

Expresión génica diferencial entre epidídimo y testículo en padrillos.

Moran, K.M.¹; Bilbao, M.G.¹; Bartolomé, J.A.² y Ferrer, M.S.³

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina.

²Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Pampa, General Pico, La Pampa Argentina.

³Departamento de Medicina de Grandes Animales, Universidad de Georgia, Athens, GA, USA
kmoran@vet.unlpam.edu.ar

RESUMEN

La espermatogénesis y la maduración espermática ocurren en el testículo y el epidídimo, respectivamente. Son procesos complejos regulados por múltiples genes. Entre ellos, los péptidos de defensa del hospedador (PDH), que pueden combatir infecciones de manera directa e indirecta, también están involucrados en la maduración espermática. Algunas funciones de estos PDH han sido caracterizadas en varias especies, aunque la información en equinos es escasa. En particular, se ha reportado que la β -defensina 126 es adquirida por la membrana del espermatozoide en su trayecto por el epidídimo y está vinculada a la motilidad y capacidad de penetrar el mucus cérvico-vaginal. Nuestra hipótesis fue que, en padrillos reproductivamente normales, la expresión génica es diferente entre el testículo y las distintas porciones del epidídimo. Para comprobarlo, nos propusimos los siguientes objetivos: 1) estudiar la expresión génica en los diferentes tejidos reproductivos y 2) analizar la expresión diferencial de genes relacionados con PDH entre los tejidos reproductivos. Para ello, se construyeron bibliotecas de expresión por RNA-Seq a partir de porciones de cada tejido reproductivo obtenidas *ex vivo*: testículo, cabeza, cuerpo y cola de epidídimo. Para el objetivo 1, se analizaron las diferencias entre las bibliotecas de expresión de cada porción del epidídimo comparadas con el testículo (control) mediante el uso de herramientas bioinformáticas (GO y KEGG). Los términos GO con un valor ajustado $P < 0,05$ se consideraron significativamente enriquecidos. Las anotaciones funcionales de los genes sobre-expresados y sub-expresados fueron asignadas a las categorías procesos biológicos (PB), funciones moleculares (FM) o componentes celulares (CC). Para el objetivo 2, se analizó la expresión diferencial de los genes relacionados con PDH utilizando el paquete de R DESeq2. Los valores P resultantes se ajustaron usando el método de Benjamini y Hochberg para controlar la tasa de descubrimientos falsos. Los genes con un valor ajustado $P < 0,05$ se consideraron diferencialmente expresados. En cabeza y cuerpo de epidídimo, los PB enriquecidos estuvieron implicados en la respuesta inmune, mientras que, en la cola, en la adquisición de la motilidad espermática. Para FM y CC, en los tres tejidos se observó la sobre-expresión de genes que activan la maquinaria de síntesis proteica. A partir de las bibliotecas de expresión, se identificaron 40 genes relacionados con PDH. En la tabla 1 se muestran los



resultados de las comparaciones de genes diferencialmente expresados entre el testículo y las diferentes porciones del epidídimo. En particular, la expresión del gen ortólogo de la β -defensina 126 (*defb126*) aumentó 10 veces en cola de epidídimo comparado con testículo. Estos hallazgos sugieren que la expresión de los PDH en el epidídimo aumenta en sentido cabeza-cola. También sugieren el potencial rol del gen *defb126* en la maduración espermática y como posible blanco de futuros estudios de fertilidad en equinos.

Palabras clave: RNA-Seq, equino, transcriptoma, genes expresados diferencialmente, β -defensinas.

Tabla 1. Comparación de 40 genes diferencialmente expresados asociados a los péptidos de defensa del hospedador ($P_{\text{ajustado}} < 0.05$; > 1 FC)					
Comparación	GED	Genes sobre-expresados	Ejemplos	Genes sub-expresados	Ejemplos
Cabeza de ep. vs testículo	9	5	<i>defb108b, cst6</i>	4	<i>defb4b, cst8</i>
Cuerpo de ep. vs testículo	25	18	<i>defb129, defb116</i>	7	<i>defb121, defb123</i>
Cola de ep. vs testículo	20	13	<i>defb126, defb110</i>	7	<i>defb121, defb123</i>

Differentially expressed genes between the epididymis and the testis in stallions

ABSTRACT

Spermatogenesis and sperm maturation occur in the testis and epididymis, respectively. These complex processes are regulated by multiple genes. Among them, Host Defense Peptides (HDPs) which can fight infections directly and indirectly, are also involved in sperm maturation. Although some HDP functions have been studied in various species, limited information is available for equines. In particular, β -defensin 126, incorporated into the sperm membrane during epididymal transit, is linked to motility and sperm penetration through the cervical mucus. Our hypothesis was that gene expression differs among the different segments of the epididymis and testis in reproductively normal stallions. The objectives were: 1) to study gene expression in the testis and epididymis, 2) to compare differentially expressed genes (DEGs) related to HDPs between the testis and epididymis. To achieve these objectives, four libraries were constructed from *ex vivo* tissues: testes, head, body, and tail of the epididymis using RNA-Seq. For objective 1, differences among libraries were analyzed comparing the different segments of epididymis with the testis (control) using bioinformatic tools (GO y KEGG). GO terms with an adjusted P-value < 0.05 were considered significantly enriched. Functional annotations of upregulated and downregulated genes were assigned to three categories: biological process (BP), molecular functions (MF) and cellular components (CC). For objective 2, DEGs related to HDPs were analyzed using the DESeq2 R package. P-values were adjusted using the Benjamini-Hochberg method



to control the false discovery rate. Genes with an adjusted P-value < 0.05 were considered significantly expressed. In the head and body of the epididymis, enriched BP were implicated in the immune response, while enriched BP in the tail of the epididymis were associated with motility. For MF and CC, upregulation of genes activating the protein synthesis machinery was observed in the three epididymal segments. From the expression libraries, 40 genes related to HDPs were identified. The results of DEG comparisons between the testis and different epididymis segments are presented in Table 1. Particularly, the expression of the β -defensin 126 ortholog gene (*defb126*) increased 10-fold in the tail of the epididymis compared to the testis. These findings suggest that the expression of HDPs in the epididymis increases from head to tail. Additionally, the potential role of the *defb126* gene in sperm maturation makes it a promising target for future studies in equine fertility.

Keywords: RNA-Seq, equine, transcriptomic, differentially expressed genes, β -defensins.

Table 1. Comparison of 40 differentially expressed genes associated with host defense peptides (P _{adjusted} <0.05; >1 FC)					
Comparación	DEG	Upregulated genes	Examples	Downregulated genes	Examples
Head of ep. vs testes	9	5	<i>defb108b, cst6</i>	4	<i>defb4b, cst8</i>
Body of ep. vs testes	25	18	<i>defb129, defb116</i>	7	<i>defb121, defb123</i>
Tail of ep. vs testes	20	13	<i>defb126, defb110</i>	7	<i>defb121, defb123</i>

