



Expression profiling and gene ontology analysis in fathead minnow (*Pimephales promelas*) liver following exposure to pulp and paper mill effluents

Shannon *et al.*,2012.

28 de Mayo, 2018

- Contaminación debido a la producción de celulosa
- La compleja matriz de compuestos
- la dificultad de relacionar el agente causante a nivel molecular de los efectos fisiológicos en las especies afectadas.

Hipótesis

Los diferentes estados de los efluentes originados en la industria de la celulosa inducen cambios en la expresión del transcriptoma vinculado a procesos biológicos.

Objetivo

Caracterizar los perfiles de expresión genética en el hígado de carpas machos y hembras expuestas a efluentes provenientes de la industria de la celulosa y usar herramientas ontológicas de genes para identificar los procesos biológicos que se ven afectados.

Animales y tratamientos

- *Pimephales promelas*



- UTK - TK - CMO
- 10% (v/v) UTK, 25% (v/v) TK, 100% (v/v) CMO o solo agua de río
- 15 días aclimatación - 6 días con tratamientos
- Se removieron los hígados mediante disección y se almacenaron a -80°C

- Extracción ARN
- Análisis mediante microarreglo

Bioformática



(a) Agilent



(b) R

- rtPCR - qPCR

Figure 2: Primers utilizados en qPCR

Gene	Forward primer	Reverse primer	Annealing temperature (°C)	Reference
<i>TBP</i>	CTCAAGGGCTGGCTTCTC	ACTGGCTGTGGTGAAGAC	59	Filby and Tyler (2007)
<i>HPRT1</i>	GATGAAGAGCAAGTTATGAC	ACACAGAGCAACGATATGG	58	Filby and Tyler (2007)
<i>3βHSD</i>	ATGAGATGCCCTACCAAAGAC	CCCTTTACCTTTGTGCCATTG	60	Villeneuve et al. (2007)
<i>17βHSD</i>	CCACCCTTAGAGGCGGAGTAT	CACAGCCAGTGTGCTGCTT	60	Garcia-Reyero et al. (2009)
<i>CYP11A1</i>	CGACACCCGGACTTGCA	CACGTCTCCTTAGAGGTGATCG	58	Villeneuve et al. (2007)
<i>CYP1A1</i>	ATCACCGACTCGTCATCG	TTCAGTTCCTCCCTGCAGGC	55	Werner et al. (2010)
<i>ZP3</i>	ATCATGGGTGCTTTGTGGATG	GCITGTGACCGAGGCATGA	60	Beggel et al. (2011)
<i>SQLE</i>	CAAGCTTCCTGCCACCCTCACCT	TGACGTCAITCAGCACAACT	60	Current study
<i>VASA</i>	GGCAGCAAGCAAGTTCAG	GCACACAGTCCCAAATG	60	Filby et al. (2006)
<i>DAZ</i>	CGCCCAACACACTTTTCGTCG	TGCAGATCCCTCCTCGGTAAGTG	58	Current study
<i>IGFBP-1</i>	TTGAACTGCAGACAGCCCTTGAC	AGCCGTGCTTGTACAGTTTGG	53	Current study

Figure 3: Diagrama de Venn que representa la diferencia en la expresión de genes en machos y hembras

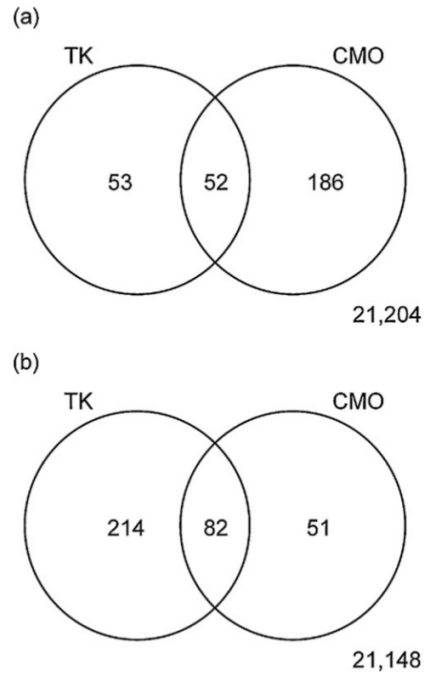


Figure 4: Cluster jerárquico de expresión genética

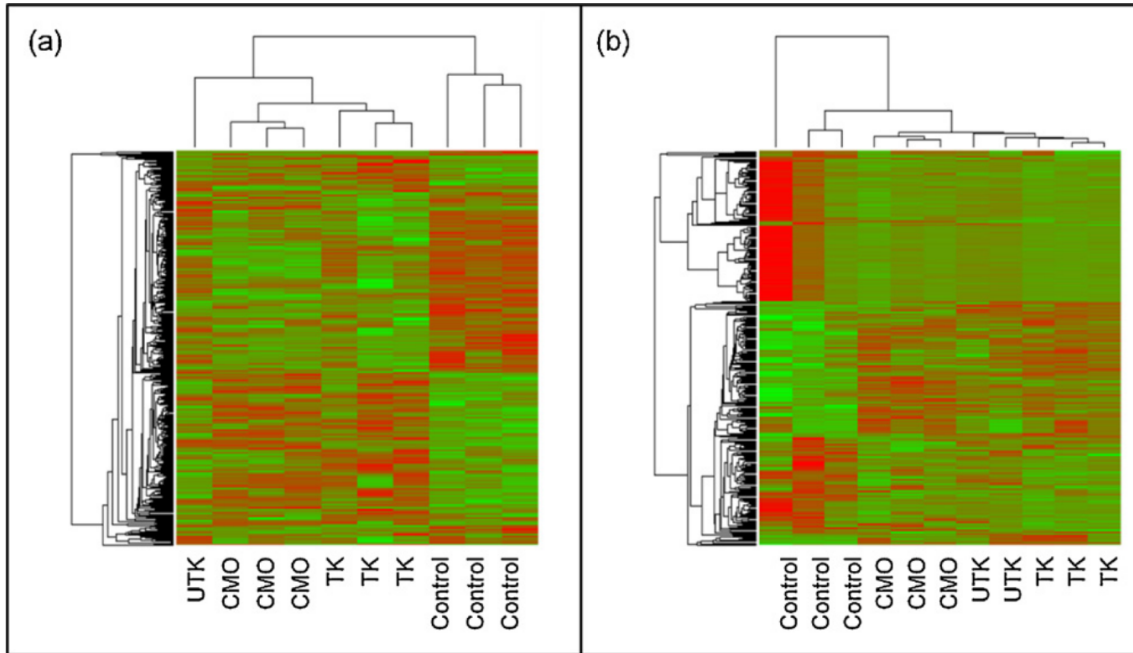


Figure 5: Procesos biológicos alterados por la exposición a *riles*

Effluent	Direction	Male		Female	
		Number of altered targets	% of targets associated with biological process GO term	Number of altered targets	% of targets associated with biological process GO term
TK	Up-regulated	47	59.6	98	68.4
	Down-regulated	58	58.6	140	82.1
CMO	Up-regulated	100	63.0	58	65.5
	Down-regulated	196	44.4	75	50.7

Figure 6: Procesos biológicos alterados por la exposición a *riles*

Effluent	GO term	Adjusted p-value	Odds ratio (Log _e)	Probe ID	Gene title
CMO	GO:0016126 – sterol biosynthetic process	2.83E–05	5.53	EA.Pp_50801	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta Isomerase 1</i>
				EA.Pp_51528	<i>Sterol-C5-desaturase</i>
				EA.Pp_52884	<i>7-dehydrocholesterol Reductase</i>
				EA.Pp_55255	<i>Squalene Epoxidase</i>
	GO:0008299 – isoprenoid biosynthetic process	8.99E–03	4.38	EA.Pp_50801	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta Isomerase 1</i>
				EA.Pp_59328	<i>Melvonate kinase</i>
				EA.Pp_59963	<i>Farnesyl diphosphate synthase</i>
GO:0006695 – cholesterol biosynthetic process	1.75E–04	4.69	EA.Pp_50801	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta Isomerase 1</i>	
			EA.Pp_52884	<i>7-dehydrocholesterol Reductase</i>	
			EA.Pp_65389	<i>Hydroxysteroid Dehydrogenase 7</i>	
			EA.Pp_59913	<i>24-dehydrocholesterol Reductase</i>	
GO:0006694 – steroid biosynthetic process	2.13E–07	4.88	EA.Pp_50801	<i>Isopentenyl-diphosphate Delta Isomerase 1</i>	
			EA.Pp_52884	<i>7-dehydrocholesterol Reductase</i>	
			EA.Pp_65389	<i>Hydroxysteroid Dehydrogenase 7</i>	
			EA.Pp_67918	<i>Lanosterol synthase</i>	
GO:0008610 – lipid biosynthetic process	3.95E–02	3.62	EA.Pp_67918	<i>Lanosterol synthase</i>	
			EA.Pp_52884	<i>7-dehydrocholesterol Reductase</i>	
			EA.Pp_51528	<i>Sterol-C5-desaturase</i>	
GO:0006118 – electron transport	3.30E–02	1.72	EA.Pp_69146	<i>Sarcosine Dehydrogenase</i>	
			EA.Pp_59913	<i>24-dehydrocholesterol Reductase</i>	
			EA.Pp_56712	<i>Cytochrome P450, 1A</i>	
			EA.Pp_71149	<i>Cytochrome C Oxidase Subunit I</i>	
			EA.Pp_55255	<i>Squalene Epoxidase</i>	
			EA.Pp_64745	<i>Thioredoxin-like 2</i>	
			EA.Pp_50075	<i>Apoptosis-inducing Factor</i>	
EA.Pp_57408	<i>Cytochrome P450, Family 51</i>				
EA.Pp_67938	<i>Cytochrome P450, 11A1</i>				

Figure 7: Expresión de genes en machos de carpas expuestos a tratamientos

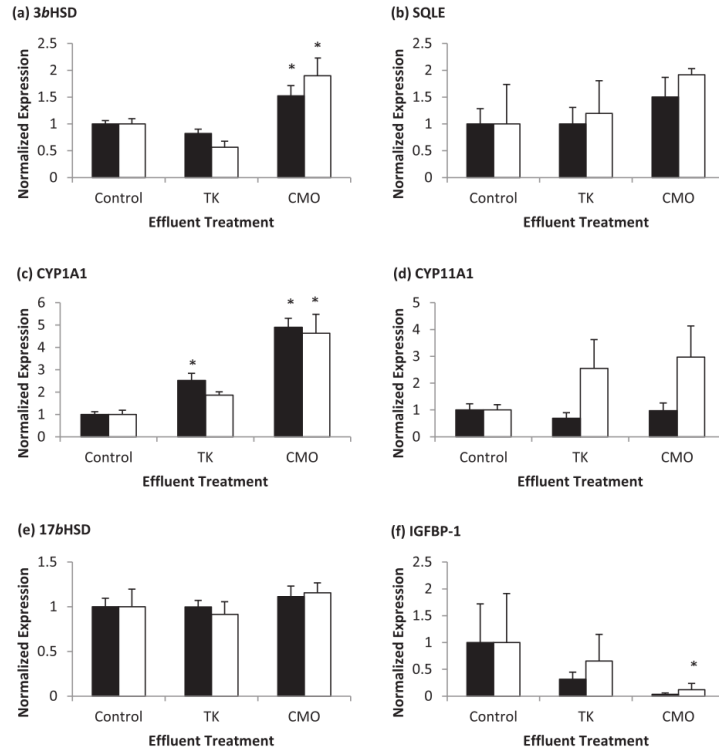
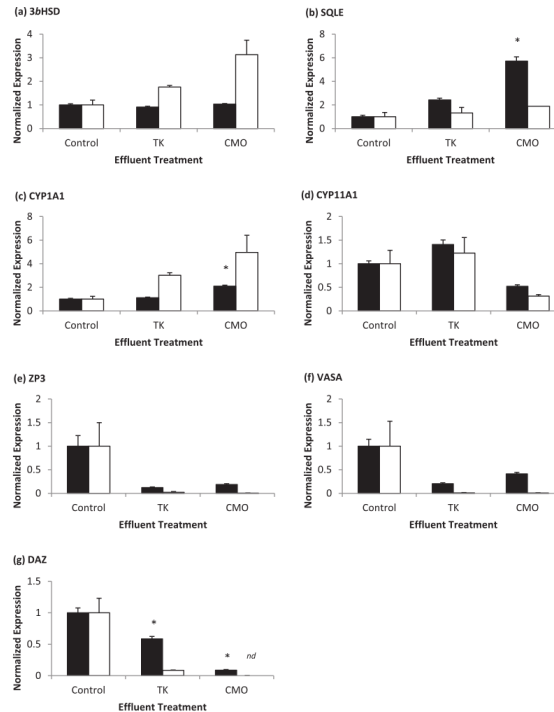


Figure 8: Expresión de genes en hembras de carpas expuestas a tratamientos



- El estudio está aportando evidencia de que los residuos industriales líquidos provenientes de la industria de la celulosa afectan la expresión de genes que tiene relación con la reproducción en el hígado de machos y hembras de los peces estudiados.