond to environmental aggressions extensively involved transcriptional and post-transcriptional regulations, and expand our understanding on the molecular mechanisms of the avian immunity system, opening the possibility of improving disease resistance or robustness using genome assisted selection approaches for increased innate IR in partridges.

