

**EFFECTO DE LA POLIPLOIDIA / ANEUPLOIDIA LINFOCITARIA SOBRE LA
FERTILIDAD DE VACAS HOLSTEIN EN EL ESTADO DE ZACATECAS, MEXICO**
EFFECT OF LYMPHOCYTE POLYPLOIDY / ANEUPLOIDY ON FERTILITY OF
HOLSTEIN COWS IN THE STATE OF ZACATECAS MEXICO

**Braulio Lozano Carbajal, ^ICarlos Meza López, Federico de la Colina Flores,
Rómulo Bañuelos Valenzuela, J. Jesús Báez Arellano**

Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas,
México.

RESUMEN

A fin de determinar si la poliploidía o aneuploidía en linfocitos tuvieron efecto sobre la fertilidad en vacas Holstein, se realizó un estudio citogenético a 107 vacas, de varios establos del Estado de Zacatecas, México, con edades comprendidas de los 3 a 10 años. Para lo cual se tomó a cada una 7.0 ml de sangre de la vena yugular en tubos vacutainer heparinizados, y en el Laboratorio de Citogenética de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas, se realizó el análisis cariotípico. De cada animal se obtuvieron los parámetros reproductivos como número de partos y número de inseminaciones artificiales por parto. Se obtuvo como resultado que el 26.8% (28) de las vacas presentaron cariotipos normales, mientras que en el 73.2% (79) se observaron poliploidías o aneuploidías en porcentajes entre 1% a 16% de las metafases analizadas. La regresión de Poisson mostró significancia ($p < 0.05$) en asociaciones entre poliploidías o aneuploidías y el número de veces que una vaca repitió celo y se le inseminó, pero no se observó asociación entre la cantidad de poliploidías o aneuploidías y número de partos. Se puede predecir que las vacas que tienen más de 8% de esta aberración tendrán una tasa superior de retorno a servicios, ya que ésta aumento significativamente. Se puede suponer que en este estudio hubo ovocitos poliploides o aneuploides que ovularon y se fecundaron pero sufrieron consecuentemente de muerte embrionaria. Adicionalmente se encontró que la fertilidad se vio afectada por el número de partos, independientemente de la presencia de poliploidía o aneuploidía, probablemente como resultado del proceso de envejecimiento de la vaca.

Palabras clave: Vacas repetidoras, tetraploidía, gestación, cariotipo, cromosoma.

^ICarlos Meza López, Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia Km 36.5 Carretera Panamericana Zacatecas Fresnillo, Calera de Víctor Rosales, Zac. C.P.98500 México Apartado Postal 9 y 11 Tel/Fax (478)98 5 12 55 y 98 5 02 02 Ext. 3551 carmezlop@yahoo.com.mx

ABSTRACT

In order to determine if polyploidy or aneuploidy in lymphocytes and parity had an effect on Holstein cows' fertility, 107 Holstein cows from several dairy farms in the Mexican state of Zacatecas with ranging ages from three to ten years were analyzed for their chromosomal makeup and tested its association with the number of times a cow returns to service and parity. 7.0 ml blood samples were collected from the cows' jugular vein in heparinized Vacutainer vials and taken to the Cytogenetics Laboratory at the University of Zacatecas Veterinary School to perform a standard karyotyping technique and a G chromosome banding assay. As result 26.8% (28) of cows showed normal karyotypes, whereas on 73.2% (79) varying degrees of polyploidy or aneuploidy were observed on these cows' lymphocytes metaphases, yielding from 1.0% to 16.0% defective karyotypes. Poisson regression showed significance ($p < 0.05$) on associations between polyploidy and the number of times a cow returned to service; and between parity and the number of times a cow returned to service nor interaction neither association were found ($p > 0.05$) between polyploidy or aneuploidy and parity. It can be predicted that cows having 8.0% or greater percentages of polyploidy or aneuploidy will have their return to service rates significantly increased. It can be speculated that, in this study, polyploidy or aneuploid oocytes, which were ovulated and fertilized and underwent embryonic death, may contribute to the impairment of fertility observed in these cows. Additionally, it was found that fertility was also impaired by parity independently from polyploidy or aneuploidy, probably as a result of the cow's aging process.

Keywords: Repeat breeder, tetraploidy, karyotype, chromosome.

INTRODUCCIÓN

Uno de los problemas en el ganado vacuno Holstein, es la baja fertilidad que se manifiesta en las vacas repetidoras (Gustafsson y Emanuelson, 2002), las cuales se caracterizan porque han parido una vez, exhiben ciclos normales, no muestran alteraciones clínicamente diagnosticables, no presentan descargas genitales anormales, no tienen anomalías anatómicas y no han concebido después de 3 o más servicios; lo que lleva a pérdidas económicas para los productores (González-Stagnaro *et al.*, 2002). Es sabido que las aberraciones cromosómicas son un factor de repetición de servicios y entre ellas las poliploidías / aneuploidías, que pueden producirse espontáneamente durante la gametogénesis, fertilización o embriogénesis (Hernández y Morales, 2001; Boneville *et al.*, 2011); dando lugar a la muerte embrionaria hasta un 50% durante la primera a segunda semana de concepción en vacas repetidoras (De Ondiz *et al.*, 2005). O incluso durante el primer trimestre de la gestación (Abd-Allah, 2011); en diferentes tipos de tejido (Anatskaya y Vinogradov, 2010).

Con base a estos previos conocimientos se planteo como objetivo: realizar el análisis cromosómico a vacas Holstein y llevar a cabo una correlación entre el número de metafases poliploidies / aneuploides, con el número de inseminaciones artificiales por parto.

MATERIAL Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en distintos establos del Estado de Zacatecas, México; donde se muestrearon 107 vacas Holstein, éstas fueron de entre 3 y 10 años de edad. Así mismo se registró el número de partos y número de servicios por parto en cada vaca, se tomaron 7.0 ml de muestra sanguínea de la vena yugular en tubos vacutainer heparinizados, se trasladaron al Laboratorio de Citogenética de la Unidad Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Zacatecas en una hielera para realizar el siguiente proceso: se sembraban 0.5 ml de sangre en 4.0 ml de medio de cultivo McCOY 5^A. Mod. Con L-Glutamina y NaHCO₃, al cual se le agregaron 6 gotas de penicilina de (400,000 UI) en el frasco de 100 ml de medio de cultivo. Al tubo de cultivo se le adicionaron 0.20 ml de fitohemaglutinina; se colocaron en la estufa a 38° C durante 70 horas, al cabo de las cuales se agregó 1.0 ml de colchicina (4mcg/mL en PBS); por 2 horas se centrifugaron a 1500 rpm, se decantó y se agregó KCL a 0.075 M; por 30 minutos se fijó en solución de Carnoy metanol-ácido acético, en relación 3-1. Se realizaron 3 lavadas con centrifugaciones y decantando, (Jiménez, 2000).

Se procedió a elaborar 5 laminillas que se tiñeron con Giemsa, durante 30 minutos; se montaron con resina y cubreobjeto; posteriormente se llevó a cabo la observación a 10X, 100X. Se observaron y cuantificaron los cromosomas de 45 a 50 metafases linfocitarias, se determinó el número de metafases normales y con aberraciones del tipo poliploide o aneuploide de cada vaca, de acuerdo a la técnica citogenética (Jiménez, 2000).

Finalmente se analizaron los datos mediante modelos lineales generalizados, como regresiones de Poisson y binomial negativa, teniendo al número de inseminaciones artificiales como variable de respuesta, al número de partos y al número de inseminaciones como variables explicativas. Con las mismas variables explicativas y transformando las inseminaciones a retornos a servicio, se realizó una regresión de inflación de ceros para distribución binomial negativa (Zeileis et al., 2008), con propósitos comparativos. También se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson, para estimar el grado de asociación entre las variables explicativas. Se utilizó el software estadístico básico R (R Core Team 2013), y el paquete 'pscl' (Jackman et al., 2011), para el procesamiento de los datos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las vacas presentaron cariotipos normales en un 26.8%, (28), como se muestra en la Figura 1; mientras que el 73.2% (79), mostró diversos grados de poliploidía o aneuploidía, que variaron entre el 1% al 16%, como se muestra en la Figura 2.

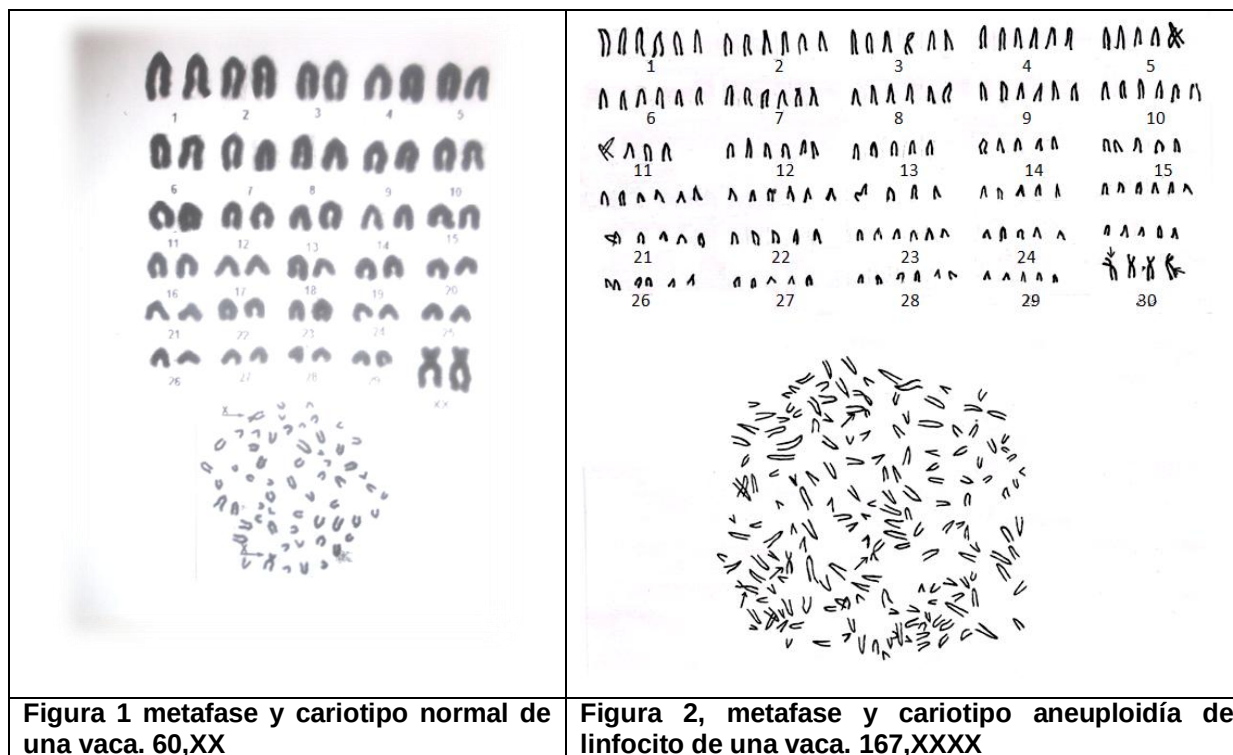


Figura 1 metafase y cariotipo normal de una vaca. 60,XX

Figura 2, metafase y cariotipo aneuploidía de linfocito de una vaca. 167,XXXX

El cuadro 1 muestra el resumen de los resultados obtenidos para las variables estudiadas; sobresale la gran variabilidad que presenta el porcentaje de poliploidías o aneuploidías, para lidiar con el exceso de variabilidad observada en el fenómeno natural. Se utilizó una estimación de cuasi máxima verosimilitud del promedio de inseminaciones, se deduce la fertilidad global del grupo de vacas estudiadas como 27.1%, suponiendo una distribución binomial negativa. La figura No. 3, hace patente el grado de asimetría que presentaron dichas variables.

Cuadro 1. Resultado de las variables estudiadas en la totalidad de vacas Holstein analizadas.

Variable	Promedio	D. E.	CV %
Poliploidías o aneuploidías (%)	3.05	3.36	110.0
Partos	1.95	0.92	46.8
Inseminaciones	3.69	1.82	49.3

(La dispersión es previa a la aplicación del modelo de regresión; D.E.de los residuales con el modelo operado fue de 0.73 de residual y baja la variabilidad a 24%)

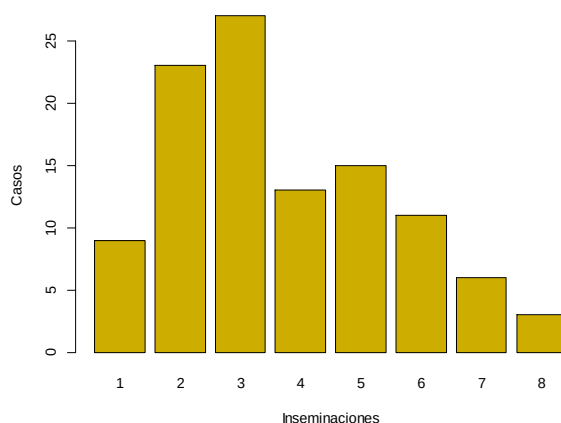


Figura 3. En la cual se muestra la asimetría de la variable inseminaciones artificiales

La correlación de Pearson muestran que tanto el porcentaje de poliploidías o aneuploidías, como el número de partos se asocian favorablemente al número de inseminaciones artificiales ($p < 0.05$). Sin embargo, existió una relación negativa entre el porcentaje de poliploidías o aneuploidías y el número de partos, como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Variables Correlación de Pearson de 107 vacas repetidoras respecto Núm. de IA, porcentaje de Poliploidías o aneuploidías y número de partos.

Variables	Número de Inseminaciones Artificiales	Porcentaje de Poliploidías	Número de partos
Número de Inseminaciones Artificiales	-	.506	.411
Porcentaje de Poliploidías	.506	-	-0.076
Número de partos	.411	-0.076	-

Tanto el análisis de regresión de Poisson, como la binomial negativa, produjeron los mismos coeficientes: para la intercepción, 0.629 ± 0.133 , para el porcentaje de poliploidías o aneuploidías, 0.0632 ± 0.0122 , y para el número de partos, 0.225 ± 0.052 . Todos estos coeficientes fueron significativos ($p < 0.001$). La regresión para inflación de ceros, para el porcentaje de poliploidías, el coeficiente de regresión fue 0.0772 ± 0.0137 , y para el número de partos, 0.265 ± 0.065 ; ambos significativos diferentes de cero ($p < 0.001$), bastante similares a los arriba presentados.

Se puede afirmar que a mayor porcentaje de poliploidías o aneuploidías, mayor número de inseminaciones; y a mayor número de partos, mayor número de inseminaciones por concepción. No existe interacción entre poliploidías y número de partos, como se indica

en el cuadro 3 del análisis Poisson, donde se muestra el coeficiente, la estimación, error estándar, los valores de z y $\text{pr}(> |z|)$

Cuadro 3. Regresión de la familia Poisson. Donde se observan la significancia del porcentaje de poliploidías; se observa también la interacción porcentaje de poliploidías y número de partos

Coeficientes	Estimado	Error estándar	Valores de z	$\text{pr}(> z)$
(Intercepto)	0.5593	0.1911	2.926	0.0034**
% poliploidías	0.0846	0.0433	1.952	0.0508 .
Núm. Partos	0.2560	0.0794	3.22	0.0012**
%poliploidías:núm.partos	-0.0099	0.0192	-0.514	NS
Código de significancia 0.001** 0.05.				

La baja fertilidad en el ganado vacuno Holstein es una constante manifestada por la presencia de vacas repetidoras (Yusuf *et al.*, 2010), a la que se han enfocado una gran cantidad de investigadores desde diferentes campos de acción, ya que éste es un síndrome multifactorial. En esta investigación se abordó el análisis citogenética hacia las aberraciones cromosómicas, como lo han llevado a cabo en los últimos años. Hong y Huai (1994) refiere, linfocitos poliploides en porcentajes de 4.12 a 5.21% en varias razas de ganado vacuno; mientras que en este trabajo se observaron desde 1.0% a 16.0%.

Por otra parte El-Bayomie *et al.*, (2011), al realizar un análisis citogenético a vacas holstein-Frisian, determinaron hasta un 19.95% de aberraciones numéricas en vacas repetidoras; estos resultados tienen cierta concordancia con los de esta investigación, al observar que las vacas de 8% a 16% de células aberrantes, fueron francamente repetidoras.

En otras razas como en la Herford, (Abd-Allanh 2011), reporta la presencia de 5.2% a 10.8% de poliploidías, así como porcentajes de 20% que se manifiestan con otras patologías, como hipertrofia muscular, defectos congénitos del sistema nervioso central y esterilidad. En esta investigación la totalidad de las vacas fueron morfológicamente normales.

Debe de existir una relación directa entre la presencia de Linfocitos poliploides y la de ovocitos también aberrantes, al considerar que cualquier individuo deriva de una sola célula diploide, el cigoto; sin embargo, también pueden surgir aberraciones espontáneas ambientales, tanto en la mitosis linfocítica, como en la meiosis. ¿En qué proporción ocurre una u otra?, no está estimada, Abd-Allah (2011) describe a un toro con diploidía y triploidía; y al usar el semen congelado y descongelado, hubo más muertes embrionarias durante los primeros 15 días de desarrollo. Lo mismo puede suceder en vacas con poliploidías o aneuploidías.

En humanos, Salazar *et al.*, (2011), de 677 abortos espontáneos, obtuvo 38.3% normales y 61.7% con aberraciones del tipo de trisomías, poliploidías, monosomías y estructurales; quedando las poliploidías en segundo lugar, por lo cual en animales se puede predecir algo semejante, cuando la vaca o el toro tienen porcentajes altos de linfocitos poliploides, producirán cigotos aberrantes que morirán en cualquier etapa del desarrollo intrauterino. Por otra parte se han llevado a cabo investigaciones cromosómicas en relación con la superovulación (Viuff *et al.*, 2001), en las que se han identificado mixoploidías y poliploidías con mayor frecuencia de la primera; y al considerar que vacas con linfocitos poliploides pueden producir ovocitos también con la aberración, podría esta presencia de linfocitos poliploides influir en los resultados citogenéticos de embriones producidos por superovulación.

CONCLUSIONES

La poliploidía o aneuploidía linfocítica presenta una relación importante con el número de inseminaciones artificiales (IA) por parto; es decir a mayor porcentaje de linfocitos aberrantes, mayor número de IA por parto, por lo cual se concluye que las aberraciones cromosómicas son un factor importante a considerar en la selección de ganado Holstein para la reproducción.

Se debe utilizar el estudio citogenético en la solución de problemas que presentan las vacas repetidoras, ya que se identificó que vacas que presentan estas aberraciones cromosómicas de poliploidías o aneuploidías de un 8% o mayor, tienen una alta probabilidad ($p < 0.05$) de repetir celo.

Se puede sugerir que se implemente la técnica de diagnóstico citogenético en becerras destinadas a la reproducción, así como para detectar la presencia de aberraciones cromosómicas en vaquillas repetidoras; para de esta manera se elimine oportunamente hembras de baja fertilidad e incluso infértiles.

LITERATURA CITADA

ABD-ALLAH SM. Impact of a novel cytogenetic finding (unusual polyploidy, 50% 2n,XY / 50% 3n,XY) on fertility of a cross breed F3 abundance bull. *Theriogenology Insight*. 2011; 1 (2): 111-118.

ANATSKAYA O V & Vinogradov E A. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome REVIEW *Funct Integr. Genomics*. 2010; 10:433–446.

DE ONDIZ SA, Palomares NR, Perea GF, Hernández FH, Gutiérrez AJ Soto BE. Uso de una solución antiséptica sola o asociada con un progestágeno en el tratamiento de la vaca repetidora de servicio. *Revista Científica, FCV-LUZ*. 2005;15(3):204-209.

- EL-BAYOMI KH, Iman E M, El-Araby and. Zagloul AW Cytogenetic Analysis Related to Some Infertility Problems in Cattle. *Global Veterinaria*. 2011; 7(4):323-329.
- GONZÁLEZ-STAGNARO C. Madrid BN, Goicochea LI J. Análisis Epidemiológico en vacas repetidoras. *Revista Científica*. 2002; 12:428 – 430.
- GUSTAFSSON H, Emanuelson U: Characterisation of the repeat breeding syndrome in swedish dairy cattle. *Acta Vet. Scand*. 2002; 43:115-125.
- HERNÁNDEZ CJ, Morales RJS. Falla en la concepción en el ganado lechero: Evaluación de terapias hormonales *Vet. Méx.*, 2001; 32 (4): 279-283.
- HONG CH; Huai Q. Chromosome Aberration Analysis of Normal Somatic Cell for Four Breeds of Yellow Cattle. *Journal of Yellow Cattle Science*, 1994.
- JACKMAN, S., Tahk, A., Zeileis, A., Maimone, C. and Fearon, J. Political Science Computational Laboratory, Stanford University, email to [accessed JACS11POLI0], 2011.
- JIMÉNEZ RL. La citogenética en Medicina Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. Departamento de ciencias fisiológicas. Laboratorio de Citogenética. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, 2000.
- R CORE Team *R: A language and environment for statistical computing*, Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2013.
- SALAZAR UA. Álamos B.C. Arriagada AM, Selman C E. Estudio Citogenético en 677 casos de aborto espontáneo. *ANACEM*. 2011; 5(2).
- VIUFF DP. Hendriksen J.MP. Vos LAM. Steph J. Dieleman JS. Bo MB. Greve T. Hyttel P. and Thomsen PD. Chromosomal Abnormalities and Developmental Kinetics in In Vivo-Developed Cattle Embryos at Days 2 to 5 after Ovulation. *Biology of Reproduction*. 2001; 65: 204–208.
- YUSUF M. Nakao T. Kumari RB. Gautam G. Thanh LS. Yoshida Ch. Koike K. Hayashi A. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*. 2010; 73(9):1220–1229.
- ZEILEIS A, Kleiber C, Jackman S. Regression models for count data in R. *Journal of Statistical Software*, 2008 27(8), Available at: <http://www.jstatsoft.org/v27/i08/>.