# LA BIOPSIA EMBRIONARIA CON LÁSER PERMITE EL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL OVINO SIN REDUCIR LA SUPERVIVENCIA A TÉRMINO

Cocero[1], M.J., Sánchez[2], P., Folch[2], J., Lahoz[2], B., Calvo[2], J.H., Quintín[3], F., Sevilla[3], E. y Alabart[2], J.L.

[1] INIA. Ctra. La Coruña km 7,500. 28040 Madrid.

[2] CITA de Aragón. Av. de Montañana 930. 50059 Zaragoza.

[3] Centro de Mejora Ganadera. Av. de Movera 580. 50194 Zaragoza.

jlalabart@aragon.es

## INTRODUCCIÓN

En el Programa de selección para mejora de la prolificidad desarrollado por UPRA-Grupo Pastores se utiliza la tecnología MOET (*Multiple Ovulation and Embryo Transfer*) para la producción de los machos a testar. Al igual que en otros programas MOET, la determinación de características del propio embrión antes de su transferencia, tales como el sexo (Dervishi et al., 2008), la resistencia a enfermedades (Dervishi et al., 2011) y el alelo ROA de alta prolificidad (*FecX*$^{R}$, Martínez-Royo et al., 2008) incrementan la eficacia del esquema. Sin embargo, los procedimientos de biopsia embrionaria comúnmente utilizados, junto a la necesidad de conservar el embrión fuera de la hembra durante la realización de los análisis genéticos, conllevan descensos de supervivencia incluso en bovino (Korhonen et al., 2012), la especie ganadera en que está más extendida la aplicación de estas técnicas. Los métodos de manipulación asociados al diagnóstico genético preimplantacional que más se han aplicado en rumiantes consisten en la apertura de un orificio en la zona pelúcida y posterior disección de una parte del embrión; el proceso suele realizarse en medio libre de proteínas y/o ausencia de iones Ca y Mg, y una vez finalizada la micromanipulación los embriones son mantenidos en cultivo o crio-conservados hasta la finalización del genotipado (ovino: Mara et al., 2004; caprino: Guignot et al., 2011). En nuestros trabajos previos, utilizando dichos procedimientos de disección mecánica en medio libre de iones Ca y Mg, observamos una reducción importante en la supervivencia embrionaria (-21,8%; Alabart et al., 2007), a pesar de que la determinación del sexo usando el gen *amelogenin* permite realizar la transferencia en 3 horas (Dervishi et al., 2008). En el presente trabajo se exponen los resultados obtenidos con la utilización de un objetivo provisto de un láser infrarrojo, con el fin de minimizar el estrés químico y mecánico y se estudia el efecto de la biopsia embrionaria sobre la supervivencia de embriones en fase de mórula compacta o blastocisto, de calidad 1 y 2 (clasificación IETS de 1998); es decir, que en el momento de su obtención presentaban o no células excluidas de la masa embrionaria principal.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Las donantes de embriones fueron ovejas Rasa aragonesa seleccionadas como madres de futuro semental del esquema. La superovulación se realizó con un total de 280 UI de FSH porcina (equivalentes a 160 mg NIH-FSH-P1; Folltropin-V, Minitub Ibérica SL, La Selva del Camp, Tarragona, España) administrados en 8 dosis decrecientes. Las receptoras se sincronizaron con esponjas de 30 mg de FGA durante 13 días y 400 UI eCG a la retirada de esponjas (Sincropart® 30 mg y Sincropart® PMSG 6000 UI, respectivamente; CEVA Animal Health S.A., Barcelona, España), que se realizó al mismo tiempo que en las donantes. Las donantes se inseminaron por vía laparoscópica 51 h después de la retirada (200 x $10^6$ espermatozoides/cuerno) con dosis seminales de los machos de mayor valor genético, preparadas en el Centro de Mejora Ganadera (Fantova et al., 1998). La recuperación de embriones se realizó bajo anestesia general mediante una sonda Foley (Foleycath, WRP, Sepang, Malasia) 8 días tras retirar las esponjas (estadios de mórula compacta y blastocisto).

Se utilizaron 200 embriones calificados como viables, de los cuales se biopsiaron 114, aproximadamente la mitad de los embriones obtenidos de cada oveja (66 embriones sin y 48 con células excluidas); la otra mitad solo se mantuvieron en cultivo en las mismas condiciones que los embriones biopsiados (n=86; 60 sin y 26 con células excluidas). Los embriones que presentaron células excluidas se sujetaron mediante una micropipeta por el lado opuesto al punto en que se visualizó un mayor número de dichas células. Se abrió un orificio aplicando un pulso de láser infrarrojo (1480 nm) anexo a un objetivo 40x (300 mW / 2,4 ms; XYClone, Hamilthon-Thorne, Parallabs Ltd., St Albans, Reino Unido) dirigido al

punto de la zona pelúcida opuesto al punto de sujeción. Mediante otra micropipeta se succionaron con facilidad 1-10 células embrionarias. En los embriones sin células excluidas, se exteriorizó una porción de la masa celular fuera de la zona pelúcida mediante succión y se aplicaron uno o varios pulsos láser para su separación. En el caso de los blastocistos, la biopsia se realizó en la zona del trofoblasto. La manipulación se realizó en 100 µl de PBS Dulbecco (Sigma D1283) sin BSA. Finalizada la micromanipulación, los embriones se cultivaron en M199 (Sigma M4530) suplementado con 10% de FCS inactivado (Sigma F4135), durante 18-22 h en un incubador (5% $CO_2$/aire, 38,5 ºC). Sólo se transfirieron los embriones que se desarrollaron hasta blastocisto expandido o eclosionado (2 embiones/receptora). Las diferencias en supervivencia embrionaria y fertilidad de las receptoras debidas a los factores biopsia, presencia de células excluidas e interacción entre ambos factores se analizaron mediante ANOVA para variables categóricas mediante el procedimiento CATMOD del paquete estadístico SAS (SAS, 2011).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se observó un efecto significativo de la biopsia o de la presencia de células excluidas sobre la supervivencia embrionaria, ni interacción entre ambos factores (Tabla 1). Así, considerando el total de embriones procesados, la biopsia reduciría la supervivencia embrionaria en embriones sin células excluidas sólo -9,2 puntos percentuales, mientras que la incrementaría ligeramente en embriones con células excluidas (+0,7). Considerando sólo los embriones que se desarrollaron durante el cultivo, la supervivencia embrionaria se reduciría escasamente en ambos tipos de embriones (-4,3 y -1,9, respectivamente). Aunque tampoco se alcanzó la significación estadística, la supervivencia embrionaria fue inferior en los embriones con células excluidas, tanto en los no biopsiados como en los biopsiados, considerada respecto al total de embriones procesados (-17,9 y -8,0), o respecto a los embriones transferidos (-13,2 y -10,8). Es decir, la supervivencia embrionaria resultó más afectada por la calidad que presenta el embrión tras su obtención que por la realización de la biopsia; de hecho, la presencia de células excluidas es el factor que presentó una tendencia a la significación ($P<0,08$). Además, el peor resultado se observó en el grupo de embriones que presentaban células excluidas pero que no se biopsiaron (53,8%). La fertilidad obtenida en las receptoras de embriones biopsiados fue muy similar a la del grupo control (78,4 vs. 80,0%; $P<0,91$), lo que demuestra que los procedimientos de micromanipulación aplicados en nuestro trabajo permiten el diagnóstico genético de mórulas compactas y blastocistos ovinos sin afectar el rendimiento del programa MOET.

La eficacia global, expresada en número de corderos nacidos del total de embriones biopsiados (62,5%), ha sido superior a la obtenida en anteriores trabajos realizados en ovino, tanto por otros grupos (38,1%; Mara et al., 2004) como en nuestros resultados previos (34,0%; Alabart et al 2007), en que se utilizaron medios mecánicos para la extracción de material embrionario. Esta mejora lograda con la utilización del láser, escasamente extendida en especies ganaderas, también está siendo constatada en humana para mejorar la eficacia de las técnicas de reproducción asistida (Geber et al., 2011), desde que fue demostrada su validez e inocuidad (Hastshorn el al., 2005).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

• Alabart, J.L. , Dervishi, E., Cocero, M.J., Sánchez, P., Echegoyen, E., Martínez-Royo, A., Calvo, J.H. & Folch, J. 2007. 23rd Scientific Meeting of the E.E.T.A. Alghero, Sardinia, 7th-8th September, p. 122. • Dervishi, E., Martínez-Royo, A., Sánchez, P., Alabart, J.L., Cocero, M.J., Folch, J. & Calvo, J.H. 2008. Theriogenology 70: 241-257. • Dervishi, E., Sánchez, P., Alabart, J.L., Cocero, M.J., Folch, J. & Calvo, J.H. 2011. Reprod Dom Anim. 46: 999-1003. • Fantova, E., Ciudad, M.A., Sevilla, E., Quintín, F.J., Folch, J. & Alabart, J.L. 1998. Producción Ovina y Caprina XXIII: 541-545. Geber, S., Bossi, R., Lisboa, C.B., Valle, M. & Sampaio, M. 2011. Reprod Biol Endocrinol. 9: 58. doi:10.1186/1477-7827-9-58. • Guignot, F., Perreau, C., Cavarroc, C., Touze, J.L., Pougnard, J.L., DuPont, F., Beckers, J.F., Rémy, B., Babilliot, J.M., Bed'Hom, B., Lamorinière, J.M., Mermillod, P. & Baril G. 2011. Reprod Dom Anim. 46: 656-663. • Hartshorn, C., Anshelevich, A., Lawrence, B.S. & Wangh, J. 2005. Fertility and Sterility 84(5): 1547-1550. • Korhonen, K., Julkunen, H., Kananenb, K., Bredbacka, P., Tiirikka, T., Räty, M., Vartia, K., Kaimio, I., Kontinen, A., Halmekytö, M., Vilkki, J., Peippo, J. & Lindeberg, H. 2012. Theriogenology 77: 201-205. • Mara, L., Pilichi,

S., Sanna, A., Accardo, C., Chessa, B., Chessa, F., Dattena, M., Bomboi, G. & Cappai, P. 2004. Molec Reprod Develop. 64: 35-42. • Martínez-Royo, A., Jurado, J.J., Smulders, J.P., Martí, J.I., Alabart, J.L., Roche, A., Fantova, E., Bodin, L., Mulsant, P., Serrano, M., Folch, J. & Calvo, J.H. 2008. Anim Genet. 39(3): 294-297. • SAS Institute Inc. 2011. SAS OnlineDoc® 9.3. Cary, NC: SAS Institute Inc. EE.UU.

**Agradecimientos:** Financiado por Convenio CITA/Oviaragón SCL e INIA (RZP 20100002).

***Tabla 1.*** *Supervivencia embrionaria y fertilidad de las receptoras de embriones biopsiados o no biopsiados, que tenían células excluidas o no en el momento de su obtención.*

| | Corderos nacidos / Embriones totales | Corderos nacidos / Embriones transferidos | Fertilidad de las receptoras |
|---|---|---|---|
| Sin CEX | | | |
| No biopsiados | 71,7 (43/60) | 74,1 (43/58) | 82,8 (24/29) |
| Biopsiados | 62,5 (30/48) | 69,8 (30/43) | 81,0 (17/21) |
| Con CEX | | | |
| No biopsiados | 53,8 (14/26) | 60,9 (14/23) | 72,7 (8/11) |
| Biopsiados | 54,5 (36/66) | 59,0 (36/61) | 76,7 (23/30) |
| Significación (P <) | | | |
| Biopsia | 0,56 | 0,68 | 0,91 |
| CEX | 0,08 | 0,11 | 0,45 |
| Biopsia x CEX | 0,50 | 0,87 | 0,76 |

CEX: Células excluidas de la compactación.

## LASER-ASSISTED EMBRYO BIOPSY ALLOWS PREIMPLANTATIONAL GENETIC DIAGNOSIS WITHOUT DECREASING EMBRYO SURVIVAL IN SHEEP

**ABSTRACT:** The effect of laser-assisted embryo biopsy on embryo survival at term was studied in ovine embryos with or without extruded cells at recovery. Two hundred viable compact morulas and blastocysts were recovered after superovulation of Rasa aragonesa ewes with pFSH. About half of embryos from each donor were biopsied (n=114; 66 with and 48 without extruded cells) while the rest were incubated at 38.5 ºC in TCM199 and 5% $CO_2$/air (n=86; 60 with and 26 without extruded cells) during 18-22 h before transfer. Biopsy was performed in Dulbecco's PBS, using an IR laser (1480 nm; 300 mW; 2.4 ms; XYClone, Hamilthon-Thorne). One to ten cells were recovered. After biopsy, embryos were incubated in the same conditions as non-biopsied embryos. The embryos that reached the expanded or hatched blastocyst stages after culture were transferred in pairs to recipient ewes. The embryo survival rate of the transferred embryos was similar in biopsied and intact embryos, irrespective of having (59.0%, 36/61 vs. 60.9%, 14/23; NS) or not (69.8%, 30/43 vs. 74.1% 43/58; NS) extruded cells. The effect of biopsy on the survival rate considering the total number of processed embryos was also non-significant. These results highlight the usefulness of laser in embryo biopsy.

**Keywords:** PGD, micromanipulation, extruded cell, blastomer.