DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN EMBRIONES VITRIFICADOS: SEXAJE DE EMBRIONES Y GENOTIPADO DEL GEN DE RESISTENCIA AL SCRAPIE. RESULTADOS PRELIMINARES.

Dervishi, E. [1], Martinez- Royo, A. [1], Sánchez, P. [1], Alabart, J.L. [1], Cocero, M.J. [2], Folch, J. [1], Calvo, J.H. [1]

[1]Unidad de Tecnología en Producción Animal. CITA. Avda de Montañana, 930. 50059-Zaragoza.

[2]Dpto. Reproducción Animal. SGIT/INIA. Av. Puerta de Hierro s/n. 28040-Madrid.

E-mail: eda_d2001@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

El Diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es una técnica que resulta de la combinación de las técnicas de producción “in vitro” o “in vivo” de embriones y las técnicas de genética molecular. Actualmente, se han desarrollado técnicas de diagnóstico molecular en embriones que permiten detectar, a partir de una o más células embrionarias, enfermedades genéticas o alelos que presenten ventajas productivas, y realizar así implantación de sólo aquellos embriones sanos y que presenten ventajas productivas ("selección embrionaria").

Dentro del Programa de mejora genética por prolificidad puesto en marcha por la UPRA-Carnes Oviaragón desde 1994 se contempla que la producción de machos que van a ser testados se realice a través de un programa basado en la técnica MOET (Multiple Ovulation and Embryo Transfer). Dicha técnica consiste en superovular las hembras de alto valor genético, inseminarlas con semen de machos mejorantes, obtener los embriones resultantes y trasferirlos a otras hembras receptoras. Esta tecnología permite explotar mejor el potencial genético de los animales y acelerar la velocidad de selección (Nicholas, 1996). Como el interés del programa de selección se centra en la producción del mayor número posible de machos, la técnica sería más rentable y efectiva si se pudiese conocer el sexo de los embriones obtenidos, sin que disminuyese su viabilidad, transfiriendo únicamente los machos. Por otra parte, las directrices de erradicación del scrapie mediante selección genética han provocado una disminución en la proporción de machos válidos para testar, lo que ha ocasionado una disminución importante en la rentabilidad de la técnica.

El scrapie pertenece al grupo de las encefalopatías espongiformes transmisibles (EETs), las cuales engloban un grupo de enfermedades neurodegenerativas causadas por priones que afectan a diferentes especies animales incluida la humana. Estas enfermedades se caracterizan por presentar alteraciones neurológicas y afectar a distintas zonas del sistema nervioso central produciendo vacuolización neuronal y una gliosis muy marcada, lo que confiere al tejido neuronal un aspecto espongiforme (Kordek, 2000). El estudio de factores genéticos relacionados con las EETs ha puesto de manifiesto una fuerte asociación entre tres de los codones del gen Prn-P (136, 154 y 171) que parecen mostrar influencia sobre la susceptibilidad a esta patología (Hunter, 1997; Chesebro, 1999). Según su genotipo, los animales se clasifican en 5 grupos (R1 a R5), de mayor a menor resistencia a padecer scrapie. Las distintas CCAA han adoptado Normativas para impulsar, que de forma progresiva, los ganaderos vayan seleccionando los moruecos de genotipos resistentes al Scrapie, con vistas a eliminar la enfermedad por la vía genética. Para cumplir con la Normativa de Aragón, en el Programa de selección de UPRA-Carnes Oviaragón se contempla que los machos mejorantes del esquema sean de los grupos de riesgo a scrapie R1, R2, y excepcionalmente R3, pero con tendencia a ir eliminando los animales de este grupo. Estas actuaciones han provocado una disminución del número de machos válidos para testar, ya que la mayor parte de la población de Rasa aragonesa es ARQ/ARQ (R4), lo que ha repercutido de una manera importante en la eficacia de la técnica.

De esta manera, el objetivo de este trabajo es la puesta a punto de una técnica de sexado y genotipado del gen *PrnP*, para la selección de embriones a implantar en un programa MOET, dentro del esquema de selección por prolificidad puesto en marcha por la UPRA-Carnes Oviaragón.

MATERIAL Y MÉTODOS

Biopsia y cultivo embrionario. Se utilizaron mórulas compactadas o blastocistos ovinos descongelados después de haber sido vitrificados. La extracción de las células de los embriones se realizó mediante aspiración a través de una pequeña perforación en la membrana pelúcida. A continuación, los embriones se cultivaron en M199 a 38.5 ºC y 5% de CO_2 en aire para observar su desarrollo "in vitro" durante 24 h.

Extracción de ADN. La extracción de ADN se realizó a partir de diferente número de células embrionarias, mediante el kit de extracción "BLOODCLEAN DNA Purification kit" (Biotools). Hasta el momento de redactar este trabajo se han analizado biopsias de 15 embriones, con diferente número de células.

Previo a los ensayos con embriones, se realizaron pruebas de sensibilidad mediante dilución a partir de ADN genómico extraído de células sanguíneas, tanto de animales machos como hembras. Las diluciones utilizadas contenían 1 ng y 500, 200, 100, 50 pg de ADN. Igualmente, se comprobo la fiabilidad de la técnica en 50 machos y 50 hembras de raza Rasa Aragonesa. Las extracciones de ADN se realizaron con el método de Lahiri *et al*. (1992).

PCR duplex. El sexaje de embriones se realizó mediante PCR duplex, que consiste en una doble amplificación de dos fragmentos de ADN mediante PCR, uno del gen *PrnP*, gen responsable de parte de la susceptibilidad/resistencia al scrapie, que amplifica tanto en machos como en hembras, y por otra parte el fragmento repetido de ADN del cromosoma Y (*Acc number* **U65982**), que sólo amplifica en los machos.

La amplificación se realizó en un volumen final de 25 μl conteniendo 5 pmol de cada cebador: PrnP F 5´- ccc atg aag cca aaa acc aa -3, PrnP 2R 5´- cgc tcc att atc ttg atg tca g-3´, REP F 5´- ctggct tccttgagat gtcc-3´ y REP R 5´- gcttctccat caacctccac-3´, 200 nM dNTPs, 2mM $MgCl_2$, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.1% Triton X-100 y 0.9 U Taq polymerasa y 0.1 U de Pfu (Biotools). Se realizaron 30 ciclos de amplificación con un paso de desnaturalización a 94ºC durante 45 s, de hibridación a 60ºC durante 45 s, y de extensión a 72ºC durante 45 s. La visualización del producto amplificado se realizó mediante electroforesis de 20 μl de la amplificación en geles de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio.

Genotipado de los tres codones del PrnP. Una vez puesta a punto la amplificación se realizó el genotipado de los tres codones relacionados con la resistencia al scrapie: Al término de la PCR duplex, se tomaron 2 μl del producto amplificado y se utilizaron en una reamplificación usando las mismas condiciones, con excepción de que se realizaron 20 ciclos de amplificación. Se secuenciaron los 320 pares de bases utilizando el cebador PRNPF-5´- ccc atg aag cca aaa acc aa -3 para la amplificación. Tras la purificación, se enviaron a secuenciar al Centro de Investigaciones Biológicas perteneciente al CSIC en Madrid. Los resultados se reciben en 3 días. Las secuencias se alinearon con el programa CLUSTALW.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la metodología descrita, en las muestras procedentes de hembras aparece una única banda de 320 pb, mientras que en las muestras procedentes de machos aparecen dos bandas de 186 y 320 pb (Figura 1). Los estudios de especificidad mostraron una concordancia total entre el fenotipo y los resultados de la PCR duplex. Los estudios de sensibilidad a partir de ADN genómico extraído de sangre mostraron un límite mínimo de detección de 50 pg de ADN, para el fragmento específico del cromosoma Y, y el fragmento control (*PrnP*), cantidad de ADN similar a la contenida en una célula (Figura 1). En la Figura 1 se puede observar la mayor intensidad del fragmento Y, con respecto al fragmento control (PrnP), debido a que dicho fragmento presenta al menos tres copias en el genoma ovino. En ensayos con diferente número de células procedentes de biopsias embrionarias se encontró que se puede detectar un embrión macho, y ser capaces de genotipar los 3 codones del *PrnP* a partir de 3 células. Con una única célula se observó que aunque las PCRs amplifican con éxito el fragmento específico del macho, el fragmento control *PrnP* falla en algunos casos, no pudiéndose obtener los resultados de genotipado del PrnP.

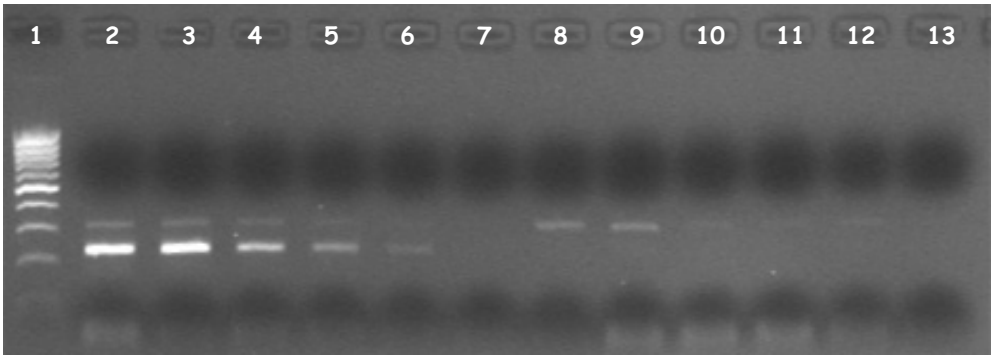
En todos los ensayos realizados, los embriones biopsiados experimentaron un desarrollo óptimo cuando fueron cultivados “in vitro”.

Nuestros resultados indican que es posible realizar el sexaje de embriones ovinos y genotipado del gen PrnP a partir de tres células embrionarias, sin producir un daño al embrión que afecte a su crecimiento futuro. Si sólo se desea conocer el sexo, los resultados se obtienen en pocas horas a partir de sólo una célula, lo que permite mantener los embriones en cultivo y transferirlos “en fresco”, sin necesidad de congelación.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado a través del proyecto CDTI nº 2004-611. Elda Dervishi tiene una beca concedida por el Instituto Agronómico Mediterráneo de Zaragoza (IAMZ-CIHEAM).

Figura 1. Estudios de sensibilidad de la PCR duplex a partir de ADN genómico extraído de sangre de los genes U65982 y *PrnP*, en la que se puede ver la amplificación de dos fragmentos de 186 y 320 pares de bases en los machos, y un único fragmento de 320 pares de bases en las hembras. Línea 1: Marcador de talla; línea 2: macho, 1ng; línea 3: macho, 500 pg; línea 4: macho, 200 pg; línea 5: macho, 100 pg; línea 6: macho, 50 pg; línea 7: control negativo; línea 8: hembra, 1ng; línea 9: hembra, 500 pg; línea 10: hembra, 200 pg; línea 11: hembra, 100 pg; línea 12: hembra, 50 pg; línea 13: control negativo.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Chesebro, B. 1999. Prion protein and the transmissible spongiform encephalopathy diseases. Neuron 24:503–506. • Hunter, N., Moore, L., Hosie, B. D., Dingwall, W. S., Greig, A. 1997. Association between natural scrapie and PrP genotype in a flock of Suffolk sheep in Scotland. *Vet Rec* 140, 59–63. • Kordek, R. 2000. The diagnosis of human prion diseases. Folia Neuropathol. 38(4):151-60. • Lahiri, D.K., Bye, S., Nurnberger, J.I., Hodes, M.E., Crisp, M. 1992. A nonorganic and nonenzymatic extraction method gives higer yields of genomic DNA from whole-blood samples than other methods tested. J. Biochem. Bioph. Meth 25 (4): 193-205. • Nicholas, F.W. 1996. Genetic improvement through reproductive technology. Anim. Reprod. Sci. 42: 205-214.