ITEA (2004), Vol. **100A N.° 3,** 151-155

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN ENTRE EL GEN PrP Y LA FERTILIDAD DE MACHOS DE LA RAZA LACAUNE

E. Bonnet, J.M. Elsen, Z.G. Vitezica, L. Bodin

Station d'Amélioration Génétique des Animaux,
INRA, BP 27, 31326 Castanet-Tolosan Cedex,
Francia.bodin@toulouse.inra.fr

Introducción

La inseminación artificial (IA) es una herramienta indispensable en la organización de todo esquema de selección. La fertilidad es un carácter difícil de cuantificar debido a que depende de diferentes procesos fisiológicos. El comportamiento sexual de los carneros implicados en la IA tiene en cuenta dos aspectos esenciales. Primero, la capacidad del animal de producir semen (volumen, concentración, motilidad), y segundo, el valor fecundante de ese semen una vez utilizado.

Las Encefalopatías Espongiformes Transmisibles (EET) engloban un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que afectan a diferentes especies animales, incluida la humana. El prúrigo lumbar o *scrapie* es una enfermedad de la especie ovina que pertenece al grupo de las EET. La resistencia-susceptibilidad a esta enfermedad depende en gran parte del polimorfismo de los codones 136, 154 y 171 del gen PrP (ELSEN *et al.*, 1999; DÍAZ *et al.*, 2003). De las posibles combinaciones de los 3 codones, 136 (A/V), 154 (R/H) y 171 (R/H/Q), el alelo ARR confiere resistencia a la enfermedad mientras que el alelo VRQ está asociado a alta susceptibilidad. Recientemente se ha demostrado que la proteína del prión, codificada por el gen PrP y responsable del scrapie, forma parte integrante de la estructura de los espermatozoides (GATTI *et al.*, 2002).

La selección de animales portadores del alelo resistente se considera como una posible vía para mejorar la resistencia al scrapie. En este marco, algunos países como Holanda, Gran Bretaña y Francia han implementado programas de mejora por selección de la resistencia a esta enfermedad. Bajo la hipótesis de que existe una asociación entre un determinado genotipo y la fertilidad de los machos, la selección de animales portadores de genotipos resistentes al scrapie podría acarrear efectos no deseables en un esquema de selección. En este contexto, el objetivo de este trabajo es estudiar una posible asociación entre los genotipos del gen PrP y la producción y calidad del semen de machos de IA en la raza Lacaune.

Materiales y Métodos

Los datos analizados provienen de *La Confédération des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort.* Dichos datos corresponden a 4825 extracciones de semen de 351 machos de raza Lacaune, presentes en el centro de IA para

el servicio de la campaña 1999. Debido a que la mayor parte de los animales no están genotipados para los codones 136 y 154, nos hemos limitado a estudiar el 'efecto alelo' del codón 171.

$$y_{i\text{-}p} = by_i + sd_j + m_k + md_l + c_{171m} + s_n + a_{i,m,n,o} + e_{i\text{-}p}$$

Las variables estudiadas fueron el volumen, la concentración, la motilidad y el número de espermatozoides del semen. Se utilizaron dos modelos. En el primer modelo se estudió el efecto propio del alelo Q o R del codón 171.

donde

$y_{i\text{-}p}$ corresponde a la variable estudiada,

by_i es el año de nacimiento de los machos. Los animales fueron agrupados en 5 clases (i=1-5): 1992-1995, 1996, 1997, 1998 y 1999,

sd_j cuantifica el intervalo de tiempo de descanso que existe entre dos extracciones sucesivas de semen del mismo carnero.

m_k corresponde al mes dentro de la estación sexual en el que se realizó la extracción de semen,

md_l es el momento del día (por la mañana o por la tarde) en el que se saca el semen,

$c_{171,m}$ representa las formas alélicas (Q o R) en el codón 171 del carnero,

s_n es el efecto aleatorio del padre del carnero y

$a_{i,m,n,o}$ es el efecto aleatorio del carnero.

En el segundo modelo se estudió el efecto de la transmisión del alelo Q o R del padre sobre las características del semen de su hijo. El codón 171 fue considerado como un marcador de un QTL próximo y los análisis se realizaron intra-padre según el siguiente modelo:

$$y_{i\text{-}p} = by_i + sd_j + m_k + md_l + c_{171p_m} + s_n + a_{i,m,n,o} + e_{i\text{-}p}$$

donde el c_{171p} representa las formas alélicas (Q o R) en el codón 171 del carnero que recibió de su padre. El número de extracciones involucradas en este análisis fue de 465 correspondientes a 34 carneros.

El programa SAS (SAS Institute Inc., 1999) fue utilizado para estudiar la pertinencia de los diferentes efectos fijos del modelo y para testar la posible asociación con el gen PrP. Los procedimientos SAS utilizados fueron Proc GLM y Proc Mixed.

Resultados y discusión

Los resultados para las diferentes variables estudiadas se muestran en el cuadro 1. Los valores medios y la desviación estándar ($\mu \pm \sigma$) están expresados en ml para el volumen, en millones de espermatozoides/ml para la concentración y en millones para el número de espermatozoides.

Volumen

Se puede observar que el intervalo de reposo del animal entre dos extracciones sucesivas fue significativo sobre el volumen de semen ($p<0,01$). Este factor fue el que más influye sobre las variaciones del volumen (R^2 parcial de 1,68%). Cuando las extracciones se hacen 6 días sobre 7, el volumen se redujo como consecuencia de un 'efecto agotamiento' que sufren los animales. La extensión del período de reposo condujo a volúmenes por debajo de los valores medios. La alternancia entre un día de extracción y un día de descanso apareció como la mejor combinación. Similares

resultados fueron encontrados para la raza Lacaune por DUVAL (1990).

El segundo efecto significativo en el modelo fue el mes de extracción ($p<0.01$). Este fenómeno lo explica el hecho de que de los 5 meses de extracción (mayo-septiembre), es en el mes de junio donde se saca la mayor proporción de semen. En consecuencia, el volumen de ese mes se reduce con respecto al valor medio de la estación. DUVAL (1990) estudió el mismo efecto considerando en el análisis la semana de extracción y no el mes. Los resultados fueron similares concluyendo que esta reducción puede deberse a un efecto de agotamiento junto con un efecto propio de la estación sexual (días decrecientes).

Una práctica común en los centros de IA consiste en sacar el semen en dos momentos específicos del día: por la mañana o por la tarde. Esta práctica no afectó al volumen de semen extraído de los carneros. El año de nacimiento de los animales tampoco tuvo influencia en el volumen.

Cuadro 1. Valores obtenidos en el análisis del volumen, de la concentración, de la motilidad y del número de espermatozoides del semen de carneros Lacaune en IA

	Volumen	Concentración	Motilidad	Número de espermatozoides
R^2	0,50	0,64	0,67	0,49
$\mu \pm \sigma$	2,0 ± 0,46	4492 ± 523	4,4 ± 0,70	9255 ± 2488
Efecto año (*by*)	ns	ns	ns	ns
Efecto intervalo (*sd*)	***	***	***	***
Efecto mes (*m*)	***	***	***	***
Efecto día (*md*)	ns	ns	**	ns

**p<0,05, ***p<0,01, ns: no significativo.

Concentración

Los factores que determinan cambios en la concentración son los mismos que actúan sobre el volumen. El efecto del mes de extracción (R^2 parcial de 2,3%) y el efecto del intervalo entre extracciones (R^2 parcial de 0,7%) presentaron resultados significativos ($p<0,01$).

Motilidad

Los factores correspondientes al intervalo y al mes también fueron significativos para la motilidad ($p<0,01$). La motilidad se reduce a medida que pasan los meses de extracción como consecuencia del agotamiento de los machos. Estos resultados son similares a los descritos por DUVAL (1990). La motilidad también se ve afectada por el momento del día en el cual se hace la extracción ($p<0,05$). Los mayores valores se observan por la tarde. Sin embargo, la diferencia observada entre estos dos momentos del día es de sólo 0.8 puntos de motilidad en una escala de 1-5. Estos resultados deberán ser confirmados por otros estudios.

Número de espermatozoides

Las variaciones observadas en el volumen y en la concentración se reflejan directamente en el número de espermatozoides. El efecto del intervalo entre extracciones y el mes de extracción presentan resultados significativos ($p<0,01$).

Estudio de asociación entre distintas características del semen y el genotipo en el codón 171

A partir del primer análisis, el genotipo del codón 171 no presentó efecto alguno sobre la concentración ni la motilidad. Sin embargo, el efecto fue significativo para las variables volumen y número de espermatozoides ($p<0,05$). Los animales homocigotos resistentes RR (n=140) presentaron los valores más altos para ambas variables, mientras que los individuos homocigotos QQ (n=175) presentaron valores próximos a la media general. Por su parte, los machos heterocigotos RQ (n=36) tuvieron los peores valores. Los valores observados en ambas variables para los individuos portadores de QQ, QR y RR nos podrían hacer pensar en un efecto de dominancia, tal que R sería el alelo recesivo y Q el dominante. Sin embargo, se podría plantear la hipótesis de que el efecto directo del alelo R sobre el volumen y el número de espermatozoides sea sólo fortuito.

Para testar esta hipótesis se hicieron dos análisis. En primer lugar, se observó que la diferencia entre los valores de volumen y número de espermatozoides, para los animales portadores de QQ y QR, no fueron significativas. En segundo lugar, se estudió el efecto de la transmisión del alelo Q o R del padre a su hijo sobre su producción de semen. Para ello se seleccionaron los padres que tuvieran al menos un hijo QQ y otro RR, obteniendo como datos 465 extracciones pertenecientes a 34 carneros hijos de 9 padres.

Con el objetivo de asegurar la representatividad de la muestra, se estimó la repetibilidad y la varianza residual del volumen y del número de espermatozoides. Los valores estimados a partir de los datos de la muestra fueron similares a las estimaciones realizadas utilizando el total de extracciones. Sobre dicha muestra se estudió: 1) el efecto directo del genotipo Q o R sobre la producción, y 2) el efecto de la transmisión del alelo Q o R del padre sobre las características del semen de su hijo (cuadro 2). Este último efecto correspondería al del alelo en el codón 171 actuando como un marcador molecular de genes que codifiquen para calidad del semen.

Cuadro 2. P-valores obtenido para el efecto del genotipo del codón 171 sobre el volumen, la concentración, la motilidad y el número de espermatozoides del semen de carneros en IA

	Volumen	Concentración	Motilidad	Número de espermatozoides
Efecto directo	0,42	0,55	0,27	0,97
Efecto marcador	0,98	0,81	0,93	0,65

Se puede observar que los p-valores de los dos análisis (efecto directo y marcador) no indicarían una asociación entre las características del semen y el genotipo Q o R del codón 171. Los resultados obtenidos confirman la hipótesis de una simple "coincidencia" debida probablemente al desbalance en el número de animales de cada grupo de genotipos.

Conclusión

Sobre la base de este análisis, podemos concluir que no se observa asociación entre los polimorfismos del codón 171 y la producción y calidad del semen de machos de IA de la raza Lacaune. Estos resultados coinciden con diferentes estudios de asociación realizados sobre el gen PrP y distintos caracteres de producción (RODEN *et al.*, 2001; BARILLET *et al.*, 2002; PROKOPOVA *et al.*, 2002; BRANDSMA *et al.*, 2004).

Agradecimientos

Los autores agradecen a la *Confédération des producteurs de lait de brebis et des industriels de Roquefort* por el suministro de los datos, y a Michel Briois por su ayuda y consejos en el análisis de la información.

Bibliografía

BARILLET F., ANDREOLETTI O., PALHIERE I., AGUERRE X., ARRANZ J.M., MINERY S., SOULAS C., BELLOC J.P., BRIOIS M., FREGEAT G., TEINTURIER P., AMIGUES ASTRUC J.M., BOSCHER M.Y., SCHELCHER F., 2002. Breeding for scrapie resistance using PrP genotyping in the french dairy sheep breeds. 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Comunication N° 20, Session 13, Disease resistance.

BRANDSMA J.H., JANSS L.L.H., VISSCHER A.H., 2004. Association between PrP genotypes and littersize and 135 days weight in Texel sheep. Liv.Prod.Sci., 85: 59-64.

DÍAZ C., VITEZICA Z.G., RUPP R., ELSEN J.M., 2003. El uso de la prediccion de genotipos en el analisis de supervivencia: un caso de scrapie. ITEA Vol. Extra 24 (II): 456-458.

DUVAL P., 1990. La maîtrise de la reproduction en race Lacaune lait: fonction sexuelle des béliers et fertilité des brebis en IA. Mémoire de fin d'étude. INRA-SAGA. 140p.

ELSEN J.M., AMIGUES Y., SCHELCHER F., DUCROCQ V., ANDREOLETTI O., EYCHENNE F., TIEN KHANG J.V., POIVEY J.P., LANTIER F., LAPLANCHE J.L., 1999. Genetic susceptibility and transmission factors in scrapie: detailes analysis of an epidemic in a closed flock of Romanov. Arch.Virol. 144: 431-445.

GATTI J.L., MÉTAYER S., MOUDJOU M., ANDRÉOLETTI O., LANTIER F., DACHEUX J.L., SARRADIN P., 2002. Prion protein is secreted in soluble forms in the epididymal fluid and proteolytically processed and transported in seminal plasma. Biology of reproduction, 67: 393-400.

PROKOPOVA L., LEWIS R.M., DINGWALL W.S., SIMM G., 2002. Scrapie genotype: a correlation with lean growth rate? 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Comunication N° 44, Session 13, Disease resistance.

RODEN J.A., HARESIGN W., ANDERSON J.M.L., 2001. Analysis of PrP genotype in relation to performance traits in Suffolk sheep. Proc.Brit.Soc.An.Sc. 45.

SAS Institute Inc., 1999. SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc®, Version 8, Cary, North Carolina.