

Dos genes del cromosoma Y pueden reemplazar la totalidad de ese cromosoma en reproducción asistida del ratón

Yasuhiro Yamauchi, Jonathan M Riel, Zoia Stoytcheva, Monika A Ward

Institute for Biogenesis Research, John A Burns School of Medicine, University of Hawaii, 1960 East – West Road, Honolulu, HI, 96822, EE.UU., Scienceexpress.

Reproducción 2015;30:26-36

Seleccionado, traducido, analizado, resumido y comentado por Aníbal A Acosta

Resumen

El cromosoma Y se considera importante en la reproducción masculina. Los autores han demostrado previamente que con el uso de reproducción asistida se pueden obtener proles vivas a partir de ratones carentes por completo del “brazo largo” del cromosoma Y. En este trabajo se demuestra, además, que una progenie de ratones vivos puede también ser generada usando células germinales de machos con la contribución del cromosoma Y limitada solamente a 2 (dos) genes: el factor SRY determinante del testículo y el factor de proliferación espermatogonial Eif2s3y. Se cree que SRY tiene como función primaria la determinación sexual durante la vida fetal. Eif2s3y puede ser el único gen del cromosoma Y requerido para originar la espermatogénesis del ratón, permitiendo la formación de células germinales haploides, que son funcionales en reproducción asistida. Nuestros hallazgos son relevantes, pero no son directamente aplicables al hombre.

Palabras claves. *Cromosoma Y, reproducción masculina, células germinales, gen SRY, factor de proliferación espermatogonial, Eif2s3y determinación sexual.*

Two Y genes can replace the entire Y chromosome for assisted reproduction in the mouse

Summary

The Y chromosome is considered important in male reproduction. The authors have previously shown that with the

use of assisted reproduction, they can obtain live offspring from completely lack of the “long arm” of the Y chromosome. This study further demonstrates that mice progeny mice alive can also be generated using male germ cells with the contribution of the Y chromosome only limited to 2 (two) genes: the determining factor SRY testis and spermatogonial proliferation factor Eif2s3y. It is considered that SRY has primary sex determination function during fetal life. Eif2s3y may be the only Y-chromosome gene required for mouse spermatogenesis allowing the formation of haploid germ cells, which are functional in assisted reproduction. Our findings are relevant but are not directly applicable to humans.

Key words. *Chromosome, male reproduction, germ cells, SRY gene, spermatogonial proliferation factor, Eif2s3y, sex determination.*

El cromosoma Y de los mamíferos, que fue considerado hasta hace algún tiempo como un desperdicio genético, es ahora reconocido como codificador de una batería de genes, muchos de los cuales se piensa que están involucrados en reproducción masculina. Se ha publicado una cantidad substancial de trabajos para definir cuáles genes son importantes para mantener la función espermática en condiciones normales in vivo. En la era de las tecnologías de reproducción asistida (TRA) es ahora posible eliminar varios pasos de la fertilización humana normal usando espermatozoides inmóviles, inviábiles o aún espermatozoides inmaduros. Nosotros hemos demostrado que ratones machos infértiles, que carecen de la totalidad del “brazo largo” del cromosoma Y, pueden generar prole viva cuando

Correspondencia: Monika A Ward
E-mail: mward@hawaii.edu

los espermatozoides, severamente anómalos, se introducen dentro de los oocitos por vía de la inyección intracitoplasmática de esperma. (ICSI). En estos ratones el cromosoma Y está reducido de 78 Mb a alrededor de 2Mb y codifica solamente 7 genes y 3 familias de genes (XY* XSxr^a en la Figura S1).

En la mayoría de los mamíferos, incluyendo seres humanos y ratones, la “determinación testicular” está regulada por el gen Sry que dirige el desarrollo gonadal hacia la diferenciación masculina. Usando adición transgénica de Sry, ratones con un cromosoma X (XOSry) desarrollan testículos, que están repletos de espermatogonias, células sexuales masculinas que tienen el potencial de diferenciarse e iniciar espermatogénesis. En ausencia de los genes del otro cromosoma Y, estas espermatogonias sufren arresto (detención) de la proliferación y los estadios meióticos y postmeióticos de la espermatogénesis están ausentes. La adición transgénica individual de los genes faltantes del cromosoma Y lleva a la identificación de Eif2s3y como el gen que restaura la proliferación espermatogonial normal. En XOSry los machos transgénicos para Eif2s3y, la espermatogénesis mostró poder completar la profase meiótica y la primera división meiótica antes de que las células se detuviesen en la fase de espermatozoides secundarios, con producción ocasional de células espermátide-símiles. Aquí tratamos de probar si estas células similares a espermátides son funcionales en reproducción asistida y si otros componentes del cromosoma Y ayudan a aumentar el desarrollo de gametas funcionales.

Primero examinamos ratones con el complemento génico del Y limitado a dos genes transgénicamente, derivados: uno “autosomalmente” localizado (Sry) y el otro ubicado en el cromosoma X, Eif2s3y (X^EOSry en la Figura S1). Estos ratones tienen testículos más pequeños que los machos XY tipo salvaje (Figura S2) pero poblados con células germinales. El análisis de los cortes testiculares confirmó que la espermatogénesis estaba activa, lo que permitía el desarrollo de células germinales con morfología similar a la espermátide (Figura 1 A, flecha) y a aquellas observadas antes. La presencia de estas espermátides fue baja y su desarrollo estuvo res-

tringido a los estadios 5 a 7, con presencia ocasional de espermátides en estadios 8 y 9 [Figura 1A, (inset) y Figura S3]. Observamos también cambios secundarios en los túbulos seminíferos con aumento en la incidencia de células en proceso de muerte celular, cuerpos multinucleados y vacuolas (Figura 1B). Estos cambios aumentaron progresivamente a medida que los machos envejecían y finalmente terminaron generando túbulos similares a los del síndrome de células de Sertoli exclusivas (Sertoli Cell Only Síndrome) (Figura 1C).

Probamos posteriormente la función de las células espermátide-símiles X(E) de OSry en reproducción asistida.

Células redondas espermátide-símiles se hallaron en suspensión de células testiculares de todos los machos usados en los intentos de técnicas de reproducción asistida, aunque estas células fueron raramente halladas y su morfología fue común y levemente anormal (tamaño aumentado, núcleos menos pronunciados y superficie rugosa en lugar de lisa) cuando se comparan con las espermátides de los machos control XY (Figura 1, D y E). Sin embargo, cuando llevamos a cabo inyección en células (espermátides) redondas (ROSI) los oocitos fertilizaron exitosamente como se evidencia por el desarrollo de 2 pronúcleos y por la expulsión del segundo corpúsculo polar así como por el clivaje subsiguiente (Figura S4). Cuando los embriones desarrollados de 2 células fueron transferidos dentro del oviducto de las hembras receptoras se obtuvieron proles vivas (Tabla 1 y Figura 1F). Tres de 4 machos que proveyeron espermátides para inyección produjeron descendencia viva. La eficiencia de ROSI con machos X(E)OSry fue significativamente más baja que con los controles XY (9% versus 26%) (Tabla 1). Toda la progenie tenía los fenotipos esperados cuando derivaron de padres

Tabla 1. Los resultados de la inyección espermática (ROSI) con espermátides de machos con complemento limitado del gen Y. Para contribución del gen Y, ver fig. S1. Los porcentajes de descendencia viva e implantación se calcularon a partir de embriones transferidos. rango etario de los machos entre 63 y 229 días.

Male genotype	Y gene contribution	Live offspring % (no.)	Implants % (no.)
X ^E OSry	Eif2s3y and Sry	9.1 (12/132) ^a	29.5 (39/132) ^b
X ^E Y ^S Sry	Eif2s3y and Sry	5.7 (13/227) ^b	27.3 (62/227) ^b
X ^E Sxr ^b O	Eif2s3y and Sxr ^b	20.0 (24/120)	45.8 (55/120) ^a
X ^E Sxr ^b Y ^S X	Eif2s3y and Sxr ^b	16.0 (24/150)	37.3 (56/150) ^b
XY ^{int} control	Intact Y	26.0 (19/73)	69.9 (51/73)

XEOSry y fue sana; aquellos que se aparearon fueron fértiles (Figura IG, Figura S5 y texto suplementario).

Un cromosoma sexual sin aparear conduce a la detención de la meiosis y a la apoptosis, de modo que la falla meiótica parcial en los machos XEOSry no fue un hecho inesperado. Las pocas espermátides que se encontraron en los testículos pueden ser “células” que se “filtraron” durante el arresto meiótico, por ejemplo, es decir que completaron la meiosis y eran haploides. Alternativamente, éstas podrían ser las células que desarrollaron una morfología de tipo espermátide sin transitar a través de la segunda división meiótica.

El contenido de DNA del núcleo de la espermátide (Figura 2 y Figura S6) y el análisis cromosómico cigótico (Figura 3) revelaron que la gran mayoría de espermátides de los machos XEOSry eran diploides y originaron cigotos triploides, lo que explicaría el pobre resultado de la inyección (ROSI = Round Spermatid Inyection). Para superar el problema del bloqueo meiótico que se origina en la monovalencia del cromosoma X, se usaron machos a los cuales se añadió un diminuto cromosoma Y*X (Figura S1) para proveer una segunda región de apareamiento (PAR) y permitir una sinapsis cromosómica PAR-PAR.

En estos machos XEY*X Sry (Figura S1) se observó en el 85% de ellos el apareamiento exitoso de Y*X y X en espermátocitos en paquitene (Figura S8). Sin embargo, el fenotipo testicular no mejoró (Figuras S2 y S7, A hasta C). La proporción de

descendencia viva obtenida después de la inyección fue igualmente baja como la de los machos XEOSry (Tabla 1) y solamente 5 de 8 machos que proveyeron células para ROSI, originaron descendencia. Por ello nosotros investigamos la ploidía y demostramos que la mayoría de las espermátides XEY*x Sry eran diploides (Figura 2 y Figura S6) y que la mayoría de los cigotos, después de ROSI, fueron triploides (Figura 3).

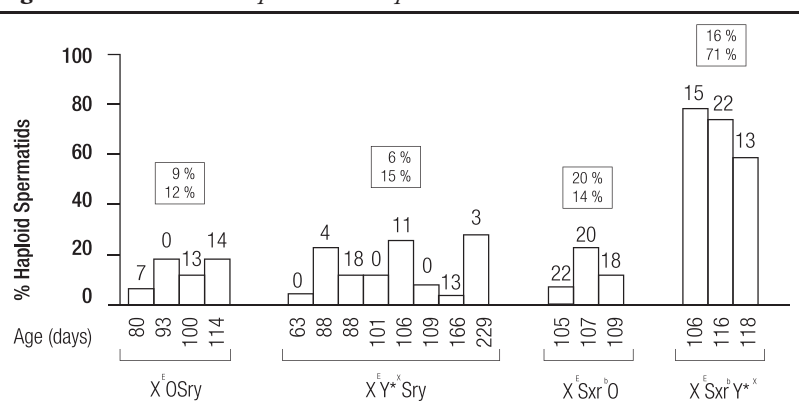
De esta manera, la superación de la univalencia del cromosoma X en machos XEY*Xsry no permitió superar el arresto meiótico y aumentar el éxito de ROSI (ver el texto suplementario).

Nosotros nos preguntamos luego si otros genes del cromosoma Y serían beneficiosos para mejorar la función espermática en reproducción asistida. Para responder a esta pregunta usamos machos en los cuales la determinación sexual conducida por el transgen Sry fue reemplazada con el factor de reversión sexual Sxrb y XESxrbY*X en la Figura S1. En estos machos el cromosoma X es portador de un transgen Eif2s3y que codifica lo necesario para la proliferación espermátocito junto con el Sxrb que codifica para Zfy2/1, Sry, H2al2y y el grupo de genes Rbmy.

Los testículos de los machos X^ESxrb^O y X^ESxrb^bY*^x eran más grandes que los de X^EOSry y X^EY*^xSry pero más pequeños que los de machos XY salvajes (Figura S2). La incidencia de espermátides redondas estaba aumentada solamente en X^ESxrb^bY*^x (Figura S3). En ambos tipos de

machos el desarrollo de las espermátides era más avanzado, con elongación clara hasta la etapa 10, ocasional presencia de espermátides en etapas 11 y 12, y aún desarrollo esporádico hasta esperma maduro testicular (Figura S7, D y G). Hubieron cambios secundarios en el epitelio seminífero (Figura S7, E, F, H, e I) aunque en los machos X^ESxrb^bY*^x fueron menos pronunciados que en los otros genotipos. El análisis cromosómico cigótico mostró que la mayoría de los cigotos, después

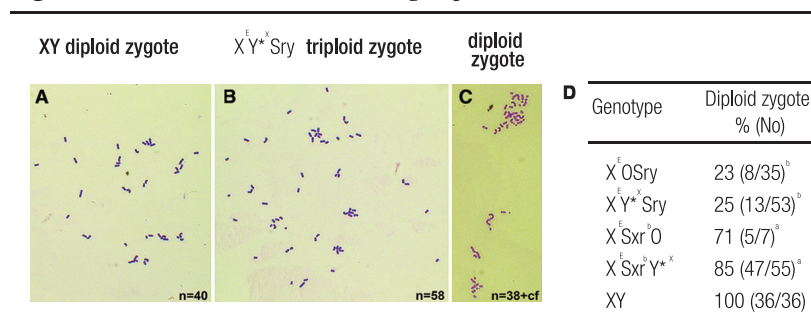
Figura 2. Incidencia de espermátides haploides.



Incidencia de espermátides haploides. Cada barra del gráfico representa un individuo macho que proporcionó células testiculares para el análisis; los números más arriba muestran el porcentaje de crías obtenidas después de ROSI.

Los datos en los rectángulos representan porcentaje promedio de espermátides haploides (azul) y descendencia ROSI (rojo) para cada genotipo. Macho control con el cromosoma Y intacto tenía 97% (67 de 69) de espermátides haploides. Los machos X^ESxrb^bY*^x tuvieron mayor incidencia promedio de espermátides haploides que otros genotipos (P < 0,01).

Figura 3. Análisis cromosómico de un cigoto post ROSI.



A. Cigoto normal diploide de ratón generado post ROSI con macho XY con 40 cromosomas. **B.** Cigoto triploide obtenido después ROSI con espermátides de un macho con dos genes Y (~ 60 cromosomas). **C.** Cigoto diploide después ROSI con espermátides de macho del mismo genotipo (~ 40 cromosomas). **D.** Incidencias de cigotos diploides generados después de ROSI. cf, fragmentos de cromosomas. n = número de cromosomas. ap <0,05, bp <0,001 versus control XY. Escala 50 µm.

de ROSI, eran diploides (71-85%) (Figura 3) y el resultado de ROSI fue significativamente mejor en todos los machos controlados (3 por genotipo) produciendo crías vivas con una tasa que alcanza ahora 20% y 16% (Tabla 1). Sin embargo, la frecuencia de espermátides haploides en machos X^ESx^bO permaneció baja (Figura 2 y Figura S6). La discrepancia en la ploidía entre las espermátides y los cigotos habla de la posibilidad de que la segunda división meiótica se realizase en los oocitos. Esto sugiere que Sx^b codifica un gen o genes que promueven la segunda división meiótica cuando todos los cromosomas están apareados y permite superar el arresto meiótico de la espermátide diploide en el oocito cuando un cromosoma adecuado (Pairing Partner) para el apareamiento con la X se ha perdido (ver el texto suplementario).

Nosotros hemos demostrado que solamente 2 genes del cromosoma Y del ratón, Sry y Eif2s3y, son necesarios para el desarrollo de células germinales haploides masculinas que son suficientes para una reproducción exitosa y para originar descendencia viva. Este complemento mínimo del gen Y debe ser suficiente entonces para una reproducción exitosa y para originar descendencia viva. Este mínimo complemento del gen Y debe ser adecuado para asegurar una metilación masculina específica y la formación correcta de cualquier otra(s) modificación(es) epigenética(s) que se requiera(n) para la embriogénesis en el genoma paterno.

Que el Sry sea uno de los dos genes no es sorprendente desde que él conduce la determinación testicular. Su expresión y translación en el ratón ocurre durante un período muy breve en el desarrollo fetal. En el testículo adulto, la trascrición del Sry parece ser aberrante y no traducible aunque

su papel como regulador (reguladores) epigenético no puede ser excluido. Sin embargo, es razonable concluir que Sry juega primariamente un papel durante la determinación sexual.

Esto sugiere que el segundo gen Y, Eif2s3y, es el único gen necesario para conducir la espermatogénesis a través de la primera división meiótica y así con la progresión meiótica ocasional formar espermátides

redondas haploides. Eif2s3y es una subunidad 3Y-codificada del factor universal 2 de iniciación de translación eucariótica. El gen Eif2s3y es omnipresente y en el testículo juega un rol en la proliferación espermatogonial. Eif2s3y ha sido conservado en el cromosoma Y durante la evolución euteriana pero no hay copia ligada a la Y de Eif2s3 detectada en primates simios, incluyendo los seres humanos.

En los hombres, la detención de la proliferación espermatogonial ocurre frecuentemente por deleciones de AZFa (azoospermia; síndrome SCO) y ha sido relacionada con una pérdida de DDX3Y. En ambos, hombres y ratones, los genes Eif2s3 y Ddx3 pertenecen a una familia de genes ampliamente expresados que codifican proteínas involucradas en la iniciación de la translación del RNAm en los ribosomas. Estos genes tienen homólogos en el X que escapan su inactivación y las copias del Y y X se sospecha que son, al menos en parte, intercambiables con la copia del Y conservada para proveer 2 dosis de producto génico en ambos: hombres y mujeres. La pérdida en el ratón del Y encoded Ddx3y no es perjudicial para la espermatogénesis debido a la compensación provista por una copia del X retrotranspuesta en un autosoma. Análogamente en hombres, la presencia de una copia del X retrotranspuesta de EIF2S3X en adición a EIF2S3X misma, explica por qué la pérdida de la copia Y todavía permite la espermatogénesis. Aunque no hay una copia humana de Eif2s3y, los hombres tienen una copia encoded (codificada) del factor de translación EIF1A (Eukaryotic Translation Initiation Factor 1^a, Y-linked), el cual muy posiblemente actúa como parte de una multiproteína compleja que in-

cluye EIF2S3X como también otros EIF miembros de la familia. Nótese que EIF1AY se encuentra en la región AZFb y su expresión disminuida contribuye esporádicamente a la azoospermia.

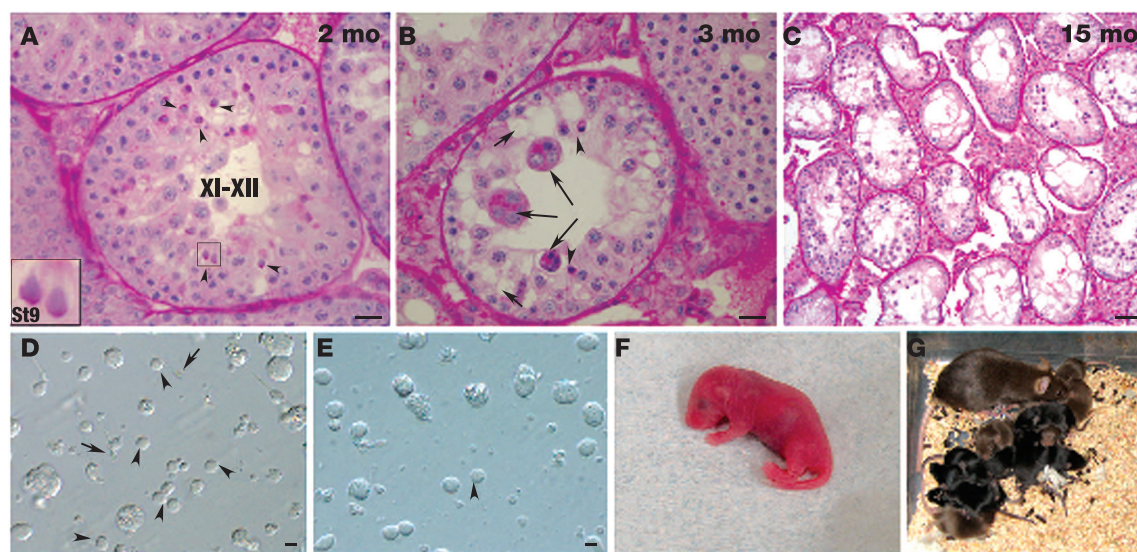
Actualmente nuestros hallazgos en ratones no pueden trasladarse directamente a seres humanos. ROSI (Round Spermatid Injection) es todavía considerada experimental en tecnologías de reproducción asistida humana, debido a dudas concernientes a la seguridad de inyectar células germinales inmaduras y a dificultades técnicas. A pesar de ello algunos niños ya han nacido y ellos fueron sanos. A medida que aprendemos más acerca de los efectos y el perfeccionamiento de los aspectos técnicos de ROSI, este método puede devenir más aceptable. En realidad los estudios de los efectos de ROSI en ratones han sido alentadores. Por ello nuestro estudio puede tener importancia para clínicos trabajando en centros de ART, en apoyo de la posibilidad de que ROSI sea una opción viable para superar la infertilidad masculina en azoospermias no obstructivas.

Considerando que nosotros hemos obtenido descendencia viva usando células germinales de machos con solo dos genes del cromosoma Y, uno pue-

de cuestionar la importancia del cromosoma Y en reproducción masculina. Nosotros creemos que la respuesta reside en definir la necesidad. El cromosoma Y humano no está en vías de desaparición, como se ha sostenido en el pasado y su información genética es indudablemente importante para muchos aspectos de la reproducción, incluyendo el desarrollo de espermatozoides maduros y su función en fertilización normal. La mayoría de los genes del cromosoma Y del ratón están incluidos en la espermatogénesis y en la función espermática y como tales son necesarios para la fertilización normal. Sin embargo, cuando se trata de reproducción asistida nuestro estudio en ratones prueba que la contribución del cromosoma Y puede ser disminuida hasta un nivel mínimo que consiste en los genes SRY y Eif2s3y. En realidad sería posible eliminar completamente el cromosoma Y del ratón si se hace un reemplazo adecuado de estos dos genes.

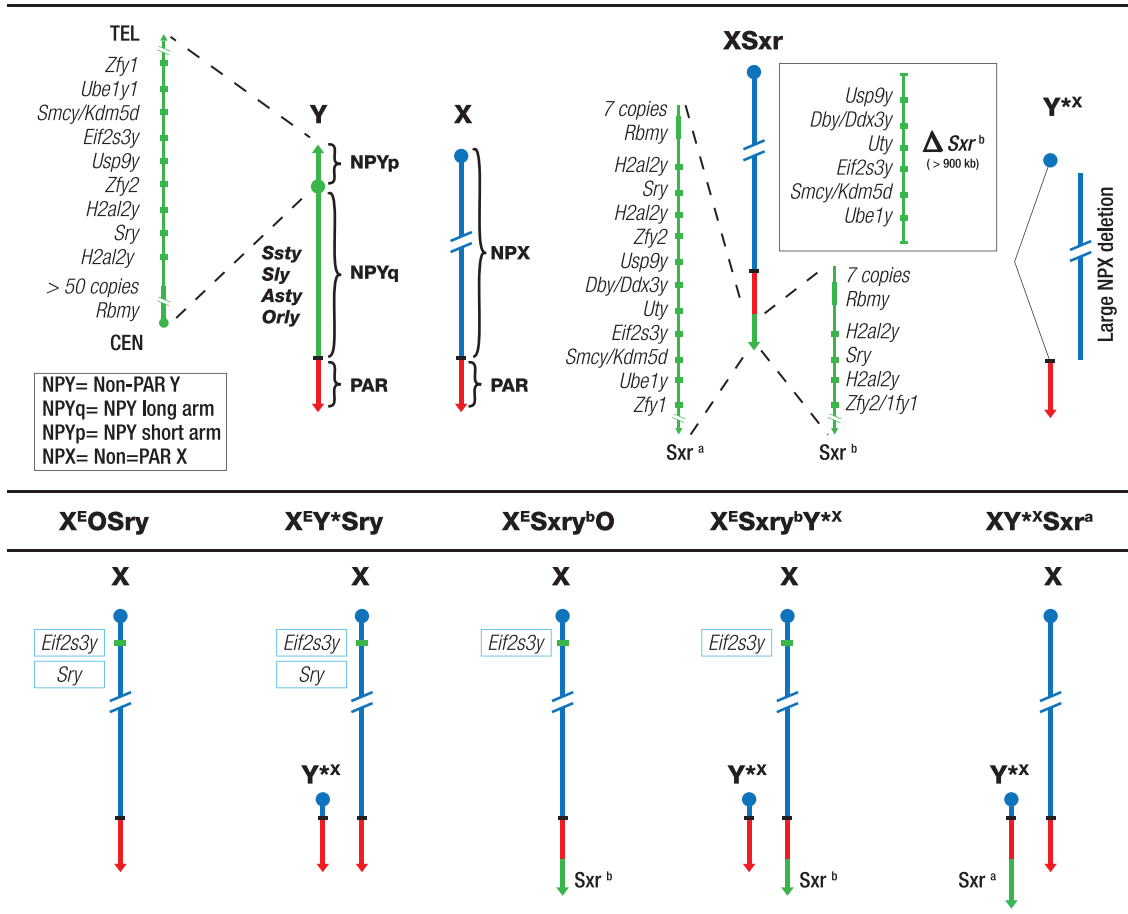
Bibliografía: 50 citas bibliográficas que no se transcriben por problemas de espacio.

Figura 1. Histología testicular, espermátides redondas y descendencia.



A. Los machos con sólo dos genes Y, Eif2s3y y Sry, tienen arrestos meióticos y postmeióticos que sólo ocasionalmente permiten la formación de espermátides (flechas) que frecuentemente se demoran y no se desarrollan. St8 / 9. **B.** la degeneración tubular con la formación de "cuerpos multinucleados" (Flechas largas), vacuolas (flechas cortas), y células germinales muertas y/o apoptóticas (puntas de flecha) es con frecuencia observada. **C.** SCO fenotipo similar en un viejo macho. **D.** Suspensión testicular de machos de tipo salvaje machos contiene espermatozoides testiculares (flechas) y muchas espermátides redondas con características morfológicas claras. **E.** Los hombres con dos genes Y tienen sustancialmente un menor número de células germinales en la suspensión de células testiculares con ausencia de espermatozoides y muy pocas espermátides redondas (punta de flecha). Estas espermátides son funcionales en ROSI. **F.** Cría ROSI obtenida después de la transferencia de embriones generados con espermátidas de un macho con sólo dos genes y **G.** Una hembra adulta desarrollado a partir de la cría mostrada con su propia camada. Números romanos y arábigos en (A) son etapas del túbulo y estadios de desarrollo de las espermátides (St), respectivamente (ver fig. S3). escala, 16 µm (A y B), 50 µm (C), y 10 µm (D y E); inset × 3, meses de edad.

Figura S1. Representación esquemática de los cromosomas X e Y del ratón, variantes de los cromosomas sexuales, y genotipos del ratón pertinentes a este estudio.



El cromosoma Y del ratón contiene ~ 78 Mb de ADN, de los cuales 0,7 Mb constituye la región pseudoautosómica (PAR) situada en el extremo del brazo largo. El PAR es la región de homología con la X que media el emparejamiento y recombinación entre X e Y en los machos normales.

Figura S2.

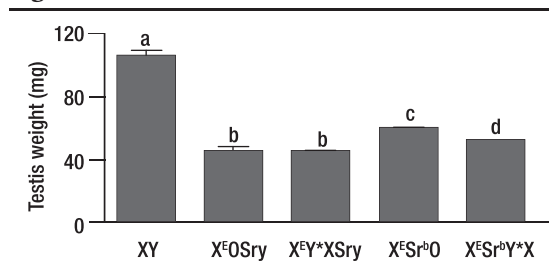


Figura S3.

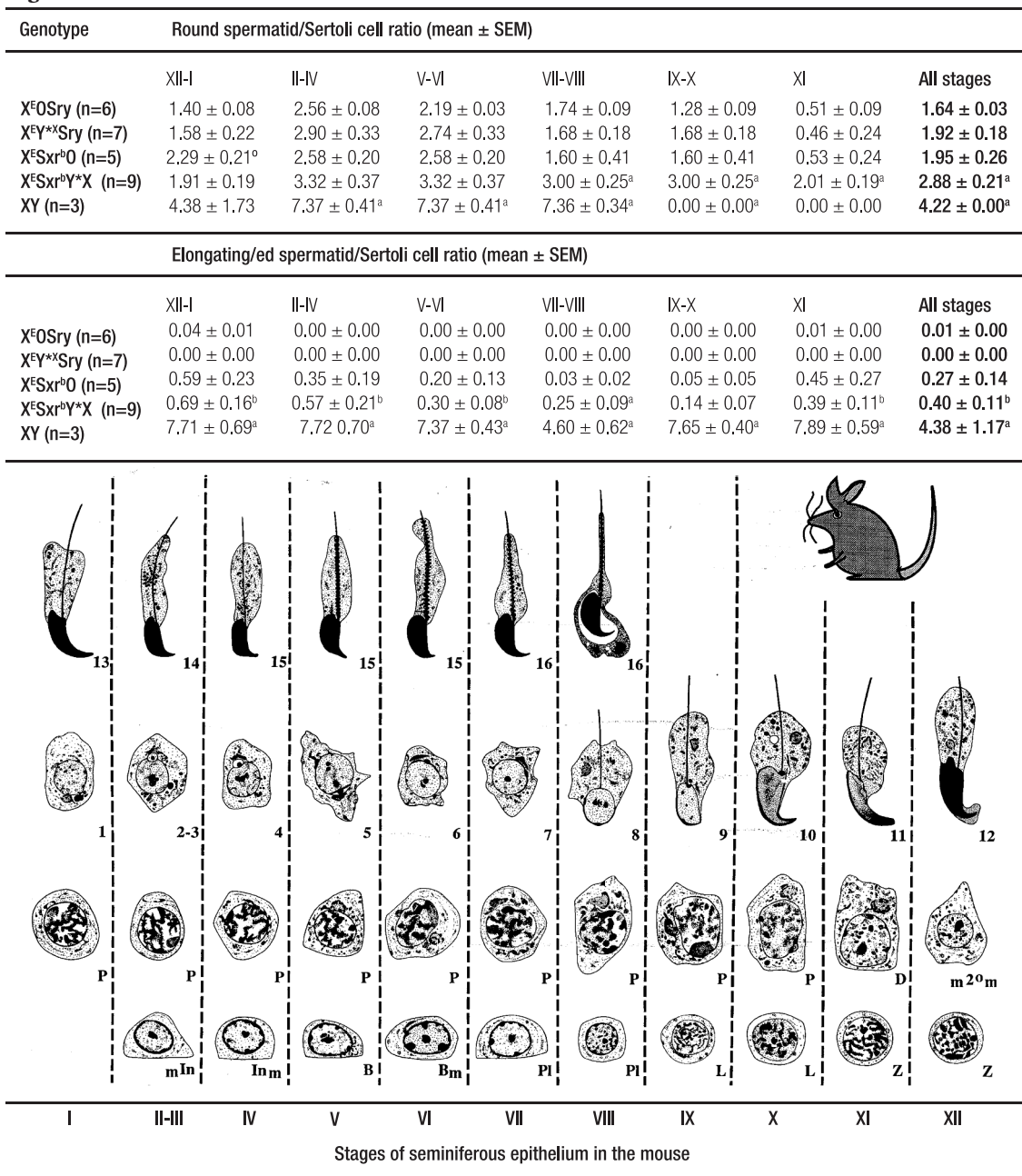


Figura S4.

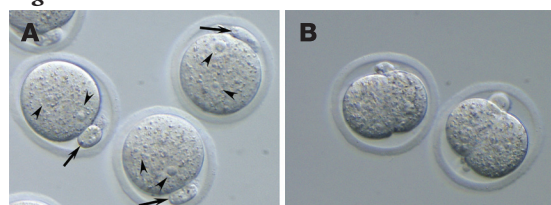
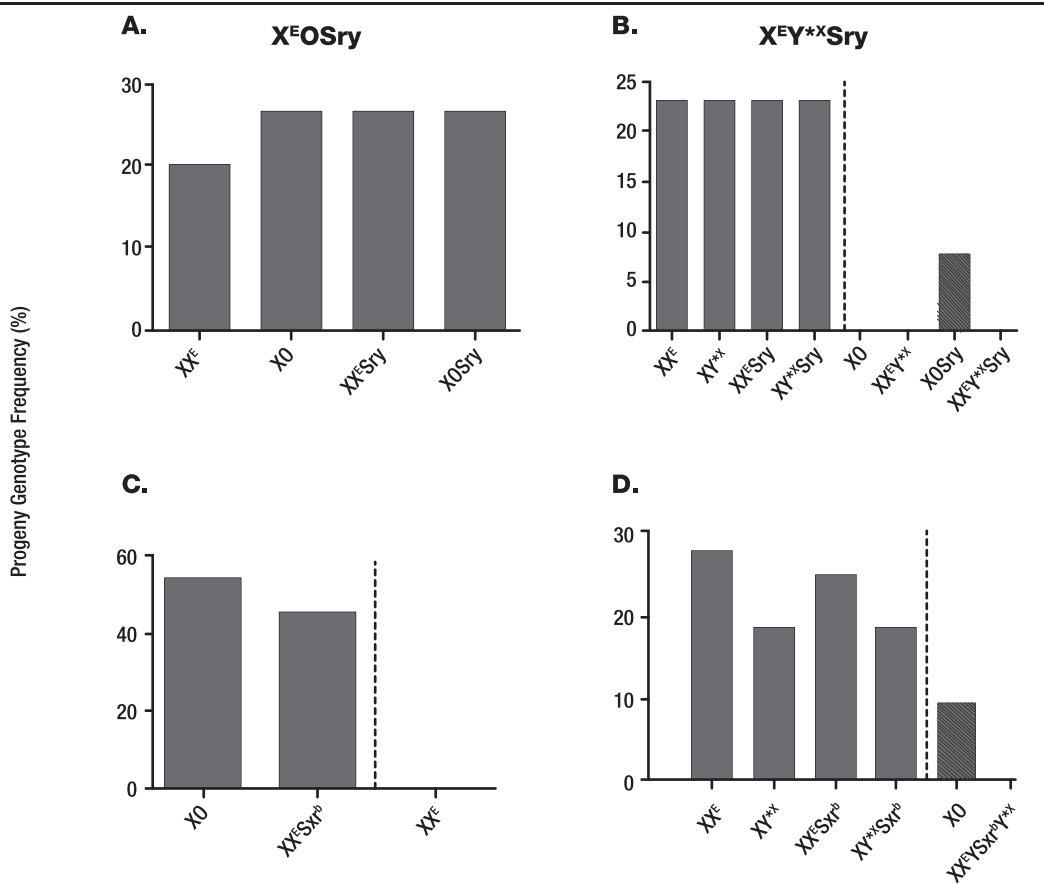


Figura S5.



E. Breeding of female progeny from males with limited Y gene complement.

Father's genotype	Progeny genotype	Breeding duration (months)	Number of litters obtained	Number of pups obtained	Average number of pups / litter
$X^E OSry$	$X^E O$	16	11	63	6
$X^E Y^* X Sry$	$X^E X$	16	14	143	10
$X^E Sxr^b O$	$XY^* X$	6	6	71	12
$X^E Sxr^b O$	$XY^* X$	6	4	43	11
$X^E Sxr^b Y^* X$	$XY^* X$	6	5	35	7
$X^E Sxr^b Y^* X$	$XY^* X$	6	5	36	7

Figura S6.

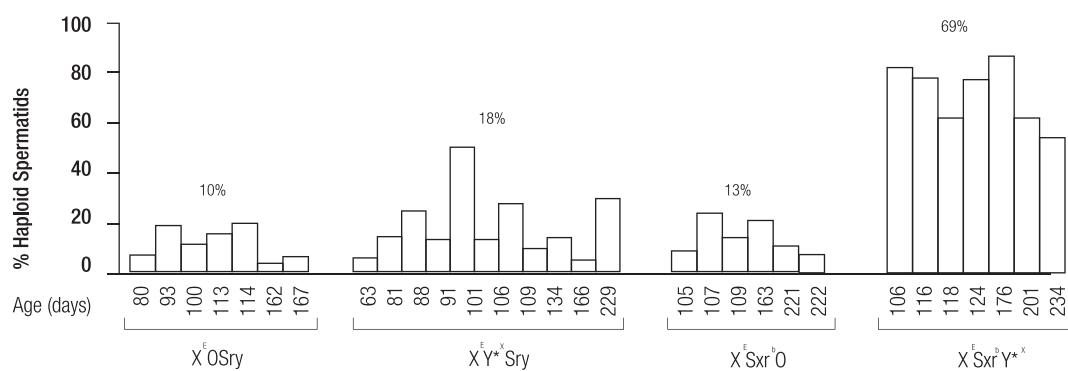
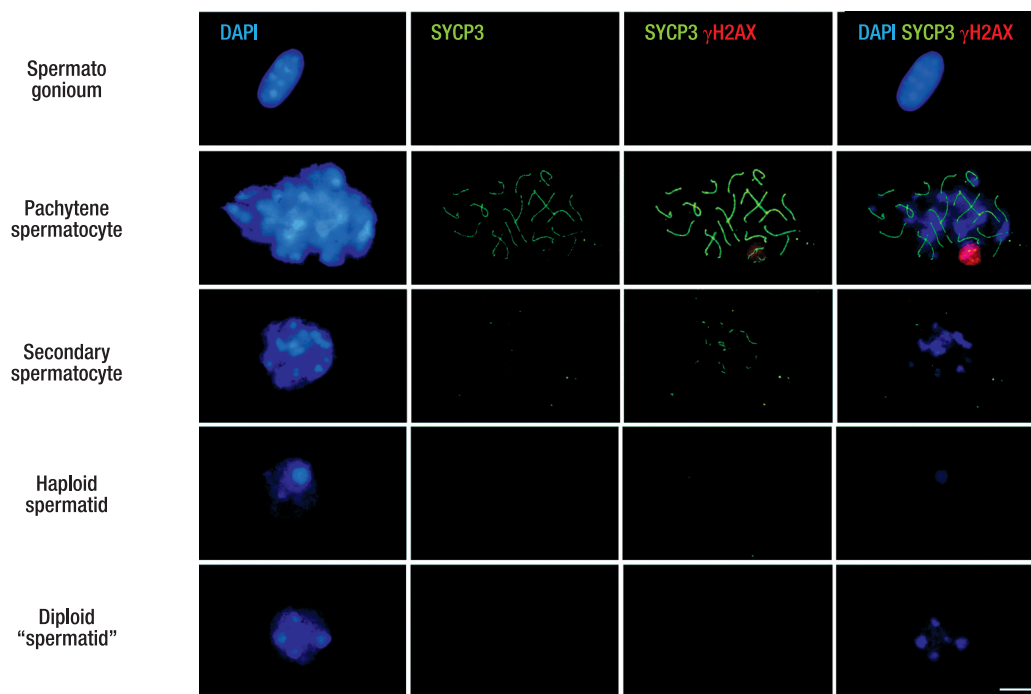


Figura S7.

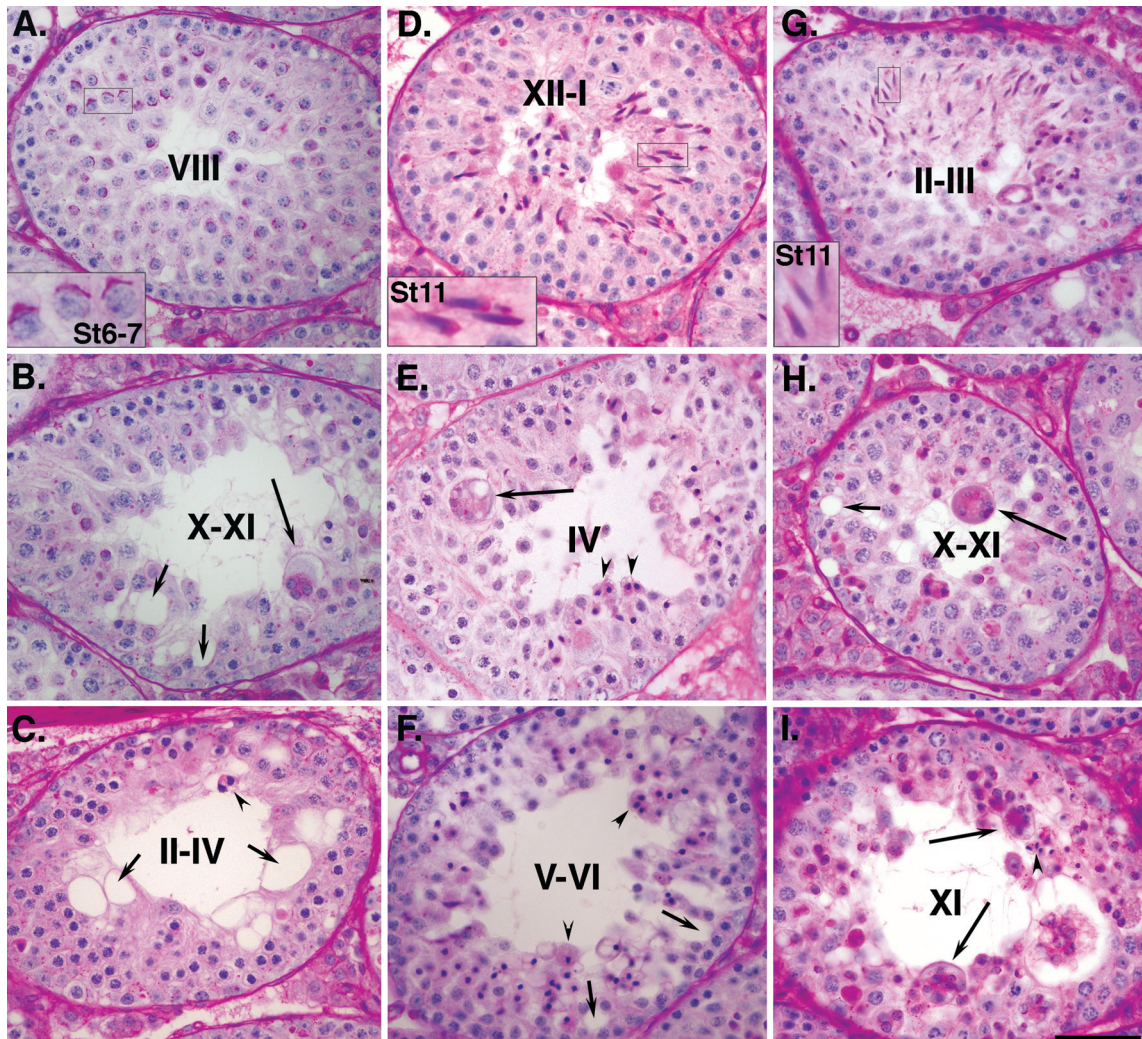
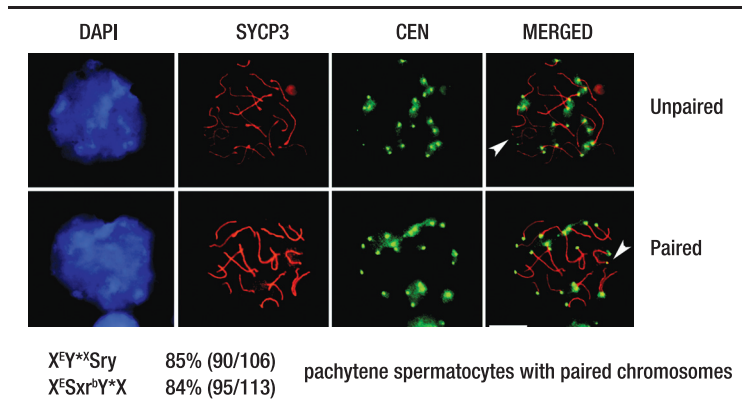


Figura S8.



Comentarios del Dr Aníbal A Acosta

Profesor Emérito de Obstetricia y Ginecología. Eastern Virginia Medical School. Norfolk. Virginia. EE.UU.

Miembro Correspondiente Nacional de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, Argentina.

Desde el comienzo de la aplicación de la reproducción asistida en humanos surgió la evidencia de la deficiencia de los criterios existentes en el laboratorio y en la clínica que se aplicaban para pronosticar la eficacia del espermatozoide humano para iniciar, estimular y completar exitosa y eficientemente el proceso de fertilización. Las normas de la Organización Mundial de la Salud de aquella época, que todos aplicábamos en clínica, se mostraban inadecuadas para una predicción diagnóstica y de eficiencia confiables. La morfología espermática con criterios estrictos pareció ser un resorte más eficiente pero resultó evidente que la Biología y la Genética Moleculares, con posibilidades de descifrar procesos celulares y moleculares iniciales, evolutivos y finales, abrían un panorama mucho más amplio, preciso y contundente en el estudio y la interpretación de la gametogénesis y embriogénesis iniciales. En relativamente poco tiempo se ha creado un panel de conocimientos biológico-moleculares que ha revolucionado y conmovido la aplicación diagnóstica y aún pronóstica y terapéutica en reproducción y que en el humano ha permitido incrementar la capacidad y eficacia diagnósticas hasta el nivel de los estudios post-genómicos. Tres trabajos han conmovido mi ignorancia: uno de J Wang y col sobre el “Análisis de la totalidad de la actividad recombinante del genoma en células individuales y la tasa de mutaciones de novo en el esperma humano”. El segundo de E Sendler y col sobre “Estabilidad, distribución y funciones del RNA del esperma humano en la fertilización”; y el tercero, y quizá el más sorprendente que hemos intentado atrevidamente traducir en esta contribución, y que nos envía, al menos en los roedores, un mensaje para mí inusitado: “Una progenie puede obtenerse en ellos con la contribución del cromosoma Y limitada a so-

lamente 2 (dos) genes: el factor determinante del testículo (Sry) y el factor de proliferación espermatogonial Eif2s3y (gen que restituye una proliferación espermatogonial normal) completando la profase meiótica y la primera división meiótica y que parece ser el único gen del cromosoma Y requerido para obtener células germinales haploides y funcionales en reproducción asistida”. Aunque estos hallazgos no sean directamente transferibles al ser humano como los autores lo dicen, constituyen una base de lanzamiento entre la investigación de alto nivel y la clínica científica que todos queremos que se desarrolle y que beneficie al médico y al paciente en la precisión diagnóstica y terapéutica. La posibilidad de obtener células germinales primordiales (Primordial Germ Cells) a partir de células pluripotentes inducidas (Induced Pluripotent Cells, IPCs) derivadas de células de piel (K Hayashi y col) abre un campo de posibilidades para mí extraordinario. Estas células inyectadas en el testículo desarrollan espermatozoides o inyectadas en la “bursa ovárica” de ratas fetales o adultas desarrollan “oocitos”. Eventualmente estas “células madre” después de FIV desarrollan embriones que originan ratones vivos y sanos.

El desmenuzamiento minucioso de estos conocimientos y el estudio de factibilidad para su aplicación en el humano han de abrir seguramente vías de progreso de incalculable valor en el desarrollo de las técnicas de avanzada en reproducción asistida.

Correspondencia: Anibal Acosta
E-mail: anibalaa@aol.com