

Generación de marcadores macho específicos para la determinación de sexo bovino por PCR

Hirigoyen, D.*; Bruzzoni Giovanelli, H.*; Azambuja, C.**; Stoll, M.* (**)

RESUMEN

La determinación prenatal del sexo en las especies de interés pecuario, es una metodología de gran interés desde el punto de vista productivo. En este trabajo se utilizó el ADN de seis bovinos, raza Holando, para detectar marcadores macho específicos (sexado), con la técnica de amplificación de ADN in-vitro (PCR). De esta forma fue posible detectar secuencias específicas de sexo masculino, utilizando cantidades de muestras tan pequeñas como 5 pg de ADN. El método diagnóstico aplicado resultó ser específico, sensible, rápido y económico.

Palabras clave: Bovinos, determinación del sexo, amplificación de ADN, PCR.

SUMMARY

The prenatal sex determination in farm animals species of interest, is an strategic goal from a productive point of view. In this work the DNA amplification in vitro technique (PCR) was used to detect male specific markers (sex marker), using the DNA of six Holstein breed bovines.

It was possible the detections of male markers DNA amplification using as little as 5 pg of DNA samples. The diagnostic method applied to bovine resulted specific, sensitive, rapid and economic.

Key Words: Cattle, DNA amplification, polymerase chain reaction, sex determination.

INTRODUCCION

La determinación prenatal del sexo en los animales domésticos genera un importante impacto productivo. El valor económico de los animales de producción varía según sea su sexo (17). En la explotación vacuna, en determinadas circunstancias, es importante lograr una mayor descendencia de un determinado sexo. Por ejemplo, mayor número de hembras en la producción lechera y de machos en la producción de carne.

En la órbita de la industria frigorífica la aplicación de marcadores de sexo postnatal en bovinos (a partir de sangre o

músculo) cobra importancia, pues las canales de animales machos reciben mayor cotización en los mercados australianos.

Para investigar el sexo, existen en bovinos métodos inmunológicos (19), citogenéticos (13) y sondas de ADN (ácido desoxirribonucleico) (15) (8), que exhiben distintos grados de sensibilidad y repetibilidad.

Los mismos se basan en detectar la presencia del cromosoma Y, un segmento del mismo, o bien un producto de la expresión de sus genes.

Ultimamente la técnica de sexado se ha sumado al trasplante de embriones donde cobra

relevancia su aplicación junto a la fertilización in-vitro y el clonado de embriones (17). Los métodos de sexado antes citados insumen mucho tiempo y presentan una serie de dificultades que pueden comprometer la viabilidad de los embriones preimplantados (17).

La técnica de amplificación de ADN in-vitro (PCR) (10) (18) permite realizar un rápido, simple y fiable diagnóstico de sexo en diferentes especies, amplificando secuencias macho específicas (2) (11) (12). Esta técnica permite copiar en forma exponencial segmentos predeterminados del ADN, a través de sucesivos ciclos térmicos.

En este trabajo se reporta la

* División Citogenética. Instituto de Investigaciones Biológicas "Clemente Estable" (IIBCE).
Avda. Italia 3318, Montevideo

** Unidad de Biotecnología. Estación Experimental "Las Brujas" INIA, Canelones.

puesta a punto de la técnica de PCR a partir de sangre (postnatal), para la identificación de secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y, propias del sexo masculino de Bovino (*Bos taurus*). Se describen los parámetros ensayados y las concentraciones decrecientes de ADN utilizadas con el propósito de estimar el grado de sensibilidad de la técnica. Se discuten elementos metodológicos y las variables a tener en cuenta en su aplicación.

MATERIALES Y METODOS

Obtención de muestras

Se trabajó con 6 bovinos adultos raza Holando, 3 de ellos hembras recién paridas y 3 machos que se utilizaban como dadores de semen.

A todos ellos se les extrajo 20 mililitros (ml) de sangre entera por punción de vena yugular, con

jeringa desechable con 1,5 mg de EDTA-Na/ml de sangre.

Las muestras colectadas fueron transportadas al laboratorio en conservadora isotérmica y mantenidas a 4°C hasta su procesamiento.

Extracción de ADN

Cada sangre extraída fue mezclada con 9 volúmenes de Tampón de lisis (Sacarosa 0.32 M, Tris 10 mM, 5mM MgCl₂, Tritón 100x 1%) y los núcleos recuperados centrifugando a 3000 rpm/10 min. Los precipitados fueron resuspendidos con 4,5 ml de tampón con 75 mM NaCl, 24 mM EDTA pH 8.0, (SE).

Se agregaron 250 microl de 10% Sodium-Duodecilo-Sulfato (SDS) y 100 microgr/ml de Proteinasa K, incubándose a 37°C por 120 min. Se mezclaron suavemente con 5 ml de Fenol saturado con 20 mM Tris pH= 8.0, se centrifugaron a 6000 rpm/10

min. recuperándose la fase acuosa, precipitándose el ADN con el agregado de 1/10 del volumen de acetato de Na (C₂H₃NaO₂) 3 M y 2 volúmenes de etanol absoluto; y se mezclaron suavemente hasta que se visualizó el ADN.

El ADN se recogió con una varilla de vidrio, se enjuagó dos veces en alcohol 70%, se dejó secar al aire, y se resuspendió en 1 ml de tampón con 10 mM Tris, pH= 8.0, 1 mM EDTA (TE).

Se evaluó la concentración del ADN por medidas de absorción a una longitud de onda de A₂₆₀/A₂₈₀ con un espectrofotómetro DMS 200 VARIAN.

Amplificación del ADN in vitro

Se seleccionaron del gen macho específico, dos secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y (2) (14) que fueron fabricados por OPERON

SAGUAYPICIDA, LOMBRICIDA, OESTRICIDA

Revanmix

Oral e
inyectable

CLOSANTEL + LEVAMISOL

LABORATORIO
Revan

GUAYAQUI 3095 MONTEVIDEO



**LE OFRECEMOS
TANTO CONFORT
COMO EL MEJOR,
NOS DISTINGUE UNA
SONRISA**

- * TV color satelital
- * Circuito cerrado de video
- * Video Cassete individual
- * Dos antenas parabólicas
 - * Frigobar
 - * DDI-DDN desde la habitación
- * Teléfono en el baño
- * Secador de pelo
- * Cofre de seguridad en las habitaciones
- * Room Service las 24 horas
 - * Desayuno bufet
 - * Snack Bar
 - * Cafetería
- * Sala de reuniones
- * Busines facilities
 - * Baby sitters
- * Aire acondicionado
- * Calefacción central
- * Estacionamiento propio
 - * Equipos de energía propios

**PARA EMPRESAS
APERTURA DE CUENTA
CORRIENTE INMEDIATA.
POR CONSULTAS
DIRIGIRSE A NUESTRO
DEPARTAMENTO DE
MARKETING**

**PARAGUAY 1286
TEL.: 92 00 46
FAX: 92 37 92
C.P. 11100
MONTEVIDEO
URUGUAY**

Technologies Inc. El par de oligonucleótidos cuyas secuencias figuran en la tabla 1, flanquean un fragmento de 307 pares de bases (pb) del gen. Oligonucleótidos específicos para el gen de Kappa-caseína que flanquean un fragmento de 350 pb (6) (7) (9), fueron utilizados para estimar el tamaño de las bandas de sexado y como controles de amplificación.

ciclador termoregulable marca Biometra con tres bloques autónomos, de 20 pocillos cada uno. El perfil termal incluyó 40 ciclos de desnaturalización, hibridización y extensión que prolongaron la reacción por un lapso de 3 hs. 20 min. (Cuadro 2).

*CORRIDA
ELECTROFORETICA*

Cuadro N°1

Secuencias de ADN específicos del cromosoma Y bovino, y pares de oligonucleótidos para la determinación de sexo

Secuencia	Oligonucleótidos	Longitud del frag. Amplificado
BRY.1 (Matthews 1990)	GGATCCGAGACACAGAACAGGCTGC TATCCTACCTACCTAATCGAACTAGTT	307 PB

ENSAYO

Se trabajó con 100 nanogramos (ng) de ADN correspondientes a cada animal para realizar la amplificación en un volumen final de 100 µl. La reacción se efectuó en tubos de microcentrífuga de polipropileno de 500 µl de volumen total conteniendo cada uno: 10 µl de tampón 10 X de PCR (GeneAmp, Perkin Elmer), 0.1 % Gelatina, 200 M de cada dNTP (dATP), dCTP, dTTP y dGTP), 20 picoMolar (pM) de cada oligonucleótido, 1.5 unidades de Enzima de Amplitaq

ADN Polimerasa (Perkin-Elmer Cetus), y agua estéril hasta completar.

Se efectuaron ensayos para estimar la sensibilidad de la técnica con concentraciones decrecientes de ADN, 50 ng, 5 ng, 50 picogramos (pg) y 5pg.

Las muestras se amplificaron en un

Los fragmentos de ADN se separaron por su tamaño, mediante electroforesis en gel de agarosa al 2.5%.

Se utilizó agarosa ultra pura (Gibco BRL) en tampón Tris-Acetato (TAE) 0.04M pH 8.0, 1 mM EDTA.

La corrida se realizó en cuba horizontal (modelo H3 Gibco BRL), con tampón TAE, a un voltaje de 2.5V/cm de distancia entre los electrodos con una fuente de poder de 230 V, 0.7 Amp y 50/60 Hz marca Polisistem, durante 90 min.

Los productos de amplificación

Cuadro N°2

Perfil termal de la reacción

1. Ciclo de:	94°C/180 seg.
2. 40 ciclos de:	56°C/60 seg. 72°C/60 seg 94°C/60 seg
3. Ciclo de:	72°C/300 seg

se visualizaron por tinción del gel con una solución de Bromuro de Etidio (EtBr) (Sigma Chem. Company) 0.5 mg/ml durante 20 min. y posterior observación bajo luz ultravioleta en un transiluminador con lámpara de 312 nm, (marca Bioblock Scientific).

RESULTADOS

Los productos de amplificación del segmento del gen macho específico obtenidos en las condiciones descritas, tienen pesos moleculares que coinciden con los esperados.

El tamaño de las bandas es de aproximadamente 307 pb (Figura 2).

Se observaron bandas en todas las muestras provenientes de los individuos fenotípicamente masculinos (Figura 1), no obteniéndose amplificación en las muestras correspondientes a las hembras.

El análisis insumió un día desde la obtención de las muestras hasta el diagnóstico correspondiente al sexo de los 6 animales analizados.

Los controles de amplificación, en los que se utilizaron oligonucleótidos para el gen de Kappa-caseína, mostraron la aparición de una banda del tamaño esperado (350 pb) en todos los individuos analizados (6) (7). En los controles negativos (sin ADN) no se observó la presencia de ninguna banda, confirmando la ausencia de amplificación

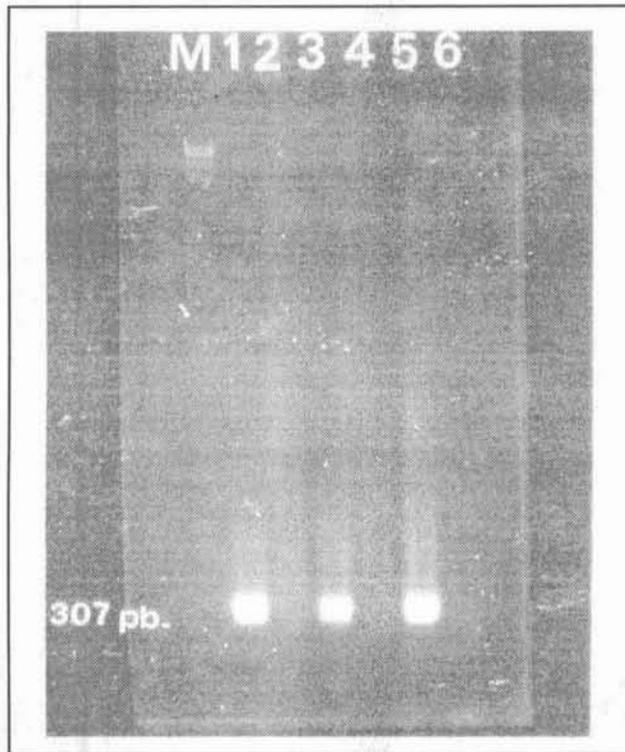


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro.

Pocillo M- Marcador de peso molecular patrón (bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III)

Pocillo 1, 2 y 5- Muestra con 5 ng de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ve banda de 307 pb).

Pocillo 2 y 4- Muestra con 5 ng de ADN de hembra en presencia de oligonucleótidos de sexado (no se ve ninguna banda).

Pocillo 6- Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).

inespecífica (Figuras 1, 2 y 3).

Las mezclas de reacción y el desarrollo del perfil termal insumieron 5 horas de las cuales 210 min. corresponden al proceso de amplificación y 90 min. a la corrida electroforética.

Las bandas se observan por lo fluorescencia del BrEt, no necesitándose marcaje isotópico.

Los ensayos realizados con concentraciones decrecientes del ADN molde, detectaron

amplificaciones hasta un nivel tan bajo como 5 pg. (Figura 2).

DISCUSION

En este trabajo se evidencia la factibilidad y eficacia del uso de una técnica molecular, altamente específica para determinar el sexo masculino de los bovinos en Uruguay.

Cuando pusimos a punto la técnica inicialmente nos inclinamos a efectuar una detección postnatal, por los riesgos de pérdida embrionaria que la manipulación trae aparejados. Posteriormente seguimos ensayando el proceso a nivel de embriones con la finalidad de mejorar el método; cabe destacar que casi por la misma fecha otro grupo de Facultad de Veterinaria del Uruguay, trabajando en coordinación con un equipo de investigadores brasileños, comunica la obtención exitosa de embriones con sexo conocido por PCR (16).

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos coinciden con reportes efectuados por otros investigadores (11) (12), que utilizaron la técnica de PCR, para amplificar específicamente secuencias repetidas del brazo corto del cromosoma Y.

La utilización de un par de oligonucleótidos que reconocen las secuencias específicas de este cromosoma, nos permite lograr amplificaciones solamente en el ADN proveniente de los machos (Figura 1).

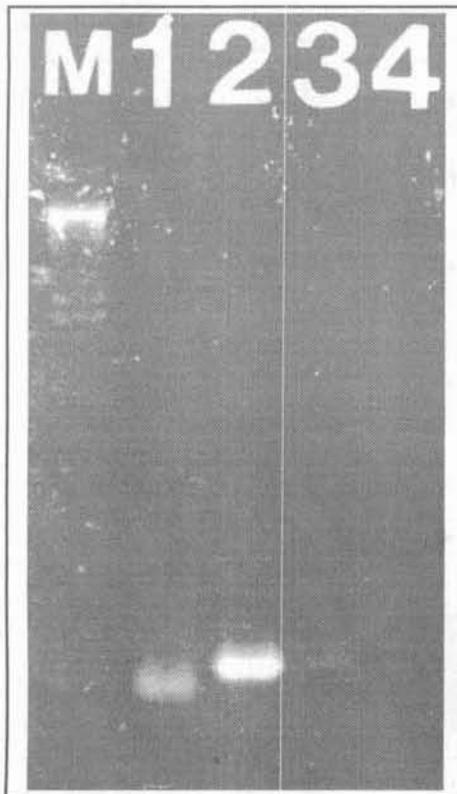


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro.

Pocillo M - Marcador de peso molecular patrón (Bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III).

Pocillo 1 - Muestra con 5 ng de ADN macho en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ve banda de 307 pb).

Pocillo 2 - Muestra con 5 ng de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de Kappa-caseína (se ve banda de 350 pb).

Pocillo 3 - Muestra con 50 pg de ADN de macho en presencia de oligonucleótidos de Kappa-caseína (se ve banda de 350 pb).

Pocillo 4 - Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).

A la luz de los resultados obtenidos, la caracterización de sexo por este procedimiento es rápida, sensible y fiable.

El producto de amplificación se evidenció con un intercalante fluorescente que sustituye los radioisótopos, permitiendo disminuir costos, brindando mayor seguridad y agilidad al operario.

Los ensayos de sensibilidad que realizamos evidenciaron amplificaciones a partir de muestras de ADN tan pequeñas

como 5 pg. Si tenemos en cuenta que una célula de mamífero posee aproximadamente 6 pg de ADN, podríamos suponer que con esta técnica es posible efectuar un diagnóstico con muy pocas células.

La ocurrencia de falsos negativos ha sido reportado por complicaciones metodológicas, pudiendo ser superado con la incorporación de un segundo par de oligonucleótidos que amplifiquen secuencias repetidas autosómicas (12). Otros autores

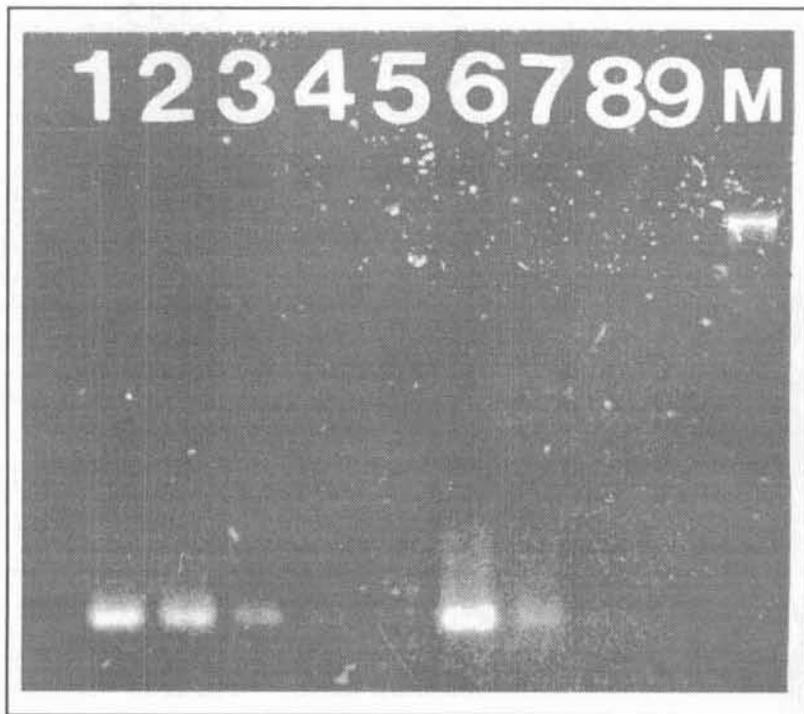


Figura 3. Electroforesis en gel de agarosa 2.5% de muestras de ADN bovino amplificado in-vitro. Ensayo de sensibilidad.

Pocillo M - Marcador de peso molecular patrón (Bacteriófago Lambda digerido con la endonucleasa de restricción Hind III).

Pocillo 1, 2, 3 y 4 - Muestras con 50 ng, 5 ng, 50 pg y 5 pg respectivamente de ADN de macho, en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ven bandas de 307 pb).

Pocillo 5 - Muestra sin ADN, en presencia de oligonucleótidos de sexado, "control de inespecificidad" (no se ve ninguna banda).

Pocillo 6, 7, 8 y 9 - Muestras con 50 ng, 5 ng, 50 pg y 5 pg respectivamente de ADN de otro macho, en presencia de oligonucleótidos de sexado (se ven bandas de 307 pb).

Pocillo 4 - Muestra sin ADN en presencia de oligonucleótidos de sexado, control de inespecificidad (no se ve ninguna banda).

evitan el problema con la determinación de sexo de muestras de ADN de humanos, bovinos, ovejas y cabra, con un solo par de oligonucleótidos universal que amplifica un fragmento (tanto en macho como en hembra) (1), que se digiere con enzimas de restricción.

En nuestros ensayos la inclusión de la amplificación del gen de Kappa-caseína, facilitó descartar la posibilidad de obtener falsos negativos. De todas maneras es necesario ajustar el método y en tal sentido, estamos ensayando oligonucleótidos que amplifcan ADN ribosomal, que esperamos nos sirvan como controles de amplificación.

El método cobra importancia en el área de reproducción, con el trasplante de embriones, donde estos pueden ser obtenidos por colectas uterinas de vacas donadoras o por fertilización in

vitro, biopsiados en el estado de blastocito, sexados por PCR e implantados, manteniendo su viabilidad (11) (16).

CONCLUSIONES

Creemos que el PCR ofrece ventajas frente a los otros métodos de sexado, por la especificidad, sensibilidad y rapidez con que se efectúa (5 horas).

El método combinado con otras tecnologías como la micro-manipulación de embriones le daría un fuerte impulso en nuestro país al mejoramiento zootécnico, a la comercialización y al desarrollo de embriones sexados y caracterizados genotípicamente.

Por otro lado, la utilización de marcadores de sexo en los bovinos podría cobrar la importancia que posee, por ejemplo en Australia, donde los Servicios cuarentenarios

de industria animal efectúan la técnica, para certificar la carne provenientes de animales machos, debido a su mayor cotización.

REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS

1. **Aasen, E. and Medrano, J.F.** (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technology* 8:1279-1281.
2. **Bondioli, K.R.; Ellis, S.B.; Pryor, J.H.; Williams, M.W. et Harpold, M.M.** (1989) The use of male specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 31:95-103.
3. **Hardy, K.; Martin, K.L.; Leese, H.J.; Wiston, R.M.L. and Hardyside, A.M.** (1990)

CON

CIENCIA

EN LA SANIDAD ANIMAL

**LABORATORIO CIENCIA
"EL DE LAS GRANDES MARCAS"**

DERRAMIN

GARRAPATICIDA INSECTICIDA

LUIS A. DE HERRERA 4009 - TELS.: 20 86 74 - 29 69 11

Human preimplantation development in vitro is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. Human Reprod. 5: 708-714.

4. **Hirigoyen, D.; Bruzzoni Giovanelli, H.; Azambuja, C. y Stoll, M.** (1991) Aplicaciones del PCR al mejoramiento bovino. In: Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias, 6ª... Piriápolis.
5. --- (1992) Variantes de Kappa-caseína en leche. Rev. Actual. Técn. Agropecu.
6. --- (1992) Análisis de variantes alélicas de Kappa-caseína en bovinos de leche. In: Congreso Latinoamericano de Genética, 10o., Río de Janeiro, Brasil.
7. **Leonard, M.; Kirszenbaum, M.; Cotinot, C.; Chesne, P.; Heyman, Y.; Stinnakre, M.G.; Bishop, C.;**

Delouis, C.; Vaiman, M. and Fellous, M. (1987) Sexing bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. Theriogenology 27:248.

8. **Medrano, J.F. and Cordova, E.A.** (1990). Genotyping of bovine kappa-casein loci following DNA sequence amplification. Bio/Technology 8:144-146.
9. **Mullis, K.B. and Falloona F.** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via polimerasa catalized chain reaction. Methods Enzimol. 155: 335-350.
10. **Nihart, M.** (1991) Le transfert embryonnaire et les biotechnologies appliquees: bissection et sexage. Rec. Med. Vet. 167 (3/4): 261-290.
11. **Peura, T.; Hyttinen, J.M.; Turunen, M. and Janne, J.** (1991) A reliable sex

determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. Theriogenology 35:547-555.

12. **Picard, L.; King, W.A. et Betteridge, K.J.** (1987) Production of sexed calves from frozen thamed embryos. Vet. Rec. 114:240-243.
13. **Plucienniczak, A.; Skowronski, J. and Joworski, T.** (1982) Nucleotidique sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. J.Mol. Biol. 158:293-304.
14. **Popescu, C.P.; Cotinot, C.; Boshier, J. et Kirszenbaum, M.** (1988) Chromosomal localization of a bovine male specific probe. Ann. Genet. 31:39-42.
15. **Postiglioni, A.; Larocca, C.; López, R.F.F.; Fernández, A.; González, A.; Llambí, S. y Rodríguez, J.** (1991) Obtención de una preñez con embriones de sexo conocido. Método de PCR. In: Jornadas Técnicas de la Facultad de Veterinaria, 2a. Montevideo.
16. **Rajchapel-Messaï, J.** (1991) Reproduction animale: Les technologies de L'embryon. Biofutur 27-37.
17. **Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A. and Arnheim, N.** (1985). Enzymatic amplification of beta globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of Sickle cell anaemia. Science 230:1350-1354.
18. **Wachte, S.S.; Nakamura, D.; Watchel, G.; Felton, W.; Kent, M. et Jaswaney, V.** (1988) Sex selection with monoclonal H-Y antibody. Fertil. Esteril. 50:355-360.

Aprobado para su publicación el 3/5/94.

casa del criador



DE TODO PARA EL CRIADOR

- JERINGAS
- DOSIFICADORES
- ESQUILA
- INSEMINACION

- EQUIPOS
- INSTRUMENTOS
- HERRAMIENTAS

DISTRIBUIDOR DE LOS AFAMADOS PRODUCTOS "WALMUR"

GRAL FLORES 3269 CASI L A DE HERREHA
TELS 23 60 13 20 80 40

