ANÁLISIS CROMOSÓMICO EN MACHOS DE CONEJO. RESULTADOS PRELIMINARES

Lavara, R., Baselga, M., Vicente, J.S.
Dpto. Ciencia Animal. Universidad Politécnica de Valencia. Camino de Vera.
rlavara@dca.upv.es

INTRODUCCIÓN

La aneuploidía consiste en la pérdida o ganancia de cromosomas como resultado de problemas durante la mitosis o meiosis, que pueden alterar el balance genético y la pérdida de heterocigosidad (Goepfert *et al.* 2000). Además de las alteraciones numéricas, existen también alteraciones estructurales, que se pueden detectar mediante el uso de diferentes técnicas de bandeo cromosómico (Hayes *et al.* 2002). Normalmente la existencia de alteraciones en el número cromosómico provoca muerte embrionaria precoz o malformaciones graves, aunque en conejo se han observado cambios en el número cromosómico en células pertenecientes a embriones que posteriormente han dado lugar a individuos normales (Shi *et al.* 2004). Además se ha demostrado en diferentes especies que las alteraciones cromosómicas pueden incidir negativamente sobre la reproducción y a su vez pueden ser transmitidas a la descendencia, así en porcino se ha observado que más del 50% de los verracos que muestran problemas reproductivos son portadores de anomalías cromosómicas (Gustavsson y Jonsson, 1992).

El objetivo del presente trabajo es determinar la existencia alteraciones durante la mitosis o meiosis en machos de conejo seleccionados que den como resultado alteraciones en el número de cromosomas, y su posible incidencia sobre los parámetros reproductivos y de calidad seminal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron un total de 25 machos adultos de edades comprendidas entre los 8 y los 20 meses, pertenecientes a una línea seleccionada por velocidad de crecimiento durante el período de engorde (Línea R).

Se tomaron muestras de sangre de forma aséptica de la vena marginal de la oreja de cada uno de los machos. Para el cultivo se utilizó 0,5 ml de sangre completa con heparina y 10 ml de medio de cultivo cromosómico (PB_MAX, Invitrogen). Los cultivos se incubaron a 37ºC y 5% $C0_2$ y 95% humedad, durante un total de 72 horas, 16 horas antes de terminar el cultivo se adicionó timidina (8mg/ml en PBS), se reincubó durante otras 4,5 horas más y posteriormente se adicionó colcemida (0,10µg/ml), y se reincubó de nuevo durante 20 minutos. Transcurridos los 20 minutos se procedió al *harvest* siguiendo el protocolo descrito por Yerle *et al.* (1987), y se prepararon los portas según el protocolo descrito por Henegariu *et al.* (2001). Una vez preparados los portas se observaron bajo el microscopio con contraste de fases a 100X, se fotografiaron 50 placas metafásicas completas de cada uno de los machos, que no presentasen solapamiento y no se presentasen fraccionadas. Las metafases fotografiadas se analizaron con la ayuda del software Leica CW4000.

Paralelamente a los estudios cromosómicos se realizaron análisis de producción y calidad seminal siguiendo el protocolo descrito por Lavara *et al.* (2005), además se tomaron los datos de fertilidad y prolificidad de cada uno de los machos. Para los análisis espermáticos se tomaron los datos de volumen, concentración, normalidad acrosómica, formas anormales, parámetros de velocidad y cinéticos del semen (ALH, BCF, VSL, VCL, LIN, MOT).

El porcentaje de partos se analizó mediante un análisis de Chi cuadrado (Statgraphics Plus). Para analizar si existían diferencias entre machos en el tamaño de camada al nacimiento y en los parámetros seminales, se realizó el correspondiente contraste del macho con anormalidades frente a la media de los otros machos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 25 machos analizados únicamente uno de ellos presenta un 16% (8/50) de alteraciones en el número cromosómico. Las alteraciones encontradas son de dos tipos, tanto hiperploidía como hipoploídia cromosómica.

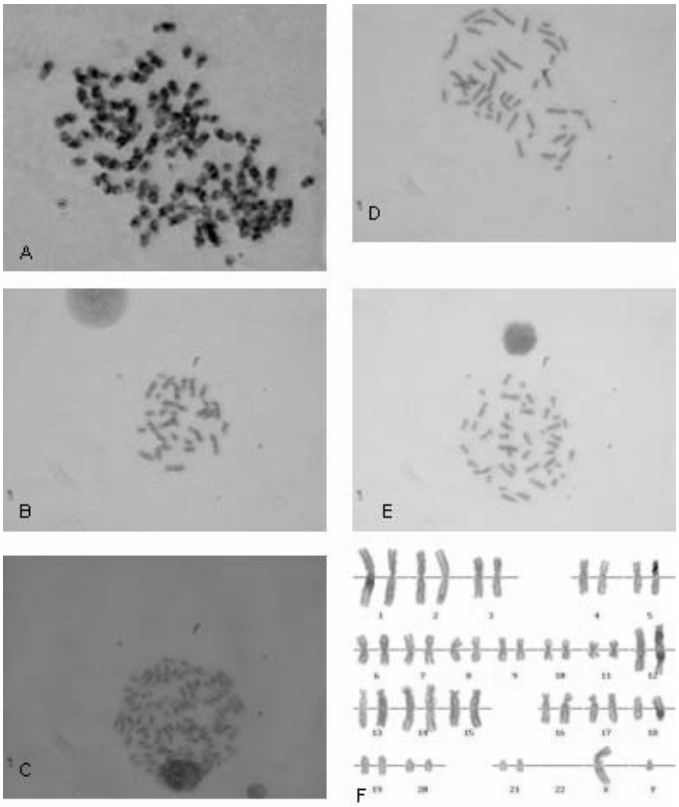


Figura 1: A, B, C: placas metafásicas que presentan alteración en el número cromosómico. D, E: placas metafásicas que presentan número cromosómico normal 2n=44 (42, XY). F: cariograma normal de un macho de conejo.

La frecuencia de individuos con alteraciones en el número cromosómico (Figura 1) es de un 4%, superior a la encontrada para individuos normales, pero inferior para individuos transgénicos de la misma especie (2% y 28% respectivamente (Parkányi *et al.* 2004)). La aneuploidía puede ser generada por diferentes factores en los que podemos incluir diferencias en la mitosis o meiosis, anormalidades en los centrosomas, duplicación, alteraciones en la condensación y cohesión cromosómica, centrómeros defectuosos (Goepfert et al. 2000), además el grado de aneuploidía varía dependiendo del origen de las células cultivadas, de su estabilidad al cultivo, del tipo de medio elegido y del tiempo de cultivo (Czepulkowski 2000).

Si comparamos los datos reproductivos del macho que muestra aneuploidía (macho A) con el resto de machos que pertenecen a la misma generación, no se observan diferencias significativas ni en el porcentaje de partos (57%, n=910), ni en el tamaño de camada al nacimiento entre el macho A y el grupo (Tabla 1). Sin embargo cuando comparamos las características seminales de los machos, observamos diferencias significativas para la variable ANOR (33,32 ± 4,71, y 19,30±1,87 para el macho A y el grupo, respectivamente ($P<0,05$)) y la variable MOT (55,97 ±6,26 y 75,49 ±2,41, para el macho A y el grupo ($P<0,05$)), sin que existan diferencias en el resto de variables (Tabla 1).

Tabla 1. Tamaño de camada y parámetros seminales de los machos analizados.

	T.C.	VOL	CON	MOT	NAR	ANOR
N	477	89	88	85	81	81
Media.	8,01	0,60	145,8	72,97	89,00	21,21
S.D.	2,080	0,39	148,7	21,66	12,15	16,27
Min	1,0	0,05	0,0	0,0	50,0	3,0
Max	15,0	2,5	624,0	98,5	99,0	80,0

	VCL	VAP	VSL	LIN	STR	WOB	ALH	BCF
N	84	84	84	84	84	84	84	83
Media.	72,66	49,64	42,92	59,32	80,34	67,86	2,97	13,35
S.D.	19,28	15,12	14,73	15,95	10,48	15,21	1,19	2,54
Min	21,0	7,1	3,3	11,1	46,2	1,0	0,98	8,19
Max	131,4	88,1	78,5	83,9	93,0	88,6	9,9	26,06

n: número de datos; S.D.: desviación estándar; T.C.: tamaño de camada al nacimiento; VOL: volumen (ml); CON: concentración en millones de spz por ml; ANOR (%): porcentaje de espermatozoides anormales; NAR (%): porcentaje de acrosomas no dañados; MOT (%): porcentaje de espermatozoides móviles totales; VCL: velocidad curvilínea total (µ/s); VSL: velocidad rectilínea total (µ/s), VAP: velocidad media total (µ/s), LIN: índice de rectitud (%); STR: índice de linealidad (%); WOB: índice de oscilación (%); ALH: amplitud media del desplazamiento lateral (µ); BCF: frecuencia de batido del espermatozoide (Hz).

Los resultados reproductivos obtenidos en el trabajo son inferiores a los encontrados en la bibliografía cuando se utiliza el semen procedente de machos de esta misma línea para inseminar hembras híbridas en granjas comerciales (57% partos y 8,01 nacidos totales, frente a un 76% partos y 9,3 nacidos vivos, Lavara *et al*. (2005)). En cuanto a los parámetros seminales cabe destacar el mayor porcentaje de espermatozoides anormales y el menor porcentaje de motilidad mostrado por el macho A, frente al resto de machos, que podría plantear la incidencia de la aneuploidía sobre la correcta espermatogénesis.

Solo cabe indicar que los resultados obtenidos son preliminares y que se están realizando análisis de estos mismos machos para observar si se encuentran alteraciones estructurales en los cromosomas no visibles con tinción sólida cromosómica, mediante técnicas de bandeo y en un futuro posiblemente se realizarán pruebas FISH para intentar detectar microdelecciones en cromosoma Y.

BIBLIOGRAFÍA

Czepulkowski, B. (2000). BIOS Scientific Publishers, Oxford.

Goepfert, T.M., Mc Carthy, M., Kittrell F.S., Stephens C., Ullrich R. L., Brinkley B. R., Medina D. (2000). FASEB J. 14, 2221-2229.

Gustavsson I., Jonsson L. (1992). Hereditas 117, 31-38.

Hayes, H,m Rogel-Gaillard, C., Zijlstra, C., De Hann, N. A., Urien, C., Bourgeaux, N., Bertaud, M., Bosma, A. A. (2002). Cytogen. Genome Res. 98, 199-205.

Henegariu, O., Heerema, A.N., Wright, L., Bray-Ward, P., Ward, D., Vance, G. (2001). Cytometry 43: 101-109.

Lavara, R., Moce, E., Lavara, F., Viudes de Castro, MP., Vicente J.S. (2005). Theriogenology 64, 1130-1141.

Parkányi, V., Chrenek, P., Rafia, J., Süvegová, K., Jurcik, R., Makarevich, A., Pivko, J., HeténYi, L., Paleyanda, R. K. (2004). Folia Biologica 50, 194-199.

Shi, W., Dirim, F., Wolf, E., Zakhartchenko, V., Haaf, T. (2004). Biol. Reprod. 71, 340-347.

Yerle, M., Echard, G., Gillois, M. (1987). Cytogenet Cell Genet 45, 5-9.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Dª Helène Hayes del INRA-Toulouse y al doctor D. Raúl Sánchez Sánchez del Departamento de Reproducción Animal del INIA-Madrid, por la ayuda prestada.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto AGL2004-02710.