

Determinación del sexo por amplificación del ADN en embriones bovinos pre-transferencia

Postiglioni, A.*; Larocca, C**.; Carbo, A.**; Fernández, A.**; Llambí, S.*; Kelly, L.*; Rodrigues, J.L.***

RESUMEN

La determinación del sexo de embriones bovinos pre-transferencia a receptoras, por el método de amplificación "IN VITRO" de secuencias específicas de ADN se acredita hoy como la técnica que permite alterar la proporción sexual 1:1 en sistemas de producción pecuaria. En nuestro país hemos realizado una primera comunicación en la determinación del sexo de embriones bovinos por el método de PCR optimizando la técnica para biopsias embrionarias. Con el objetivo de controlar la viabilidad de los embriones biopsiados y la confiabilidad del método, en este trabajo se presentan 3 experiencias realizadas en diferentes Centros de Transferencia de Embriones de nuestro país.

Se biopsiaron en total 16 embriones bovinos obteniéndose (6♂/10♀), todos ellos transferidos a receptoras sincronizadas. Se discuten los porcentajes de gestación de los embriones biopsiados (25%) frente a aquellos embriones enteros gestantes (46%). La confiabilidad del método se acentuó al nacer 2 terneras normales con sexo predeterminado por la metodología del PCR, siendo estos los primeros obtenidos en el país por éste método.

INTRODUCCION

La alteración de la proporción sexual 1:1 en bovinos, ha creado expectativas económicas que han revolucionado diversas tecnologías de avanzada en producción animal. Este desequilibrio podrá ser incorporado a sistemas de producción

una vez que las técnicas sean optimizadas en su totalidad. (10). La separación de fracciones de espermias viables con cromosomas X e Y, y el diagnóstico de sexo de embriones previo a su transferencia en vacas receptoras (métodos invasivos y no invasivos) son algunos de los desafíos que se han

planteado en técnicas biotecnológicas de la reproducción animal con el fin de alterar la proporción sexual en animales de interés pecuario. (3,10).

Técnicas inmunológicas (2), citogenéticas (13) y moleculares (5,9,11,12,14,20) se trataron de maximizar al tener en cuenta los

SUMMARY

Sex determination of bovine embryos prior to transfer, by DNA amplification of specific sequences of Y chromosome is widespread as a technique that alter the sex-proportion 1:1 in animal farms.

In our country we presented a first communication about sexing of bovine embryos with the PCR method. With the purpose to control the viability of sex-embryos and the accuracy of the method, we have presented in this paper 3 experiences of sex determination. Embryonic cells, were taken out from pre transfer bovine embryos belonged to different Centre of Embryos Transfer.

16 embryos were biopsied (6♂/10♀) and all of them were transferred in synchronised receptors. Percentages of gestation of biopsied embryos (25%) compared to complete embryos transferred (46%) are discussed.

The accuracy of the method was confirmed with the birthing of 2 normal female-calves.

* Area Genética. Instituto de Biociencias Veterinarias. Departamento de Biología Celular y Molecular. Facultad de Veterinaria. (Uruguay) A. Lasplacas 1550. C.P. 11600.

** Departamento de Reproducción Animal. Instituto de Producción Animal. Facultad de Veterinaria. (Uruguay)

*** Laboratorio de Embriología Experimental y Aplicada. (UFRGS). Brasil.

siguientes parámetros: tiempo, costo, confiabilidad de los resultados, siendo las técnicas de amplificación "in vitro" del ADN, conocida como PCR (polymerase chain reaction) las que hoy mundialmente se utilizan para el sexado de embriones. En la industria de la Genética y la Transferencia de Embriones, el tiempo es un parámetro muy valorado, ya que es posible la interrupción de las gestaciones de sexo no deseado en dependencia con la rapidez con que se entregue el resultado. Por otro lado la determinación del sexo de embriones pre-transferencia, valoriza la gestación tanto para el mercado como para la planificación productiva y genética del establecimiento.

Actualmente existen diversos oligonucleótidos específicos del cromosoma Y, que pueden ser utilizados en el diagnóstico de sexo (1,5,11,20).

En nuestro país, las primeras experiencias en determinación del sexo de embriones bovinos pre-transferencia por el método del PCR se realizó en el Centro de Transferencia de Embriones San Alberto, optimizada esta experiencia en un tiempo de 7 hs. (15,16). Se trabajó con muestras de ADN entre 5 y 50pg/L. amplificándose el segmento nucleotídico marcado por el par de primers BRY.1, de 307pb. (5,19,20,21).

Con el propósito de: a) realizar los primeros controles de viabilidad de los embriones biopsiados y, b) acentuar la confiabilidad del método, se planteó realizar 3 experiencias en determinación del sexo de embriones bovinos, pre-transferencia en vacas receptoras sincronizadas. Estas experiencias se realizaron entre el Equipo de

Genética y Reproducción Animal de la Facultad de Veterinaria y dos Centros de Transferencia de Embriones de nuestro país. Como muestras control para cada una de las experiencias se tomó la gestación de transferencias de embriones enteros. La viabilidad del embrión implantado y el diagnóstico de sexo realizado por PCR, son controlados respectivamente por ultrasonografía lineal del feto y por la obtención del producto final en las pariciones.

MATERIALES Y METODOS

Se realizan 3 experiencias de sexado de embriones bovinos- por obtención de biopsias- previo a su transferencia en receptoras. El diseño experimental para este trabajo consta de 2 etapas: a) preparación del material a procesar por la metodología del PCR; b) amplificación "in vitro" de secuencias específicas del cromosoma Y.

La primera etapa, que se cumple en el Centro de Transferencia de Embriones, tiene por finalidad la obtención de embriones en estadios de mórula compacta y blastocisto temprano. En cada una de las 3 experiencias se mantuvieron 2 muestras: una control (transferencia de embriones enteros), otra a sexar (transferencia de embriones biopsiados).

Preparación de la Donante

Se realiza de la siguiente manera: a) superovulación con 44 mg. como dosis total de FSH-p *, durante 4 días. Se inyecta 2 dosis decrecientes con intervalos de 12 hs. habiendo comenzado con una dosis inicial de 14 mg. ; b) inducción del celo con PGF2 α ** a las 48 hs. de iniciado el

tratamiento de FSH-p; c) inseminación artificial a las 48 hs. de la PGF2 α . Se realizan dos servicios aplicándose 2 dosis, una cada 12 hs. Los embriones se recuperan al día 6-7 del celo de la donante. Se obtienen biopsias entre 4 y 20 células de mórulas compactas y blastocistos. La biopsia de blastocisto se obtiene por un corte que abarca células de trofoblasto y macizo interno. Se utiliza un equipo Narishige de micromanipulación con cuchilla metálica de 35°, incorporado a un microscopio invertido Nikon. El embrión, se mantiene en PBS*** mientras se realiza la biopsia. Luego de extraída la muestra celular con micropipeta de 1 μ L., se agrega 10% de suero fetal. Inmediatamente, cada embrión es aspirado con una pajuela (0.25mL.IMV), a los efectos de su transferencia. La calidad del embrión se establece de la siguiente manera: muy buena (3) para el embrión casi entero (biopsia entre 4 y 8 células); buena (2), para biopsias entre 8 y 15 células; regular (1), para biopsias entre 15 y 20 células.

Se realiza la transferencia de cada embrión biopsiado, en receptoras previamente sincronizadas con la edad del embrión respecto al celo de la donante. Se controla la gestación a los 25 y 44 días por ultrasonografía lineal, con un ecógrafo con scanner modo B de tiempo completo unido de un conductor lineal de 5 MHz****, confirmándose, a los 90 días por palpación rectal.

Preparación del ADN de la muestra control.

Las muestras controles para la amplificación del ADN de los embriones se realiza por dos métodos:

* (Antrin, Japón)

** Gladinex

*** Dulbecco's solución buffer-fosfatada

**** Aloka, Echocamera SSD 210 DX II, Tokio, Japón

a) método rápido de sexado a partir de linfocitos de sangre periférica (19) ajustando concentraciones y lavados celulares y, b) método de aislamiento de ADN a partir de sangre entera.

Método rápido de aislamiento ADN a partir de linfocitos

Se aíslan linfocitos por centrifugación en gradiente de densidad de Ficoll Isopaque (1000 rpm, 10 min.), diluyéndolos en PBS (pH. 7.4) a una concentración de 5000 células/mL. (2.5mL.sangre + 2.5mL.PBS+2.5mL.Ficoll). Se lavan sucesivas veces en PBS (10mL.) realizándose un último lavado con 1xPCR buffer (pH 8.4) (50 mM KCl, 10 mM Tris/HCl pH 8.4, 1.5 mM MgCl₂, 0.01% gelatina). Las células se diluyeron en 15µl. 1xPCR buffer.(7).

Aislamiento de ADN a partir de Sangre entera

Se diluye 50 µl. de sangre entera en 500 µl T.E. (10 mM Tris Cl; 1mM EDTA, pH 8.0), luego de centrifugar a 13.000 G/10seg. Se resuspende el sedimento en 0,5 mL de T.E. con vortex. Se repite 2 veces y se resuspende el sedimento final en 100 µL de buffer K (0.5% Tween 20, 100 g/mL de proteinasa K). (7). La digestión se realiza incubando a 56°C, 45 min. e inactivando las proteasas a 95°C, 10 min. Se utiliza 2 µL. de ADN para amplificar, como muestra control positivo.

Método de PCR

Las biopsias obtenidas se procesan de acuerdo al protocolo de Schröder y col., (19) utilizando tubos de 0.5mL. dependiendo éste del modelo del ciclador térmico. La amplificación del fragmento de ADN (307pb) flanqueado por el par de primers específico del cromosoma Y, BRY.1 (4) se realizó con el

Kit de Gene AmpliTaq*.

Las biopsias entre 4 y 20 células se introducen a tubos de microcentrífuga conteniendo 10µL de 1.5 x buffer-PCR, cubriéndose luego, con aceite mineral (50µL) para evitar la evaporación.

Se realiza el aislamiento del ADN de la biopsia, sometiendo ésta a la acción de 5L de proteinasa K (400µg/mL.). Luego de incubar, a 37°C durante 1 hr. se procede a la inactivación de la proteinasa a 94°C (15 min.).

Posteriormente, se desnatura el ADN de la muestra a 95°C (2 min.) llevándose, inmediatamente a -20°C. Se incorpora, a cada muestra, 10µL. de la solución mezcla, (50mM KCl, 10mM Tris/HCl pH 8.4, 1.5mM MgCl₂, 0.01% gelatina, 5pmols de cada primer, 200mM de cada dNTP y 0.6U Ampli Taq DNA polimerasa) obteniéndose un volumen total de 25 µL.

Las muestras se someten a un ciclador térmico**, a efectos de comenzar la amplificación. La desnaturalización, hibridación y extensión se obtuvo al programar la máquina con 40 ciclos de: 94°C (60 seg); 56°C (30 seg); 72°C (60 seg.), precedido de una desnaturalización de 94°C (3 min.) y finalizando con una extensión de 72°C (5 min).

Se mantuvieron las muestras a 4°C hasta su análisis en corridas electroforéticas (90V, 45mA) en gel de agarosa (1.4%), teñido con bromuro de etidio (0.5µg/mL.). Las bandas, producto de la hibridación del par de primers, se observan con luz ultravioleta (transiluminador). Como control de la corrida electroforética de las muestras embrionarias y muestras controles de sexo, se utiliza el marcador de

peso molecular, DNA 123pb* por presentar una amplia escalera de peso molecular dando mayor seguridad a la interpretación del resultado.

RESULTADOS

Se procesan 16 embriones para diagnóstico de sexo pre-transferencia. (Cuadro 1 y 2). La calidad del embrión y evaluación se realiza según escala descripta.

Experimento 1. Se realizan biopsias a 4 embriones, pre-transferencia. La biopsia incluye de 7 a 15 células ($\bar{X}=10,3$) determinándose el sexo de los embriones por PCR (1M y 3H). Se diagnostica una gestación (25%) correspondiente a un embrión hembra, (Cuadro 1). En esta experiencia se transfieren 5 embriones enteros, a efectos de controlar la viabilidad de los embriones biopsiados. Se obtienen 3 preñeces (60%). (Cuadro 2).

Experimento 2. Se procesan para el sexado, 9 mórulas compactas de calidad 2 y 3, obteniéndose biopsias entre 4 y 15 células ($\bar{X}=9,33$).

De los 9 embriones, 4 fueron diagnosticados como machos, al dar positiva la banda de hibridación del primer BRY.1. Se obtiene una sola gestación de los embriones biopsiados (11.1%) (Cuadro 1). Se transfieren 24 embriones enteros obteniéndose un 41% de gestación. (Cuadro 2).

Experimento 3. Se realizan 3 biopsias entre 10 y 20 células. ($\bar{X}=10,5$). El sexo diagnosticado al aplicar el método de PCR fue de un macho. En la figura 1 se observan los resultados de esta experiencia.

El pocillo 2 muestra la hibridación del par de "primers" BRY.1,

* Perkin-Elmer/Cetus

** Biometra

*** Ladder

Cuadro N° 1				
SEXAJE DE EMBRIONES POR PCR				
N° Exper.	Embrión biops.	N° cél. biops.	Sexo M H	Gestación 44 días
1	4	x=10.3	1 3	1(25%)
2	9	x=9.33	4 5	1(11.1%)
3	3	x=10.5	1 2	1(33%)

Cuadro 2						
VIABILIDAD DE EMBRIONES BIOPSIADOS RESPECTO A LOS ENTEROS						
Exp. N°	Embr. biops.	Calidad E. Impl.	E. Impl. N°	Ges- ción 44d.	E. Impl. Enteros	Gestación E. enteros
1	4	2-3	4	1(25%)	5	3(60%)
2	9	2-3	9	1(11.1%)	24	10(41%)
3	3	1-2	3	1(33%)	4	2(50%)

DISCUSION

Existen alrededor de 10 secuencias (11) específicas del cromosoma Y que se han clonado, además de la secuencia correspondiente al gene ZFX/ZFY (1,14). Este gene se encuentra ubicado en el brazo corto del cromosoma Y de todos los mamíferos placentarios, en homología con el cromosoma X. El uso de este par de primer para el sexado de embriones tiene la ventaja de determinar ambos sexos (♂ y ♀) pero, para que esto ocurra se deben realizar cortes con enzimas de restricción y construir un "nested primer" (14). El oligonucleótido utilizado en nuestros trabajos de determinación del sexo (15,16,17) tiene la particularidad de no ser un gene o fragmento de éste, propio del macho bovino (6), sino una secuencia nucleotídica repetida específica del cromosoma Y conservada en la evolución (9) que flan-

utilizado como control de las muestras de células embrionarias (muestras 4,5,6). Se detecta una banda a la altura de 307pb en la muestra 4, controlada por las bandas de 369 y 246 del marcador "123bp DNA ladder" (Muestras 1 y 7).

La muestra embrionaria 4, de macho, corresponde a 10 células. De los embriones biopsiados transferidos se detecta 1 gestación (33%).(Cuadro 1).

A su vez, se transfieren 4 embriones enteros, como control de gestación diagnosticándose un 50 % de gestaciones.

De las experiencias 2 y 3 nacieron 2 terneras hembras; las primeras en Uruguay y en la región, confirmándose la validez del diagnóstico pre-transferencia obtenido por el método de PCR.



Fig. 1: Resultado del sexado de embriones por PCR. Pocillo 1. Marcador DNA (123pb, Ladder). Pocillo 2 y 3 ADN de sexo conocido (♂ y ♀). Pocillo 4, 5, 6., ADN de embriones diagnosticados como (♂, ♀, ♀), Pocillo 7. Marcador DNA (123pb, Ladder).

quea un fragmento de 307pb y que hibridiza en bovinos especialmente en la zona cercana al centrómero del cromosoma Y (19). Este primer entonces puede ser utilizado para la determinación del sexo de otras especies emparentadas con el bovino (9). La amplificación del ADN de células embrionarias bovinas, con la incorporación de este primer a la solución de amplificación nos ha resultado confiable para la determinación del sexo macho, pretransferencia en receptoras. Los resultados obtenidos de la amplificación "in vitro", controlados por ultrasonografía lineal y nacimiento de terneros apoyan nuestros resultados primarios. Sin embargo, la confiabilidad del método la podremos presentar a nuestro medio al optimizar, para biopsias embrionarias, las ampliificaciones realizadas con primers autosómicos conjuntamente con aquel específico de sexo macho. Estas experiencias se han optimizado en sangre entera para diagnosticar Freemartins (8).

Con respecto al tiempo que insume el sexado, parámetro este importante ya que el productor necesita el diagnóstico lo antes posible para continuar o no con la transferencia, éste se regula con los ciclos de amplificación (desnaturalización, hibridización y extensión), habiéndose reducido a 2hs. 30 min (16) con una confiabilidad del 100% para el sexo macho.

Con respecto a los porcentajes de gestación de embriones biopsiados frente a los enteros (Cuadro 2) el porcentaje mayor se dió en la Experiencia 3, a pesar de responder también al mayor promedio de células biopsiadas.

La experiencia 3, es además donde se ha obtenido uno de los nacimientos de una ternera normal con sexo predeterminado por esta

metodología.

Sin embargo, es conocido que para casos de gestación de demembriones (splitting), sexados por métodos invasivos, el número de células de las biopsias incidiría sobre el porcentaje de gestación así como se ha reportado en experiencias de sexado por métodos invasivos (5,12).

Por lo expuesto consideramos que, con el número de embriones que hemos trabajado, en estas 3 experiencias no es posible sacar aún conclusiones de cómo afecta el número de células de la biopsia el porcentaje de gestación. De cualquier manera pensamos que, hemos logrado superar el primer escalón y, siendo una metodología que mundialmente se está utilizando, nos comprometemos a:

a) mejorar la calidad de las biopsias; b) mejorar la confiabilidad del diagnóstico de la hembra; c) mejorar el porcentaje de gestación.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. **Aasen, E., Medrano J.F** (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Biotechnology* 8, 1279-1281.
2. **Anderson, G.B.** (1987) Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 21, 18-28.
3. **Cran, D.G., Johnson L.A. Miller N.G.A. Cochrane, D. Polge, C.** (1993) Production of bovine calves following separation of X- and Y-chromosome bearing sperm and in vitro fertilisation. *Veterinary Record*, 132:40-41.
4. **Eggen A., Fries R.** (1994)

A integrated cytogenetic and meiotic map of the bovine genome INRA CRJ, France.

5. **Herr, C.M. et al.** (1990) Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome detection assay. *Theriogenology*, 33:(1)247.
6. **Hirigoyen D. et al.** (1994) Generación de marcadores macho específicos para la determinación del sexo bovino por PCR *Veterinaria* 29:122.
7. **Innis, M. et al.** (1990) PCR Protocols A guide to Methods and Applications (AP) pp 482.
8. **LLambi, S. et al.** (1994). Estudio comparativo de técnicas genéticas para el diagnóstico de Freemartins. II Jorn. Téc. F. Veterinaria. 23.
9. **Matthews, M.E. Reed, K.C.** (1991) A DNA sequence that is present in both sexes of Artiodactyla is repeated on the Y chromosome of cattle, sheep, and goats. *Cytogenet Cell Genet*, 56:40-44.
10. **McEvoy, J.D.** (1992) Alteration of the sex ratio. *Animal Breeding Abstracts*, 60:97-110.
11. **Miller J.R.** (1991) Isolation of Y chromosome specific sequences and their use in embryo sexing. *Reprod. Domest. Anim.* 26:58-65.
12. **Peura, T. et al.** (1991) A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35:(3)547-555.
13. **Picard, L. King, W.A. Betteridge, K.J.** (1985) Production of sexed calves from frozen-thawed embryos. *Veterinary Record*, 117:603-608.
14. **Pollevick, et al.** (1992). Sex determination of bovine

- embryos by restriction fragment polymorphisms of PCR amplified ZFX/ZFY loci. *Bio/Technology* 10-7,805-807.
15. **Postiglioni, A. Setiabudi, R. Gustavsson, I.** (1991) Determinação do sexo de embriões bovinos pelo método de reação de cadeias de polimerase. In: Congreso Brasileiro de Reprodução Animal, 9:59.
 16. **Postiglioni, A. et al.** (1991) Sex determination of preimplanted bovine embryos using the PCR System (Preliminar Communication). *Rev. Bras. Reprod. Anim.*, 15(3-4):199-205.
 17. **Postiglioni A. et al.** (1991) Obtención en Uruguay de una preñez con embriones bovinos de sexo conocido. Método de PCR. II *Jorn. Téc. Fac. Vet.*, pp 65.
 18. **Postiglioni, A. et al.** (1992) Determinación del sexo en embriones bovinos pre-implantados en receptoras. Método de PCR. *Revista Brasileira de Genética*, 15(1) p.82.
 19. **Schroder, A., Miller, J. R., Thomsen, P. D., Roschlau, K., Avery, B., Poulsen, P. H., Schmidt, M., Schwerin, M.** (1990). Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnol.* 1:121-131.
 20. **Schwerin, M. Gallagher, D. S., Jr. Miller, J. R. Thomsen, P. D.** (1992) Mapping of repetitive bovine DNA sequences on cattle Y chromosomes. *Cytogenet Cell Genet*, 61:189-194.
 21. **Setiabudi, R. Gustavsson, I.** (1991) Establishment of Embryo Sexing Techniques in Sweden. *Reprod. Dom. Anim.*, 26,78-81.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a los Drs. Bottaro, Cuenca, (Centro de Transferencia de Embriones de Cerro Largo), y al Dr. Alberto Gonzalez, (Centro de Transferencia de Embriones de San Alberto (Florida)), al Dr. I. Gustavsson (Department of Animal Breeding and Genetics of the University of Agriculture Science (Uppsala, Suecia) y al Br. Andrés Tarallo (Area Genética, F. de Veterinaria).

Este trabajo se financió por proyecto de la (C.S.I.C) Universidad de la República, J.I.C.A. (Japón) y PEDECIBA (U. de la República).

Aprobado para su publicación: mayo/1995.

SAGUAYPICIDA, LOMBRICIDA, OESTRICIDA

Revanmix

**Oral e
inyectable**

CLOSANTEL + LEVAMISOL

LABORATORIO
Revan

GUAYAQUI 3095 MONTEVIDEO