UTILIZACIÓN DE "POOLES" DE ADN COMO HERRAMIENTA PARA ESTIMAR LAS FRECUENCIAS DE LOS CROMOSOMAS X E Y EN EYACULADOS DE TORO

Maria Luisa Checa, Susana Dunner y Javier Cañón
Laboratorio Genética. Dpto. Producción Animal. Facultad de Veterinaria. UCM.

INTRODUCCIÓN

La posibilidad de controlar el sexo de la descendencia constituye uno de los objetivos de mayor interés en producción animal. Algunas de las aplicaciones más inmediatas son, por ejemplo, minimizar la incidencia de ciertas enfermedades genéticas ligadas al sexo o disponer de mayor porcentaje de uno u otro sexo según el tipo de explotación. Aunque la relación de sexos al nacimiento depende de muchos factores, como estado nutricional, edad, época del parto (Clutton-Brock et al, 1986; Hardy ICW, 1997; Krackow S, 1995), o el momento de inseminación artificial de la ovulación (Rorie RW, 1999; Gutierrez-Adan A et al., 1999; Guerrero R, 1974; Harlap S, 1979), parece evidente que el control del sexo de la descendencia puede llevarse a cabo, en una primera instancia, controlando el porcentaje de cromosomas X e Y de un eyaculado. Una de las estrategias más utilizadas, como la que se basa en la citometría de flujo, consiste en manipular la composición de los eyaculados en relación con la concentración de cromosomas X o Y. Estas técnicas aunque todavía muy costosas y lentas parece que tienen un claro futuro. Otras estrategias, dentro de las que se incluiría la que presentamos en este trabajo, se han basado en la aparente gran variabilidad en concentración de cromosomas sexuales que puede observarse entre eyaculados dependiendo de una serie de factores no muy bien identificados. Algunos trabajos previos presentaban una relación de cromosomas sexuales con intervalos relativamente próximos a lo que sería una relación de 1:1. Así, por ejemplo, Nalbandov (1964) encontraron rangos de variación (porcentaje de machos al nacimiento) entre el 48,6 y el 51,8 y, en la especie humana, Lobel et al. (1993) encontraron un rango de variación entre el 41,9 y el 56,7. Si embargo, Chandler et al. (1998) presentaron unos resultados con una variabilidad en el porcentaje de cromosomas Y mucho mayor, de tal manera que en el 20 % de los eyaculados de un toro el porcentaje de cromosomas Y estaba fuera del rango 24 %- 84 %. En nuestro trabajo se pone a punto una técnica que permite estimar el porcentaje de ambos cromosomas sexuales de que es portador un eyaculado y se aplica a diferentes sementales con el fin de conocer si existe una variabilidad suficiente en la composición de cromosomas sexuales como para garantizar la rentabilidad de estos análisis. Hay que tener en cuenta que el coste de detección de un eyaculado de interés ganadero se repercutiría entre un elevado número de pajuelas que pueden ser obtenidos de cada eyaculado (400-600) lo que podría hacer rentable la distribución de pajuelas en las que la probabilidad de obtener uno u otro sexo fuera muy elevada.

MATERIAL Y MÉTODOS

Material biológico

Semen: Se recogieron un total de 204 muestras pertenecientes a 42 machos diferentes (22 toros Holstein y 20 Asturiana del Valle). De 12 de ellos se recogieron 10 eyaculados por toro que eran el resultado de la mezcla de dos saltos consecutivos, mientras que el resto de muestras provenían de un solo salto con el fin de minimizar la pérdida de extremos. En el caso de 24 toros se analizaron dos saltos por toro recogidos en días consecutivos y en 9 toros se analizaron cuatro saltos recogidos cada par con una diferencia de entre 7 y 9 días.

Las muestras se diluyeron en una solución tamponada para su conservación hasta el momento de la extracción.

Cuantificación del ADN de semen y sangre: Extraído el ADN mediante un procedimiento estándar, estimamos su concentración en las muestras mediante

fluorimetría (TD 360 Mini Fluorometer, Turner Designs) hasta lograr una concentración final de ADN de 2 ng/µl.

PCR: Como marcador utilizamos el gen de la amelogenina que se encuentra presente en ambos cromosomas, X e Y, aunque el segundo tiene una deleción de 63 pb. Amplificamos en una única reacción el fragmento de ambos cromosomas, con una sola pareja de primers, uno de los cuales se marcó con el fluorocromo HEX. A continuación el producto de la PCR se sometió a electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 310 dando lugar a un pico de 217 pb perteneciente a Y y 280 pb a X cuyas áreas son reflejo del número de copias del fragmento amplificado. Elaboramos 'pooles' con ADN procedente de machos y hembras, en los que la composición de cromosomas sexuales era conocida y tuvimos en cuenta dos artefactos que pueden intervenir en el desarrollo de la PCR, como son la fase plateau y la amplificación diferencial.

En la tabla 1 aparece el análisis de regresión que nos permitió obtener los parámetros de la recta y predecir el porcentaje de cromosomas sexuales en un 'pool' utilizando la salida proporcionada por el secuenciador como variable independiente.

Tabla 1: Análisis de regresión de los resultados obtenidos en "pooles" de ADN de machos y hembras.

F. de V.	G.l.	Sumas de Cuadrados	Cuadrados Medios	Valor de F	Prob>F
Modelo	1	7065.04603	7065.04603	306.435	0.0001
Error	51	1175.83473	23.05558		
C Total	52	8240.88075		R-cuadrado	0.8573

Variable	g.l.	Estimación parámetro	Error Estándar	Prob > |T|
Ordenada en el origen	1	23.277094	2.69874116	0.0001
Coef. regresión	1	0.803573	0.04590454	0.0001

Análisis estadístico: Se llevó a cabo un primer análisis de medidas repetidas con el fin de contrastar la hipótesis de diferencias entre los dos saltos que realiza un semental el día que se le extrae semen. Un segundo análisis se llevó a cabo para analizar los efectos de semental y repetición (efecto que incluyó la variabilidad entre análisis que pueda ser consecuencia tanto del efecto de extracción de ADN, como el efecto de la PCR), como efectos principales, y el eyaculado como efecto jerarquizado al semental.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las condiciones óptimas de amplificación, en las que se minimiza el efecto distorsionador de la fase plateau y la amplificación diferencial, se obtuvieron trabajando con PCRs de 25 ciclos, 25 µl de volumen final y 6 ng de ADN de partida. Existe un incremento lineal (y = 23,8 + 0,8036X; R=0,93) del área del pico correspondiente al cromosoma X a medida que incrementamos la representación de este cromosoma dentro del "pool".

El porcentaje medio de cromosomas X por eyaculado fue de 51,5±2,99. Este resultado muestra la baja frecuencia de eyaculados en los que el porcentaje de cromosomas X o Y se situaría en los extremos de la distribución, por ejemplo la posibilidad de encontrar un eyaculado en el que el porcentaje de cromosomas X sea superior al 80% o inferior al 20% es casi cero porque representa una posición alejada en más de 9 desviaciones típicas de la media.

El análisis de medidas repetidas que se utilizó para contrastar las diferencias entre los dos saltos que realiza un toro cada día indicó, que no hay diferencias

significativas entre saltos y, la ausencia de interacción entre los efectos del toro y de la repetición, con el salto.
Tampoco se encontraron diferencias entre los eyaculados de un semental. Los factores que mostraron una significativa influencia sobre el contenido en cromosomas X fueron el toro y la repetición, sin que exista interacción entre ambos factores (Tabla 2). El factor repetición constituye la mayor fuente de variación, explicando aproximadamente un 25% de la variabilidad en el porcentaje de X, mientras que el efecto toro es responsable del 12 % de la variabilidad total.

Tabla 2.- Resultados del análisis de varianza

Fuentes de Variación	g.l.	Sumas Cuadrados	Cuadrado Medio	Valor F	Pr > F
TORO	34	611.42	17.98	2.18	0.0027
Repetición	4	219.21	54.80	6.63	0.0001
TORO*Repetición	22	186.35	8.47	1.03	0.4464
EYACulado(TORO)	56	304.03	5.42	0.66	0.9496
Error	75	619.74	8.26		

R-Cuadrado	C.V.	Porcentaje de X
0.681	5.58	51.52

Esperanzas de los cuadrados medios

REPETICION	Var(Error) + 3.8394 Var(TORO*REPETICION) + 17.688 Var(REPETICION)
TORO	Var(Error) + 2.8047 Var(TORO*REPETICION) + 4.5674 Var(TORO)
TORO*REPETICION	Var(Error) + 2.5714 Var(TORO*REPETICION)

De acuerdo con estos resultados, la utilización de esta herramienta sólo estaría justificada en aquellos casos en los que existieran factores externos identificados y manipulables que permitieran obtener eyaculados con porcentajes de X o Y extremos. Nuestros resultados estarían en contradicción con los encontrados por Chandler et al. (1998) quienes, desde nuestro punto de vista, utilizaron métodos de trabajo con importantes fuentes de error, como la cuantificación del ADN mediante espectrofotometría, Breen et al. (1999) en su trabajo con "pooles" de ADN y microsatélites estimaron un coeficiente de variación atribuible al espectofotómetro del 28,3% mientras que con fluorímetro fue del 1,23 %, y la ausencia de contrastes internos en la PCR al utilizar un marcador presente sólo en el cromosoma Y.
Aunque tenemos que finalizar todavía el análisis de un centenar de eyaculados provenientes de 10 toros, no creemos que los resultados modifiquen significativamente las conclusiones expuestas.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la CICYT y Fondos FEDER a través de los proyectos: 1FD97-0042 y 2FD97-1191.
A Lupicinio Prieto del CENSYRA de Somió (SERIDA) por proporcionarnos las muestras de semen con las que se ha llevado a cabo este trabajo.

REFERENCIAS

-Breen, G.; P. Sham, T. Li, D.A. Collier and D. St. Clair (1999). *Molecular and Cellular Probes* **13**:359-365.
-Chandler, J.E.; H.C. Steinholt-Chenevert, R.W. Adkinson and E.B. Moser (1998). *J Dairy Sci* **81**:1855-1867.
-Clutton-Brock, T.H.; G.R. Lason (1986).*Q Rev Biol* **61**:339-374.
-Guerrero, R. (1974). *New Eng J Med* **291**:1956-1959.
-Gutierrez-Adan, A.; S. Perez-Garnelo, J. Granados, J.J. Garde, M. Perez-Guzman, B. Pintado, J. De la Fuente (1999). *Zygote* **7**:37-43.
-Hardy, I.C.W. (1997). *Appl Anim Behav Sci* **51**:217-241.
-Harlap, S. (1979). *New Eng J Med* **300**:1445-1448.
-Krackow, S. (1995). *Biol Rev* **70**:225-241.
-Lobel, S. M.; A.J. Pomponio and G.L. Mutter (1993). *Fert. Steril.* **59**:387-392.
-Nalbandov, A.V. (1964). Reproductive Physiology (Pages 3-11). W. H. Freeman and Co., San Francisco, CA.
-Rorie, R.W.(1999). *Theriogenology* **52**:1273-1280.