

01690
2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS VETERINARIAS
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**ANALISIS DE SECUENCIAS DE ADN DEL CROMOSOMA Y
PARA LA DETERMINACION DEL SEXO EN EMBRIONES
PREIMPLANTADOS DE RUMIANTES DOMESTICOS.**

T E S I S
PARA OBTENER EL GRADODE:
DOCTOR EN CIENCIAS
PRESENTADA POR:
JESUS REFUGIO CORTES FERNANDEZ

TUTOR: DR. ROGELIO A. ALONSO MORALES

COMITE TUTORAL: DRA. GLADIS FRAGOSO GONZALEZ
DR. CARLOS SOSA FERREIRA
DRA. MARISOL LOPEZ LOPEZ
DR. SALVADOR ROMO GARCIA
DR. PEDRO OCHOA GALVAN
DR. CARLOS GUTIERREZ AGUILAR

MEXICO, D.F.

2003

1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

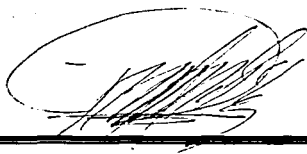
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

PAGINACIÓN DISCONTINUA

DECLARACIÓN

EL AUTOR DA CONSENTIMIENTO A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO PARA QUE LA TESIS ESTÉ DISPONIBLE PARA CUALQUIER TIPO DE REPRODUCCIÓN E INTERCAMBIO BIBLIOTECARIO.



J. Refugio Cortés Fernández

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DEDICATORIA

Con respeto e infinito cariño:

A mi Madre:

Esperanza Fernández Sarmiento que con su gran fortaleza y esfuerzo me brinda su amor y su apoyo para no dejarme decaer.

En memoria de mi Padre:

Heriberto Cortés Avelar que siempre lo recuerdo con amor.

A mis Hermanos:

José Heliodoro, Alfonso, Marcela, Lucta, Irene, Primitivo, Susana, Heriberto, Alicia, Josefina, Angélica y Silvia; así como a mis Cuñadas y Sobrinos por su cariño, apoyo y confort que me manifiestan.

A:

Daniel Camacho Fernández que con sus consejos me alienta y motiva para ser persistente; y con gran cariño a sus Hermanas y en memoria de su Mami por su Infinita generosidad.

A quienes me han dado su amistad, apoyo y compañerismo:

Rosalba Carreón Nápoles, Silvia Reyes Maya, Noé Reyes Gutiérrez y Oscar Hernández Ponce de León

Amanda Gayosso Vázquez

Rebeca Acosta

Raúl Ulloa Arvizu, Belem Huerta Lozano, Simón Martínez Castañeda, Addi Oropeza, Dalila D'Ascencao, Felicitas Vázquez, Mario Espinoza, Espiridión Ramos, Verónica Ocampo e Iván Sánchez

Ana María Martínez Lavín

Ma. Dolores Torres Estrada

De manera especial a:

Dr. Carlos Galina Hidalgo, Dr. Carlos Sosa Ferreira, Dr. Néstor Estrella Chulín, Dr. Benjamín Calva Rodríguez y Esposa, y al Dr. Armando Aguirre Brunnetti por su amistad y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Con infinita gratitud:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, y especialmente a la División de Estudios de Posgrado e Investigación por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca-crédito (65734) que me fue otorgada para realizar mis estudios de Doctorado. Así como, a la Dirección General de Estudios de Posgrado (programa de apoyo a los estudiantes de Posgrado-UNAM) (009303), DGAPA-PAPIIT-UNAM (IN 224198 y IN 2007976) y a CONACYT (0114PB) por su apoyo financiero para el desarrollo del proyecto de tesis.

Al Dr. Rogelio Alonso Morales como Tutor y Director de Tesis y al Dr. Salvador Romo García como Asesor por su gran apoyo y orientación para la elaboración del proyecto de tesis.

A los integrantes de mi H. Jurado: Dra. Gladis Fragoso González, Dr. Carlos Sosa Ferreira, Dra. Marisol López López, Dr. Salvador Romo García, Dr. Pedro Ochoa Galván, Dr. Rogelio Alonso Morales y al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por sus acertados comentarios que enriquecieron este trabajo.

Al Director de la Facultad: Dr. Luis Zarco Quintero y a la División de Estudios de Posgrado: Dr. Francisco Trigo Tavera, Dr. Francisco Suárez Güemes y especialmente al Dr. Javier Flores Covarrubias por su cordial atención, apoyo y orientación.

Cordialmente a la Dra. Gladis Fragoso González por su valioso asesoramiento para desarrollar la técnica de micromanipulación embrionaria.

Especialmente a la Dra. Marisol López López, Dra. Gladis Fragoso González y al Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar por su valioso tiempo y quienes proporcionaron acertados y oportunos comentarios para el manuscrito final de este trabajo; y a la Matemática Margarita Jiménez Villarruel por su valiosa colaboración en el análisis estadístico.

Al Laboratorio de Genética Molecular por la disponibilidad de su personal e infraestructura para el desarrollo del proyecto de tesis. Especialmente al Jefe del Laboratorio Dr. Rogelio Alonso Morales y a la Técnica Biol. Amanda Gayosso Vázquez por su valioso asesoramiento en técnicas de biología Molecular.

Al Dr. Javier Valencia y M.V.Z Verónica Caballero (C.E.P.I.P.S.A., Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia-UNAM.); Dr. Marco Antonio Hidalgo (CONAMEGRA, Ajuchitlán, Gro); y M.V.Z. Moisés Peña Verdúzco (Departamento de Agrobiología-UAT) por sus valiosas aportaciones de embriones congelados para la realización del estudio.

Al **Department of Veterinary Pathobiology y en Research Laboratory Building del College of Veterinary Medicine, Texas A&M University; College Station, Texas**, principalmente al *Dr. James Derry* y a la *Dra. Karen Jones* por haberme asesorado en técnicas de PCR y micromanipulación de embriones.

Al *Dr. Benjamin Calva Rodríguez, Dr. Daniel Camacho Fernández, M.V.Z Oscar Hernández Ponce de León y C.P. Margarita Camacho Fernández* por su gran apoyo en la tramitación y recolección de material biológico que fue primordial para el desarrollo de este estudio.

Al *Ing. Armando Aparicio Tejeda* y al *Dr. Enrique Camacho Fernández* por su valioso tiempo para el desarrollo de material visual.

A los **Departamentos de Genética y Reproducción**: profesores y administrativos por sus enseñanzas y amistad.

Mi más sincero agradecimiento a la *M. en C. Silvia Reyes Maya* y al *Biol. Noé Reyes Gutiérrez* por su valioso apoyo para la realización de trámites.

Infinitamente al *Dr. Daniel Camacho Fernández* por toda la disponibilidad y su apoyo incondicional para la culminación de mis estudios.

... *Gracias*

RESUMEN

Cortés Fernández Jesús Refugio: "Análisis de Secuencias de ADN del cromosoma Y para la Determinación del Sexo en Embriones Preimplantados de Rumiantes Domésticos". Tutor: Dr. Rogelio Alonso Morales; Comité Tutorial: Dra. Gladis Fragozo González, Dr. Carlos Sosa Ferreira, Dra. Marisol López López, Dr. Salvador Romo García, Dr. Pedro Ochoa Galván y Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar.

En el presente estudio se evaluaron secuencias de ADN del cromosoma Y de bovino para la determinación del sexo en blastómeros de embriones preimplantados de bovino, ovino y caprino por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); así como la investigación de la presencia y distribución de las secuencias del cromosoma Y bovino en el genoma del búfalo, ovino y caprino por Southern blot. La técnica de PCR fue estandarizada con ADN genómico de hembras y machos, evaluando diferentes condiciones para la amplificación de secuencias del cromosoma Y de bovino de copia única (AMX/Y, SRY y ZFX/Y) y de copia repetida (BC1.2, BOV97M y BRY.1), y de secuencias de ADN satélite 1.709 (en bovino) y 1.715 (en bovino, ovino y caprino) utilizadas como controles internos de amplificación. Se evaluó el nivel de sensibilidad y especificidad de la técnica utilizando ADN genómico de hembras y machos de bovino, ovino y caprino para posteriormente realizar ensayos con diferente número de blastómeros de embriones congelados de las tres especies. Por otra parte, se realizaron Southern blot utilizando ADN genómico de hembras y machos de bovino (Holstein y Cebú), búfalo, ovino y caprino, digeridos con *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* y *SaII* usando como sondas de hibridización BC1.2 y BRY.1. Los resultados indican que los iniciadores para las secuencias AMX/Y, SRY, ZFX/Y y BOV97M no alcanzaron los niveles de sensibilidad requeridos; lo contrario a los iniciadores para BC1.2 y BRY.1 que alcanzaron niveles de amplificación hasta con 0.005 ng de ADN (equivalente a una célula), no encontrando diferencias estadísticas entre las diferentes cantidades de ADN utilizadas para amplificar las secuencias BC1.2 y BRY.1, pero sí para las secuencias de AMX/Y, SRY, ZFX/Y y BOV97M ($p < 0.001$). La amplificación de productos diagnósticos fue satisfactoria al emplear los juegos de iniciadores para BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.715 a partir de 1, 2, 3 y 4 blastómeros; obteniendo el 100% de especificidad al corroborarlo con la evaluación del resto del embrión micromanipulado y con el ADN genómico de hembras y machos previamente identificados. El análisis estadístico confirmó que no existieron diferencias estadísticas entre el uso de los iniciadores de BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.715 para determinar el sexo a partir de blastómeros. Asimismo, se corroboró por Southern blot que la secuencia de BRY.1 es específica de macho al igual que la secuencia de BC1.2, pero en este último caso, además de encontrarse en el macho bovino, también se encuentra presente en machos de ovino, caprino y búfalo. Asimismo, BC1.2 y BRY.1 por su múltiple número de copias en el cromosoma Y, son potencialmente más factibles para ser usadas en el diagnóstico del sexo; lo contrario a las secuencias AMX/Y, SRY y ZFX/Y que no presentaron la sensibilidad adecuada, posiblemente por presentarse en una sola copia en el cromosoma Y; y BOV97M aunque es una secuencia de copia repetida no presentó la sensibilidad requerida debido a su escaso número de

copias. Por lo tanto, en este estudio se encontró que las secuencias repetidas del cromosoma Y BC1.2 y BRY.1 y la secuencia satélite 1.715 presentan los niveles requeridos de sensibilidad y especificidad para determinar el sexo en embriones preimplantados de bovino, ovino y caprino a partir de biopsias de 1 a 4 blastómeros. También, se demostró que la secuencia de BC1.2 puede ser usada para determinar el sexo en embriones de búfalo, aunque en este estudio no se evaluó dicha secuencia en blastómeros de esta especie, se demostró que BC1.2 se encuentra presente en el genoma del macho, encontrando los mismos niveles de sensibilidad que en bovino, ovino y caprino. De esta manera, se encontró un método preciso por medio de la técnica de PCR para diagnosticar el sexo en embriones preimplantados de rumiantes domésticos que puede ser aplicado en sistemas comerciales de producción.

Palabras clave: Secuencias del cromosoma Y, blastómeros, sensibilidad y especificidad, determinación del sexo, PCR (reacción en cadena de la polimerasa), Southern blot, rumiantes domésticos.

ABSTRACT

CORTES FERNANDEZ JESÚS REFUGIO: "DNA Sequences Analysis of the Y-Chromosome to Determine the Sex in Preimplanted Embryos of Domestic Ruminants". Tutor: Dr. Rogelio Alonso Morales; Tutorial Committee: Dr. Gladis Fragozo González, Dr. Carlos Sosa Ferreira, Dr. Marisol López López, Dr. Salvador Romo García, Dr. Pedro Ochoa Galván and Dr. Carlos Gutiérrez Aguilar.

In the present study, DNA sequences of the bovine Y-chromosome were assessed to determine the sex in blastomeres of bovine, ovine, and caprine preimplanted embryos by means of the polymerase chain reaction (PCR) technique. The presence and distribution of the bovine Y-chromosome sequences in the buffalo, ovine, and caprine genome were also investigated through Southern blot analysis. The PCR technique was standardized with genomic DNA from females and males, assessing different conditions for the amplification of single copy (AMX/Y, SRY, and ZFX/Y) and repeat copy (BC1.2, BOV97M, and BRY.1) bovine Y-chromosome sequences, as well as of satellite DNA sequences, 1.709 (in bovine) and 1.715 (in bovine, ovine, and caprine) used as internal amplification controls. Sensitivity level and specificity of the technique were assessed by using genomic DNA from bovine, ovine, and caprine males and females to perform assays with different numbers of blastomeres obtained from frozen embryos of the three species. Besides, Southern blot analyses were performed using genomic DNA from bovine (Holstein and Zebu), buffalo, ovine, and caprine males and females, digested with *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI*, and *SalI*, using BC1.2 and BRY.1 hybridization probes. Results indicated that the primers for sequences AMX/Y, SRY, ZFX/Y, and BOV97M did not reach the amplification levels required, as opposed to the primers BC1.2 and BRY.1 that reached amplification levels of up 0.005 ng DNA (equivalent to one cell). No statistically significant differences were found among the different amounts of DNA used to amplify sequences BC1.2 and BRY.1; however, differences were significant for AMX/Y, SRY, ZFX/Y, and BOV97M sequences ($p < 0.001$). Amplification of diagnostic products was satisfactory when using primer sets for BC1.2 + 1.715 and BRY.1 + 1.715 starting from 1, 2, 3, and 4 blastomeres. A 100% specificity was obtained as corroborated by assessing the remainder of the micromanipulated embryos and with the genomic DNA from previously identified males and females. Statistical analysis confirmed that no significant differences existed between primers BC1.2 + 1.715 and BRY.1 + 1.715 when used to determine the sex using blastomeres. Likewise, Southern blot analysis corroborated that the BRY.1 sequence is specific for males as the BC1.2 sequence, but the latter is not only present in the bovine male, but also in ovine, caprine and buffalo males. BC1.2 and BRY.1, because of their multiple numbers of copies in the Y-chromosome, have a greater potential to be used for sex diagnosis, as opposed to sequences AMX/Y, SRY, and ZFX/Y that did not depict an adequate sensitivity, probably because they are present in a single copy in the Y-chromosome. Although BOV97M is a repeat copy sequence, it did not reveal the required sensitivity due to its scarce number of copies. This study revealed that the repeat sequences Y BC1.2 and BRY.1 of the Y-chromosome and the satellite sequence 1.715 depict the required sensitivity and specificity levels to determine the sex in preimplanted bovine, ovine, and caprine embryos based on biopsies of 1 to 4 blastomeres. Besides,

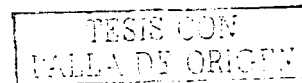
the study demonstrated that the sequence BC1.2 can be used to determine the sex in buffalo embryos. Although in this study this sequence was not assessed in blastomeres from this species, it was demonstrated that BC1.2 is present in the male's genome, finding the same sensitivity levels as those found in bovine, ovine, and caprine species. This study describes a precise method by means of the PCR technique, to diagnose the sex in preimplanted embryos of domestic ruminants that can be applied in commercial production systems.

Key words: Y-chromosome sequences, blastomeres, sensitivity and specificity, sex determination, PCR (Polymerase Chain Reaction), Southern blot, domestic ruminants.

CONTENIDO

PÁGINA

DECLARACION.....	I
DEDICATORIA.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE CUADROS.....	XII
LISTA DE FIGURAS.....	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
<u>CAPÍTULO PRIMERO</u>	
ANTECEDENTES	
1.1. Reproducción sexual.....	5
1.2. Importancia del sexo en la producción.....	5
1.3. Cromosomas sexuales.....	6
1.4. Organización y secuencias del cromosoma Y.....	7
1.4.1. Organización del cromosoma Y.....	7
1.4.2. Secuencias de ADN de copia única del cromosoma Y.....	9
1.4.3. Secuencias de ADN de copia repetida del cromosoma Y.....	14
1.4.4. Secuencia de ADN Microsatélite (TG) _n del cromosoma Y.....	25
1.5. Secuencias de ADN satélite autosómicas en el bovino empleadas para el diagnóstico del sexo.....	26
1.6. Técnicas utilizadas para el diagnóstico del sexo.....	28
1.6.1. Técnica citológica.....	28
1.6.2. Técnica inmunológica.....	29
1.6.3. Técnicas de biología molecular.....	30
1.6.4. Técnica de micromanipulación embrionaria.....	35
<u>CAPÍTULO SEGUNDO</u>	
OBJETIVOS, HIPÓTESIS Y METAS	
2.1. Objetivos.....	37
2.1.1. Objetivo general.....	37
2.1.2. Objetivos específicos.....	37



2.2. Hipótesis.....	38
2.2.1. Hipótesis general.....	38
2.2.2. Hipótesis específicas.....	38
2.3. Metas.....	39

CAPÍTULO TERCERO

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Purificación y evaluación de ADN genómico.....	40
3.2. Estandarización de la técnica de PCR.....	40
3.3. Evaluación del nivel de sensibilidad.....	44
3.4. Evaluación de especificidad.....	45
3.5. Sexado de embriones completos.....	46
3.6. Diagnóstico del sexo de embriones de bovino, ovino y caprino a partir de blastómeros.....	47
3.7. Técnica de Southern blot utilizando sondas de BC1.2 y BRY.1.....	48

CAPÍTULO CUARTO

RESULTADOS

4.1. Estandarización de la técnica de PCR.....	52
4.2. Evaluación del nivel de sensibilidad.....	53
4.3. Evaluación de especificidad.....	55
4.4. Sexado de embriones completos.....	57
4.5. Diagnóstico del sexo de embriones de bovino, ovino y caprino a partir de blastómeros.....	58
4.6. Southern blot utilizando sondas de BC1.2 y BRY.1.....	61

CAPÍTULO QUINTO

DISCUSIÓN

5.1. Estandarización de la técnica de PCR.....	69
5.2. Evaluación del nivel de sensibilidad.....	69
5.3. Evaluación de especificidad.....	71
5.4. Sexado de embriones completos.....	72

	<u>PÁGINA</u>
5.5. Diagnóstico del sexo de embriones de bovino, ovino y caprino a partir de blastómeros.....	72
5.6. Southern blot utilizando sondas de BC1.2 y BRY.1.....	75
CONCLUSIONES Y SUGERENCIAS.....	78
LITERATURA CITADA.....	81
ANEXOS	
Anexo 1. Abreviaturas.....	95
Anexo 2. Determinación del sexo.....	96
Anexo 3. Purificación de ADN a partir de sangre periférica.....	103
Anexo 4. Purificación de ADN a partir de tejido (hígado).....	105
Anexo 5. Buffer utilizados.....	107

ÍNDICE DE CUADROS

PÁGINA

CAPÍTULO TERCERO MATERIALES Y MÉTODOS

Cuadro No. 1	Secuencias de los iniciadores empleados para la amplificación de secuencias diagnósticas del sexo.....	41
Cuadro No. 2	Condiciones óptimas de reacción para la amplificación de secuencias de copia única y de copia repetida del cromosoma Y, así como de secuencias satélite.....	43
Cuadro No. 3	Condiciones óptimas de termociclador para la amplificación de secuencias de copia única y de copia repetida del cromosoma Y, así como de secuencias satélite.....	44
Cuadro No. 4	Enzimas utilizadas para la restricción del ADN genómico.....	49

CAPÍTULO CUARTO RESULTADOS

Cuadro No. 5	Nivel de sensibilidad de las secuencias del cromosoma Y al utilizar diferentes concentraciones de ADN genómico de hembras y machos.....	54
Cuadro No. 6	Nivel de sensibilidad de las secuencias BC1.2 y BRY, y de las secuencias satélites 1.709 y 1.715 en las 4 especies estudiadas.....	55
Cuadro No. 7	Especificidad de las secuencias BC1.2 + 1.709 y BRY.1 + 1.709 empleando ADN genómico de bovino.....	56
Cuadro No. 8	Especificidad de las secuencias BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.75 empleando ADN genómico de bovino.....	56
Cuadro No. 9	Diagnóstico del sexo empleando BC1.2 + 1.709 y BRY.1 + 1.709, y ADN de embriones completos de bovino.....	57
Cuadro No. 10	Diagnóstico del sexo empleando BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.715, y ADN de embriones completos de bovino.....	58
Cuadro No. 11	Resultado del diagnóstico del sexo a partir de blastómeros.....	60

ÍNDICE DE FIGURAS

PÁGINA

CAPÍTULO PRIMERO

REVISIÓN DE LITERATURA

Figura No. 1	Cromosomas sexuales de euterios.....	7
Figura No. 2	Localización de <i>AMY</i> , <i>SRY</i> y <i>ZFY</i> en el cromosoma Y de bovino.....	10
Figura No. 3	Localización de BC1.2 en el cromosoma Y bovino (<i>Bos taurus</i>).....	17
Figura No. 4	Localización de BRY.1 en el cromosoma Y bovino (<i>Bos taurus</i>).....	22
Figura No. 5	Localización de LambdaES6.0 en el cromosoma Y bovino (<i>Bos taurus</i>).....	25

CAPÍTULO TERCERO

MATERIALES Y MÉTODOS

Figura No. 6	Técnica de Southern blot.....	50
--------------	-------------------------------	----

CAPÍTULO CUARTO

RESULTADOS

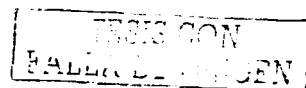
Figura No. 7	Amplificación por PCR de secuencias de ADN de copia única y de copia repetida diagnósticas del sexo.....	53
Figura No. 8	Ejemplo del diagnóstico del sexo con diferente número de blastómeros empleando los iniciadores para las secuencias BC1.2 + 1.715.....	59
Figura No. 9	Ejemplo del diagnóstico del sexo con diferente número de blastómeros empleando los iniciadores para las secuencias BRY.1 + 1.715.....	60
Figura No. 10	Southern blot con BC1.2 en ADN de Holstein y Cebú digerido con <i>HpaI</i> , <i>MspI</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> y <i>SalI</i>	61
Figura No. 11	Southern blot con BRY.1 en ADN de Holstein y Cebú digerido con <i>HpaI</i> , <i>MspI</i> , <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> , <i>PstI</i> y <i>SalI</i>	63
Figura No. 12	Southern blot con BC1.2 en ADN de Holstein y Cebú digerido con <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	64
Figura No. 13	Southern blot con BRY.1 en ADN de Holstein y Cebú digerido con <i>BamHI</i> , <i>EcoRI</i> y <i>PstI</i>	65
Figura No. 14	Southern blot con BC1.2 en ADN de Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino con <i>BamHI</i>	66

PÁGINA

Figura No. 15 Southern blot con BC1.2 en ADN de Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino con <i>EcoRI</i>	67
Figura No. 16 Southern blot con BC1.2 en ADN de Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino con <i>PstI</i>	68

ANEXOS

Figura No. 17 Representación esquemática de la relación que existe entre los genes para la determinación del sexo de un individuo.....	100
--	-----



Introducción

Con el propósito de mejorar la calidad genética de individuos en la ganadería se han realizado cruza de individuos con características hereditarias selectivas, procedimiento que ha sido utilizado desde hace mucho tiempo. Sin embargo, los cruzamientos naturales en algunos casos han sido desplazados por técnicas reproductivas como la inseminación artificial (IA) que tiene la ventaja primordial de disminuir los costos involucrados, considerando la selección única de un macho para la obtención de un gran número de progenies de alto valor genético. Esta técnica ha sido combinada con la técnica de transferencia de embriones (TE), donde se utilizan procedimientos para que de hembras superovuladas e inseminadas se obtengan embriones que pueden ser transferidos en fresco o almacenados por congelación para su posterior transferencia a hembras receptoras con el propósito de contribuir a multiplicar una población seleccionada. También en recientes avances de la biología de la reproducción, la técnica de fertilización *in vitro* (FIV) ha tenido gran importancia para la obtención de embriones, buscando el mismo propósito que en la TE.

Estos tipos de procedimientos han tenido varias ventajas, tales como, el gran rendimiento reproductivo, especialmente en hembras donde se pueden cambiar los periodos de gestación, de acuerdo a las estaciones climáticas y de acuerdo a las circunstancias comerciales que prevé grandes facilidades en la industria nacional e internacional (Frásch and Ugalde, 1996). No obstante, una de las importantes limitantes es el desconocimiento que se puede tener del sexo del producto obtenido al final de la gestación, aunque este es determinado desde el momento de la fertilización; así es que, al desconocer el sexo del embrión implantado, se obtiene un resultado sexual impredecible que puede ocasionar pérdidas económicas al productor.

Para resolver estas limitaciones se ha propuesto diagnosticar el sexo del embrión antes de su transferencia, permitiendo de esta manera, programar el nacimiento de hembras o machos y así obtener los beneficios en la comercialización y explotación del ganado. Un ejemplo de esto, sería la pre-selección de progenies de hembras en la industria lechera, donde se obtendrían beneficios si los embriones se sexaran rutinariamente antes de ser transferidos a hembras receptoras. Es decir, la disponibilidad de sexar embriones en la producción láctea, permitiría la selección de la descendencia para sus estirpes de embriones que posean características deseables, tales como el incremento de la producción láctea y la habilidad maternal. Similarmente en la industria ovina y caprina, la disponibilidad de los embriones sexados, podría habilitarse para seleccionar la descendencia más deseable de sus estirpes, reducir costos de reemplazos e incrementar el tamaño del hato.

El sexado de embriones, es un procedimiento donde se diagnostica el sexo de embriones antes de que estos sean transferidos (llamados también embriones preimplantados) a hembras que llevarán a término su gestación. Para esto, en las últimas décadas se han desarrollado varios métodos para realizar el diagnóstico, pero algunos han sido limitados e inespecíficos. En recientes reportes, se han utilizado métodos de biología molecular donde al analizar genes específicos del cromosoma Y en el ADN de un animal, presumiblemente identifica el sexo de un individuo especialmente en mamíferos, en los cuales, el sexo puede ser determinado por la identificación de secuencias de ADN que están asociadas específicamente con el cromosoma Y.

Varios investigadores han identificado secuencias de ADN en bovinos que están preferentemente o exclusivamente en el ADN del macho. Estas secuencias hasta el momento no han sido caracterizadas funcionalmente, pero se han utilizado como sondas de ADN para el sexado de embriones y fetos por tener la propiedad de hibridar con el ADN del macho. Varios estudios mencionan que una desventaja particular asociada con las secuencias de ADN es que son específicas de especie (por ejemplo específicas de bovino y por lo mismo, no hibridan para el ADN de otros rumiantes, tales como ovinos y caprinos). Por lo que la especificidad de especie para éstas secuencias, limita su uso como un reactivo general para diagnosticar el sexo de embriones o fetos de diferentes especies de rumiantes. Sin embargo, en otros reportes se menciona el descubrimiento de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y que universalmente están conservadas entre rumiantes.

De manera que con el advenimiento de la identificación de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y se han logrado grandes avances para identificar el sexo de embriones preimplantados, usando métodos con un alto grado de precisión para el diagnóstico, pero algunos de estos métodos resultan ser laboriosos y con un alto consumo de tiempo, provocando una disminución de la viabilidad del embrión.

En el presente trabajo se muestran resultados experimentales de sexado de embriones de bovino, ovino y caprino diagnosticado por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR: siglas en inglés de Polymerase Chain Reaction) con un alto grado de sensibilidad y especificidad utilizando secuencias presentes en el cromosoma Y de bovino, proporcionando a la ganadería una técnica de sexado que permitiría obtener beneficios en la comercialización y explotación del ganado e incrementar la eficiencia productiva en México.

CAPÍTULO I

Antecedentes

Desde inicios de la civilización humana la población de genes en los animales domésticos fue pasivamente modificada por la selección de individuos basada en criterios de producción, fertilidad, comportamiento o estéticos, siendo el cimiento para las generaciones próximas. Con el descubrimiento de las leyes genéticas de Mendel, este arte de la agricultura sería una ciencia en la modificación lenta y pasiva de los fenotipos de animales domésticos. A inicio de los años 1980s, las técnicas transgénicas fueron desarrolladas en el ratón, creando una expectación en la reprogramación directa del genoma para efectuar la modificación fenotípica de los animales domésticos y de esta manera, mejorar características de producción, tales como etapas de desarrollo, características corporales, producción láctea y resistencia a enfermedades en el ganado. En estudios preliminares, se demostró que técnicamente el ganado transgénico era posible producirse por medio de microinyecciones por vía pronuclear, sin embargo por el gran costo que representaba fue prohibido para propósitos prácticos; sumado a que los animales resultantes no fueron útiles en términos de mejorar las características de producción (Cross, 1989; Purcel *et al.*, 1989).

Uno de los principales parámetros en la producción de animales domésticos es el fenotipo sexual que puede ser manipulado por medios biotecnológicos. En recientes años, la clonación molecular ha tenido avances rápidos en la identificación de genes involucrados en la determinación y diferenciación del sexo. La clonación de células somáticas de embriones ha proporcionado nuevos

medios para identificar a temprana edad embrionaria el posible fenotipo sexual de un individuo. Estos desarrollos ahora permiten considerar el fenotipo sexual como un potencial para mejorar la producción en animales domésticos (Silversides, 2001).

1.1. REPRODUCCIÓN SEXUAL

La reproducción sexual es la base de la vida multicelular que se da por la unión de dos eventos biológicos: reproducción, que es la renovación de individuos entre generaciones; y el sexo, como la recombinación de genes. La reproducción como una acción genética pasiva ocurre entre cada generación, asegurando la posible variedad de combinaciones genéticas que pueden ocurrir dentro de una población de individuos de una especie, un rasgo deseable para asegurar la sobrevivencia de una especie (Purcel *et al.*, 1989). El enfoque central de la reproducción sexual radica en los mecanismos moleculares y de desarrollo que son específicos para la determinación de los dos morfotipos (macho y hembra). En mamíferos la determinación del sexo se basa en un gen llevado sobre el cromosoma Y, y por ende, la segregación mendeliana de los cromosoma sexuales (X y Y) durante la espermatogénesis, asegurando que el 50% del espermatozoides lleve cromosomas X y el 50% lleve cromosomas Y, por lo que aproximadamente el 50% de los embriones resultarían en individuos macho y el 50% resultarían en individuos hembra (Cross, 1989).

1.2. IMPORTANCIA DEL SEXO EN LA PRODUCCIÓN

En sistemas agropecuarios de producción es importante tener un control de la proporción del sexo de los animales, como en la producción láctea donde se busca favorecer concepciones más altas y el nacimiento de animales de sexo femenino, sin embargo, en estos sistemas se presentan gestaciones no deseables que son las del sexo masculino. Por otro lado, en sistemas de producción de carne, incluyendo bovinos y ovinos, los animales de sexo masculino son generalmente más ventajosos. Para controlar el sexo de los nacimientos se ha tenido el interés de realizar el diagnóstico del sexo antes del nacimiento de los individuos, donde el sexado de fetos comúnmente puede efectuarse después de la implantación vía ultrasonido y por amniocentesis, pero estos

métodos resultan dar un diagnóstico sexual en una etapa tardía de la gestación, proporcionando gastos innecesarios para la producción (Silversides, 2001). Sin embargo, se puede realizar el sexado antes de la implantación de embriones por métodos moleculares de ADN, en donde al sexar embriones preimplantados en técnicas de TE y de FIV la selección del sexo puede tan pronto como sea posible llegar a ser comercialmente aprovechable. Por lo tanto, al considerar los métodos moleculares en la selección del sexo en animales de producción es importante considerar el enfoque de los cromosomas sexuales X y Y, la expresión de genes (Anexo 2) y secuencias de ADN que pueden ser evaluadas para diagnosticar el sexo.

1.3. CROMOSOMAS SEXUALES

En todas las especies de mamíferos los machos son heterogaméticos, conteniendo un cromosoma sexual X y un cromosoma sexual Y (presentan espermatozoides haploides con un cromosoma X ó un cromosoma Y), mientras que las hembras son homogaméticas conteniendo dos cromosomas sexuales XX (cada ovocito contiene un cromosoma X) (Page, 1989).

Tanto X como Y, se dividen en brazos cortos (Xp o Yp) y en brazos largos (Xq o Yq). Page (1989) indica que la parte distal de Xp y de Yp, presentan regiones homólogas, al igual que una de recombinación. Los *loci* comunes entre Xp y Yp permiten recombinaciones frecuentes como un evento normal durante la meiosis del macho, intercambiando material genético en un lugar denominado "Región Pseudoautosómica".

Para el entendimiento de la organización y comportamiento de los cromosomas X y Y en la determinación del sexo, Graves (1996) y Graves *et al.* (1998) se guiaron por dos ideas influyentes expuestas originalmente por Susumo Ohno "Ley de Ohno", mencionando que principalmente X y Y de euterios están altamente diferenciados, donde el cromosoma X es más grande y contiene de tres a cuatro mil genes; siendo que la mayoría no tienen un papel particular en la determinación sexual y están sujetos a la inactivación. El cromosoma Y es más pequeño pero presenta genes que son primordiales para la determinación del sexo y por ende el desarrollo gonadal de un individuo (Anexo 2).

Particularmente, en mamíferos euterios el cromosoma X implica alrededor del 5% del genoma haploide, es sustancialmente más grande que el cromosoma Y (Figura 1) y lleva varios genes que

no son paralelos con los genes que lleva Y. En monotremas tanto el cromosoma X como el cromosoma Y son grandes, comparados con los marsupiales que tienen un X más pequeño (cerca del 3% del complemento haploide) y con los euterios (cerca del 5%), siendo Y más diminuto (Toder *et al.*, 1997b).

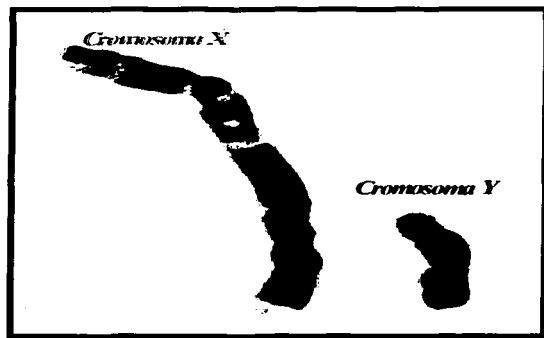


FIGURA 1. CROMOSOMAS SEXUALES DE EUTERIOS

1.4. ORGANIZACIÓN Y SECUENCIAS DEL CROMOSOMA Y

1.4.1. ORGANIZACIÓN DEL CROMOSOMA Y

Palmer *et al.* (1989) argumentan que el cromosoma Y es excepcional ya que presenta un *locus* de un elemento genéticamente esencial para la diferenciación sexual (*SRY*). También en 1989, Ellis *et al.* mencionan que el cromosoma Y de humano está compuesto por dos regiones funcionalmente distintas: 1) La región pseudoautosómica que es compartida entre X y Y, probablemente requerida para la segregación correcta de los cromosomas sexuales durante la meiosis del macho; y 2) La región que incluye genes esenciales para determinar el sexo y necesarias para el desarrollo testicular. Las dos regiones tienen propiedades contrastantes, por un lado, la región pseudoautosómica que es recombinante entre X y Y, y por otra parte la región

específica de Y que debe evitar la recombinación, ya que de otro modo, la región cromosómica de la determinación sexual se puede interponer. La región pseudoautosómica está limitada en la parte distal final por el telómero y en la parte proximal final por el ADN específico de X y Y. Por lo tanto, la limitación podría ser definida por los genes funcionales específicos o por elementos de regulación.

Se ha llegado a proponer que el origen del cromosoma Y de mamíferos se desarrolló de un cromosoma ancestral por ciclos de atrición, compensación por adición de regiones autosomales. Los genes sobre Y, por lo tanto pueden ser derivados de un cromosoma X original o más recientemente de una o de otras regiones adicionales. Solamente los genes que se encuentran en Y están involucrados en las funciones específicas para la determinación del sexo y de la espermatogénesis. De manera que la estructura y la función de Y, han sido impuestas por fuerzas evolutivas relacionadas a factores genéticos y ambientales (Morell, 1994; Graves, 1996).

Toder *et al.* (1997b) concluyen que la región pseudoautosómica de euterios ancestrales fue más grande que la región pseudoautosómica de humanos; pero que la mutación y la pérdida de genes en la diferenciación del cromosoma Y, ha reducido la homología en diferentes linajes, por lo que, el contenido y actividad de los genes sobre Y de euterios cambian rápidamente durante la evolución. Esto fue apoyado por los conceptos mencionados por Pecon Slaterry y O'Brien (1998) quienes indicaron un aspecto para la evolución de mamíferos, que concierne a la permanencia y a la segregación de la diversidad genética dentro de los cromosomas sexuales. Primordialmente en euterios, sólo una pequeña porción de Y experimenta la recombinación con X, especulando el destino de los genes ligados a Y localizados fuera de la región pseudoautosomal.

Esto ha abierto las posibilidades de conocer más ampliamente el cromosoma Y en otras especies, principalmente en animales domésticos de importancia en la industria productiva como en el ganado bovino y ovino, entre otros.

Específicamente, el cromosoma Y de bovino representa alrededor del 2.1% del total del genoma haploide. Miller (1991) asume que aproximadamente el 50% de Y es específico del macho. Por lo que la parte específica de Y podría ser el 1% del total del genoma del macho. En estudios citogenéticos, se ha demostrado que el cromosoma Y de *Bos indicus* es acrocéntrico y el de *Bos taurus* es submetacéntrico, y estas diferencias morfológicas posiblemente se pueden deber a una inversión pericéntrica (Halnan and Watson, 1982; Goldammer *et al.*, 1997). Siendo que la variabilidad pueda ser el resultado de una diferencia en la cantidad de heterocromatina (Schwerin *et*

al., 1992). En cambio, en ovinos y caprinos (*Ovis aries* y *Capra hircus*) el cromosoma Y es más pequeño (12×10^6 pb) que el cromosoma Y de bovino (15×10^6 pb) (Toder *et al.*, 1997a) y además se presenta de forma metacéntrica (King, 1984).

Por análisis de Dot blot de ADNs de *B. taurus* y de *B. indicus* se revelaron regiones de secuencias de ADN repetidas específicas del macho (Perret *et al.*, 1990; Cotinot *et al.*, 1991). Subsecuentemente, se realizaron clonaciones de 10 secuencias de ADN específicas del macho bovino (Herr *et al.*, 1990a; Miller and Koopman, 1990; Schröder *et al.*, 1990; Peura *et al.*, 1991) que presentan un potencial como:

- a) Sondas de ADN en análisis de hibridación *in situ* para biopsias de embriones preimplantados que podrían proveer un método de alta sensibilidad para el sexado de embriones;
- b) Sondas de ADN para estudios genealógicos del macho bovino; y
- c) Análisis de linajes paternos, de manera que se aclare la estructura de poblaciones de bovinos comunes y para la reconstrucción reciente de la evolución del bovino.

1.4.2. SECUENCIAS DE ADN DE COPIA ÚNICA DEL CROMOSOMA Y

> AMELOGENINA (AM)

Amelogenina (AM) es un gen que se expresa en ameloblastos para proteínas que son requeridas para la formación del esmalte dental dentro del órgano dental. El gen de AM pertenece a un pequeño grupo de genes que son activos tanto en Y (Figura 2) como en X (denominado como AMX y AMY) (Nakahory *et al.*, 1991).

Con base en la distancia de polimorfismo del *locus* de AM de los cromosomas X y Y del humano, Sullivan *et al.* (1993) amplificaron por la técnica de PCR la parte del gen de AM homóloga en XY con un par de iniciadores de oligonucleótidos para determinar el sexo de embriones en humanos. Los productos amplificados fueron de un fragmento de 177 pb en el primer intrón del homólogo de X, un fragmento de 788 pb específico de Y y uno de 955 pb específico de X. Concluyendo que la

amplificación de los homólogos de *AM* en X/Y ofrece la ventaja de que las secuencias específicas de X y Y pueden ser utilizadas para obtener un diagnóstico sexual específico.

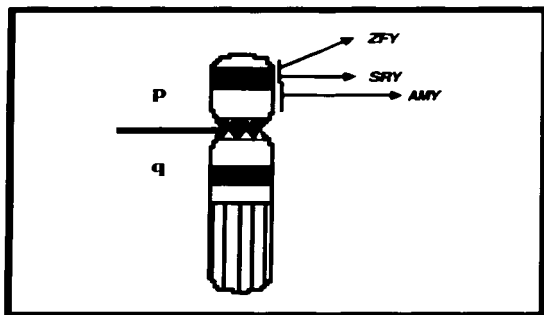


FIGURA 2. LOCALIZACIÓN DE *AMY*, *SRY* Y *ZFY* EN EL CROMOSOMA Y DE BOVINO

Con relación a bovinos, Gibson *et al.* (1991) mencionan que existen dos secuencias diferentes de transcripción de amelogenina en bovinos denominadas como clase I y clase II; las cuales son los productos de genes localizados sobre los cromosomas X y Y, de tal manera que se les considera como el producto de un fragmento de longitud polimórfica (RFLP). Más tarde Gibson *et al.* (1992) determinaron que entre la región de *AMX* y *AMY* existe una homología en la secuencia del intrón entre la clase I de *AMX* y *AMY*, y una supresión de 63 pb en la clase II con relación a la clase I.

Con esto, Ennis y Gallagher (1994) desarrollaron un método basado sobre la diferencia entre el *loci* de la clase I y de la clase II de *AM*, con el fin de establecer un método por PCR para el diagnóstico del sexo en ganado bovino. Para esto, diseñaron iniciadores de oligonucleótidos para amplificar ambas secuencias del *locus* de *AMX/AMY* y obtener un fragmento de 280 pb de la secuencia de *AM* del cromosoma X (clase I) y un fragmento de 217 pb de la secuencia de *AM* para el cromosoma Y (clase II), sobre ADN obtenido de biopsias de aproximadamente de 10 células de embriones de 6 a 7 días de edad. Los resultados fueron satisfactorios al diagnosticar el sexo de dichos embriones.

Por otra parte, al comparar las regiones de los genes de *AM* entre X y Y de bovino, Chen *et al.* (1998) mencionan que estas dos regiones tienen una conservación aproximadamente del 60% en

300 pb del tercer exón para X y Y. Posteriormente, Chen *et al.* (1999) desarrollaron una técnica de sensibilidad para el sexado de embriones de bovino usando PCR para la amplificación de *AM* sobre los cromosomas X y Y de ganado lechero Holstein. Inicialmente, realizaron la clonación y secuenciación de *AMX* y *AMY*, demostrando una homología del 41.5% entre el quinto intrón de *AMX* y *AMY* con múltiples supresiones. Consecutivamente con esto, diseñaron un par de iniciadores específicos para la amplificación de un simple fragmento de 467 pb del cromosoma X de la hembra y por otra parte, dos fragmentos de 467 pb y 341 pb de los cromosomas X y Y de macho que fueron utilizados para el diagnóstico del sexo con pocas células embrionarias, proporcionando resultados satisfactorios.

La amplificación de una parte del gen *AM* homóloga en X y Y con un simple par de iniciadores, ha sido usada para la determinación del sexo de embriones en humanos, basada sobre una distancia de polimorfismo en los cromosomas X y Y del humano. Sullivan *et al.* (1993) al utilizar un par de iniciadores por la técnica de PCR, amplificaron fragmentos de 177 pb en el primer intrón del homólogo X, 788 pb específico de Y y 956 pb específico de X. La amplificación de los fragmentos homólogos en *AMX* y *AMY* ofrece la ventaja de que ambas secuencias específicas de X y Y son amplificadas en la misma reacción.

➤ **SRY**

SRY es un gen que está representado únicamente sobre el cromosoma Y (Figura 2), no existiendo secuencias homólogas de este en el cromosoma X. Esta característica marcó a *SRY* como un blanco ideal para ser usado en métodos de diagnóstico sexual y para la selección fenotípica sexual. Peyen y Cotinot (1993) mencionan que *SRY* por tener características similares de conservación entre especies puede ser utilizado como un marcador en el diagnóstico sexual de bovinos, ovinos y caprinos.

En 1994, Cui *et al.* realizaron un estudio en humanos para determinar el sexo de embriones biopsiados con el objeto de descartar desórdenes ligados al sexo por medio de PCR. Para esto, utilizaron un par de iniciadores que fueron obtenidos de la secuencia de 80 aminoácidos de *SRY* que es codificada por Yp35.3 humano y un par de iniciadores como control obtenidos del gen *ZP3*

localizado en el cromosoma 7. Los resultados fueron específicos y seguros para determinar el sexo de embriones preimplantados de humano.

Con base a lo anterior, Silversides *et al.* (1997) proponen determinar el sexo genético a partir de ADN obtenido de tejidos o de muestras embrionarias de bovino y jabalí, utilizando sondas de ADN de *SRY* e iniciadores derivados de secuencias de ADN de bovino y porcino. Por otra parte, proponen proveer secuencias promotoras y de control para *SRY*, las cuales pueden ser usadas para la manipulación genética del fenotipo sexual en animales domésticos, así como proveer iniciadores de oligonucleótidos, específicamente para la hibridación de ADN genómico de machos bovinos y porcinos. Revelando los mismos autores, que *SRY* de bovino es de 1,644 pb compuesto de una región promotora no codificada 5' de 911 pb, un codón de iniciación ATG, un marco abierto de lectura (ORF) de 688 pb, un codón de alto TAG y secuencias no codificadas 3' de 45 pb. Por el análisis de Southern blot, las secuencias de ORF demostraron ser específicas de macho y estar ausentes en ADN de hembras, corroborando que son específicas del cromosoma Y. En el caso del gen *SRY* de porcino, es de 1667 pb y está compuesto de una región promotora no codificada 5' de 618 pb, un codón de iniciación ATG, un ORF de 624 pb, un codón de alto TAA y una región no codificada 3' de 425 pb.

De acuerdo a los resultados obtenidos, Silversides *et al.* (1997) propusieron también sondas de ADN para la amplificación de ADN por PCR y por reacción en cadena de la ligasa para diagnosticar el sexo de embriones de bovino y porcino. El sexado se llevó a cabo con 2 ó más células de embriones de bovino en etapa de 2 a 32 células. Para esto, se utilizó un par de iniciadores externos diseñados para amplificar entre 300 y 400 pb de las secuencias de ADN centrales de *SRY* de bovino alrededor de HMG, y además, un par de iniciadores internos diseñados para amplificar entre 200 y 300 pb. El mismo método fue usado para embriones de porcino, a excepción que los iniciadores de *SRY* de bovino fueron reemplazados por iniciadores específicos de *SRY* de porcino, en el que se obtuvieron resultados favorables para la determinación sexual.

➤ ZFY/ZFX

El gen *ZFY* por estar presente en el cromosoma Y (Figura 2) y por tener un homólogo (región pseudoautosómica) en el cromosoma X (gen *ZFX*), se ha utilizado en ensayos para

determinar el sexo en diferentes especies, como lo realizaron Kunieda *et al.* (1992) que determinaron el sexo de embriones preimplantados de ratón, a través de la detección de los genes *SRY* y *ZFY* por medio de PCR, utilizando el locus *DXNd3* (microsatélite polimórfico localizado en el cromosoma Y del ratón) como una secuencia control de amplificación. Para esto, diseñaron un par de iniciadores de oligonucleótidos para *SRY*, *ZFY* y para *DXNd3*. El ADN templado fue obtenido de biopsias de dos blastómeros de cada embrión evaluado, siendo que un blastómero fue sujeto a cariotipificación y el otro fue sujeto a la amplificación por PCR. Los resultados del ensayo fueron considerados de gran sensibilidad para el sexado de embriones de ratón. Todos los embriones fueron tipificados, correspondiendo el sexo a la presencia del cromosoma Y. El tiempo del ensayo fue aproximadamente de 10 h.

En bovinos, los ensayos se realizaron inicialmente por Aasen y Medrano (1990), determinando el sexo en embriones de bovino con la amplificación específica de una región de *ZFX* y *XFY*. Después, Kirkpatrick y Monson (1993) desarrollaron un método rápido y sensible para la determinación del sexo en biopsias de embriones por duplicado de 2 a 8 células, con el uso de PCR anidado para la amplificación de alelos específicos de *ZFX* y de *ZFY* de bovino. En este estudio se examinó la factibilidad de la PCR para determinar el sexo, utilizando la combinación de iniciadores anidados y alelos específicos de *ZFX/ZFY*, considerando diminutas cantidades de ADN, tales como las cantidades encontradas en gametos individuales u obtenidas de biopsias embrionarias. Sin embargo, los resultados demostraron que la amplificación en estos casos, es generalmente complicada por cambios dramáticos en las concentraciones del templado de ADN, relativos para las concentraciones de los iniciadores y reactivos para la reacción. De 20 embriones biopsiados, 18 fueron transferidos a hembras receptoras corroborando el sexo fetal por ultrasonido alrededor de los 60 días de gestación, y de estos solo 12 llegaron al término de la gestación, siendo el sexo preciso en 11 casos. El tiempo requerido para realizar el ensayo se disminuyó a 9 horas, aunque mencionan que al mejorar el protocolo se puede reducir entre 6 y 7 h.

Por otra parte, el par de iniciadores para *ZFY/ZFX* ha sido utilizado como control de amplificación, como lo realizado por Pomp *et al.* (1995) que desarrollaron un método para determinar el sexo de embriones completos de 10 y 11 días de edad de cerdos, utilizando *SRY* para el diagnóstico del sexo por PCR. El diagnóstico se realizó utilizando iniciadores para estas secuencias (*ZFY/ZFX* + *SRY*) en una sola reacción de PCR. La determinación del sexo se llevó con éxito; además de la

determinación exitosa en otras especies probadas como bovinos, caprinos, ovinos, llamas, perros, equinos, gatos y en el humano. El sexado se llevó a cabo aproximadamente en 6 h.

Más tarde, Frásch y Ugalde (1996) determinaron el sexo de biopsias de 8 a 12 células de embriones de bovino en etapa de blástula por PCR. Para aumentar el grado de sensibilidad del diagnóstico utilizaron un primer par de iniciadores para la amplificación del segmento original entre *ZFX/ZFY* en una primera reacción; una segunda amplificación con el uso de un par de iniciadores anidados para proporcionar un segundo fragmento interno para el primer fragmento amplificado y adicionalmente utilizaron la enzima de restricción *PstI* que es capaz de cortar el segundo fragmento amplificado del ADN del cromosoma sexual, cuando es un cromosoma Y, y no es capaz de cortar cuando es un cromosoma X. Con este ensayo, se obtuvo una alta sensibilidad para el diagnóstico del sexo; sin embargo el método resultó ser complicado y de largo tiempo.

En ovinos, Gutiérrez-Adán *et al.* (1997) reportaron un método para el diagnóstico del sexo usando biopsias de embriones de 6 días de edad y utilizando el método de RAPD-PCR. Para esto, se utilizó un dúplex con un par de iniciadores que amplifican un ADN polimórfico (RAPD) del *locus UcdO43* que es específico del cromosoma Y del ovino, y un par de iniciadores para la amplificación del fragmento de *ZFX/ZFY* como un control interno positivo de amplificación y como un medio para confirmar los resultados obtenidos con el primer marcador. El ensayo resultó ser preciso con base a la comparación de los resultados con *ZFX/ZFY*, sensible y rápido con un tiempo de diagnóstico menor a 3 h. Los mismos autores confirmaron que el marcador RAPD *UcdO43* se encuentra en el cromosoma Y de ovinos, siendo convertido como un marcador para hibridación *in situ*, y debido a esta ventaja fue utilizado para el diagnóstico del sexo. Por lo que el uso de marcadores RAPDs en animales domésticos, representa una importante aplicación para construir mapas genéticos.

1.4.3. SECUENCIAS DE ADN DE COPIA REPETIDA DEL CROMOSOMA Y

Las primeras secuencias de ADN repetidas específicas del cromosoma Y fueron aisladas en el humano por Cooke (1976) y años más adelante en ratón, bovino, ovino y porcino como lo menciona Miller en 1991. En 1978, se argumentó que los genes específicos de Y responsables para la determinación del macho podrían ser "inmunes" a la recombinación y que las secuencias de ADN circundantes aisladas del resto del genoma podrían duplicarse a sí mismas (Lucchesi, 1978).

Consecutivamente, Deininger y Schmid (1979) mencionan que las secuencias repetidas como un grupo presente en primates diverge más rápidamente que las secuencias de copia única, sugiriendo que durante la replicación, estas secuencias pueden ser separadas para dirigir la acumulación de repeticiones específicas de especie, asociadas únicamente con el cromosoma Y.

En 1982, Page *et al.* aislaron de una biblioteca genómica del hombre, una secuencia de copia única derivada de sitios homólogos sobre los cromosomas X y Y. Con base a esto, más adelante Bishop *et al.* (1983) describieron la primera secuencia específica de Y no repetida en el humano. Años después, varias secuencias repetidas específicas del cromosoma Y fueron encontradas en un bajo número de copias. Baron *et al.* (1986) obtuvieron varias secuencias específicas del cromosoma Y de ratón purificadas por citometría de flujo. Con esto, Smith *et al.* (1987) mencionan que algunos genes están presentes en regiones particulares de Y de mamíferos, incluyendo el de humano, e indicando que una gran parte del cromosoma Y está compuesto por secuencias repetidas no funcionales. En 1988, Reed y Matthews mencionan que las secuencias se encuentran en forma repetida con cierto grado de variación, siendo un número de repeticiones que difieren entre individuos no relacionados, y siendo también capaces de ser transmisibles o heredables.

Las secuencias de ADN repetidas son consideradas como componentes poderosos de los genomas de mamíferos y han sido estudiadas extensivamente en el humano (Kunkel *et al.*, 1976; Tyler-Smith and Brown, 1987). La localización cromosómica ha sido investigada por hibridación *in situ*, demostrando que una gran proporción de satélites del humano está localizada en regiones heterocromáticas constitutivas y que predominan sobre el cromosoma Y. El análisis de enzimas de restricción y de secuenciación han sido usadas para determinar la estructura de estas secuencias repetidas. El análisis de secuencias repetidas específicas de especie ha sido de interés en estudios de la evolución del genoma, como en estudios realizados en humanos donde se les ha encontrado una aplicación práctica en el diagnóstico fetal o en el sexado de embriones donde existe un riesgo de enfermedades ligadas al cromosoma X (Handyside *et al.*, 1989).

Específicamente, para el diagnóstico sexual prenatal se han empleado procedimientos tales como hibridación *in situ* de células en interfase (Pinkel *et al.*, 1986) y la PCR que ha mejorado la sensibilidad en el diagnóstico para una o para muy pocas células de embriones preimplantados en etapa de blastocisto (Handyside *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1988). Además, Cotinot *et al.* (1991) mencionan que las secuencias repetidas usadas como sondas moleculares, proveen marcadores

útiles para el estudio de la organización y evolución del cromosoma Y en animales domésticos, y que pueden ser útiles para el diagnóstico sexual de espermatozoides, embriones y fetos. Por lo que, la predeterminación del sexo genético representa un valor importante en especies de producción (Bondioli, 1992).

➤ BC1.2

Es una secuencia de ADN por naturaleza repetitiva y específica del cromosoma Y bovino. Popescu *et al.* (1988) por hibridación *in situ* encontraron la presencia de 711 señales, dentro de las cuales: 139 (19.5%) se encontraban agrupadas sobre todo el cromosoma Y y cerca del 71% fueron localizadas únicamente sobre el brazo corto del cromosoma Y; presentándose entre 2,000 y 2,500 copias por genoma sobre Y de 54 pb, específicamente en Yp de *Bos taurus*. Por lo que concluyeron estos autores que BC1.2 podría ser útil para el sexado de embriones en conexión con la transferencia embrionaria. Esto fue corroborado después por Bondioli *et al.* (1989) que además mencionan que BC1.2 es completamente específico del macho bovino.

Para obtener sondas derivadas de Y de bovino, Cotinot *et al.* (1991) construyeron una biblioteca genómica de plásmido de bovino enriquecida para secuencias de ADN específicas de Y por un método de delección. Los clones resultantes fueron analizados por hibridación para un Southern blot de ADN genómico de macho y hembra. De 200 clones probados, sólo BC1.2 y BC1.34 fueron completamente específicos de macho, seis daban patrones diferenciales de hibridación macho-hembra y la permanente reacción similarmente con ADN de macho y hembra. Los estudios de células somáticas híbridas interespecie y la hibridación *in situ* cromosómica confirman que la secuencia de BC1.2 fue derivada del cromosoma Y. No se reveló polimorfismo en las enzimas de restricción utilizadas (*PvuII*, *RsaI*, *HaeIII* y *BamHI*), sugiriendo una conservación en el sitio enzimático dentro de los bloques de repetición. El estudio evolutivo demostró que BC1.2 es una secuencia conservada en los géneros de *Bos* y *Bison*, y específica del macho. Además, mencionan que la distribución de las señales no está restringida en Yp, y BC1.2 también se puede encontrar sobre la región distal de Yq, como anteriormente lo demostraron Popescu *et al.* (1988). Por lo que, Cotinot *et al.* (1991) concluyen que la sonda BC1.2 es específica de *Bos* y *Bison*. Asimismo, mencionan que las 2,000 a 2,500 copias de cualquier BC1.2 pueden estar organizadas como un

satélite (ej. repetición en tandem, pueden ser entremezcladas o la combinación de ambos). Siendo que los fragmentos comparten altos niveles de homología, aunque no se excluye la posibilidad de presentarse otras repeticiones con homología más débiles.

Schwerin *et al.* (1991a) y Schwerin *et al.* (1992) también mencionan que las copias de la secuencia de BC1.2 representan el 2.5% del total del genoma del macho, indicando que BC1.2 se encuentra en el cromosoma Y de *B. taurus*, siendo un 38.9% en la región Yp13, indicando una gran acumulación próxima al telómero Yp; mientras que en *B. indicus*, el 89% está localizado sobre la parte media distal, con una gran acumulación en el telómero del cromosoma Y acrocéntrico (Figura 3).

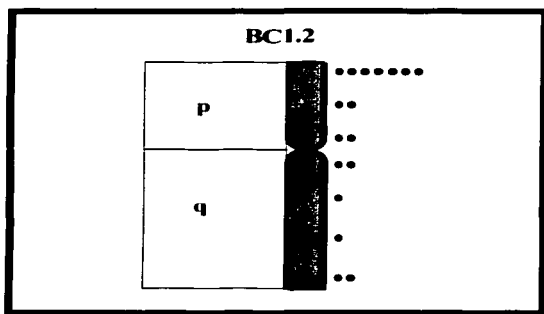


Figura 3. LOCALIZACIÓN DE BC1.2 EN EL CROMOSOMA Y BOVINO (*Bos taurus*). Indicando los puntos externos la presencia de BC1.2 de acuerdo a pruebas de hibridación *in situ* (Schwerin *et al.* 1991a; Schwerin *et al.* 1992).

Además, Schwerin *et al.* (1992) reportan que el producto de BC1.2 es de 250 pb en lugar de lo esperado de 49 pb, como lo demostraron en un estudio anterior, donde indicaron que el producto de 250 pb consiste de un fragmento de ADN bovino de 150 pb flanqueado por dos fragmentos de 49 pb, de acuerdo a un análisis de RFLPs usando las enzimas de restricción *StyI* y *Avall* que presentaron sitios de restricción en el fragmento de BC1.2 (Schwerin *et al.*, 1991b). Los mismos autores indican que la distribución regional de la secuencia de BC1.2 es útil para análisis citogenéticos comparativos del cromosoma Y de Bóvidos. A parte de que puede ser de gran utilidad para el diagnóstico del sexo en embriones preimplantados, específicamente de bovino.

Por otra parte, Schwerin *et al.* (1992) al evaluar individuos dentro de la subfamilia *Bovidae* se observó una señal en los géneros *Bos* y *Bison*, pero no con *Bubalu bubalis* y *Bubalu caffer*, sugiriendo una posible divergencia evolutiva entre estas especies. Al presentarse una señal más baja en *Bos taurus* y *Bos indicus* o *Bison*, podría indicar un número menor de copias de una secuencia relacionada a BC1.2 o la presencia de secuencias modificadas con respecto a *B. taurus*; además de denotar que morfológicamente el cromosoma Y de *B. taurus* y de *B. indicus* difieren morfológicamente, siendo submetacéntrico y acrocéntrico, respectivamente. En conclusión, los autores mencionan que la especificidad en el macho y la naturaleza repetida de la secuencia de BC1.2 es un requisito primordial para su uso como una sonda molecular para el diagnóstico del sexo en bovinos.

Con base a lo anterior, Setiabudi y Gustavsson (1991) realizaron ensayos para determinar el sexo en bovinos por medio de hibridación *in situ*, utilizando como sonda radiactiva BC1.2. Los resultados presentaron una señal únicamente en embriones macho, indicando que BC1.2 presenta un alto número de copias, por ser una secuencia repetida, como también fue indicado en ensayos realizados por Bondioli *et al.* (1989).

Asimismo, Setiabudi y Gustavsson (1991) realizaron ensayos con PCR, utilizando células trofoblásticas, un par de iniciadores para la amplificación de BC1.2 y simultáneamente un par de iniciadores para una secuencia autosomal conocida para eliminar resultados negativos, debido a la ausencia de material celular. Los resultados indicaron que de una a tres células son necesarias para determinar el diagnóstico sexual, mencionando que se pueden tener desventajas al utilizar cantidades mínimas de células, debido a la posibilidad de contaminantes y problemas para obtener el ADN blanco. Sin embargo, los mismos autores mencionan que la técnica de hibridación *in situ* puede tener un uso práctico para el sexado, aunque se debe de considerar que el tiempo para llevarse a cabo fue alrededor de 7 h.

Thomsen *et al.* (1991) también desarrollaron un método por hibridación *in situ* utilizando como sonda BC1.2 para proveer un método preciso para determinar el sexo en embriones de bovino, usando de 4 a 20 células embrionarias obtenidas de embriones de 6 a 7 días de edad. Las células obtenidas fueron cultivadas, fijadas, teñidas y posteriormente hibridadas. De acuerdo a los resultados obtenidos se presentó una eficiencia alta para el sexado de embriones de bovino. Sin embargo, los mismos autores mencionan que este método es considerado como inferior a la técnica de PCR, ya

que para el sexado de embriones por el método de hibridación *in situ*, se requiere de 12 a 16 h y de 1 a 6 días para presentar el diagnóstico del sexo.

Kobayashi *et al.* (1998) utilizaron la secuencia de BC1.2 como sonda molecular en la técnica de FISH, obteniendo una alta precisión en el sexado de embriones utilizando un número pequeño de células embrionarias. Además mencionan que la técnica desarrollada, puede detectar el quimerismo de freemartin (hembra bovina gemelar con un macho), y simultáneamente la detección de aberraciones cromosómicas.

➤ **BOV97**

Miller y Koopman (1990) aislaron dos secuencias repetidas específicas de Y que presentan un número menor de copias, siendo éstas: BOV97 (ó llamada también BOV97M) y BOV35M. Estas dos secuencias, se estima que están presentes entre un rango de 1 a 5 copias por genoma haploide. Miller y Koopman, también mencionan que BOV97M contiene un marco abierto de lectura, presentando la posibilidad de que podría codificar para una proteína. Además, se demuestra que BOV97M presenta una hibridación cruzada con ovinos y caprinos, lo cual es notable ya que a través de la línea evolutiva, han sido conservados entre subfamilias: Bovinae (bovino) y Caprinae (ovino y caprino) por algunos 15 - 20 millones de años (Appa Rao *et al.*, 1993).

Hochman *et al.* (1996) realizaron sexado de embriones de bovino por PCR, utilizando iniciadores para la amplificación de BOV97M, BRY.1 (secuencia repetida del cromosoma Y) y ZFX/ZFY. Para esto, utilizaron embriones en etapa de blastocisto divididos en cuatro partes; además utilizaron un análisis múltiple de genotipificación en los mismos embriones. Específicamente con relación al sexado, encontraron que la precisión fue del 87% al utilizar BRY.1, 97% con ZFX/ZFY y el 100% con BOV97M. Estos autores llegaron a la conclusión de que el uso combinado de los *Loci* BOV97 y ZFX/ZFY, resulta ser un procedimiento altamente seguro para el sexado de embriones.

Posteriormente, Park *et al.* (2001) por medio de PCR diagnosticaron el sexo de embriones de bovino en etapa de 8 a 16 células, utilizando iniciadores para BOV97 y para la secuencia satélite 1.715 que fue utilizada como control de amplificación para muestras embrionarias de hembra. Los resultados mostraron una eficiencia de sexado de 100, 96.3, 94.3 y del 92.1% para muestras embrionarias de 8, 4, 2 y 1 blastómeros respectivamente. No encontraron diferencias significativas ($p > 0.2$) al utilizar

biopsias embrionarias o embriones intactos; sugiriendo también que al obtener las biopsias el trauma es muy pequeño para el embrión.

➤ BRY.1

BRY.1 es una secuencia repetida específica de Y de bovino de 307 nucleótidos en bovinos, dentro de la cual los primeros 237 fueron descubiertos inicialmente por Reed *et al.* (1988). BRY.1 incluye variantes donde algunos nucleótidos han sido substituidos o eliminados. Tales variantes como las variaciones de hibridación, específicamente con todo o parte de la secuencia diverge no más del 25% de la misma. Estas variaciones pueden ocurrir de forma natural por variaciones alélicas que ocurren dentro de una población de individuos a causa de mutaciones puntuales, eliminadas o insertadas de secuencias de ADN. Alternativamente, estas variaciones pueden ser producidas artificialmente, debido a sitios dirigidos de mutagénesis, fragmentos de ADN substituidos por la utilización de endonucleasas (enzimas de restricción) o por la adición de secuencias de ADN por porciones de ligación (Reed *et al.*, 1988).

Por las características de los oligonucleótidos que amplifican la secuencia de BRY.1, son iniciadores que también pueden ser utilizados para detectar grandes o menores variaciones de la secuencia de BRY.1 entre individuos, tales análisis son de utilidad en pruebas de paternidad. El esperma también puede ser probado con un ácido nucleico aislado de la misma naturaleza, particularmente el esperma enriquecido por el contenido de cromosoma Y (Reed *et al.*, 1988).

Más adelante, Matthews y Reed (1991) reportan el aislamiento y caracterización de un fragmento Sau3AI de 307 pb del cromosoma Y del bovino. Encontrando que una simple copia homóloga está presente en el genoma del bovino hembra; y por otra parte, en el bovino macho se encontró que dicha secuencia se encontraba de forma repetitiva en una moderada y variable frecuencia, siendo asignada como secuencia repetida de bovino asociada a Y.

BRY.1 es una secuencia cuantitativamente polimórfica que se encuentra presente entre 10 y 50 copias en todos los machos. Matthews y Reed (1991) también indican que el mismo patrón ocurre en ovinos y caprinos, y en cantidades iguales en ambos sexos de ciervos y cerdos aproximadamente en una única copia. Esto sugiere que la conservación de la secuencia data de millones de años y su

exclusividad repetida sobre el cromosoma Y *Bovidae* levanta interés en los cuestionamientos concernientes al origen, evolución y una posible función inusual de este elemento.

El aislamiento de BRY.1 como una secuencia repetida, presumiblemente se le considera como una secuencia no codificante, conservada a través de una distancia evolutiva de 15 a 20 millones de años y que ha permanecido confinada largamente a un único cromosoma, probablemente puede presentar problemas especiales en el entendimiento de los mecanismos de su evolución y permanencia. Debido a esto, y a que BRY.1 tiene homología para secuencias repetidas sobre el cromosoma Y de ovinos y caprinos, y para ambos sexos de ciervos y porcinos, BRY.1 fue usada como una sonda para aislar un fago recombinante conteniendo ADN de bovino (λ EMBL3A) con base al fragmento Sau3AI de 307 pb, previamente clonado por Matthews y Reed en 1991. Demostrando que el inserto no presentó un patrón específico del sexo por hibridación del ADN de bovino en Southern blot. Los subclones del fago demostraron que el fragmento tiene un origen cromosomal de Y. Además, se estimó que el 40% del cromosoma Y del ganado bovino está compuesto por secuencias repetidas relacionadas a estos fragmentos subclonados. Las secuencias de estos subclones son específicas del macho (BRY.2 y BRY.3) bovino, y también en machos de ovinos, caprinos y ciervos. La comparación homóloga en bovinos y en ovinos de estas secuencias, revela que la mayoría de amplificaciones ocurren sobre el cromosoma Y del bovino, que sobre el cromosoma Y de ovinos. Una aparente inserción de las secuencias dentro de las secuencias específicas de Y de bovino es relativa a homólogos en los ovinos, sugiriendo posibles mecanismos para la evolución del cromosoma Y de artiodáctilos (Matthews and Reed, 1992).

Por otra parte, en un estudio realizado por Schwerin *et al.* (1991a) y Schwerin *et al.* (1992) mencionan que BRY.1 representa el 5% del total del genoma del macho. Las repeticiones de esta secuencia se encuentran distribuidas a lo largo del cromosoma Y, pero específicamente el 46.2% está localizado entre Yp11... q12, indicando una gran acumulación sobre la región céntrica del cromosoma Y de *B. taurus* (Figura 4). Además, mencionan que debido a la combinación de la especificidad en el macho y la amplia distribución sobre el cromosoma Y, la secuencia de BRY.1 puede ser útil como una herramienta para aislar nuevas secuencias de ADN específicas de macho. Sumado a lo anterior, Reed *et al.* (1995) mencionan el aislamiento de BRY.1 como una secuencia específica del cromosoma Y y universalmente conservada entre rumiantes, con ciertos grados de

variación, con un número repetido que difiere entre individuos no relacionados y con una estabilidad heredable.

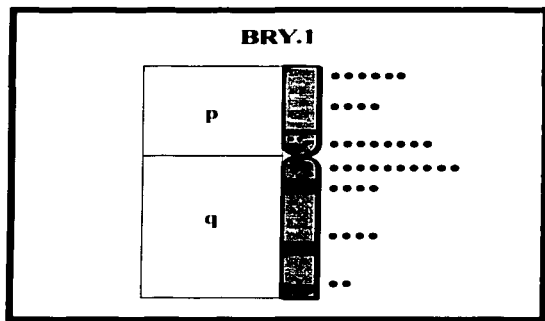


FIGURA 4. LOCALIZACIÓN DE BRY.1 EN EL CROMOSOMA Y BOVINO (*Bos taurus*). Indicando los puntos externos la presencia de BRY.1 de acuerdo a pruebas de hibridación *in situ* (Schwerin *et al.*, 1991a; Schwerin *et al.*, 1992).

Con relación a la aplicación de BRY, varios autores han utilizado esta secuencia como una herramienta para el sexado de embriones de bovino. Bredbacka *et al.* (1991) utilizaron embriones intactos o biopsiados en etapa de mórula o de blastocisto para evaluar la precisión y eficiencia de BRY.1 por PCR. Para esto, emplearon un par de iniciadores derivados de BRY.1, conjuntamente con un par de iniciadores derivados del gen de la hormona del crecimiento de bovino como un control de amplificación. Los resultados de amplificación no fueron satisfactorios debido a las concentraciones utilizadas en la reacción y al tiempo requerido para el diagnóstico que fue de 5 a 8 h.

Más tarde, Appa Rao *et al.* (1993) señalan que la secuencia de BRY.1 puede ser utilizada para el diagnóstico del sexo por PCR en biopsias de blastocistos de *Bubalu bubalis* obtenidos por FIV, además de utilizar la secuencia satélite 1.715 como control de amplificación para embriones de hembra. Se demostró un patrón específico del sexo, no difiriendo de la proporción del sexo 1:1 con una precisión del 100%, pero el intervalo de tiempo entre la biopsia embrionaria hasta el diagnóstico del sexo de cada muestra obtenida fue alrededor de 12 h.

Además, Appa Rao *et al.* (1994) mencionan que las secuencias específicas del cromosoma Y y la secuencia autosomal (1.715) son altamente conservadas durante la línea evolutiva. También refieren que los resultados, aparentemente demuestran que BRY.1, BRY4.a y BOV97M son secuencias también conservadas en el búfalo. Con esto, indican que el alto grado de conservación de diferentes secuencias del cromosoma Y en la familia *Bovidae* se encuentran en un área de Y que está protegida de un cambio rápido, quizá debido a una asociación con elementos cruciales para la fertilidad del macho, como lo indican Mathews y Reed (1991). También, Appa Rao *et al.* (1994) indican que la precisión selectiva para la permanencia de segmentos de secuencias repetidas, puede deberse cuando una de estas secuencias está ligada a un *loci* sujeto a una selección positiva. Al sugerir Appa Rao *et al.* (1994) la existencia de un homólogo de BRY.1 en búfalos, Appa Rao y Totey (1999) desarrollaron un método para evaluar la sensibilidad del diagnóstico del sexo por PCR, utilizando embriones preimplantados de búfalo de la India, un par de iniciadores para BRY.1 y un par de iniciadores anidados para BuRYN.1 y un multiplex (BuRYN.1 y ZFX/ZFY). Los iniciadores para BRY.1 y BuRYN.1 fueron el blanco para la amplificación de secuencias específicas de Y, y el *loci* ZFX/ZFY fue amplificado para ser usado como control positivo en las muestras de hembras y machos. La precisión del ensayo fue inicialmente verificada con ADN genómico obtenido de sangre de animales de sexo conocido. Con esto, se prosiguió a examinar el ensayo de sensibilidad y reproductividad, usando ADN obtenido de 1 a 2 blastómeros de embriones bipartidos. Un total de 80 embriones fueron obtenidos por FIV, alcanzando su desarrollo en etapa de blastocisto, desde 2 a 4 células que fueron usadas para el diagnóstico sexual. Las señales claras y definitivas por amplificación por PCR fueron obtenidas de todas las muestras de embriones. La exactitud del ensayo fue determinada, comparando los resultados de una simple célula con aquellos embriones en etapa de blastocisto. Con esto, se indicó que 1 o 2 blastómeros obtenidos de embriones preimplantados de búfalo son suficientes para diagnosticar el sexo por PCR, sugiriendo el desarrollo de un método con alta seguridad.

Por otra parte, los mismos autores clonaron y secuenciaron la secuencia repetida de ADN (BuRYN.1) específica del cromosoma Y de búfalo, confirmando por Southern blot la identidad del fragmento amplificado. Las amplificaciones del macho (BuRY.1) fueron también observadas en otras especies de la familia *Bovidae*, tales como bovino, ovino y caprino. Por lo tanto, de acuerdo a la señal observada, se ha sugerido que la secuencia de BuRY.1 del genoma del búfalo, no es

completamente homóloga con la secuencia de BRY.1; ya que con la clonación y secuenciación de BuRY.1 se reveló que tiene un 88% de homología con BRY.1, detectando 36 puntos de mutación (28 sustituciones y 4 adiciones) en la secuencia de BRY.1 de 301 pb.

En el caso de bovinos, Macháty *et al.* (1993) al utilizar los iniciadores para BRY.1 y 1.715 en la técnica de PCR y biopsias de un sólo blastómero de embriones en etapa de 16 a 32 células obtenidos por FIV, indican una alta precisión en el diagnóstico del sexo en un intervalo de tiempo de 5 h.

➤ LAMBDAES6.0

LambdaES6.0 conjuntamente con ES5 y ES8 son fragmentos repetidos específicos del cromosoma Y con 2,600, 600 y 20 copias respectivamente (Ellis and Harpold, 1986; Ellis *et al.*, 1988; Bondioli *et al.*, 1989). De acuerdo a la caracterización de LambdaES6.0, Schwerin *et al.* (1992) indicaron que es una secuencia de ADN específica del cromosoma Y bovino y por naturaleza repetitiva, representando el 5.5% del total del genoma bovino que se encuentra distribuida a lo largo del cromosoma Y, pero específicamente en *B. taurus* se encontró que el 70.8% se encuentra en Yp13--12, indicando una gran acumulación en la parte media distal (Figura 5).

También, Schwerin *et al.* (1992) indican que BRY.1 en *B. indicus* se encuentra en un 81% en la parte media distal, indicando una gran acumulación en el telómero del cromosoma Y. Además, dichos autores mencionan que LambdaES6.0 es útil para realizar ensayos de análisis citogenéticos comparativos del cromosoma Y de Bóvidos. Como por ejemplo, el uso de sondas conjuntamente con BC1.2 y de BRY.1 para estudios comparativos de los cromosomas Y de *B. taurus* y *B. indicus*.

Ellis y Harpold (1986) proporcionaron sondas de hibridación que tienen secuencias complementarias para secuencias de segmentos de ADN específico de bovino macho (principalmente LambdaES6.0), con el objeto de sexar embriones. De esta manera, desarrollaron un método suficientemente sensible y confiable al 100% para determinar el sexo en bovinos con 10^4 células embrionarias, teniendo un tiempo de diagnóstico alrededor de 3 días.

Con base a lo anterior, Leonard *et al.* (1987) determinaron el sexo de embriones de bovino, utilizando biopsias de 10 a 20 células trofoblásticas que fueron fijadas y preparadas para hibridación

in situ, utilizando LambdaES6.0 como sonda de ADN. La ocurrencia del sexado fue alrededor del 95%. Sin embargo, el desarrollo metodológico fue alrededor de 3 días.

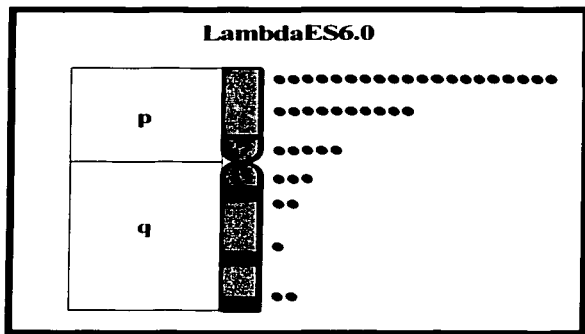


FIGURA 5. LOCALIZACIÓN DE LAMBDAES6.0 EN EL CROMOSOMA Y BOVINO (*Bos taurus*). Indicando los puntos externos la presencia de LambdaES6.0 de acuerdo a pruebas de hibridación *in situ* (Schwerin *et al.*, 1992).

1.4.4. SECUENCIA DE ADN MICROSATÉLITE (TG)_n DEL CROMOSOMA Y

Perret *et al.* (1990) hibridaron una sonda minisatélite de ratón para ADN de macho y hembra de bovino con enzimas de restricción *HaeIII*, *HinI* y *MboI*. Ellos observaron que el ADN de la hembra daba una banda de 3 kb en la parte ascendente, bandas reminiscentes de una huella de ADN que le correspondía a una huella del macho; y el ADN del macho fue completamente cubierto por una fuerte señal. Las secuencias responsables para estos patrones de hibridación específicos de macho fueron subsecuentemente aisladas. Una clona llamada *bt* DYZ-1 fue completamente caracterizada. Se demostró que esta clona contiene 17 repeticiones en tandem de una secuencia que consiste de una unidad de 40 pb separadas de la repetición próxima por una secuencia de (TG)_n, variando de 12 a 63 pb. La unidad de 40 pb demuestra una divergencia (separación) del 27% entre repeticiones. Posteriormente, se utilizó esta clona para experimentos de hibridación específicos del macho donde Kashi *et al.* (1990) consideraron que la secuencia microsatélite (TG)_n presenta una distribución diferencial en los ADNs de macho y hembra de bovino; ya que el ADN de hembra restringido

presenta 4 cortes por *HaeIII*, existiendo sólo fragmentos ocasionales de 3 kb; sin embargo, el ADN del macho contiene tales secuencias en abundancia. Perret *et al.* (1990) llegaron a la conclusión, que *bt* DYZ-1 es un microsatélite rico en (GT)_n, presente en repeticiones en tandem con 60,000 copias localizado en la región pericéntrica del cromosoma Y bovino Yp12.

1.5. SECUENCIAS DE ADN SATÉLITE AUTOSÓMICAS EN EL BOVINO EMPLEADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL SEXO

Los ADNs satélite comprenden una fracción grande del genoma de muchos eucariotes. En algunos ADNs satélite, las unidades repetidas son muy similares o idénticas por una gran extensión de ADN (Pech *et al.*, 1979). Streeck (1981) menciona que de las varias clases de secuencias repetidas en eucariotes, los componentes altamente repetidos - conocidos como satélites de ADN - son secuencias que se encuentran desde miles a millones de copias de secuencias repetidas en tandem, que difieren principalmente en cambios de una sola base. Por ser secuencias repetidas, presentan mutaciones que guardan distribuciones de forma de racimo y no aleatoria en copias adyacentes. Las unidades repetidas, están frecuentemente compuestas por unidades repetidas cortas de un proceso de amplificación durante la evolución de estos ADNs.

Con el análisis de secuencias de ADN satélites, Modi *et al.* (1996) mencionan el proceso evolutivo de mamíferos, principalmente del orden Artiodactyla que representa uno de los eventos más importantes evolutivamente en un gran número de mamíferos en el mundo. Aproximadamente se han descrito 275 especies, presentando una distribución cosmopolita en todas partes, excepto en Australia y en la Antártica. Además, un conjunto importante de fósiles para este grupo existente, revela una diversidad evolutiva muy extensa a través de tiempos históricos. Los ejemplos de familias incluyen agrupaciones de antílopes y gacelas de la Sabana Africana, cabras del occidente de Norte América, hipopótamos acuáticos del África Central y llamas de la región Andeana, entre otros. Estos animales son extremadamente diversos morfológica, ecológica y ambientalmente; y como resultado, tienen especial atención en estudios de todas las áreas de historia natural, ecología y en la biología evolutiva. Muchos de éstos animales son también muy importantes en la agricultura como resultado de la reciente destrucción de hábitat y de la intrusión por el hombre.

Específicamente en bovinos, Pech *et al.* (1979) mencionan que en el genoma bovino existen 8 ADN_s satélite y varios componentes repetidos menores, comprendiendo un total del 27% del ADN. Estos incluyen satélites formados en tandem. Un ejemplo son: 1.709 (Skowronski *et al.*, 1984) y 1.715 (Gaillard *et al.*, 1981; Plucienniczak *et al.*, 1982; Taparowsky and Gerbi, 1982). Estas familias son altamente complejas en estructura, variando en el número de copias y colectivamente comprenden cerca de una cuarta parte del genoma del bovino.

La importancia de las secuencias de ADN_s satélite radica en su utilización en estudios dirigidos para:

- a) Conocer las diferentes repeticiones que son evolutivamente conservadas y reconstrucciones filogenéticas entre y dentro de especies (Modi *et al.*, 1996); y
- b) Aplicadas en la técnica de PCR como una herramienta adicional en el diagnóstico del sexo.

➤ **1.709**

Es una secuencia de ADN satélite (Skowronski *et al.*, 1984). Por Southern blot se demostró que el satélite 1.709 de bovino se encuentra organizado en tandem de 3.8 Kb, donde los monómeros individuales se encuentran estructurados en mosaico (Modi *et al.*, 1996).

Se ha utilizado la amplificación de ADN satélite 1.709 de bovino para la identificación del origen de carne (congelada o autoclaveada). La especificidad de la prueba demostró que este método es positivo al utilizar hasta 0.32 pg de ADN obtenido de carne de bovino y Yak; pero negativo para equinos, ovinos, caprinos, camello, cerdo, ciervo y ratones (Guoli *et al.*, 1999).

➤ **1.715**

Es una secuencia de ADN satélite autosómica presente en hembras y machos de bovino y en otras especies de rumiantes (Plucienniczak *et al.*, 1982). Por Southern blot se demostró que la familia repetida de 1.715 está organizada en forma de monómeros de 1.4 kb, conteniendo variantes

imperfectas de 31 pb en el genoma del bovino doméstico, manifestando un alto grado de conservación evolutiva con un común ancestral alrededor de 2 - 4 millones de años y preferentemente distribuida en centrómeros de autosomas acrocéntricos (Modi *et al.*, 1996).

Por ser una secuencia satélite y autosomal, 1.715 ha sido utilizada como un apoyo en métodos para determinar el sexo de embriones preimplantados en bovinos, como el realizado por Peura *et al.* (1991) utilizando la técnica de PCR. Para el diagnóstico utilizaron dos pares de iniciadores que reconocían secuencias específicas del cromosoma Y bovino (BRY.1 y BRY4a) y un par de iniciadores que reconocían la secuencia satélite 1.715. Siendo esta última, utilizada como un control positivo de amplificación para hembras, ya que los primeros pares de iniciadores sólo reconocen secuencias únicamente presentes en el cromosoma Y (machos). Para el ensayo se utilizaron embriones bipartidos en etapa de blastocisto. Con este método se obtuvieron resultados satisfactorios para el sexado de embriones al utilizar el satélite 1.715 como un control de amplificación.

Por otra parte, al realizar Peura *et al.* (1991) una serie de diluciones, estas revelaron que el ADN satélite está repetido de 100 a 1,000 tiempos más que las secuencias de BRY4a y BRY.1. Por lo que, en caso de existir una pequeña muestra, el ADN satélite puede ser amplificado más efectivamente que las secuencias específicas del macho. Esto ha sido corroborado en otros estudios, donde el ADN satélite 1.715 ha sido utilizado como un control de amplificación para el sexado de embriones en otras especies como *B. bubalis* (Appa Rao *et al.*, 1993).

1.6. TÉCNICAS UTILIZADAS PARA EL DIAGNÓSTICO DEL SEXO

1.6.1. TÉCNICA CITOLÓGICA

Un primer método para el sexado de embriones fue a nivel citológico, donde se examinaron células de blastocistos de conejo de 55 días para la detección del cuerpo de Barr (Gardner and Edwards, 1968). Una biopsia contenía de 200 a 300 células que fueron tomadas con la ayuda de un micromanipulador. Las células fueron fijadas y teñidas sobre un portaobjetos con acetato de orceína 1%, examinadas dentro de pocos minutos y marcadas para la presencia o ausencia del cuerpo de

Barr. De los 109 blastocistos, sexados y transferidos, 18 sobrevivieron al término de la gestación. Por lo tanto, la técnica fue altamente segura para realizar el diagnóstico del sexo, aunque el porcentaje de sobrevivencia embrionaria fue relativamente baja.

En 1976, Hare *et al.* utilizaron un método por el cual fueron removidas células trofoblásticas de embriones de bovino de 14 y 15 días de edad y preparadas para evaluar los cromosomas sexuales, obteniendo resultados poco satisfactorios en la precisión del método, ya que sólo el 58% de los embriones pudieron ser sexados con certeza, el 8.8% con resultados ambiguos y el 32.4% de los embriones no fue posible realizarles el sexado.

El refinamiento del procedimiento anterior, incluyó la remoción de pocas células a partir de mórulas para el análisis de los cromosomas sexuales. La seguridad del sexado por la remoción de 8 a 17 células fue de 30 a 60% (Singh and Hare, 1980). Sin embargo, este tipo de procedimiento no puede ser aplicable a embriones de todos los animales domésticos, debido a la naturaleza granular del citoplasma con un material nuclear oscuro, de este modo, hace difícil la identificación del cromosoma X inactivo (Rowson, 1974). Además, King (1984) menciona que algunos embriones femeninos pueden ser diagnosticados erróneamente como masculinos, debido a la ausencia del cuerpo de Barr, posiblemente la ausencia sea porque no se haya llevada a cabo la inactivación completa del cromosoma X.

Asimismo, el método puede ser poco confiable, con una baja precisión y con un alto riesgo de perder la viabilidad embrionaria; debido a que el método es muy laborioso ya que se involucran procedimientos como: colecta de células en metafase, disociación de células, propagación de las células, su fijación, disociación celular, adherencia celular, tinción de Giemsa 4% y evaluación microscópica para el diagnóstico del sexo.

1.6.2. TÉCNICA INMUNOLÓGICA

Un método para la selección sexual fue estudiado por medio de la detección inmunológica de un factor que es específicamente expresado por los embriones masculinos y no por los embriones femeninos, siendo este factor H-Y (Wachtel *et al.*, 1975).

Wachtel (1984), propuso el uso del anticuerpo monoclonal H-Y en un sistema de fluorescencia. Para esto, los embriones fueron expuestos a un anticuerpo (H-Y) primario. Después de la incubación, los

embriones fueron expuestos a un anticuerpo secundario, para finalmente ser visualizados bajo microscopio fluorescente. Los fenotipos H-Y presuntivos fueron asignados sobre las bases de los blastómeros embrionarios fluorescentes (H-Y⁺) diagnosticados como machos o no fluorescentes (H-Y) diagnosticados como hembras. Estos resultados sugirieron que este tipo de método, podría ser usado para el diagnóstico temprano del sexo en embriones de bovino, realizando algunas modificaciones del método. Sin embargo, es de considerar que la diferenciación gonadal del macho puede también ocurrir en la ausencia del antígeno H-Y, porque su expresión no se requiere para el desarrollo testicular y por lo tanto, la presencia del antígeno H-Y no garantiza que la gónada XX se someterá al desarrollo testicular como lo indica McLaren *et al.* (1984). Por lo anterior, se deduce que el utilizar H-Y como un método de sexado a nivel embrionario no garantiza la especificidad del diagnóstico.

1.6.3. TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Se han utilizado técnicas de biología molecular para aislar secuencias de ADN específicas del cromosoma Y bovino con el objeto de predecir el sexo embrionario por cuatro rutas metodológicas: hibridación *in situ*, Southern blot, Dot blot o por ensayos basados en PCR.

Para la identificación y para el aislamiento de las secuencias de ADN, inicialmente se utilizó un método simple basado en el análisis de **enzimas de restricción** de muestras de ADN de macho y hembra con la esperanza de localizar fragmentos repetitivos específicos de macho. La primera secuencia obtenida y específica del cromosoma Y humano *DYZ-1* fue clonada usando este método (Cooke, 1976). Subsecuentemente, se desarrolló **la técnica de hibridación** que permitió la búsqueda de secuencias específicas del macho. Este procedimiento fue descrito originalmente en una biblioteca genómica de ratón en un bacteriófago *Lambda* que fue hibridado con ADN de macho marcado radiactivamente, después de la pre-hibridación con un exceso de ADN de hembra. El ADN de hembra debió "bloquear" todas las secuencias comunes para machos y hembras, así es que, las secuencias específicas del macho fueron hibridadas por ADN de macho (Nallaseth and Dewey, 1983).

Posteriormente, la combinación de enzimas de restricción y de hibridación fue utilizada para desarrollar sondas enriquecidas del cromosoma Y por marcaje radiactivo para ADN de macho

bovino, el cual fue desnaturalizado e hibridado. Esto, con el propósito de proporcionar métodos de hibridación para la identificación de embriones machos con la utilización de secuencias de ADN específicas del cromosoma Y, obteniendo sondas de ADN para tales secuencias y ser utilizadas en métodos de hibridación para pruebas de diagnóstico sexual.

La preparación de la sonda específica del macho fue después hibridada por **Southern blot** utilizando ADNs de macho y hembra bovino, digeridos con varias enzimas de restricción. Después de la transferencia a una membrana, fueron pre-hibridados con ADN de hembra (Bondioli *et al.*, 1989). Por este método, se observó un fragmento *R*sall de 6.0 Kb en el ADN del macho, pero no en ADN de la hembra. Este fragmento fue clonado por restricción y preparado en un gel por electroforesis, seguido por elusión y ligación en un plásmido.

La clonación por enriquecimiento de supresión, fue una técnica utilizada originalmente para obtener secuencias específicas del cromosoma Y del ratón (Lamer and Palmer, 1984); y posteriormente para obtener secuencias de ADN de humano para identificar problemas de distrofia muscular (Kunkel *et al.*, 1985). En teoría, este método tiene un significado para cualquier clonación de secuencias presentes en un genoma, pero ausentes en un genoma relacionado. La clonación por enriquecimiento de supresión fue usada para obtener 2 fragmentos de ADN específicos del macho bovino (BOV35M y BOV97M) (Miller and Koopman, 1990).

Las sondas de ADN específicas del cromosoma Y bovino, han sido utilizadas para realizar ensayos por **Dot blot** (Bondioli *et al.*, 1989; Perret *et al.*, 1990) con ADN obtenido de un número pequeño de células embrionarias. Específicamente, Perret *et al.* (1990) reportan que unas pocas células embrionarias pueden ser colocadas directamente sobre una membrana para su posterior hibridación, evitando la necesidad de aislar el ADN; y Bondioli *et al.* (1989) reportan una exactitud del 99% con este método. Sin embargo, el reporte de estos autores menciona que el método presenta el inconveniente de consumir demasiado tiempo, ya que el tiempo total requerido para el ensayo fue de 8 días.

El uso de sondas de ADN específicas del cromosoma Y para el diagnóstico sexual hace que el desarrollo del método sea laborioso y con gran consumo de tiempo (Van Vliet *et al.*, 1989). Sin embargo, el medio más factible para incrementar la velocidad de un ensayo que permita realizar diagnósticos del sexo en un intervalo de tiempo más corto, es la utilización de la **técnica de PCR** que está basada en la amplificación enzimática de ADN *in vitro*, sintetizando varias copias de una

secuencia de ADN de interés y por lo tanto, incrementar substancialmente la calidad del ADN blanco (Saiki *et al.*, 1985). Además, para permitir la amplificación específica de la secuencia de ADN de interés se emplea un grupo de oligonucleótidos que son usados como flanqueadores (asignados iniciadores) (Saiki *et al.*, 1988). Es decir, que para aplicar PCR en la determinación sexual, primero se debe de reconocer una secuencia específica de nucleótidos para el cromosoma sexual, tales como secuencias de ADN de copia única (Sinclair *et al.*, 1990) o secuencias de ADN repetidas (Schröder, 1990).

En otros reportes, se ha descrito el uso de la PCR de baja rigurosidad (LS-PCR) (Dias-Nieto *et al.*, 1993) o la detección de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLPs) específicos de XY, tales como los genes ZFY y ZFX homólogos para los cromosomas X y Y en humanos, bovinos, ovinos y caprino (Aasen and Medrano, 1990). Sin embargo, el análisis de RFLPs requiere adicionalmente un paso más que consta de una digestión con enzimas de restricción del producto de PCR, así que, con esto se incrementa el tiempo de diagnóstico y el riesgo de contaminación que por ende, puede proporcionar un diagnóstico incorrecto. No obstante, el uso de la técnica de PCR resulta ser un procedimiento más promisorio para determinar el sexo, debido a sus características particulares durante su práctica.

Uno de los primeros reportes publicados sobre el uso de PCR para el sexado de embriones fue un estudio sobre la viabilidad del sexado de embriones preimplantados en humanos (Handyside *et al.*, 1989). En este caso, una célula fue extraída de un embrión con 8 células. La amplificación de la secuencia repetida específica del hombre fue parte de un fragmento Haell de 3.4 kb originalmente descrito por Cooke (1976). De 18 embriones normales que fueron sexados por PCR, 15 fueron sexados correctamente y corroborados por otros métodos. En otro estudio, realizado también en humanos por Lo *et al.* (1989) demostraron que las células del hombre pueden ser detectadas a través de sangre periférica de mujeres gestantes, llevando un feto masculino. También, Handyside *et al.* (1990) sugieren que el sexo fetal podría ser detectado por las secuencias de ADN repetidas específicas del hombre, tomando en cuenta precauciones rigurosas como falsos positivos (muestras de hembras, que serían diagnosticadas como machos o una posible contaminación de la muestra experimental que podría ser el resultado en un macho). Las precauciones tomadas, incluyen todas las manipulaciones internas de gabinete y de los componentes de reacción.

Particularmente, la utilización de secuencias repetidas específicas del cromosoma Y en la técnica de PCR es de gran utilidad, como se mencionan en estudios realizados en bovinos (Herr *et al.*, 1990a) y en ovinos (Herr *et al.*, 1990b), al indicar que la determinación del sexo de un embrión tiene una alta precisión con un tiempo relativamente corto para que se lleve a cabo. Esto, también fue corroborado por Brandbury *et al.* (1990) al determinar por PCR el sexo de embriones de ratón a partir de 8 células.

Con esto, se confirma que la PCR resulta ser el procedimiento más promisorio para realizar diagnósticos del sexo a partir de ADN de muestras celulares. Considerando además que la región homóloga de los cromosomas X y Y presenta diferencias en sus secuencias, siendo posible para identificar el sexo de los embriones (Brandbury *et al.*, 1990) o la utilización de secuencias de nucleótidos repetidos específicos únicamente del cromosoma Y, indicando con esto, que sólo se encuentran en embriones masculinos (Handyside *et al.*, 1990; Brandbury *et al.*, 1990); aparte de que es posible realizar el diagnóstico del sexo alrededor de 5 a 6 horas.

Entre los aspectos que se deben considerar durante la aplicación de la PCR para el diagnóstico del sexo, se encuentran:

- a) La obtención de una mínima cantidad de ADN obtenida de biopsias embrionarias para no dañar el desarrollo y viabilidad de un embrión para su posterior transferencia y que llegue a buen término su gestación;
- b) La aplicación de secuencias específicas del cromosoma Y en la PCR que no proporcionen resultados falsos positivos en el diagnóstico sexual, debido a que la modificación de una base del oligonucleótido (iniciadores) puede causar drásticas alteraciones en los productos de la reacción, traduciéndose en un diagnóstico sexual virtualmente imposible, como lo menciona Brandbury *et al.* (1990);
- c) Utilización de iniciadores para la amplificación de una secuencia autosómica que nos indique una respuesta de amplificación con relación a embriones de hembra; y
- d) Riesgo de contaminación que por ende, se puede proporcionar un diagnóstico incorrecto.

Frásch y Ugalde (1996) mencionan que cualquier célula de mamífero tiene cerca de 2 pg (2×10^{-12} g de ADN). El ADN podría tener cerca de $2-3 \times 10^9$ pb. Pero un gen, como por ejemplo el que determina el sexo, podría tener alrededor de 1,000 pb, significando que es necesario para realizar la millonésima parte del ADN de una célula.

Esta técnica, tiene una limitación, el número de fragmentos de ADN que sería finalmente detectado es duplicado en cada paso, llegando a un momento en que por diferentes razones, un número de fragmentos no relacionados al fragmento blanco producido en el mismo tiempo y los fragmentos no relacionados, podrían enmascarar los resultados deseados; y al incrementar el número de pasos de amplificación el fondo podría ser mayor.

Dado que es necesario la amplificación de un fragmento de ADN del cromosoma sexual para obtener la suficiente sensibilidad para determinar el sexo de los embriones de una muestra de pocas células, se discute a continuación los mecanismos moleculares para la amplificación de ADN proporcionados por Frásch y Ugalde (1996):

- a) Una simple cadena de ADN tiene dos terminales (ó extremos), una de ellas con fosfato en el carbón 5' de la molécula de desoxirribosa (extremo 5') y la otra con hidroxilo en posición 3' del azúcar (extremo 3'). Al mismo tiempo, la cadena complementaria tiene el mismo tipo de extremos, pero en posiciones opuestas, siendo que el extremo 3' de una cadena tiene el otro extremo 5' enfrente de sí. Por esta razón, se considera que las dos cadenas complementarias de una molécula de ADN tienen polaridades opuestas.
- b) Es conocido que la replicación de una cadena de ADN es producida por la combinación de un nucleótido-5'-trifosfato con el extremo 3' de la cadena. Por lo tanto, este extremo 3' es el punto creciente del ADN y el proceso de síntesis en direcciones opuestas en ambas cadenas complementarias.
- c) Una cadena plantilla es simplemente una cadena de ADN. No obstante, la cadena plantilla no provee cualquier extremo 3', capaz de fomentar la iniciación del crecimiento de una nueva cadena que vaya a ser sintetizada. Por esta razón, la síntesis de una nueva molécula de ADN es sólo posible en la presencia de un fragmento de ácido nucleico que pueda proporcionar el extremo 3'. El nombre dado a este fragmento de ácido nucleico es "iniciador".

- d) Además, los mecanismos de la síntesis de ADN requieren de la acción de una serie de enzimas que catalizan las reacciones. La presencia de ADN polimerasa es de gran importancia para la extensión de la cadena de ADN para que en pasos consecutivos realice la amplificación de un fragmento.
- e) En cada paso de la técnica, el número de cadenas obtenidas en el paso anterior es duplicado, así que, este número tiene un crecimiento geométrico. Sin embargo, la aplicación de esta técnica, tiene una limitación derivada de la síntesis de un fragmento de ADN falso de los mismos iniciadores que no corresponden a la plantilla (o templado) que se desea para la copia. Esto puede atribuirse a la contaminación, así como a otras causas. Pero las copias correctas del templado (o plantilla), así como de unas falsas, tienen en sus terminales las secuencias de los mismos iniciadores que crean secuencias complementarias que en el próximo paso, serían amplificadas. Por consiguiente, las cadenas blanco, así como la amplificación de algunas falsas, llevarían a un punto donde es posible mejorar la sensibilidad.

1.6.4. TÉCNICA DE MICROMANIPULACIÓN EMBRIONARIA

La técnica de PCR requiere de una muestra de ADN de un embrión preimplantado, la cual se puede obtener por un número existente de métodos, siendo crucial para cualquier técnica donde la biopsia no afecte adversamente el desarrollo potencial del embrión.

En embriones de humano y de ratón se han efectuado varios métodos para perforar la zona pelúcida y remover células de embriones preimplantados como el uso de soluciones acidificadas (Handyside *et al.*, 1989), por aspiración usando una fina micropipeta (Wilton *et al.*, 1989; Wilton and Trounson, 1989) y por biopsias de blastómeros (Roudebush *et al.*, 1990; Takeuchi *et al.*, 1992) para no afectar el subsecuente desarrollo embrionario.

En embriones de bovino se han obtenido muestras embrionarias para determinar el sexo, como en el caso de Bondioli *et al.* (1989) quienes separaron de 10 a 20% de la masa celular de embriones en etapa de blastocisto, colectados de hembras superovuladas y determinando el sexo por hibridación de ADN. Herr y Reed (1991), Peura *et al.* (1991), y Thibier y Nibart (1992) determinan el sexo de embriones por PCR, después de seccionar el embrión usando una microcuchilla y obtener unas

pocas células de una mórula o de blastocisto. En 1992, Macháty *et al.* lograron remover una célula de embriones preimplantados en la etapa de 16 a 32 células, no alterando el desarrollo del embrión *in vitro*, hasta su consecutivo desarrollo a etapa de blastocisto por incubación.

Con base a esto, Macháty *et al.* (1993) realizan un ensayo de la precisión del sexado de embriones de bovino por PCR, así como la evaluación del desarrollo potencial de los embriones biopsiados hasta su transferencia a hembras receptoras. Realizaron biopsias de una célula de embriones (obtenidos por FIV) en etapa de 16 a 32 células (5° día después de la fertilización); y para la reacción de PCR utilizaron un par de iniciadores para una secuencia repetida específica del cromosoma Y bovino (BRY.1) de 301pb y un par de iniciadores específicos de bovino (1.715) de 216 pb. Los resultados obtenidos, indicaron que un blastómero de un embrión es suficiente para la determinación del sexo por PCR en un 95.4%. Por otra parte, de 19 embriones que fueron biopsiados y sexados, y que fueron transferidos a hembras receptoras, sólo 10 de estas quedaron gestantes (52.6%) al corroborarlo por ultrasonografía. También, mencionan que los resultados obtenidos no difieren significativamente ($p>0.1$) de lo alcanzado con un grupo control de embriones obtenidos también por FIV que no fueron manipulados antes de su transferencia, donde se encontró el 54% de gestaciones.

CAPÍTULO II

Objetivos, Hipótesis y Metas

2.1. OBJETIVOS

2.1.1. OBJETIVO GENERAL

Análisis de secuencias de ADN del cromosoma Y de bovino tanto de copia única como de copia repetida para la determinación del sexo en embriones preimplantados de bovino, ovino y caprino por medio de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR); así como el análisis de la presencia y distribución de secuencias de ADN del cromosoma Y de copia repetida del bovino en el genoma de búfalo, ovino y caprino.

2.1.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estandarización de la técnica de PCR para la amplificación de secuencias de ADN del cromosoma Y de copia única y de copia repetida; así como de secuencias de ADN satélite del bovino como control interno de amplificación.

- b) Evaluación del nivel de sensibilidad y la especificidad en la amplificación de secuencias de ADN de copia única y de copia repetida del cromosoma Y, y de las secuencias satélite de bovino.
- c) Diagnóstico del sexo de embriones completos de bovino.
- d) Diagnóstico del sexo de embriones de bovino, ovino y caprino a partir de 1 a 4 blastómeros obtenidos por micromanipulación.
- e) Análisis de la presencia y distribución de secuencias de ADN de copia repetida del cromosoma Y del bovino en el genoma de búfalo, ovino y caprino por medio de Southern blot.

2.2. HIPÓTESIS

2.2.1. HIPÓTESIS GENERAL

Las secuencias de ADN de copia repetida por la abundancia que presentan en el cromosoma Y son más factibles de ser utilizadas por PCR para la determinación del sexo de embriones preimplantados que las secuencias de ADN de copia única.

2.2.2. HIPÓTESIS ESPECÍFICAS

- a) Las secuencias de copia repetida presentan una mayor sensibilidad y una mayor especificidad que las secuencias de copia única para realizar un diagnóstico preciso del sexo de un embrión.
- b) La cantidad de ADN presente en 1, 2, 3 y 4 blastómeros es suficiente para la amplificación de las secuencias de copia repetida del cromosoma Y de bovino; y el uso de dichas secuencias pueden también diagnosticar el sexo de embriones preimplantados de ovinos y caprinos.

- c) Las secuencias de copia repetida del cromosoma Y de bovino se conservan en otras especies de rumiantes (búfalo, ovino y caprino) variando en su organización y abundancia.

2.3. METAS

- a) Se aplicaron diferentes condiciones de PCR: diferentes concentraciones de Mg^{++} , dNTPs, Taq-polimerasa, iniciadores (Forward y Reverse) y de ADN de interés; así como diferentes temperaturas de alineación y tiempos de amplificación para encontrar la amplificación de segmentos del cromosoma Y, tanto de copia única (*AMX/Y*, *SRY* y *ZFX/Y*) como de copia repetida (BC1.2, BOV97M, BRY.1 y LambdaES6.0); y de segmentos de ADN satélite que fueron utilizados como control interno de amplificación (1.709 y 1.715).
- b) Para cada secuencia de ADN se evaluaron diferentes concentraciones de ADN equivalentes a $\frac{1}{2}$, 1, 2, 5, 10, 50, 100, 1,000 y 4,000 células, con el fin de encontrar la cantidad mínima de ADN requerida para obtener un producto de amplificación diagnóstico para el sexo (sensibilidad). De igual manera, se evaluó la precisión (especificidad) de las secuencias de ADN que resultaron más eficientes con ADN genómico proveniente de individuos de sexo conocido.
- c) Por otra parte, las secuencias de ADN que resultaron más eficientes fueron utilizadas para determinar el sexo de embriones preimplantados completos, así como de blastómeros obtenidos por micromanipulación.
- d) Se analizó la presencia y abundancia de las secuencias de ADN del cromosoma Y de bovino en el genoma de búfalo, ovino y caprino. Siendo dichas secuencias, las evaluadas para la determinación del sexo a partir de blastómeros.

CAPÍTULO III

Materiales y Métodos

3.1. PURIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE ADN GENÓMICO

Se utilizó ADN genómico purificado a partir de sangre periférica (Anexo 3) y de tejido (higado) (Anexo 4) de hembras y machos de bovino (Holstein y Cebú), ovino, caprino y búfalo americano. El ADN obtenido fue cuantificado por fluorometría y la evaluación de su integridad fue realizada por electroforesis en geles de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio 0.5 $\mu\text{g/ml}$, utilizando como marcador molecular ADN Lambda digerido con la enzima de restricción *BstEII* (λ *BstEII*), el corrimiento se realizó a 92 V (voltios) por 30 min con buffer de corrida TBE 1 X (Anexo 5) y visualizado por luz ultravioleta (UV) en un fotodocumentador (Transilluminator White/UV, Mod. GDS 7500 UVP Upland, CA).

3.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Se realizaron ensayos por PCR con el ADN genómico de hembras y machos de bovino, ovino, caprino y búfalo con el objeto de establecer las mejores condiciones de amplificación para las secuencias de ADN del cromosoma Y de bovino, tanto de copia única: **AMXY**, **SRY** y **ZFXY**; como de copia repetida: **BC1.2**, **BOV97M**, **BRY.1** y **LambdaES6.0** (Cuadro 1).

CUADRO 1. SECUENCIAS DE LOS INICIADORES EMPLEADOS PARA LA AMPLIFICACION DE SECUENCIAS DIAGNOSTICAS DEL SEXO

IDENTIFICACION DE LAS SECUENCIAS DIAGNOSTICAS		SECUENCIAS DE INICIADORES	TAMAÑO DEL FRAGMENTO AMPLIFICADO
* COPIA UNICA	AMXY (Ennis and Gallagher, 1994)	5' - CAGCCAAACCTCCCTCTGC - 3' 5' - CCCGCTTGGTCTTGTCTGTTGC - 3'	280 pb 217 pb
	SRY (Peyen and Colnot, 1993)	5' - TGAAGCGACCCATGAACG - 3' 5' - CGACGAGGTCGATACTTA - 3'	200 pb
	ZFXV (Kirkpatrick and Monson, 1993)	5' - ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT - 3' 5' - GCACTTCTTTGGTATCTGAGAAAGT - 3'	447 pb 445 pb
* COPIA REPETIDA	BC1.2 (Popescu <i>et al.</i> , 1988)	5' - ATCAGTGCAGGGACCCAGATG - 3' 5' - AAGCAGCCGATAAACCTCCTT - 3'	562 pb
	BOV 97M (Miller and Koopman, 1990)	5' - CCTACCTAATAGATCCAGCTG - 3' 5' - CTGTCTCTGAAACAGATGAGCTG - 3'	97 pb
	BRY.1 (Reed <i>et al.</i> , 1988, Reed <i>et al.</i> , 1995)	5' - GGATCCGAGACACAGAACAGGCTG - 3' 5' - TTGATCAAGCTAATCCATCCATCCTAT - 3'	307 pb
	LambdaES6.0 (Ellis and Hatpold, 1986)	5' - GAATTCGGTAGAGCCCGCATCTCGGTC - 3' 5' - GAATTCTTGAAGCAGCCAAGCCCGCG - 3'	250 pb
** SATELITE	1.709 (Skowronski <i>et al.</i> , 1984)	5' - TGTACGAAGAAATGTGCCG - 3' 5' - TCAATGCAAAGGACAAGCCTGC - 3'	536 pb
	1.715 (Plucienniczak <i>et al.</i> , 1982)	5' - TGGAAGCAAAGAACCCCGCT - 3' 5' - TCGTGAGAAACCGCACACTG - 3'	720 pb

* Secuencias de ADN del cromosoma Y de bovino.

** Secuencias de ADN satélite de bovino como controles de amplificación.

En el caso de secuencias exclusivas del cromosoma Y fue necesario contar con un control interno de amplificación que permitiera distinguir entre hembras y falsos negativos en las reacciones de PCR. Es decir, los machos amplifican el segmento de ADN del cromosoma Y en conjunto con el ADN satélite control y en cambio, las hembras sólo amplifican el segmento de ADN satélite control. Para esto, se emplearon las secuencias de ADN satélite de bovino **1.709** y **1.715** (Cuadro 1). La secuencia 1.709 únicamente fue evaluada en bovinos por ser una secuencia específica de especie, además de no ser una secuencia conservada en ovinos, caprinos (Guoli *et al.*, 1999). La secuencia 1.715 fue evaluada tanto en bovinos como en búfalos, ovinos y caprinos, ya que se encuentra presente en el genoma de éstas especies (Plucienniczak *et al.*, 1982; Appa Rao *et al.*, 1993).

Para encontrar las condiciones óptimas de amplificación de las secuencias de interés por la técnica de PCR, se realizaron reacciones en un volumen final de 20 μ l. Para esto, se utilizaron concentraciones estándar de Tris-HCl 10 mM pH 8.4, KCl 50 mM, gelatina 10 μ g/ml y Tritón 0.1%; y la evaluación de distintas concentraciones de $MgCl_2$ [0.5 a 2.5 mM], dNTPs [0.1 a 0.2 mM] (BIOTECSA), Taq-polimerasa [0.25 a 1 U] (BIOTECSA), ADN genómico [concentraciones iniciales de 20 a 50 ng] y del par de iniciadores (Forward: 5' y Reverse: 3') (GIBCO BRL Custom Primers: *Certificate of análisis*; BIO-SYNTHESIS: *Oligo Data Sheet*) [0.5 a 1 pM]. Igualmente, se evaluaron diferentes condiciones en el termociclador (Hybaid Omn-E, Mod. HBTRE02HL110) con relación a tiempos y temperaturas específicas de amplificación.

Para visualizar los productos amplificados, estos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 2 y 3%, teñidos con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml, utilizando como marcador molecular ADN pBR322 digerido con la enzima de restricción *MspI* (pBR322/*MspI*) para conocer los tamaños de fragmentos amplificados. La electroforesis fue a 84 V por 45 min con buffer de corrida TBE 1 X y la valoración se realizó por UV.

Las condiciones de reacción para la amplificación de las secuencias **AMXY** y **ZFX/Y** fueron con $MgCl_2$ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U; ADN 2 - 5 ng y de cada iniciador 0.5 pM. Las condiciones en termociclador fueron con una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos conformados por los pasos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 52°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg, y con un paso de extensión final a 72°C por 3 min (Cuadros 2 y 3).

Las condiciones para **SRY** fueron de $MgCl_2$ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U, ADN 2 - 5 ng y del par de iniciadores 0.5 pM. Las condiciones en termociclador fueron con una desnaturalización inicial de 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos conformados por una desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 64°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 3 min (Cuadros 2 y 3).

Las condiciones de reacción para **BC1.2** fueron empleando $MgCl_2$ 0.75 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.5 U, ADN 2 - 5 ng y de cada iniciador 1 pM. Las condiciones en termociclador fueron con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos conformados por los pasos de desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 63°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y con una extensión final a 72°C por 3 min (Cuadros 2 y 3).

En el caso de **BOV97M** las condiciones de reacción fueron de MgCl₂ 0.75 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.5 U, ADN 2 - 5 ng y del par de iniciadores 1 pM. La amplificación se efectuó con una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguido de 30 ciclos conformados por una desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 55°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg; y una extensión final a 72°C por 5 min (Cuadros 2 y 3).

Las condiciones para **BRY.1** se obtuvieron con MgCl₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.75 U, ADN 2 - 5 ng y del par de iniciadores 1 pM. Las condiciones en termociclador se llevaron a cabo con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos conformados por una desnaturalización a 94°C por 1 min, alineación a 64°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min; y finalmente una extensión a 72°C por 3 min (Cuadros 2 y 3).

CUADRO 2. CONDICIONES ÓPTIMAS DE REACCIÓN PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA Y DE COPIA REPETIDA DEL CROMOSOMA Y; ASÍ COMO DE SECUENCIAS SATELITE

SECUENCIAS DE ADN		CONDICIONES EVALUADAS	CONDICIONES ESTÁNDAR
COPIA ÚNICA	AMX/Y	MgCl ₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 0.5 pM (Forward/Reverse)	Tris-HCl 10 mM pH 8.4, KCl 50 mM, gelatina 10 µg/ml; Tritón 0.1%
	ZFX/Y		
	SRY	MgCl ₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 0.5 pM (Forward/Reverse)	
COPIA REPETIDA	BC1.2	MgCl ₂ 0.75 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.5 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 1 pM (Forward/Reverse)	
	BOV97M	MgCl ₂ 0.75 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.5 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 1 pM (Forward/Reverse)	
	BRY.1	MgCl ₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.75 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 1 pM (Forward/Reverse)	
SATELITE	1.709	MgCl ₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 0.5 pM (Forward/Reverse)	
	1.715	MgCl ₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U; ADN 2 - 5 ng; iniciadores 0.5 pM (Forward/Reverse)	

Las concentraciones proporcionadas de cada reacción son las concentraciones finales en la reacción de PCR en un volumen de 20 µl.

Con relación al par de iniciadores para la secuencia **LambdaES6.0** no se logró obtener las condiciones de amplificación.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Las condiciones de reacción para las secuencias **1.709** y **1.715** fueron empleando MgCl₂ 0.5 mM, dNTPs 0.2 mM, Taq-polimerasa 0.25 U, ADN 2 - 5 ng y de cada iniciador 0.5 pM. Las condiciones en termociclador fueron con una desnaturalización inicial de 94°C por 3 min, seguido de 30 ciclos conformados por los pasos de desnaturalización a 94°C por 30 seg, alineación a 52°C por 30 seg y extensión a 72°C por 30 seg; y con una extensión final a 72°C por 3 min (Cuadros 2 y 3).

CUADRO 3. CONDICIONES ÓPTIMAS DE TERMOCICLADOR PARA LA AMPLIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA Y DE COPIA REPETIDA DEL CROMOSOMA Y; ASÍ COMO DE SECUENCIAS SATELITE

CONDICIONES EN TERMOCICLADOR		SECUENCIAS DE COPIA ÚNICA			SECUENCIAS DE COPIA REPETIDA			SECUENCIAS SATELITE	
		AMX [*] /Y	SRY	ZFX/Y	BC1.2	BOV97M	BRY.1	1.709	1.715
Desnaturalización inicial		94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'	94°C/3'
C I C L O S	Desnaturalización	94°C/30"	94°C/30"	94°C/30"	94°C/1'	94°C/1'	94°C/1'	94°C/30"	94°C/30"
	Alineación	52°C/30"	64°C/30"	52°C/30"	63°C/30"	55°C/30"	64°C/30"	52°C/30"	52°C/30"
	Extensión	72°C/30"	72°C/1'	72°C/30"	72°C/1'	72°C/30"	72°C/1'	72°C/30"	72°C/30"
Extensión final		72°C/3'	72°C/3'	72°C/3'	72°C/3'	72°C/5'	72°C/3'	72°C/3'	72°C/3'

* Secuencias amplificadas con 30 ciclos.

** Secuencia amplificada con 35 ciclos.

Al encontrar las mejores condiciones de amplificación para cada uno de los pares de iniciadores (a excepción de LambdaES6.0), se procedió a evaluar el nivel de sensibilidad y la especificidad de la técnica para su posterior utilización en el diagnóstico del sexo de embriones.

3.3. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE SENSIBILIDAD

Con el propósito de encontrar la cantidad mínima necesaria de ADN para la amplificación de las secuencias diagnósticas del cromosoma Y (AMX/Y, ZFX/Y, SRY, BC1.2, BOV97M y BRY.1) se realizaron ensayos utilizando diferentes concentraciones iniciales de ADN [0.0025, 0.005, 0.01, 0.025, 0.05, 0.25, 0.5, 5 y 20 ng], equivalentes a las cantidades de ADN contenidas en 1/2, 1, 2, 5, 10,

50, 100, 1,000 y 4,000 células de machos y hembras de bovino, ovino, caprino y búfalo. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen final de 20 μ l y de acuerdo a las condiciones estandarizadas. Los ensayos de sensibilidad para la amplificación de *AMX/Y*, *ZFX/Y*, *SRY*, *BC1.2*, *BOV97M* y *BRY.1* se realizaron en 6 ocasiones bajo las mismas condiciones.

Los iniciadores de las secuencias del cromosoma Y que presentaron mejores niveles de sensibilidad fueron evaluados en conjunto con los iniciadores para las secuencias satélite **1.709** (únicamente con ADN macho y hembra de bovino) y **1.715** (evaluada con ADN de macho y hembra de bovino, ovino, caprino y búfalo), utilizando únicamente las concentraciones de ADN de 0.005, 0.01, 0.025 y 0.05 ng y como control de diagnóstico se utilizó ADN genómico de hembras y machos, de acuerdo a la concentración utilizada para la estandarización de la técnica. Los ensayos fueron realizados en 6 ocasiones bajo las mismas condiciones de reacción.

La contrastación se realizó por la prueba no paramétrica de Friedman para evaluar los niveles de sensibilidad con relación a las diferentes concentraciones de ADN (desde 0.0025 hasta 20 ng), los productos amplificados de las secuencias de copia única (*AMX/Y*, *SRY* y *ZFX/Y*) y de copia repetida (*BC1.2*, *BOV97M* y *BRY.1*) y el número de veces (6 ensayos) que se repitió cada uno de los ensayos, esperando encontrar diferencias estadísticamente significativas. Por otra parte, con la misma prueba estadística, se realizó un análisis de los productos amplificados de las secuencias del cromosoma Y que fueron evaluados conjuntamente con las secuencias 1.709 o 1.715 con relación a las diferentes concentraciones de ADN y el número de veces que se repitieron los ensayos, esperando no encontrar diferencias significativas dentro de los grupos de iniciadores utilizados. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico computacional SPSS.

3.4. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD

Para evaluar la precisión del método (distinguir productos amplificados de ADN de hembra y de macho) se realizaron dos ensayos manejando una prueba ciego.

El primer ensayo se realizó con dos grupos de muestras de ADN genómico obtenido de sangre periférica de 114 bovinos de sexo conocido; siendo 57 muestras para la evaluación de los iniciadores para las secuencias **BC1.2 + 1.709** y 57 muestras para **BRY.1 + 1.709**. El segundo ensayo se realizó con un solo grupo de muestras de ADN genómico, obtenidas de 75 bovinos de

sexo conocido, evaluando por separado los dos conjuntos de iniciadores para **BC1.2 + 1.715** ó **BRY.1 + 1.715**. Se utilizó como control de diagnóstico ADN genómico de macho y hembra previamente evaluado.

Los productos amplificados de los dos ensayos fueron evaluados por la prueba estadística no paramétrica de Kappa de Cohen para buscar diferencias en los productos amplificados de ADN de machos y hembras de bovino en ambos ensayos. El análisis se realizó por el paquete estadístico SPSS.

3.5. SEXADO DE EMBRIONES COMPLETOS

Como un primer acercamiento para conocer la sensibilidad de las condiciones diagnósticas del sexo con material embrionario, se procedió a evaluar las secuencias del cromosoma Y (BC1.2 y BRY.1) y con las secuencias satélite (1.709 y 1.715), conformando dos ensayos. En el primero se utilizaron dos grupos para la evaluación de **BC1.2 + 1.709** y **BRY.1 + 1.709** respectivamente, utilizando para cada uno 31 embriones completos de bovino (Holstein). En el segundo ensayo también se utilizaron dos grupos para la evaluación de **BC1.2 + 1.715** y **BRY.1 + 1.715**, empleando para cada grupo 27 embriones de bovino (Holstein).

Los embriones utilizados se encontraban en etapas de mórula o de blastocisto, almacenados en nitrógeno líquido que fueron obtenidos a partir de programas de transferencia de embriones¹. Para esto, cada embrión fue descongelado y colocado en tubos de PCR de 0.2 ml con 10 µl de H₂O_{dd}, incubados a 95°C por 5 min y enseguida colocados en hielo. Posteriormente, se adicionaron los componentes de reacción de PCR a un volumen final de 20 µl. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo de acuerdo a las estandarizadas anteriormente. Para cada ensayo, se realizaron reacciones utilizando ADN genómico de machos y hembras de bovino previamente sexados, empleados como controles de diagnóstico.

Se realizó la prueba no paramétrica de Friedman para evaluar la sensibilidad de BC1.2/BRY.1 y de 1.709/1.715 al utilizar embriones completos en reacciones de PCR, esperando buscar diferencias

¹ Embriones proporcionados por el Dr. Marco Antonio Hidalgo (CONAMEGRA, Ajuchitlán, Qro.); y MVZ Moisés Peña Verduzco (Departamento de Agrobiología-UAT).

estadísticamente significativas en los ensayos realizados. El análisis se realizó mediante el paquete estadístico computacional SPSS.

3.6. DIAGNÓSTICO DEL SEXO DE EMBRIONES DE BOVINO, OVINO Y CAPRINO A PARTIR DE BLASTÓMEROS

Con base a los resultados obtenidos anteriormente, se procedió a realizar el diagnóstico del sexo en embriones de bovino, ovino y caprino a partir de blastómeros, utilizando la combinación de iniciadores de las secuencias **BC1.2 + 1.715** y **BRY.1 + 1.715**, bajo las condiciones de PCR evaluadas. En estos experimentos se decidió no utilizar la secuencia satélite 1.709 como control por su especificidad únicamente para bovinos. Por otra parte, no se continuó con la evaluación de la técnica en el sexado de embriones de búfalo, debido a la dificultad para obtener embriones de dicha especie.

Inicialmente, se realizaron varios ensayos de micromanipulación para la obtención de blastómeros, obtención de ADN y amplificación por PCR, únicamente realizados con embriones de bovino. Esto, con el objeto de evitar errores de pérdida embrionaria para la obtención de ADN y contaminación en las reacciones de PCR.

Posteriormente, para cada conjunto de iniciadores se procedió a realizar las evaluaciones con 34 embriones de bovino, 6 embriones de ovino y 6 embriones de caprino. Para esto, se utilizaron embriones en etapa de mórula ó de blastocisto que se encontraban almacenados en nitrógeno líquido, obtenidos por Fertilización *in vitro* o en programas de transferencia de embriones^{1,2}. Cada embrión fue descongelado, colocado en un portaobjetos y cubierto con aceite mineral. El embrión fue sostenido con una micropipeta de sostén, la zona pelúcida fue perforada con una micropipeta en forma de cuchilla, y se utilizó una tercera micropipeta que pasó por la zona pelúcida, removiendo por succión de 1 a 4 blastómeros. Los blastómeros removidos fueron transferidos a tubos de PCR de 0.2 ml conteniendo 10 µl de H₂O_{dd}.

Para cada experimento se tomó el resto de los embriones micromanipulados para realizar también reacciones de PCR. Tanto los blastómeros como los restos embrionarios fueron incubados a 95°C

² Embriones proporcionados por Dr. Salvador Romo García (Departamento de Reproducción, FMVZ-UNAM); Dr. Javier Valencia Méndez (CEPIPSA, FMVZ-UNAM).

durante 5 min e inmediatamente colocados en hielo durante 5 min, con objeto de liberar el ADN de las células. Posteriormente, en cada tubo se adicionaron los componentes de reacción de PCR a un volumen final de 20 μ l. Las condiciones de amplificación se llevaron a cabo, de acuerdo a los ensayos de sensibilidad obtenidos anteriormente con los iniciadores de BC1.2 + 1.715 y para BRY.1 + 1.715. Además, se realizaron reacciones control de diagnóstico con ADN genómico previamente sexado de cada especie.

La prueba de Kappa de Cohen fue utilizada para realizar un análisis de contraste en los dos grupos de iniciadores (BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.715) con relación al diagnóstico del sexo a partir de 1, 2, 3 y 4 blastómeros obtenidos de los embriones de bovino, ovino y caprino; así como para conocer el resultado de utilizar biopsias embrionarias o el resto de las células de los embriones que fueron manipulados. El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS.

3.7. TÉCNICA DE SOUTHERN BLOT UTILIZANDO SONDAS DE BC1.2 Y BRY.1

La técnica de Southern blot se realizó con el objeto de localizar la presencia y copias de las secuencias de ADN repetidas **BC1.2** y **BRY.1** de bovino en ovino, caprino y búfalo. Así, como para valorar su distribución entre bovinos (Holstein y Cebú). Para esto, se realizaron tres ensayos:

ENSAYO 1

Se utilizó ADN genómico obtenido de tejido (hígado) de bovino tanto de macho como de hembra, el cual fue digerido con enzimas de restricción *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* y *SalI* (Cuadro 4). Para esto, se utilizó el ADN genómico 50 μ g, enzima 50 U, buffer de enzima 1 X (Anexo 4), espermidina 1 mM y de acuerdo al tipo de enzima, se utilizó BSA 1 X; cada reacción se llevó a un volumen final de 500 μ l con H₂O_{dd}. La digestión se llevó a cabo de 48 a 72 horas a una temperatura de 37°C. Para determinar si el ADN genómico se encontraba completamente digerido, las muestras fueron evaluadas por electroforesis en un gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio 0.5 μ g/ml y usando como marcador molecular ADN λ BstEII. El corrimiento se efectuó a 92 V por 30 min en buffer TBE 1 X y fue visualizado por UV.

CUADRO 4. ENZIMAS UTILIZADAS PARA LA RESTRICCIÓN DEL ADN GENÓMICO

ENZIMA DE RESTRICCIÓN	ORIGEN	SECUENCIA RECONOCIDA											
HpaI (BioLabs)	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	5'	-	G	T	T	↓	A	A	C	-	3'	
		3'	-	C	A	A	↑	T	T	G	-	5'	
MspI (BioLabs)	<i>Moraxella species</i>	5'	-	.	C	↓	C	G	G	G	-	3'	
		3'	-	.	G	.	G	C	↑	C	-	5'	
BamHI (BioLabs)	<i>Bacillus amyloliquefaciens II</i>	5'	-	G	↓	G	A	T	C	C	-	3'	
		3'	-	C	.	C	T	A	G	↑	G	-	5'
EcoRI (BioLabs)	<i>Escherichia coli RY 13</i>	5'	-	G	↓	A	A	T	T	C	-	3'	
		3'	-	C	.	T	T	A	A	↑	G	-	5'
PstI (Gibco)	<i>Providencia stuartii</i>	5'	-	C	.	T	G	C	A	↓	G	-	3'
		3'	-	G	.	A	C	G	T	.	C	-	5'
SalI (BioLabs)	<i>Streptomyces albus G</i>	5'	-	G	↓	T	C	G	A	C	-	3'	
		3'	-	C	.	A	G	C	T	↑	G	-	5'

Las flechas indican la restricción que realizan las enzimas de acuerdo a la secuencia de ADN reconocida.

Para realizar el Southern blot (Figura 6) los ADNs digeridos fueron concentrados a 10 µg/µl y llevados a un gel de agarosa 1%, teñido con bromuro de etidio, utilizando como marcador molecular ADN λBstEII y corrido en buffer TBE 1 X por electroforesis a 23 V durante 12 horas. Después de efectuada la electroforesis, el gel fue expuesto a UV por 1 min, lavado brevemente en agua destilada, después colocado en 200 ml de solución desnaturalizante (Anexo 5) agitándolo suavemente durante 30 min, colocado después en solución neutralizante (Anexo 5) por 30 min agitándolo suavemente y lavado brevemente con agua destilada, quedando listo para la transferencia. Para esto, se colocó un trozo de papel filtro inmerso en amortiguador SSC 6 X (Anexo 5) sobre una base. Encima de éste, se colocó el gel hacia abajo; sobre el mismo se colocó una membrana de nylon del tamaño del gel, encima un trozo de papel filtro y finalmente se colocó papel absorbente. La transferencia se llevó a cabo durante 16 h y se consideró finalizada cuando el gel se encontraba completamente deshidratado.

Posteriormente, el sistema de transferencia fue desmontado y el gel fue volteado conjuntamente con la membrana, quedando al contrario de como se llevó a cabo la transferencia. La membrana fue marcada con un lápiz carbón, localizando en la misma, cada uno de los pozos y el delineamiento del gel. La membrana fue desprendida del gel y fue expuesta a UV en Cross-linker durante 12 seg con el objeto de fijar el ADN a la membrana, y se procedió a realizar el marcaje. Para esto, la membrana

fue colocada en un tubo de hibridación con 15 ml de solución de pre-hibridación (Anexo 5) a 42°C durante toda la noche, después se llevó a cabo la hibridación, utilizando en la misma solución de pre-hibridación 100 ml de la "sonda" BC1.2 o BRY.1. Cada sonda, fue obtenida del producto PCR que fue aislado de gel de agarosa 2%, purificado y marcado radiativamente por el método de PCR y/o método de "Random Priming" con α -³²P-dATP. Para su utilización, la sonda obtenida fue desnaturalizada a 95°C durante 10 min. Para la hibridación se tomó en cuenta una incorporación de 1-2 X 10⁶ cpm/ml de solución para hibridar. La hibridación se llevó a cabo a 42°C durante toda la noche.

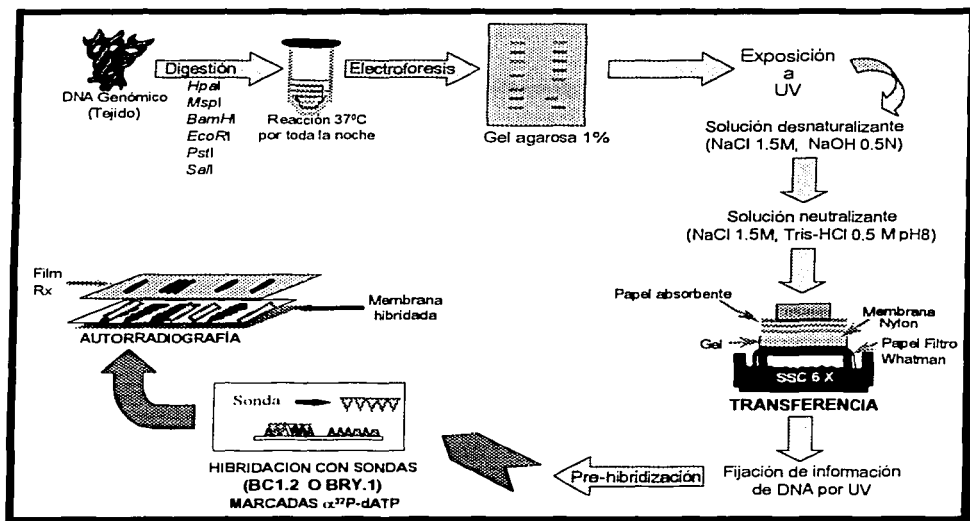


FIGURA 6. TÉCNICA DE SOUTHERN BLOT. Representación esquemática de restricción de ADN con diferentes enzimas, electroforesis, transferencia, pre-hibridación, hibridación y autorradiografía de la información obtenida.

Después del tiempo dado, la sonda fue extraída del tubo de hibridación y la membrana fue lavada en 4 ocasiones con 10, 30, 30 y 30 ml respectivamente con solución de lavado (Anexo 5) a 55°C por 10

min cada una, con el objeto de eliminar residuos de la solución de hibridación. Terminados los lavados, la membrana fue cubierta con papel plástico auto-adherible y se expuso a una placa fotográfica (Film de RX) durante toda la noche a -20°C. Finalmente la placa fue revelada y evaluada.

ENSAYO 2

Con base a los resultados obtenidos, se realizó un segundo Southern blot, utilizando únicamente las enzimas de restricción **BamHI**, **EcoRI** y **PstI** con ADN genómico de machos y hembras de bovino (Holstein y Cebú), utilizando las sondas de **BC1.2** y **BRY.1**, obtenidas nuevamente para hibridar. La metodología se llevó a cabo de acuerdo al ensayo 1.

ENSAYO 3

Se llevó a cabo un tercer ensayo de Southern blot, con el objeto de comparar la distribución de la secuencia de BC1.2 de bovino en búfalo, ovino y caprino. Para esto, se utilizó ADN genómico de hembras y machos de Bovino (Holstein y Cebú), búfalo, ovino y caprino, digeridos con **BamHI**, **EcoRI** y **PstI**, y para la hibridación se utilizó la sonda de **BC1.2**.

CAPÍTULO IV

Resultados

4.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Los ensayos realizados con las diferentes variables evaluadas en la técnica de PCR (condiciones de reacción: MgCl₂, dNTPs, Taq-polimerasa, ADN genómico e iniciadores; y condiciones en termociclador: tiempos y temperaturas específicas), identificaron condiciones aceptables para la amplificación de las secuencias de ADN del cromosoma Y (Figura 7) de copia única **AMX/Y**, **SRY** y **ZFX/Y**; y de copia repetida **BC1.2**, **BOV97M** y **BRY.1** en bovino, ovino, caprino y búfalo.

No obstante, al realizar inicialmente los ensayos en bovino con el par de iniciadores para la secuencia de **LambdaES6.0**, y al no obtener resultados favorables de amplificación, desde ese momento se optó por no proseguir con su evaluación.

Por otra parte, al evaluar los iniciadores para las secuencias de ADN satélite **1.709** y **1.715** se obtuvieron resultados favorables de amplificación; usando 1.709 únicamente para bovino y 1.715 para bovino, ovino, caprino y búfalo. Corroborando su uso conjuntamente con las secuencias del cromosoma Y para ser utilizadas como control interno de amplificación en las reacciones de PCR: amplificación en machos de la secuencia de Y y de la secuencia satélite, y en hembras la amplificación únicamente de la secuencia satélite.

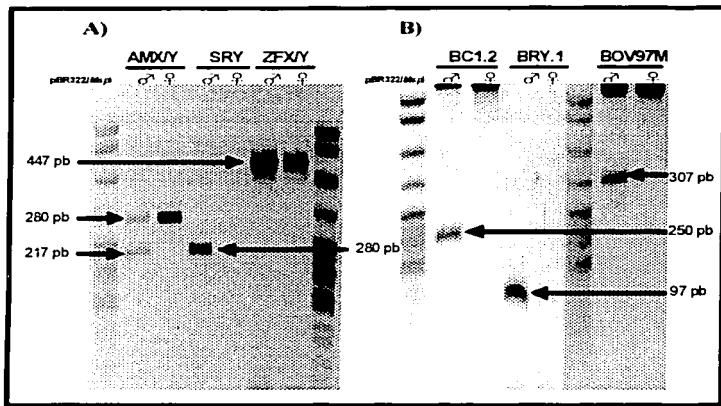


FIGURA 7. AMPLIFICACIÓN POR PCR DE SECUENCIAS DE ADN DE COPIA ÚNICA Y DE COPIA REPETIDA DIAGNÓSTICAS DEL SEXO. En **A)** se muestran los fragmentos amplificados de copia única (*AMXY*, *SRY* y *ZFX*) a partir de ADN genómico de sexo conocido (♂ o ♀). En **B)** se muestran los fragmentos amplificados de copia repetida (*BC1.2*, *BRY.1* y *BOV97M*). Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de agarosa 3%, teñidos con bromuro de etidio y visualizados bajo luz UV, utilizando el marcador molecular pBR322/*MspI*. Las flechas indican el tamaño de los fragmentos amplificados.

4.2. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE SENSIBILIDAD

Inicialmente se ensayaron las diferentes concentraciones de ADN de bovino con cada uno de los pares de iniciadores para la amplificación de las secuencias diagnósticas, no observando resultados aceptables de sensibilidad con los iniciadores para las secuencias de copia única *AMXY*, *SRY* y *ZFX* debido a que la amplificación fue hasta de 20 ng de ADN, equivalente a 4,000 células. La secuencia de ADN repetida *BOV97M* requirió 10 veces menos de ADN que las secuencias de copia única, logrando amplificar hasta 0.05 ng de ADN, equivalente a 10 células. En cambio, con los iniciadores para las secuencias de ADN repetidas *BC1.2* y *BRY.1* alcanzaron los niveles requeridos de amplificación con 0.005, equivalente a una célula; sin embargo al utilizar 0.0025 ng de ADN los resultados de amplificación fueron inconsistentes ya que de las 6 ocasiones que se repitieron los

ensayos, solamente cuatro veces se presentó amplificación de BC1.2 y en tres ocasiones se presentó amplificación para BRY.1 (Cuadro 5).

Los seis ensayos que se realizaron bajo las mismas condiciones para cada secuencia de ADN, presentaron el mismo comportamiento, no encontrando diferencias estadísticas entre las diferentes cantidades de ADN utilizadas para la amplificación de las secuencias de BC1.2 y BRY.1, pero si para las secuencias de *AMXY*, *SRY*, *ZFX* y para BOV97M ($p < 0.001$).

CUADRO 5. NIVEL DE SENSIBILIDAD DE LAS SECUENCIAS DEL CROMOSOMA Y AL UTILIZAR DIFERENTES CONCENTRACIONES DE ADN GENÓMICO DE HEMBRAS Y MACHOS

ADN (ng)	*CÉLULAS								
	½	1	2	5	10	50	100	1,000	4,000
0.0025	0.0025	0.005	0.01	0.025	0.05	0.25	0.5	5	20
<i>AMEXY</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>SRY</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>ZFX</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	+
BOV97M	-	-	-	-	+	+	+	+	+
BC1.2	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+
BRY.1	-/+	+	+	+	+	+	+	+	+

Los ensayos se realizaron en 6 ocasiones bajo las mismas condiciones de reacción.

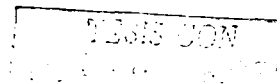
* Número aproximado de células.

-/+ Resultado inconsistente de amplificación: Para BC1.2 cuatro amplificaciones y BRY.1 tres amplificaciones de los seis ensayos realizados.

+ Amplificación: 6 amplificaciones en los 6 ensayos realizados.

- No se observó amplificación en los 6 ensayos realizados.

Posteriormente, al encontrar los mejores niveles de sensibilidad para BC1.2 y para BRY.1 en las cuatro especies en estudio, éstas fueron evaluadas conjuntamente con 1.709 únicamente para la evaluación con ADN genómico de hembras y machos de bovino (**BC1.2 + 1.709** y **BRY.1 + 1.709**); y 1.715 para ADN de machos y hembras de bovino, ovino, caprino y búfalo (**BC1.2 + 1.715** y **BRY.1 + 1.715**), observando niveles óptimos de sensibilidad con las concentraciones de ADN de macho y hembra [0.005, 0.01, 0.025, 0.05 ng] en ovinos, caprinos y búfalos con relación a los encontrados en las concentraciones mínimas requeridas de ADN en el bovino (Cuadro 6), no encontrando diferencias estadísticas en los 6 ensayos realizados para cada grupo de iniciadores y entre especies.



CUADRO 6. NIVEL DE SENSIBILIDAD DE LAS SECUENCIAS BC1.2 Y BRY.1, Y DE LAS SECUENCIAS SATELITE 1.709 Y 1.715 EN LAS 4 ESPECIES ESTUDIADAS

ADN [ng]			0.005	0.01	0.025	0.05
No. BLASTOMEROS			1	2	3	4
BOVINO	B	1.709 / 1.715	+	+	+	+
OVINO	C	1.715	+	+	+	+
CAPRINO	1.	1.715	+	+	+	+
BÚFALO	2	1.715	+	+	+	+
BOVINO	B	1.709 / 1.715	+	+	+	+
OVINO	R	1.715	+	+	+	+
CAPRINO	Y.	1.715	+	+	+	+
BÚFALO	1	1.715	+	+	+	+

Los ensayos se realizaron en 6 ocasiones bajo las mismas condiciones de reacción.

+ Demuestra la sensibilidad encontrada para la amplificación de las secuencias BC1.2, BRY.1, 1.709 y 1.715: Amplificación en los seis ensayos realizados.

4.3. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD

En el primer ensayo se evaluaron los dos grupos de iniciadores para la amplificación de las secuencias de ADN BC1.2 + 1.709 y de BRY.1 + 1.709, utilizando para cada grupo 57 muestras de ADN genómico de bovinos de sexo conocido y ADN genómico de macho y hembra como control de amplificación. Se identificó con **BC1.2 + 1.709** el sexo de 33 machos y 24 hembras. El diagnóstico fue concordante al 100% con el sexo de los individuos. Con **BRY.1 + 1.709** se identificaron 29 machos y 23 hembras, siendo coherente al 100% con el sexo de los individuos. Sin embargo, cinco muestras de ADN no amplificaron, posiblemente por error en el manejo de las muestras de ADN (Cuadro 7).

Por lo tanto, no se encontraron diferencias estadísticas con relación al diagnóstico del sexo dentro de cada grupo de iniciadores, pero si entre los dos grupos de iniciadores ($p < 0.005$) que posiblemente se debió al uso de grupos diferentes de muestras de ADN para la evaluación de BC1.2 + 1.709 y para BRY.1 + 1.709; sumado al error que se tuvo en el manejo de cinco muestras de ADN al evaluar BRY.1 + 1.709.

CUADRO 7. ESPECIFICIDAD DE LAS SECUENCIAS BC1.2 + 1.709 Y BRY.1 + 1.709 EMPLEANDO ADN GENÓMICO DE BOVINO

	SECUENCIAS AMPLIFICADAS	
	BC1.2 + 1.709	BRY.1 + 1.709
	No. Muestras de ADN	No. Muestras de ADN
MACHOS	33	29
HEMBRAS	24	23
AUSENCIA DE AMPLIFICACIÓN	-	5
TOTAL	57 muestras de ADN diagnosticadas al 100% con el sexo de los individuos	52 muestras de ADN diagnosticadas al 100% con el sexo de los individuos

La evaluación de los dos grupos de iniciadores se realizó con grupos de muestras de ADN independientes.

En el segundo ensayo, se evaluaron los grupos de iniciadores para **BC1.2 + 1.715** y **BRY.1 + 1.715**, utilizando un solo grupo de ADN genómico de 75 bovinos de sexo conocido. Se identificó el sexo de 42 machos y 33 hembras con ambos grupos de iniciadores (Cuadro 8).

El sexado de las muestras diagnosticadas como machos y hembras fue concordante al 100% con el sexo de los individuos, no encontrando diferencias estadísticas entre ambos grupos de iniciadores. Posiblemente se debió a la evaluación de un solo grupo de ADNs para ambos grupos de iniciadores.

CUADRO 8. ESPECIFICIDAD DE LAS SECUENCIAS BC1.2 + 1.715 Y BRY.1 + 1.715 EMPLEANDO ADN GENÓMICO DE BOVINO

	SECUENCIAS AMPLIFICADAS	
	BC1.2 + 1.715	BRY.1 + 1.715
	No. Muestras de ADN	No. Muestras de ADN
MACHOS	42	42
HEMBRAS	33	33
AUSENCIA DE AMPLIFICACIÓN	-	-
TOTAL	75 muestras de ADN diagnosticadas al 100% con el sexo de los individuos	75 muestras de ADN diagnosticadas al 100% con el sexo de los individuos

La evaluación de los dos grupos de iniciadores se realizó con un sólo grupo de muestras de ADN.

4.4. SEXADO DE EMBRIONES COMPLETOS

Se realizó el sexado de 62 embriones completos de bovino, conformando dos grupos de 31 embriones. En el primer grupo donde se aplicaron los iniciadores para **BC1.2 + 1.709** se determinó que 12 embriones fueron machos, 8 fueron hembras y en 11 embriones no fue posible diagnosticar su sexo. En el segundo grupo con los iniciadores para **BRY.1 + 1.709** se diagnosticó que 10 embriones fueron machos, 15 fueron hembras y en seis muestras embrionarias no se determinó el sexo (Cuadro 9). En ambos grupos donde no fue posible determinar el sexo de los embriones, probablemente se debió a errores en el manejo del método para obtener el ADN. Cabe mencionar que todas las muestras que amplificaron en ambos grupos, coincidieron con el diagnóstico de las ampliificaciones de las muestras que contenían ADN de sexo conocido y que fueron utilizadas como control de diagnóstico en las reacciones de PCR.

No se encontraron diferencias estadísticas entre la identificación de las muestras embrionarias que amplificaron y el ADN genómico utilizado como control de diagnóstico; pero si con relación a los errores en la obtención de ADN de los embriones para realizar las reacciones de PCR ($p < 0.001$).

CUADRO 9. DIAGNÓSTICO DEL SEXO EMPLEANDO BC1.2 + 1.709 Y BRY.1 + 1.709, Y ADN DE EMBRIONES COMPLETOS DE BOVINO

	SECUENCIAS AMPLIFICADAS	
	BC1.2 + 1.709	BRY.1 + 1.709
	Diagnóstico a partir de ADN de embriones completos	Diagnóstico a partir de ADN de embriones completos
MACHOS	12	10
HEMBRAS	8	15
AUSENCIA DE AMPLIFICACIÓN	11	6
TOTAL DE EMBRIONES UTILIZADOS	31	31

En el segundo ensayo, al evaluar en el primer grupo los 27 embriones completos con **BC1.2 + 1.715**, se identificó que 17 embriones fueron machos y 10 fueron hembras. En el segundo grupo al evaluar los 27 embriones completos con **BRY.1 + 1.715**, se identificaron 12 embriones machos y 15 hembras (Cuadro 10), no encontrando diferencias estadísticas entre las muestras de embriones amplificadas y del ADN genómico utilizado como control de diagnóstico.

CUADRO 10. DIAGNÓSTICO DEL SEXO EMPLEANDO BC1.2 + 1.715 Y BRY.1 + 1.715, Y ADN DE EMBRIONES COMPLETOS DE BOVINO

	SECUENCIAS AMPLIFICADAS	
	BC1.2 + 1.715	BRY.1 + 1.715
	Diagnóstico a partir de ADN de embriones completos	Diagnóstico a partir de ADN de embriones completos
MACHOS	17	12
HEMBRAS	10	15
TOTAL DE EMBRIONES UTILIZADOS	27	27

4.5. DIAGNÓSTICO DEL SEXO DE EMBRIONES DE BOVINO, OVINO Y CAPRINO A PARTIR DE BLASTÓMEROS

Se procedió a realizar el diagnóstico del sexo en bovino, ovino y caprino a partir de 1, 2, 3 y 4 blastómeros obtenidos por micromanipulación, empleando los juegos de iniciadores para las secuencias BC1.2 + 1.715 (Figura 8) y BRY.1 + 1.715 (Figura 9).

Al utilizar los iniciadores para las secuencias **BC1.2 + 1.715** se diagnosticaron 19 embriones masculinos y 15 embriones femeninos de bovinos; 2 embriones masculinos y 4 femeninos de ovinos; y 3 embriones masculinos y 3 femeninos de caprinos. Los resultados obtenidos con los iniciadores para **BRY.1 + 1.715** fueron 11 embriones masculinos y 23 femeninos de bovinos; un embrión masculino y 5 femeninos de ovinos; y 2 embriones masculinos y 4 femeninos de caprinos (Cuadro 11). El diagnóstico del sexo a partir de cada muestra de blastómeros fue corroborado al evaluar el

resto del embrión micromanipulado y conjuntamente con el ADN genómico de macho y hembra, previamente sexados.

El análisis estadístico confirma que no existieron diferencias estadísticas en el uso de los iniciadores para BC1.2 + 1.715 y BRY.1 + 1.715 con relación al número de blastómeros empleados para realizar el diagnóstico del sexo; así como al utilizar ADN de biopsias embrionarias o el ADN total del resto del embrión micromanipulado para obtener las biopsias.

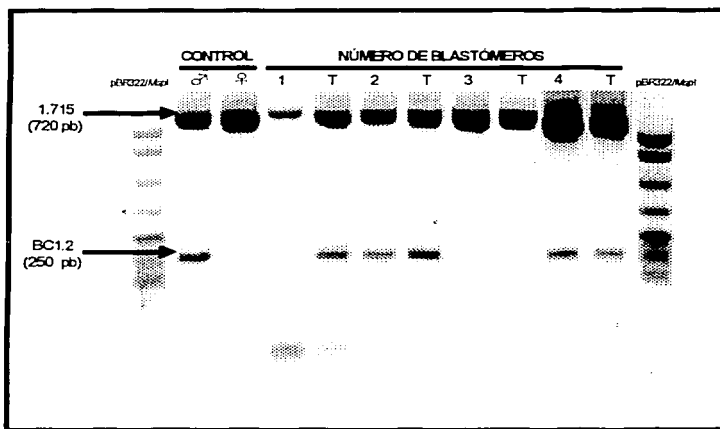


FIGURA 8. EJEMPLO DEL DIAGNÓSTICO DEL SEXO CON DIFERENTE NÚMERO DE BLASTÓMEROS EMPLEANDO LOS INICIADORES PARA LAS SECUENCIAS BC1.2 + 1.715. Se muestra la separación de los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 3%. En la parte superior de cada carril se indica el número de blastómeros empleados en el ensayo (1, 2, 3 y 4), junto al resultado obtenido cuando se empleó el resto del embrión (T) donde se obtuvo cada una de las muestras de blastómeros, además de ADN genómico de macho (♂) y hembra (♀) previamente identificados. Se utilizó el ADN pBR322/Msp1 como marcador molecular para la verificación de los tamaños de los fragmentos de BC1.2 y de 1.715. Los resultados indican que los embriones evaluados con 1, 2 y 4 blastómeros fueron machos (1.715 y BC1.2) y el embrión evaluado con 3 blastómeros fue hembra (1.715).

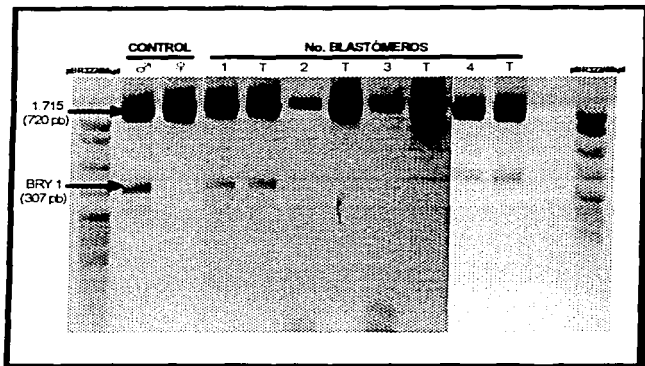


FIGURA 9. EJEMPLO DEL DIAGNÓSTICO DEL SEXO CON DIFERENTE NÚMERO DE BLASTÓMEROS EMPLEANDO LOS INICIADORES PARA LAS SECUENCIAS BRY.1 + 1.715. Se muestra la separación de los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 3%. En la parte superior de cada carril se indica el número de blastómeros empleados en el ensayo (1, 2, 3 y 4), junto al resultado obtenido cuando se empleó el resto del embrión (T) donde se obtuvo cada una de las muestras de blastómeros, además de ADN genómico de macho (♂) y hembra (♀) previamente identificados. Se utilizó el ADN pBR322/Msp1 como marcador molecular para la verificación de los tamaños de los fragmentos de BRY.2 y de 1.715. Los resultados indican que los embriones evaluados con 1 y 4 blastómeros fueron machos (1.715 y BRY.1) y los embriones evaluados con 2 y 3 blastómeros fueron hembras (1.715).

CUADRO 11. RESULTADO DEL DIAGNÓSTICO DEL SEXO A PARTIR DE BLASTÓMEROS

No. BLASTÓMEROS	BC1.2 + 1.715						BRY.1 + 1.715					
	BOVINO		OVINO		CAPRINO		BOVINO		OVINO		CAPRINO	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
1	3	5	1	1	1	-	3	7	-	3	-	2
2	5	4	1	-	-	2	4	5	-	1	1	1
3	5	4	-	1	2	1	3	5	1	-	1	-
4	6	2	-	2	-	-	1	6	-	1	-	1
* TOTAL DE EMBRIONES	19	15	2	4	3	3	11	23	1	5	2	4

* Los ensayos se realizaron con los blastómeros y con los embriones que fueron micromanipulados.

4.6. SOUTHERN BLOT UTILIZANDO SONDAS DE BC1.2 Y BRY.1

En el primer ensayo donde se realizaron hibridaciones con ADN genómico de hembras y machos de bovinos (Holstein y Cebú), previamente digeridos con *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* y *SalI* (ADN/*HpaI*, ADN/*MspI*, ADN/*BamHI*, ADN/*EcoRI*, ADN/*PstI* y ADN/*SalI*) y utilizando la sonda de **BC1.2** (Figura 10) se observó un patrón complejo de hibridación, difiriendo en la intensidad del bandeo³.

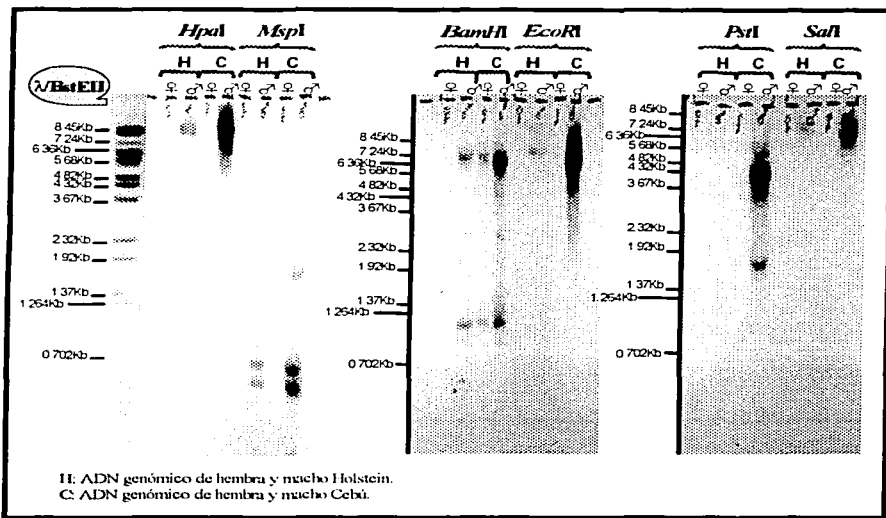


FIGURA 10. SOUTHERN BLOT CON BC1.2 EN ADN DE HOLSTEIN Y CEBÚ DIGERIDO CON *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* Y *SalI*. Hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADN/*HpaI*, ADN/*MspI*, ADN/*BamHI*, ADN/*EcoRI*, ADN/*PstI* y ADN/*SalI* de hembras y machos Holstein (H) y Cebú (C), utilizando como marcador molecular λ /BstEII. Se observa un patrón similar de hibridación con ADN de machos Holstein y Cebú digeridos con *MspI*, *BamHI* y *EcoRI*; y con *PstI* solo se revela un patrón de hibridación en Cebú macho.

³ La intensidad de bandas que se presentaron en las hibridaciones fue definida de acuerdo al número de copias de una secuencia: mayor intensidad (mayor número de copias) y menor intensidad (menor número de copias).

Con respecto al ADN/*HpaI*, se mostró una banda aproximadamente de 8.4 Kb en ambos machos, con mayor intensidad en Cebú. En ADN/*MspI* se observaron 2 bandas similares en ambos machos con un tamaño menor de 0.7 Kb, aunque en el macho Cebú se observó con mayor intensidad ambas bandas, sumado a que presentó también una banda de menor intensidad de 1.8 Kb. En ADN/*BamHI*, sin tomar en cuenta el error en la hembra Cebú, se observaron 2 bandas en ambos machos de aproximadamente de 7.24 (con mayor intensidad en Cebú) y 1.0 Kb; y una banda más en Cebú de 2.9 Kb. Con respecto a ADN/*EcoRI*, se observó una banda en los dos machos, alrededor de 6.8 Kb con mayor intensidad en Cebú. En ADN/*PstI*, únicamente se observó un patrón de bandeo en el macho Cebú con 4.9, 4.0, 3.5 y 1.6 Kb. En ADN/*SaI* no se observó ningún patrón. Con esto, se ratificó que la secuencia de BC1.2 únicamente se encuentra presente en machos, específicamente en el cromosoma Y y al observar una mayor intensidad en machos Cebú que en machos Holstein, posiblemente es porque BC1.2 se encuentra presente en un mayor número de copias en Cebú.

Con relación a ADNs de hembras en general no se observó la presencia de BC1.2, a excepción de la restricción con *BamHI* en ADN de hembra Cebú que presentó un patrón de bandeo muy similar al de los machos, pero posiblemente esto se debió a un problema de contaminación con ADN de macho.

En las hibridaciones con la **sonda de BRY.1** (Figura 11), no se observaron patrones de bandeo definidos de BRY.1 con ADN/*HpaI*, ADN/*MspI* y ADN/*SaI*. Con relación a ADN/*BamHI*, ADN/*EcoRI* y ADN/*PstI*, no se refleja una clara definición, ya que en ADN de machos Holstein no se observó la presencia de BRY.1, en cambio en machos Cebú se observaron 2 bandas en ADN/*BamHI* de 6.3 y 4.9 Kb; en ADN/*EcoRI* se observaron dos bandas aproximadamente de 7.5 y de 5.6 Kb; y con relación a ADN/*PstI* se observaron tres bandas de 4.3, 1.9 y 1.6 Kb.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el primer ensayo, se desarrolló un segundo ensayo obteniendo nuevamente ambas sondas de BC1.2 y BRY.1 y la restricción de ADNs de hembras y machos de Holstein y Cebú únicamente con *BamHI*, *EcoRI* y *PstI*, observando en general un patrón más definido de hibridación en machos, que el logrado en el primer ensayo.

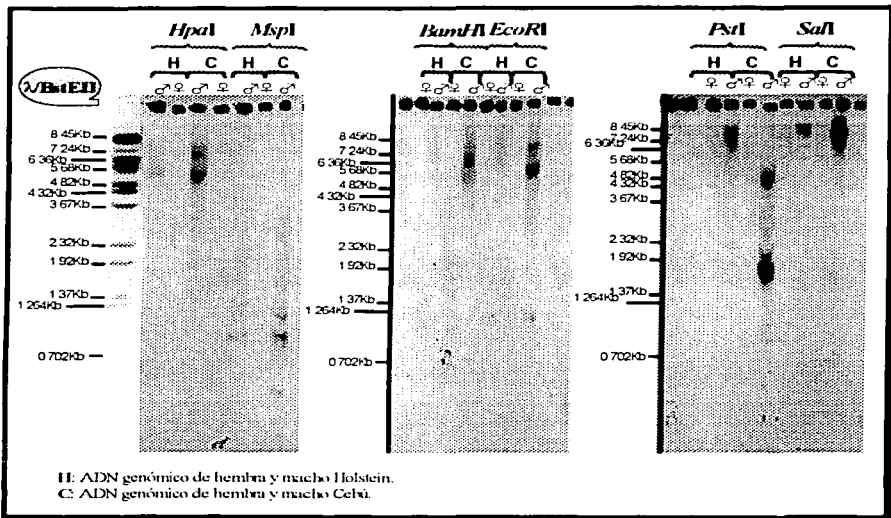


FIGURA 11. SOUTHERN BLOT CON BRY.1 EN ADN DE HOLSTEIN Y CEBÚ DIGERIDO CON *HpaI*, *MspI*, *BamHI*, *EcoRI*, *PstI* Y *SalI*. Hibridaciones con la sonda de BRY.1 sobre ADN/*HpaI*, ADN/*MspI*, ADN/*BamHI*, ADN/*EcoRI*, ADN/*PstI* y ADN/*SalI* de hembras y machos Holstein (H) y Cebú (C), utilizando como marcador molecular λ /*BstEII*. Se observa un patrón de hibridación con ADN de macho Cebú digerido con *BamHI*, *EcoRI* y *PstI*; no observándose así en el macho Holstein.

En las hibridaciones con la **sonda de BC1.2** (Figura 12) sobre ADN/*BamHI* de machos Holstein y Cebú, se observó un patrón de bandeo de BC1.2 muy similar, aunque con una mayor intensidad en el Cebú, los tamaños de bandeo para ambos machos fue aproximadamente de 5.4, 4.8, 2.2, 1.6 y de 0.8 Kb; y con relación al Holstein, el Cebú presentó tres bandas más de 3.5, 3 y de 0.7 Kb. En ADN/*EcoRI*, tanto el Holstein como el Cebú presentaron dos bandas aproximadamente de 6.3 y 5.5 Kb, observándose mayor intensidad en el Cebú. En ADN/*PstI* se presentaron similarmente en intensidad dos bandas, tanto en Holstein como en Cebú con 4.8 y 1.9 Kb.

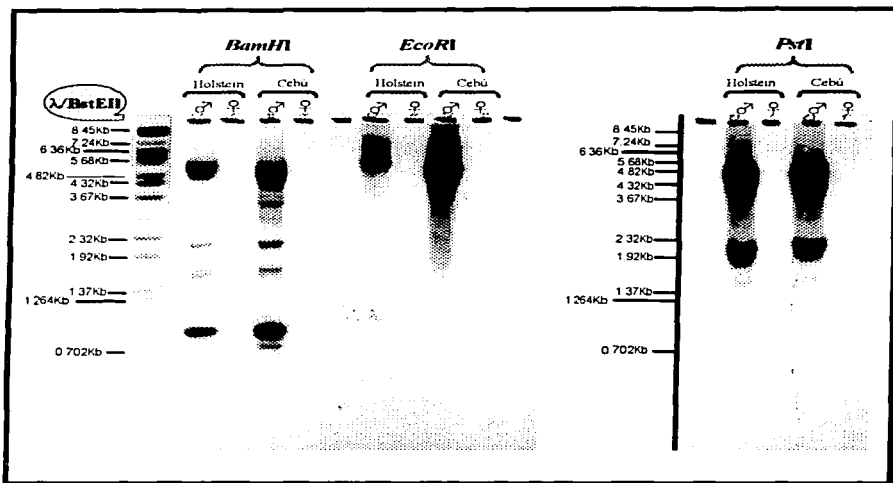


FIGURA 12. SOUTHERN BLOT CON **BC1.2** EN ADN DE HOLSTEIN Y CEBÚ DIGERIDO CON *BamHI*, *EcoRI* Y *PstI*. Hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADN/*BamHI*, ADN/*EcoRI* y ADN/*PstI* de hembras y machos Holstein (H) y Cebú (C), utilizando como marcador molecular λ /BstEII. Se observa un patrón definido de hibridación y similar en los machos Holstein y Cebú con la digestión de las tres enzimas.

Esto corrobora que la secuencia de BC1.2 es específica de machos y por ende presente en el cromosoma Y; asimismo se demuestra con ADN/*PstI* que existe un mayor número de copias de BC1.2 en Cebú que en Holstein por observarse un mayor número de bandas y con mayor intensidad.

Con respecto a las hibridaciones con la **sonda de BRY.1** (Figura 13) se observaron patrones similares en ADN/*BamHI* en los machos Holstein y Cebú con 6.3, 5.6 y de 1.9 Kb. Sin embargo, se observó una banda en ambos machos con tamaño diferente, ya que en Holstein fue una banda de 4.3 Kb y en Cebú de 4.1 Kb. Con relación a ADN/*EcoRI* se presentaron tres bandas en el macho Cebú de 8.4, 6.3 y de 1.5 Kb.

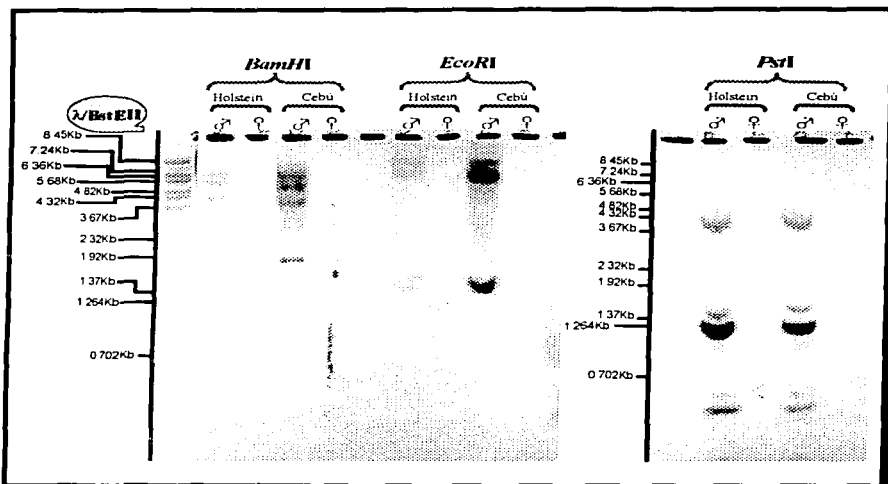


FIGURA 13. SOUTHERN BLOT CON BRY.1 EN ADN DE HOLSTEIN Y CEBÚ DIGERIDO CON *Bam*HI, *Eco*RI y *Pst*I. Hibridaciones con la sonda de BRY.1 sobre ADN/*Bam*HI, ADN/*Eco*RI y ADN/*Pst*I de hembras y machos Holstein y Cebú, utilizando como marcador molecular λ BstEII. Se observa un patrón definido de hibridación y similar en los machos Holstein y Cebú con la digestión de *Bam*HI y *Pst*I. No sucediendo así con *Eco*RI.

En ADN/*Pst*I se observaron cinco bandas con un comportamiento muy similar en ambos machos de 3.67, 1.37, 1.0 (con mayor intensidad) y dos bandas menores a 0.7 Kb. Con esto se demuestra que BRY.1 es una secuencia específica de machos por no presentar hibridación en ADNs de hembras y por ende está presente únicamente en el cromosoma Y. Asimismo, al presentar un patrón de bandeo muy similar tanto en Holstein como en Cebú, se demostró que la distribución de copias de la secuencia de BRY.1 es similar en ambas razas de bovinos.

Para corroborar la presencia de BC1.2 en las otras especies estudiadas para el sexado de embriones, se desarrolló un tercer ensayo de Southern blot, realizando hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADNs de machos y hembras de Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino, digeridos con *Bam*HI, *Eco*RI y *Pst*I.

Con relación a las hibridaciones realizadas sobre ADN/*Bam*HI (Figura 14), se observó que en los machos Holstein y Cebú presentaron en general patrones de hibridación muy similares; siendo los mismos que los encontrados en el ensayo 2.

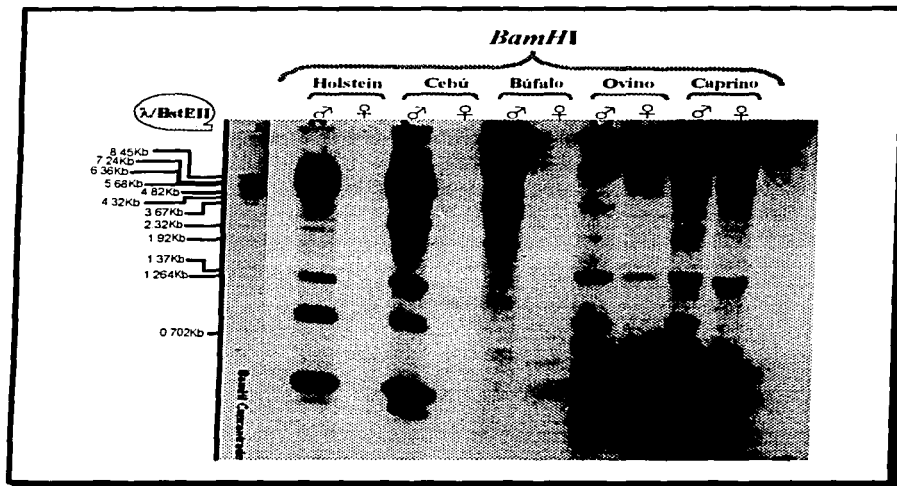


FIGURA 14. SOUTHERN BLOT CON BC1.2 EN ADN DE HOLSTEIN, CEBÚ, BÚFALO, OVINO Y CAPRINO CON *Bam*HI. Hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADN/*Bam*HI de hembras y machos Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino, utilizando como marcador molecular $\lambda/BstEII$. Se observa un patrón definido de hibridación y similar en machos Holstein y Cebú; un patrón de hibridación en búfalo que difiere de los machos de bovinos; y un patrón similar en machos de ovino y caprino; con un patrón también similar pero en menor número en hembras de ambas especies.

En el macho búfalo se observaron cuatro bandas, donde dos de ellas fueron mayores a 8.45, y las otras dos de 2.99 y 1.85 Kb con menor intensidad, observando que BC1.2 se presenta únicamente en el macho con un menor número de copias y una distribución diferente a lo observado en Holstein y Cebú. En los ADNs de ovino y caprino presentan patrones de bandeo muy similares (1.37, 0.84 y una banda menor a 0.7 Kb), a excepción que el ovino presentó dos bandas más de 8.45 y 3.67 Kb y el caprino una banda de 4.8 Kb. Siendo que la secuencia de BC1.2 en ambas especies se encuentra

distribuida más ampliamente que en el búfalo. También en ambas especies se observó que en los ADN de hembras hubo presencia de un patrón de bandeo de BC1.2 de 6.36 y 1.26 Kb, observando también un menor número de copias y una escasa distribución comparada a la de los machos. En las hibridaciones realizadas en ADN/*EcoRI* (Figura 15) se observaron los mismos patrones de bandeo de BC1.2 en machos de Holstein y Cebú con relación a lo observado en el ensayo 2. En ADN de búfalo, únicamente BC1.2 hibridó para el macho encontrando dos bandas de menor intensidad de 1.6 y 1.37 Kb; y tres bandas de mayor intensidad de 0.7 Kb y dos de menor tamaño a 0.7 Kb, con una distribución más amplia que en bovinos. En ovinos y caprino no se observaron patrones de hibridación, tanto en machos como para hembras.

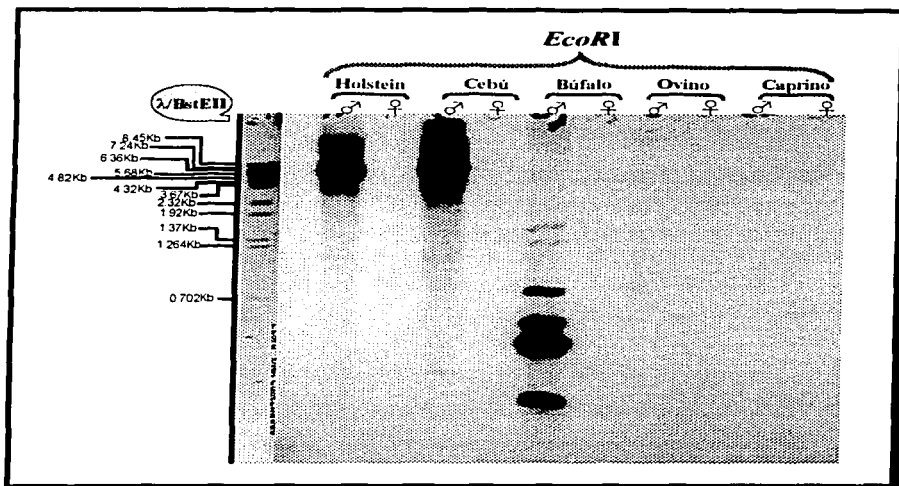


FIGURA 15. SOUTHERN BLOT CON BC1.2 EN ADN DE HOLSTEIN, CEBÚ, BÚFALO, OVINO Y CAPRINO CON *EcoRI*. Hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADN/*EcoRI* de Hembras y machos Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino, utilizando como marcador molecular λ BstEII. Se observa un patrón definido de hibridación y similar en machos Holstein y Cebú; un patrón de hibridación en búfalo que difiere de los machos de bovinos. No se observan patrones de hibridación en ovinos y caprinos.

En las hibridaciones para ADN/*Pst*I, (Figura 16) se presentaron patrones más definidos en Holstein y Cebú que lo observado en los ensayos 1 y 2 para BC1.2 con un patrón muy similar en ambos machos, pero con mayor intensidad en Cebú. En el ADN de macho de búfalo se presentaron hibridaciones que difieren en tamaño de bandas con relación a los bovinos con 1.85, 1.37, 1.26, 1.12, 0.9, 0.73 y cinco menores a 0.7 Kb. Con relación a ADNs de ovinos y caprinos, al igual que en ADN/*Eco*RI no presentaron patrones de hibridación.

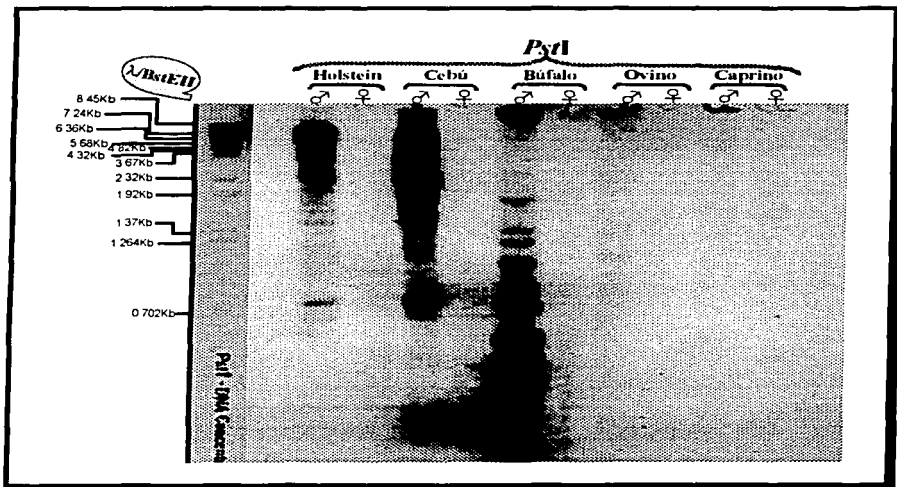


FIGURA 16. SOUTHERN BLOT CON BC1.2 EN ADN DE HOLSTEIN, CEBÚ, BÚFALO, OVINO Y CAPRINO CON *Pst*I. Hibridaciones con la sonda de BC1.2 sobre ADN/*Pst*I de Hembras y machos Holstein, Cebú, búfalo, ovino y caprino, utilizando como marcador molecular λ /*Bst*EII. Se observa un patrón definido de hibridación y similar en machos Holstein y Cebú; un patrón de hibridación en búfalo que difiere de los machos de bovinos con tamaños menores de bandeo. No se observan patrones de hibridación en ovinos y caprinos.

CAPÍTULO V

Discusión

5.1. ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR

Con base a los resultados encontrados en este estudio, inicialmente al estandarizar la técnica con concentraciones iniciales de 20 a 50 ng de ADN genómico de hembras y machos de bovino, ovino, caprino y búfalo se obtuvieron resultados favorables de amplificación de las secuencias específicas del cromosoma Y, tanto de copia única (*AMXY*, *SRY* y *ZFX*), como de las secuencias de copia repetida (BC1.2, BOV97, BRY.1), no resultando así, con LambdaES6.0 donde no se obtuvieron condiciones adecuadas de amplificación.

5.2. EVALUACIÓN DEL NIVEL DE SENSIBILIDAD

Al realizar los ensayos de sensibilidad con ADN genómico de bovinos, ovinos y caprinos claramente se demostró que los iniciadores que amplifican secuencias de copia única (*AMXY*, *SRY* y *ZFX*) no son recomendables para el sexado de blastómeros; ya que las cantidades mínimas de ADN para la amplificación fue de 20 ng, lo que equivale cerca de 4,000 células. En cambio, con los iniciadores para las secuencias de copia repetida BC1.2 y BRY.1 se encontró que se amplificaron consistentemente hasta con 0.005 ng de ADN, cantidad equivalente a la contenida en una célula, considerando que la cantidad de ADN por célula diploide es de 6×10^{-12} g (Fries and Ruvinski,

1999). Esto no fue el caso para la secuencia repetida BOV97M, cuyo límite de amplificación fue 10 veces más (0.05 ng de ADN, equivalente a 10 células).

Las diferencias en los niveles de sensibilidad puede explicarse por la abundancia de estas secuencias en el genoma. En el caso de *AMXY*, *SRY* y *ZFX/Y* sólo están presentes en una sola copia en el cromosoma Y, y BOV97M aunque es una secuencia repetida, existe en un bajo número de copias (aproximadamente 5 copias) (Miller and Koopman, 1990). Con esto, se considera que dichas secuencias no son suficientes para que se amplifiquen por PCR a los niveles requeridos de sensibilidad en nuestras condiciones ($p < 0.001$). En contraste, con BC1.2 y BRY.1 que representan cada una de 0.2% a 0.5% del genoma del macho como lo mencionan Popescu *et al.* (1988) y Schwerin *et al.* (1992), por lo que las hace ser más sensibles.

Con relación a las secuencias *AMXY*, *SRY* y *ZFX/Y*, en varios estudios se ha mencionado que presentan resultados satisfactorios para el sexado. No obstante, una desventaja de utilizar secuencias de copia única, es que pueden ocasionar la amplificación del gen de humano o de otra especie, que no esté relacionada con el ensayo de diagnóstico sexual. Como el caso de *SRY* que presentan una región homóloga entre especies (ej. Región de ADN de humano que se puede aplicar para el diagnóstico del sexo en bovino, caprino y ovino) (Peyen and Cotinot, 1993); o el dúplex *SRY/ZFX-ZFY* usado por Pomp *et al.* (1995) para determinar el sexo en embriones de cerdo, siendo que el mismo dúplex puede ser utilizado para la determinación en varias especies de mamíferos; además, de que puede proporcionar problemas de contaminación al amplificar una secuencia de ADN de otra especie que no sea la de interés.

Asimismo, la utilización de marcadores de ADN de copia única como el *locus ZFX/ZFY* (Aasen and Medrano, 1990) y la secuencia de HMG de *SRY* (Peyen and Cotinot, 1993) específicos de macho, usados para el sexado de embriones en el bovino y para otros mamíferos, tienen la desventaja de requerir iniciadores anidados, necesarios para la amplificación de las secuencias de interés y para encontrar mayor sensibilidad del ensayo, debido a la cantidad tan pequeña de ADN que es obtenida de biopsias de embriones (Gutiérrez-Adán *et al.*, 1996) que resulta complicado por los cambios dramáticos en las concentraciones del templado de ADN, relativos a las concentraciones de los iniciadores y reactivos para la reacción de PCR. Adicionalmente, la utilización de métodos de restricción para el análisis de RFLPs (Aasen and Medrano, 1990; Frásch and Ugalde, 1996). Por lo

que al realizar varios pasos consecutivos para obtener el diagnóstico del sexo, hace que los ensayos sean laboriosos con la posibilidad de tener problemas de contaminación.

Por otra parte, al evaluar los iniciadores para las secuencias de ADN satélite 1.709 y 1.715 se obtuvieron resultados favorables de amplificación, corroborando su uso como controles de amplificación para hembras, conjuntamente con la amplificación de las secuencias repetidas BC1.2 y BRY.1 que sólo pueden amplificar en machos; ya que tanto 1.709 como 1.705 son secuencias autosomales en forma de tandem en hembra y macho de bovino como mencionan Guoli *et al.* (1999) y Plucienniczak *et al.* (1982). Encontrándose el ADN satélite repetido desde 100 a 1,000 tiempos más que una secuencia repetida específica del cromosoma Y, por lo tanto, el ADN satélite puede ser amplificado más efectivamente que las secuencias específicas del macho, cuando se tienen pequeñas cantidades de ADN templado como lo indica Peura *et al.* (1991).

No obstante, al observar amplificaciones con ambas secuencias satélite, en este trabajo de estudio se determinó utilizar 1.715 como control positivo de amplificación en el diagnóstico del sexo en bovinos, ovinos y caprinos, debido a que la secuencia de 1.709 es específica de bovinos como lo menciona Modi *et al.* (1996); por lo que se requiere profundizar estudios para conocer la presencia de esta secuencia en ovinos y caprinos.

Appa Rao *et al.* (1993) han utilizado con éxito la secuencia de BRY.1 en conjunto con el satélite 1.715 para el sexado de embriones de bovinos, ovinos, caprinos y búfalos. Lo cual, en este estudio se logró demostrar. La secuencia BC1.2 sólo se había utilizado previamente como sonda molecular en bovinos en experimentos de hibridación *in situ* (Thomsen *et al.*, 1991; Kobayashi *et al.*, 1998). Sin embargo, en el presente trabajo, dicha secuencia se empleó en los ensayos de PCR, amplificando con éxito no sólo en bovinos, sino también en ovinos y caprinos con niveles adecuados de sensibilidad.

5.3. EVALUACIÓN DE ESPECIFICIDAD

Se demostró la precisión del diagnóstico del sexo en ADN genómico de bovinos con los grupos de iniciadores para BC1.2 + 1.709, BRY.1 + 1.709, BC1.2 + 1.715 y para BRY.1 + 1.715. Demostrando que las secuencias BC1.2 y BRY.1 únicamente se encuentran en machos y por ende en el cromosoma Y, y la secuencias satélite 1.709 y 1.715 se presentan tanto en machos como en

hembras. Esto, fue demostrado inicialmente con los productos amplificados por PCR al utilizar como control de diagnóstico ADN de macho y hembra previamente evaluados, y posteriormente al corroborar los resultados diagnosticados con el sexo de los individuos, por lo que se obtuvo el 100% de especificidad. También, se demostró que se puede encontrar la misma especificidad al utilizar BC1.2 + 1.715 ó BRY.1 + 1.715 para realizar el diagnóstico del sexo a partir de ADN genómico; sin embargo, al identificar el sexo al 100% con BC1.2+ 1.709 y BRY.1 + 1.709 se encontró una diferencia estadística ($p < 0.005$) entre ambos grupos de iniciadores, que se le atribuye al uso de ADN genómico diferente para ambos grupos y al error que se tuvo en cinco muestras de ADN al evaluar BRY.1 + 1.709.

5.4. SEXADO DE EMBRIONES COMPLETOS

Al realizar los ensayos con ADN obtenido de embriones completos de bovino se corroboró el uso de las secuencias BC1.2 y de BRY.1 para el sexado de embriones, ya que el diagnóstico proporcionado por los productos de PCR de BC1.2 + 1.709 y de BRY.1 + 1.709 fue verificado con la amplificación de muestras de ADN de hembras y machos de individuos adultos previamente sexado, en las cuales, no se encontraron diferencias estadísticas. Sin embargo, se presentaron errores en la obtención de ADN de los embriones para realizar las reacciones de PCR ($p < 0.001$), donde se tuvieron ausencias de amplificación con BC1.2 + 1.709 en un 35.48% de los casos y con BRY.1 + 1.709 en un 19.35%, probablemente se debió a errores en el manejo del ADN obtenido de los embriones. Lo contrario a los ensayos realizados con BC1.2 + 1.715 y con BRY.1 + 1.715 donde no se encontraron diferencias estadísticas entre los productos amplificados del ADN de embriones y del ADN genómico utilizado como control de diagnóstico obtenido de individuos adultos previamente sexado.

5.5. DIAGNÓSTICO DEL SEXO DE EMBRIONES DE BOVINO, OVINO Y CAPRINO A PARTIR DE BLASTÓMEROS

Al presentarse errores en la obtención del ADN de los embriones, se procedió a realizar varios ensayos de micromanipulación embrionaria, obtención de ADN de blastómeros y amplificación

de las secuencias de interés, antes de realizar los ensayos para realizar el diagnóstico del sexo a partir de biopsias de embriones.

Se observó que los errores se presentan desde la obtención y la lisis de los blastómeros para obtener el ADN, ya que al no tener un manejo adecuado del ADN puede sufrir degradación y por lo tanto, presentarse problemas en la amplificación de las secuencias de ADN de interés o en el tiempo que se requiere para su obtención.

A este respecto, Kirkpatrick y Monson (1993) mencionan que la contaminación del procedimiento de la biopsia, es posible, si el blastómero no es extraído totalmente dentro de la gota de sostén antes de su aspiración, o si las células individuales no son lisadas durante el procedimiento. Sin embargo, el método alternativo de partir o de cortar el embrión presenta un gran potencial de contaminación a través de la introducción de fragmentos de la zona pelúcida y adherencia de las células del cúmulus y espermatozoides que pueden estar adheridos a la zona pelúcida.

Con relación a los productos de PCR obtenidos, se observó que pueden presentarse problemas de contaminación a través del equipo de laboratorio y de los componentes de reacción de la PCR utilizados, ocasionando serias complicaciones en la detección de las secuencias específicas a partir de una pequeña cantidad de ADN obtenida de blastómeros. Se puede obtener un gran número de moléculas que podrían ser amplificadas por procedimientos subsiguientes de la PCR, proporcionando resultados falso positivos. Un ejemplo de esto, es la presencia de BSA (Suero de Albúmina Bovino) cuando este es llevado a la reacción o específicamente como componente en la reacción de PCR. De acuerdo a este punto, en este estudio se observó que el BSA era un origen potencial de contaminación de ADN bovino, proporcionando productos de PCR como falsos positivos en el diagnóstico del sexo a partir de blastómeros (dato no mostrado).

Al realizar el diagnóstico del sexo en bovinos, ovinos y caprinos a partir de biopsias de embriones, se tomaron precauciones en el manejo de las biopsias y de posibles contaminaciones, con el objeto de prevenir la pérdida de ADN y de evitar resultados falso positivos en la técnica de PCR. Se observaron resultados satisfactorios de diagnóstico del sexo, al utilizar ADN obtenido desde 1 a 4 blastómeros de embriones preimplantados de bovino, ovino y caprino, obteniendo una amplificación adecuada de las secuencias BC1.2 + 1.715 y de BRY.1 + 1.715. El diagnóstico realizado fue 100% preciso al verificarlo con los productos de PCR donde se utilizó ADN genómico de machos y hembras de individuos adultos que fueron utilizados como controles de diagnóstico; además de

verificarlo con los productos de PCR obtenidos del ADN del resto de los embriones micromanipulados para obtener las biopsias embrionarias.

Los experimentos realizados indican que la metodología ensayada en este proyecto para determinar el sexo por medio de la técnica de PCR resulta ser sensible y precisa. Se demostró que al utilizar la mínima cantidad posible de ADN (contenido hasta en un blastómero) y la aplicación de iniciadores que amplifican las secuencias del cromosoma Y de copia repetida BC1.2 y BRY.1 del bovino, en conjunto con la secuencia satélite 1.715 son eficaces para ser utilizadas también en el diagnóstico del sexo en ovinos y caprinos con niveles de sensibilidad y especificidad similares a los alcanzados en bovinos.

El uso de una secuencia de ADN autosómica como control interno de amplificación en la reacción de PCR es de gran importancia para disminuir el riesgo de proporcionar conclusiones falsas. Esto ha sido considerado en otros estudios, donde se han adicionado secuencias autosomales o del cromosoma X como controles positivos de amplificación (Peura *et al.*, 1991; Avery *et al.*, 1992; Kunieda *et al.*, 1992; Valdivia *et al.*, 1993; Wu, 1993). Así como, el uso de iniciadores sintetizados adecuadamente para las secuencias específicas del cromosoma Y, facilita detectar la ausencia de blastómeros en la reacción de PCR y esto excluye resultados falsos positivos de un posible diagnóstico de hembra, lo que puede ser extremadamente difícil. Sin embargo, en este estudio, todas las muestras contenían material embrionario, como fue revelado por los dos pares de iniciadores para las secuencias BC1.2 y BRY.1 del cromosoma Y y de la secuencia satélite 1.715 utilizadas en este estudio. Esto coincide con el estudio realizado por Macháty *et al.* (1993) donde demuestran que el contenido de ADN de un simple blastómero de un embrión de bovino obtenido por FIV, es suficiente para una exitosa amplificación de BRY.1 + 1.715 por PCR, ya que la señal específica de Y fue insuficiente sólo en el 4.6% de los casos.

Es de considerar que BC1.2 se ha utilizado para el sexado de embriones únicamente en bovinos, como sonda en métodos de hibridación *in situ* (Bondioli *et al.*, 1989; Setiabudi and Gustavsson, 1991; Thomsen *et al.*, 1991) y en la técnica de FISH (Kobayashi *et al.*, 1998). Sin embargo, en este estudio, además de ser evaluada la secuencia de BC1.2 para bovino, también fue evaluada en el sexado de embriones para ovino y caprino, proporcionando un método sensible y específico para el diagnóstico del sexo por PCR. En el caso de BRY.1, ha sido utilizada como sonda en métodos de hibridación para el sexado de embriones de bovino, ovino y caprino (Reed *et al.*, 1995). También ha

sido utilizada en la técnica de PCR para el sexado de bovinos y búfalos en un tiempo promedio de 8 h para realizar el diagnóstico (Bredbacka *et al.*, 1991; Appa Rao *et al.*, 1993). Con relación al tiempo en que se puede desarrollar el diagnóstico del sexo, en este estudio se valoró este parámetro proporcionando un tiempo mínimo de 3 horas (dato no mostrado).

Cabe mencionar que la remoción de un sólo blastómero puede causar un pequeño trauma al embrión, el cual no altera el desarrollo del embrión *in vitro*; como lo indican Macháty *et al.* (1992) al observar que las biopsias de una mínima cantidad de embrionaria no tienen un efecto dañino sobre la viabilidad de los embriones obtenidos por FIV; así como en su capacidad de llevar a término la gestación (53.3% de los embriones micromanipulados y el 55.1% de embriones no micromanipulados se desarrollan a etapa de blastocisto *in vitro*). De manera similar Macháty *et al.* (1993) reportan que después de realizar las biopsias, el 56.3% (49 de 87 embriones) de los embriones biopsiados, alcanzaron la etapa de transferencia.

5.6. SOUTHERN BLOT UTILIZANDO SONDAS DE BC1.2 Y BRY.1

Con base a los resultados obtenidos en el presente trabajo, en el primer ensayo donde los ADNs de hembras y machos fueron digeridos con 6 enzimas e hibridados con las sondas de BC1.2 y BRY.1, se observó un patrón complejo de hibridación. Sin embargo, se puede demostrar que la secuencia de BC1.2 únicamente se encuentra presente en machos, específicamente en el cromosoma Y y al observar una mayor intensidad en machos Cebú que en machos Holstein, posiblemente es porque BC1.2 se encuentra presente en un mayor número de copias en Cebú. De acuerdo a las mínimas observaciones encontradas en el primer ensayo, se realizó un segundo ensayo, en la cual, nuevamente se usaron sondas de BC1.2 y de BRY.1 que fueron utilizadas para hibridar ADNs de machos y hembras Holstein y Cebú digeridos únicamente con 3 enzimas (*BamHI*, *EcoRI* y *PstI*), observando un patrón más definido de hibridación. Se corroboró que tanto BC1.2 como BRY.1 son específicos del macho, observando una variación entre Holstein y Cebú con relación al tamaño e intensidad de bandeo que puede deberse a una variación cuantitativa entre machos tanto de BC1.2 como de BRY.1 como lo menciona Schwerin *et al.* (1992). Además, de que los patrones de bandeo son diferentes entre machos, siendo que las copias de las secuencias de BC1.2 y BRY.1 presentan una distribución que difiere entre Holstein y Cebú. Esto es apoyado por el

trabajo realizado por Miller y Koopman (1990) donde indican que son secuencias repetidas por naturaleza y que pueden presentarse con un menor o mayor número de copias a lo largo del cromosoma Y.

Asimismo, se observaron patrones de bandeo débiles, que posiblemente puede deberse a hibridaciones cruzadas por la organización de las secuencias con una forma repetida en tandem, como también lo indican Schwerin *et al.* (1992). Pero de acuerdo a los patrones de mayor intensidad en los ADNs/*BamHI*, *EcoRI* y *PstI* con la sonda de BC1.2, se observó un patrón muy similar de BC1.2 entre ambos machos (Holstein y Cebú), con una intensidad mayor de bandeo (mayor número de copias) en el macho Cebú, esto puede deberse a diferencias en la cantidad de heterocromatina del cromosoma Y, encontrándose BC1.2 con mayor repetición sobre Yp, como lo cita Popescu *et al.* (1988) y Schwerin *et al.* (1992). Por métodos de hibridación *in situ* y por Southern blot realizados por Popescu *et al.* (1988), Bondioli *et al.* (1989) y Cotinot *et al.* (1991) se menciona que BC1.2 es completamente específico de bovino, presentándose alrededor de 2,000 y 2,500 copias.

En las hibridaciones realizadas con la sonda BRY.1 se observaron patrones similares de hibridación en el ADN de ambos machos digeridos con las tres enzimas de restricción, observándose con mayor intensidad de bandeo en el macho Cebú. BRY.1 es una secuencia no codificante y cuantitativamente polimórfica que se encuentra presente entre 10 a 50 copias en los machos bovinos. Mathews y Reed (1992) indican que ocurre el mismo patrón en ovinos y caprinos; y Reed *et al.* (1995) mencionan que BRY.1 es una secuencia repetida, universalmente conservada entre especies que difiere entre individuos no relacionados y con una estabilidad heredable.

De acuerdo a los resultados anteriores y al no conocer la presencia de BC1.2 en búfalo, ovino y caprino, se realizó el tercer ensayo, donde se realizaron las hibridaciones de ADN de machos y hembras de bovino (Holstein y Cebú), búfalo, ovino y caprino restringidos con *BamHI*, *EcoRI* y *PstI*, utilizando la sonda de BC1.2. De acuerdo a los resultados, se corroboró que BC1.2 es específica de los machos Holstein y Cebú, presentando un patrón de hibridación muy similar con las tres restricciones; pero no es una secuencia específica de especie, ya que se demostró su presencia en el ADN del macho búfalo con una patrón de bandeo que difiere de los bovinos. Asimismo en ovinos y caprinos, los machos presentaron un patrón similar de hibridación con *BamHI*, pero diferente al observado en los bovinos y al búfalo. No obstante, en las hembras de ovino y caprino demostraron algunas bandas de BC1.2.

Con los resultados obtenidos en el presente estudio, se deduce que BC1.2 es una secuencia repetida del cromosoma Y que no es completamente específica del macho de bovinos, si no que también se encuentra en menor cantidad en el macho de búfalo, ovino y caprino. También presente con un mínimo de copias en las hembras de las últimas dos especies que puede deberse a una contaminación con ADN de machos. Siendo necesario ampliar el estudio de esta secuencia para verificar los datos obtenidos en este estudio. No obstante, se puede considerar que BC1.2 es una secuencia que se encuentra conservada entre rumiantes domésticos como lo es la secuencia de BRY.1.

Es de considerar también, que los patrones de hibridación son similares, pero no exactos entre una especie y otra; ya que en los machos Holstein y Cebú proporcionan patrones de bandeo muy similares en cuanto al número de bandas distribuidas, pero con relación a la intensidad de cada banda, tienden a ser más intensas en Cebú. Esto es probablemente debido a un mayor número de copias de cierto tamaño de bandeo. Sin embargo, no se puede descartar que de acuerdo a la metodología empleada, pudieron suceder variaciones durante el procedimiento, como la concentración del ADN para ser digerido, el gradiente del corrimiento de electroforesis del ADN digerido, así como su transferencia, aunque se hizo todo lo posible de controlar cada paso para evitar el mínimo error.

Conclusiones y Sugerencias

➤ CONCLUSIONES

1. Las secuencias de copia repetida BC1.2 y BRY.1 por su gran abundancia en el cromosoma Y presentan una mayor sensibilidad que las secuencias de copia única *AMXY*, *SRY* y *ZFXY* y de la secuencia repetida BOV97M.
2. Las secuencias de copia repetida BC1.2 y BRY.1 por presentar una mayor sensibilidad presentan una mayor precisión (especificidad) para identificar ADN de machos y hembras por la técnica de PCR.
3. En este estudio se demostró que al utilizar la mínima cantidad necesaria de ADN (contenido hasta de un blastómero) y la aplicación de los iniciadores que amplifican las secuencias repetidas del cromosoma Y BC1.2 y BRY.1, y de la secuencia satélite 1.715 son factibles de ser utilizadas en el diagnóstico del sexo en ovinos y caprinos, encontrando la misma sensibilidad y especificidad que en bovinos. De manera que los productos amplificados por PCR pueden ser distinguibles por electroforesis en geles de agarosa, no requiriendo de pasos adicionales en el ensayo para determinar el sexo. La eliminación de la digestión con enzimas de restricción y/o iniciadores anidados puede reducir el costo y el tiempo del diagnóstico. Por lo tanto, la técnica de PCR resulta ser más sensible y precisa que otros métodos de biología molecular.

4. En los dos primeros ensayos de Southern blot se afirmó que las secuencias BC1.2 y BRY.1 se encuentran en machos y no en hembras de Holstein y Cebú y por ende, solamente se encuentran presentes en el cromosoma Y como lo indican varios autores.
5. En el tercer ensayo de Southern blot se deduce que la secuencia BC1.2 no es completamente específica de machos de bovino, si no que también se encuentra en el genoma de machos de búfalo, ovino y caprino con un menor número de copias y con un patrón de distribución que difiere de los bovinos. Con esto, se considera que BC1.2 es una secuencia conservada entre ruminantes domésticos como lo es la secuencia de BRY.1.

➤ SUGERENCIAS

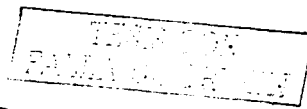
1. Al obtener una biopsia con una mínima cantidad blastómeros, puede causar un trauma muy pequeño al embrión, sin alterar potencialmente su desarrollo para llegar a término la gestación como lo indican varios autores.
2. Se sugiere que los ensayos de sexado, podrían tener la capacidad de funcionalidad con una mínima cantidad de ADN, tal como lo obtenido en biopsias de 1 a 4 células, asegurando una máxima viabilidad del embrión en aplicaciones subsecuentes a la transferencia del embrión. De modo que el éxito del diagnóstico del sexo, resultaría ser un ensayo extremadamente sensible.
3. El sexado de embriones de mamíferos podría proveer numerosas ventajas en la industria lechera y en la ganadería en general. La eficiencia económica en la ganadería y en la industria láctea podría mejorar significativamente por la decisión sexual de gestaciones. Es decir, en situaciones donde por razones económicas se indique la determinación del sexo del embrión, es beneficioso, ya que de lo contrario, en la ganadería resultaría económicamente ineficiente, debido a que reduce la eficiencia reproductiva de una hembra, para llevar mucho más que necesariamente un embrión que finalmente tendría un sexo no deseado para la productividad de un hato. Por lo tanto, la capacidad para determinar el sexo

de un embrión, favorece las ventajas que se tienen con los avances de la biología reproductiva, principalmente en la transferencia de embriones y en la fertilización *in vitro*.

4. Para un mayor entendimiento de BC1.2 y BRY.1, es necesario profundizar en estudios de biología molecular para precisar su localización y distribución en bovinos, búfalos, ovinos y caprinos, la cual se puede realizar utilizando dichas secuencias como sondas en métodos de hibridación *in situ* y por Southern blot con métodos de gel con campo de pulsación.

Literatura Citada

- Aasen E, Medrano JF. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/tech* 1990; 8:1279-1281.
- Anderson GB. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 1987; 27:81-98.
- Appa Rao KBC, Bhat PP, Bhat PN. A rapid and simple procedure for isolation of genomic DNA from blood for RFLP studies in livestock animals. *Indian J Anim Sci* 1994; 64:460-462.
- Appa Rao KBC, Pawshe CH, Totey SM. Sex determination of in vitro developed buffalo (*Bubalu bubalis*) embryos by DNA amplification. *Mol Reprod Dev* 1993; 36:291-296.
- Appa Rao KBC, Totey SM. Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: sexing of in-vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1999; 51:785-797.
- Avery B, Jorgensen CB, Madison V, Greve T. Morphological development and sex of bovine in vitro-fertilized embryos. *Mol Reprod Dev* 1992; 32:265.
- Baron B, Metezeau Ph, Hatat D, Roberts C, Goldberg ME, Bishop C. Cloning of DNA libraries from mouse Y chromosomes, purified by flow cytometry. *Somatic Cell Mol Genet* 1986; 12:289-295.
- Berta P, Hawkins JR, Sinclair AH, Taylor BL, Griffiths PN *et al*. Genetic evidence equating SRY and the testis-determining factor. *Nature* 1990; 348:448-450.
- Bishop CE, Guellaen G, Geldwerth D, Voss R, Fellous M, Weissenbach J. Single copy DNA sequences specific for the human Y chromosome. *Nature* 1983; 303:831-833.
- Bishop CE, Mitchell MJ. Mouse Y chromosome. *Mammal Genome* 1999; 10:962.



- Bondioli KR. Embryo sexing: A review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J Anim Sci* 1992; 70 (Suppl. 2):19.
- Bondioli KR, Ellis SB, Prior JH, Williams MW, Harpold MM. The use of male-specific chromosomal DNA fragments to determine the sex of bovine preimplantation embryos. *Theriogenology* 1989; 31:95-104.
- Brandbury MW, Isola LM, Gordon JW. Enzymatic amplification of a chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc Natl Acad Sci* 1990; 87:4053-4057.
- Bredbacka P, Bredbacka K, Peippo J. Experiences of using PCR for sexing bovine embryos. *Reprod Dom Anim* 1991; 26:75-77.
- Brennan J, Karl J, Martineau J, Nordqvist K, Schmahl J, Tilmann C, Ung K, Capel B. Sry and the testis: molecular pathways of organogenesis. *J Exp Zool* 1998; 281:494-500.
- Buhler EM. A Synopsis of the human Y chromosome. *Hum Genet* 1980; 55:145-174.
- Burgoyne PS, Buehr M, Koopman P, Rossant J, McLaren A. Cell-autonomous action of the testis-determining gene: Sertoli cells are exclusively XY in XX--XY chimaeric mouse testes. *Development* 1988; 102:443-450.
- Cameron FJ, Sinclair AH. Mutations in SRY and SOX9: Testis-determining genes. *Human Mutat* 1997; 9:388-395.
- Capel B. Sex in the 90s: SRY and the switch to the male pathway. *Annu Rev Physiol* 1998; 60:497-523.
- Chen CM, Hu CL, Wang CH, Hung CM, Wu HK, Choo KB, Cheng WTK. Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Mol Rep Dev* 1999; 54:209-214.
- Chen E, Yuan ZA, Collier PM, Greene SR, Abrams WR, Gibson CW. Comparison of upstream regions of X- and Y- chromosomal amelogenin genes. *Gene* 1998; 16(1):131-137.
- Cooke H. Repeated sequences specific to human males. *Nature* 1976; 262:182-184.
- Cotinot C, Kirszenbaum M, Leonard M, Gianquinto L, Vaiman M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryo sexing. *Genomics* 1991; 10:646-653.
- Crawford PA, Dorn C, Sadovsky Y, Milbrandt J. Nuclear receptor DAX-1 recruits nuclear receptor corepressor N-Corto steroidogenic factor 1. *Mol Cell Biol* 1998; 18:2949-2956.
- Cross BA. Animal Biotechnology. *Phil Trans R Soc Lond B* 1989; 324:563-575.

- Cui K-H, Warnes GM, Jeffrey R, Matthews CD. Sex determination of preimplantation embryos by human testis-determining-gene amplification. *Lancet* 1994; 343:79-82.
- Davis RM. Localization of male determining factors in man: a thorough review of structural anomalies of the Y chromosome. *J Med Genet* 1981; 18:161-195.
- Deininger PL, Schmid CW. A study of the evolution of repeated DNA sequences in primates and the existence of a new class of repetitive sequences in primates. *J Mol Biol* 1979; 127:437-460.
- Dias-Nieto E, Santos FR, Pena SDY, Simpson AJG. Sex determination by low stringency PCR (LS-PCR). *Nucleic Acids Res* 1993; 21:763-764.
- Ellis SB, Bondioli KR, Williams ME, Pryor HH, Harpold MM. Sex determination of bovine embryos using male-specific DNA probes. *Theriogenology* 1988; 29:242.
- Ellis NA, Goodfellow PJ, Pym B, Smith M, Palmer M, Frischauf AM, Goodfellow PN. The pseudoautosomal boundary in man is defined by an *A/tu* repeat sequence inserted on the Y chromosome. *Nature* 1989; 337:81-84.
- Ellis SB, Harpold MM. Nucleic acid probes for prenatal sexing. Patent Cooperation Treaty WO 86/07095; 1986.
- Ennis E, Gallagher TF. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Anim Genet* 1994; 5:425-427.
- Frásch AC, Ugalde RA. Procedure for the sex determination of embryos in mammals especially applied to bovine embryos. Patent Cooperation Treaty Number 5,578,449; 1996.
- Fries R, Ruvinski A. *The Genetics of Cattle: Molecular Anatomy of Cattle Genome*. CAB International, New York USA 1999:125.
- Gaillard C, Doly J, Cortadas J, Bernardi G. The primary structure of bovine satellite 1.715. *Nucleic Acids Res* 1981; 10:6069-6082.
- Gardner RL, Edwards RG. Control of the sex ratio at full term in the rabbit by transferring sexed blastocysts. *Nature* 1968; 218:346-348.
- Gibson CW, Golub EE, Abrams WR, Shen G, Ding W, Rosenbloom J. Bovine amelogenin message heterogeneity: Alternative splicing and Y-chromosomal gene transcription. *Biochemistry* 1992; 31:8384-8388.
- Gibson C, Golub E, Herold R, Risser M, Ding W, Shimokawa H, Young M, Termine J, Rosenbloom J. Structure and expression of the bovine amelogenin gene. *Biochemistry* 1991; 30:1075-1079.

- Goodfellow PN, Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 1993; 27:71-92.
- Goldammer T, Brunner RM, Schwerin M. Comparative analysis of Y chromosome structure in *Bos taurus* and *B. indicus* by FISH using region-specific, microdissected, and locus-specific DNA probes. *Cytogenet Cell Genet* 1997; 77(3-4):238-241.
- Graves JAM. Mammals that break the rules: genetics of marsupials and monotremes. *Annu Rev Genet* 1996; 30:233-260.
- Graves JAM. Interactions between SRY and SOX genes in mammalian sex determination. *Bioessays* 1998; 20:264-269.
- Graves JAM, Disteché CM, Toder R. Gene dosage in the evolution and the function of mammalian sex chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80:94-103.
- Greenfield A. Genes, cells and organs: recent developments in the molecular genetics of mammalian sex determination. *Mammalian Genome* 1988; 9:683-687.
- Gubbay J, Collignon J, Koopman P, Capel B, Economou A, Münsterberg A, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. *Nature* 1990; 346:245-250.
- Gubbay J, Vivian N, Economou A, Jackson D, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Inverted repeat structure of the Sry locus in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:7953-7957.
- Guoli Z, Mingguang Z, Zhijiang Z, Hongsheng O, Qiang L. Establishment and application of a polymerase chain reaction for the identification of beef. *Meat Sci* 1999; 51:233-236.
- Gutiérrez-Adán A, Behboodi E, Medrano JF, Murray JD, Anderson GB. Nested PCR primers for sex determination across a range of mammalian orders. *Theriogenology* 1996; 45:189.
- Gutiérrez-Adán A, Cushwa WT, Anderson GB, Medrano JF. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. *Animal Genetics* 1997; 28:135-138.
- Halnan CRE, Watson JI. Y chromosome variants in cattle, *Bos taurus* and *Bos indicus*. *Annals Génét Sél Anim* 1982; 14:1-16.
- Handyside AH, Penketh RJA, Winston RML, Pattinson JK, Delhanty JDA, Tuddenham EGD. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet* 1989; 2:347-349.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990; 344:768-770.

- Hare WCD, Mitchell D, Betteridge KJ, Eaglesome MD, Randall GCB. Sexing two week old bovine embryos by chromosomal analysis prior to surgical transfer. *Preliminary methods and results. Theriogenology* 1976; 5:243-253.
- Herr CM, Holt NA, Matthaei KI, Reed KC. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-chromosome-detection assay. *Theriogenology* 1990a; 33:247.
- Herr CM, Matthaei KI, Petrzak U, Reed KC. A rapid Y-chromosome detecting ovine embryo sexing assay. *Theriogenology* 1990b; 33:245.
- Herr CM, Reed KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 1991; 35:45-54.
- Hochman D, Zaron Y, Dekel I, Feldmesser E, Medrano JF, Shani M, Ron M. Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology* 1996; 46:1063-1075.
- Ikeda Y, Swain A, Weber TJ, Hentges KE, Zanaria E. Steroidogenic factor I and Dax-1 co-localize in multiple cell lineages: potential links in endocrine development. *Mol Endocrinol* 1996; 10:1261-1272.
- Kashi Y, Iraqi F, Tkochinski Y, Ruzitsky B, Nave A, Beckmann JS, Friedmann A, Soller M, Gruenbaum Y. (TG)_n uncovers a sex-specific hybridization pattern in cattle. *Genomics* 1990; 7:31-36.
- King WA. Sexing embryos by cytological methods. *Theriogenology* 1984; 21:7-17.
- Kirkpatrick BW, Monson RL. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. *J Reprod Fert* 1993; 98:335-340.
- Kobayashi J, Sekimoto A, Uchida H, Wada T, Sasaki K, Sasada H, Umezumi M, Sato E. Rapid detection of male-specific DNA sequence in bovine embryos using fluorescence *in situ* hybridization. *Mol Reprod Dev* 1998; 51:390-394.
- Koopman P. The molecular biology of SRY and its role sex determination in mammals. *Reprod Fert Dev* 1995; 7:713-722.
- Koopman P, Gubbay J, Colligon J, Lovell-Badge R. *Zfy* gene expression patterns are not compatible with a primary role in mouse sex determination. *Nature* 1989; 342:940-942.
- Koopman P, Gubbay J, Vivian N, Goodfellow P, Lovell-Badge R. Male development of chromosomally female mice transgenic for *Sry*. *Nature* 1991; 351:117-121.
- Kunieda T, Xian M, Kobayashi E, Imamichi T, Moriwaki K, Toyoda Y. Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequences using polymerase chain reaction. *Biol Reprod* 1992; 46:692-697.

- Kunkel LM, Monaco AP, Middlesworth W, Ochs HD, Latt SA. Specific cloning of DNA fragments absent from the DNA of a male patient with an X chromosome deletion. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:4778-4782.
- Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH. Human Y chromosome specific reiterated DNA. *Science* 1976; 191:1189-1191.
- Lamer EE, Palmer E. Y-encoded, species-specific DNA in mice: evidence that the Y chromosome exists in two polymorphic forms in inbred strains. *Cell* 1984; 37:171-177.
- Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:2493-2501.
- Leonard M, Kirszenbaum M, Cotinot C, Chesné P, Heyman Y, Stinnakre MG, Bishop C, Delouis C, Vaiman M, Fellows M. Sexin bovine embryos using Y chromosome specific DNA probe. *Theriogenology* 1987; 27(1):248.
- Li H, Gyllenstein U, Cui X, Saiki R, Erlich H, Arnheim N. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* 1988; 335:414-417.
- Lo Y-MD, Wainscoat JS, Gillmer MDG, Patel R, Sampietro M, Fleming KA. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989;1363-1365.
- Lucchesi JC. Gene dosage compensation and the evolution of sex chromosomes. *Science* 1978; 202:711-716.
- Luo X, Ikeda Y, Parker KL. A cell-specific nuclear receptor is essential for adrenal and gonadal development and sexual differentiation. *Cell* 1994; 77:481-490.
- Lynch JP, Lala DS, Peluso JJ, Luo W, Parker KL, White B. Steroidogenic factor I, an orphan nuclear receptor, regulates the expression of the rat aromatase gene in gonadal tissues. *Mol Endocrinol* 1993; 7:776-786.
- Macháty Z, Páldi A, Csáki T, Varga Z, Kiss I, Bárándi Z, Vajta G. Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 1993; 98:467-470.
- Macháty Z, Vajta G, Bárándi Zs, Solti L. Developmental potential of biopsied preimplantation bovine embryos produced in vitro. *Assisted Reproductive Technology/Andrology* 1992; 3:249-256.
- Matthews ME, Reed KC. 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* 1991; 56:40-44.
- Matthews ME, Reed KC. Sequences from a family of bovine Y-chromosomal repeats. *Genomics* 1992; 13:1267-1273.

- McElreavey K, Fellous M. Sex determination and the Y chromosome. *Am J Med Genet* 1999; 89(4):176-185.
- McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P, Hogg H. Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 1984; 312:552-555.
- Miller KR: Isolation of Y chromosome-specific sequences and their use in embryo sexing. *Reprod Domest Animal* 1991; 26:58-65.
- Miller JR, Koopman M. Isolation and characterization of two-specific DNA fragments from the bovine genome. *Anim Genet* 1990; 21:77-82.
- Mitchell M, Simon D, Affara N, Ferguson-Smith M, Avner P, Bishop C: Localization of murine X and autosomal sequences homologous to the human Y located testis-determining region. *Genetics* 1989; 121:803-809.
- Modi WS, Gallagher DS, Womack JE. Evolutionary histories of highly repeated DNA families among the *Artyodactyla* (Mammalia). *J Mol Evol* 1996; 42:337-349.
- Moniot B, Berta P, Scherer G, Südbek, Poulat F. Gene expression pattern: Male specific expression suggest role of DMRT1 in human sex determination. *Mechanisms of Development* 2000; 91:323-325.
- Morell V. Rise and fall of the Y chromosome. *Science* 1994; 263:171-172.
- Müller U. The Y chromosome and its role in primary sex differentiation. *Journal of Animal Science* 1992; 70(Suppl.2):1-7.
- Nachtigal MW, Hirokawa Y, Enyeart-VanHouten DL, Flanagan JN, Hammer GD, Ingraham HA. Wilms' tumor 1 and Dax-1 modulate the orphan nuclear receptor SF-1 in sex-specific gene expression. *Cell* 1998; 93:445-454.
- Nakahory Y, Takenaka O, Nakagome Y. A human X-Y homologous region encodes "amelogenin". *Genomics* 1991; 9:264-269.
- Nallaseth FS, Dewey MJ: Moderately repeated mouse Y chromosomal sequence families present distinct types of organization and evolutionary change. *Nucleic Acids Research* 1983; 14:5295-5307.
- O'Neill MJ, O'Neill RJW. Whatever happened to SRY?. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1999; 56:883-893.
- Page DC. Y-specific DNA hybridization probes and uses therefore. Patent Cooperation Treaty WO 89/02440; 1989.

- Page D, De Martinville B, Barker D, Wyman A, White R, Francke U, Botstein D. Single copy sequence hybridizes to polymorphic and homologous loci on human X and Y chromosomes. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1982; 79:5352-5356.
- Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, McGillivray B, de la Chapelle A, Brown LG. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 1987; 51:1091-1104.
- Palmer SJ, Burgoyne PS. *In situ* analysis of fetal, prepubertal and adult chimeric mouse testes: Sertoli cells are predominantly but not exclusively, XY. *Development* 1991; 112:265-268.
- Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE, Fellous M. Genetic evidence that ZFY is not the testis-determining factor. *Nature* 1989; 342:937-939.
- Park JH, Lee JH, Choi KM, Joung SY, Kim JY, Chung GM, Jin DI, Im KS. Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 2001; 55:1843-1853.
- Parker KL, Schimmer BP. Steroidogenic factor 1: a key determinant of endocrine development and function. *Endocrine Rev* 1997; 361-377.
- Parker KL, Schimmer BP, Schedl A. Genes essential for early events in gonadal development. *CMLS Cell Mol Life Sci* 1999; 55:831-838.
- Pecon Slaterry J, O'Brien S. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 1998; 148:1245-1255.
- Pech M, Streeck RE, Zachav HG. Patchwork structure of a bovine satellite DNA. *Cell* 1979; 18:883-893.
- Pelliniemi LJ, Frojzman K, Sundstrom J, Pollanen P, Kuopio T. Cellular and molecular changes during sex differentiation of embryonic mammalian gonads. *J Exp Zool* 1998; 281:482-493.
- Perret J, Shia YC, Fries R, Vassart G, Georges M. A polymorphic satellite sequence maps to the pericentric region of the bovine Y chromosome. *Genomics* 1990; 6:482-490.
- Peura T, Hyttinen J-M, Turunen M, Jänne J. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 1991; 35:547-555.
- Peyen EJ, Cotinot CY. Comparative HMG-box sequences of SRY gene between sheep, cattle and goats. *Nucleic Acids Res* 1993; 21:2772.
- Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high sensitivity, fluorescence hybridisation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 1986; 83:2934-2938.

- Plucienniczak A, Skowronski J, Jaworski J. Nucleotide sequence of bovine 1.715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. *J Mol Biol* 1982; 158:293-304.
- Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ. Sex identification in mammals with polymerase chain reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or -11 pig embryos. *J Anim Sci* 1995; 73:1408-1415.
- Popescu CO, Cotinot C, Boscher J, Kirszenbaum M. Chromosoma localization of a bovine male-specific probe. *Annals Génét* 1988; 31:39-42.
- Purcel VG, Pinkert CA, Miller KF, Bolt DJ, Campbell RG, Palmiter RD, Brinster RL, Hammer RE. Genetic engineering of livestock. *Science* 1989; 244:1281-1288.
- Raymond CS, Kettlewell JR, Hirsch B, Bardwell VJ, Zarkower D. Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev Biol* 1999; 215:208-220.
- Reed KC, Matthews ME, Jones MA. Sex determination in ruminants using Y-chromosome specific polynucleotides. Patent Cooperation Treaty WO 88/01300; 1988.
- Reed KC, Matthews ME, Jones MAS. Sex determination in cattle, sheep and goats using Y-chromosome polynucleotides. Patent Number 5418133; 1995.
- Roberts LM, Shen J, Ingraham HA. New solutions to an Ancient Riddle: Defining the differences between Adam and Eve. *Am J Hum Genet* 1999; 65:933-942.
- Rowson LEA. The role of research in animal production. *Vet Rec* 1974; 95:276-280.
- Russel DW, Goodfellow PN and Lovell-Badge R. SRY and sex determination in mammals. *Annu Rev Genet* 1993; 27:71-92.
- Roudebush WE, Kim JG, Minhas BS, Dodson MG. Survival and cell acquisition rates after preimplantation embryo biopsy: use of two mechanical techniques and two mouse strains. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* 1990; 162:1084-1090.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Sharf S, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 239:487-491.
- Schröder A, Miller JR, Thomsen PD, Roschlau K, Avery B, Poulsen PH, Schmidt M, Schwerin M. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Anim Biotech* 1990; 1(2):121-133.
- Schubert S, Dechend F, Skawran B, Kunze B, Winking H, Weile C, Römer I, Hemberger M, Fundele R, Sharma T, Schmidtke J. *Mamm Genome* 2000; 11:288-291.

- Schwerin M, Blottner S, Thomsen PD, Roschlau D, Brockmann G. Quantitation of Y-chromosome bearing spermatozoa of cattle using *in situ* hybridization. *Mol Rep Develop* 1991a; 30:34-38.
- Schwerin M, Gallagher DS Jr., Miller JR, Thomsen PD. Mapping of repetitive bovine DNA sequences on cattle Y chromosomes. *Cytogenet Cell Genet* 1992; 61:189-194.
- Schwerin M, Warnat G, Giehm D, Wolf H, Thomsen PD. Multilocus genetic typing of bovine single cells by multiplex polymerase chain reaction. *Reprod Dom Anim* 1991b; 26:70-74.
- Setiabudi R, Gustavsson I. Establishment of embryo sexing techniques in Sweden. *Reprod Dom Anim* 1991; 26:78-81.
- Shen W-H, Moore CCD, Ikeda Y, Parker KL, Ingraham HA. Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates MIS gene expression: a link to the sex determination cascade. *Cell* 1994; 77:651-661.
- Silversides DW, Daneau IM, Houde A. Oligonucleotide probe and primers specific to bovine or porcine male genomic DNA. Patent Cooperation Treaty Number 5596089; 1997.
- Silversides DW, Pilon N, Behdjani R, Boyer A, Daneau I, Lussier J. Genetic Manipulation of sex differentiation and phenotype in domestic animals. *Theriogenology* 2001; 55:51-63.
- Sinclair AH, Berta P, Palmer MS, Hawkins JR, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf A-M, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 1990; 346:240-244.
- Sinclair AH, Foster JW, Spencer JA, Page DC, Palmer M, Goodfellow PN, Marshall Graves JA. Sequences homologous to ZFY, a candidate human sex-determine gene, are autosomal in marsupials. *Nature* 1988; 336:780-783.
- Singh EL, Hare WCD. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. *Theriogenology* 1980; 14:421-427.
- Skowronski J, Plucienniczak A, Bednarek A, Jaworski J. Bovine 1.709 satellite recombination hot spots and dispersed repeated sequences. *J Mol Biol* 1984; 177:399-416.
- Smith CA, Smith MJ, Sinclair AH. Gene expression during gonadogenesis in the chicken embryo. *Gene* 1999; 234: 395-402.
- Smith KD, Young KE, Talbot CC, Schmeckpeper BJ. Repeat DNA of the human Y chromosome. *Development* 1987; 101(Supl.):77-92.
- SPSS. SPSS 10.0 for Windows © SPSS Inc. All rights reserved 1999.
- Streck RE. Inserted sequences in bovine satellite DNA'S. *Science* 1981; 213(24):443-445.

- Sullivan KM, Manncci A, Kimpton CD, Gill P. A rapid and quantitative DNA sex test: Fluorescence based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. 1993; 15:636-642.
- Swain A, Lovell-Badge R. Mammalian sex determination: a molecular drama. *Genes Dev* 1999; 13:755-767.
- Takeuchi K, Sandow BA, Morsy M, Kaufmann RA, Beebe SJ, Hodgen GD. Preclinical models for human pre-embryo biopsy and genetic diagnosis I. Efficiency and normalcy of mouse pre-embryo development after different biopsy techniques. *Fertility and Sterility* 1992; 57:425-430.
- Taparowsky EJ, Gerbi SA. Sequence analysis of bovine satellite I DNA (1.715 gm/cm³). *Nucleic Acids Res* 1982; 10:1271-1281.
- Thibier M, Nibart M. Bovine embryo sexing by a DNA probe on the field. *Reprod Dom Anim* 1992; 27:29-33.
- Thomsen PD, Schwerin M, Poulsen PH, Avery B. Sex determination of bovine embryo biopsies using *in situ* hybridization. *Reprod Dom Anim* 1991; 26:66-69.
- Toder R, Gläser B, Schiebel K, Wilcox SA, Rappold G, Graves JAM, Schempp W. Genes located in and near the pseudoautosomal region are located in the X-Y pairing region in dog and sheep. *Chrom Res* 1997a; 5:301-306.
- Toder R, Wienberg J, Voullaire L, O'Brien PCM, Maccarone P. Shared DNA sequences between the X and Y chromosomes in the tammar wallaby – evidence for independent additions to eutherian and marsupial sex chromosomes. *Chromosoma* 1997b; 106:94-98.
- Tucker PK, Lundrigan BL. Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and Rats. *Nature* 1993; 364:715-717.
- Tyler-Smith C, Brown WRA. Structure of the major block of haploid satellite DNA on the human Y chromosome. *J Mol Biol* 1987; 195:457-470.
- Vainio S, Heikkilä M, Kispert A, Chin N, McMahon AP. Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling: *Nature* 1999; 397; 199:63-70.
- Valdivia RPA, Kunieda T, Azuma S, Toyoda Y. PCR sexing and developmental rate differences in preimplantation mouse embryos fertilized and cultured *in vitro*. *Mol Reprod Devel* 1993; 35:121.
- Van Vliet RA, Verrinder, Gibbins AM, Walton JS. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology* 1989; 32:421-438.

- Veitia RA, Fellous M, McElreavey K. Conservation of Y chromosome specific sequences immediately 5' to the testis determining gene in primates. *Gene* 1997a; 199:63-70.
- Veitia RA, Nunes M, McElreavey, Fellous M. Genetic basis of human sex determination: an over view. *Theriogenology* 1997b; 47:83-91.
- Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, Botstein D, De La Chapelle A, Weissenbach J. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986; 38:109-124.
- Viger RS, Mertineit C, Trasler JM, Nemer M. Transcription factor GATA-4 is expressed in a sexually dimorphic pattern during mouse gonadal development and is a potent activator of the Mullerian inhibiting substance promoter. *Development* 1998; 125:2665-2675.
- Vogel T, Borgmann S, Dechend F, Hecht W, Schmidtke J. Conserved Y-chromosome location of TSPY in Bovidae. *Chrom Res* 1997; 5(3):182-185.
- Vogel T, Schmidtke J. Structure and function of TSPY, the Y-chromosome gene coding for the "testis-specific protein". *Cytogenet Cell Genet* 1998; 80:209-213.
- Wachtel SS. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. *Theriogenology* 1984; 21:18-28.
- Wachtel SS, Ohno S, Koo GC, Boyse EA. Possible role for H-Y antigen in the primary determination of sex. *Nature* 1975; 257:235-236.
- Werner MH, Huth JR, Gronenborn AM, Clore GM. Molecular basis of human 46 XY sex reversal revealed from the three-dimensional solution structure of the human SRY-DNA complex. *Cell* 1995; 81:705-714.
- Whitfield LS, Lovell-Badge R, Goodfellow PN. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. *Nature* 1993; 364:713-715.
- Wilton LJ, Shaw JM, Trounson AO. Successful single-cell biopsy and cryopreservation of preimplantation mouse embryos. *Fertility and Sterility* 1989; 51:513-517.
- Wilton LJ, Trounson AO: Biopsy of preimplantation mouse embryos development of micromanipulated embryos and proliferation of single blastomeres in vitro. *Biol Reprod* 1989; 40:145-152.
- Wu B. Amplification of the SRY gene allows identification of the sex of mouse preimplantation embryos. *Theriogenology* 1993; 40:441.

Yu RN, Ito M, Jameson JL. The murine Dax-1 promoter is stimulate by SF-1 (steroidogenic factor-1) and inhibited by COUP-TF (chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor) via a composite nuclear receptor regulatory element. Mol Endocrinol 1998; 12:1010-1022.

Zazopoulos E, Lalli E, Stocco DM, Sassone-Corsi P. DNA binding and transcriptional repression by DAX-1 blocks steroid genesis. Nature 1997; 390:311-315.

A n e x o s

ABREVIATURAS

DETERMINACIÓN DEL SEXO

PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO (HIGADO)

BUFFER UTILIZADOS

ANEXO 1. ABREVIATURAS

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

AM (Amelogenin): Amelogenina.

BSA (Bovine Serum Albumin): Albúmina de suero bovino.

FISH (Fluorescence in situ Hybridization): Hibridación *in situ* de fluorescencia.

FIV: Fertilización *in vitro*.

g: Gramos.

h: Hora.

HMG (High Mobility Group): Grupo de alta movilidad.

IA: Inseminación artificial.

Kb: Kilobases.

LS-PCR (Low Stringency Polymerase Chain Reaction): Reacción en cadena baja de la polimerasa de rigor.

M: Molar.

min: Minutos.

MIS (Müllerian Inhibitory Substance): Sustancia Mülleriana inhibitoria.

ml: Mililitros.

mM: Milimolar.

ng: Nanogramos.

ORF (Open Reading Frame): Marco abierto de lectura amplificado.

pb: Pares de bases.

PCR (Polimerase Chain Reaction): Reacción en cadena de la polimerasa.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Amplificación al azar del ADN polimórfico.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism): Polimorfismo de la longitud del fragmento de la restricción.

rpm: Revoluciones por minuto.

seg: Segundos.

TDF (Testes Determining Factor): Factor determinante testicular.

TE: Transferencia de embriones.

U: Unidades

UV: Luz ultravioleta.

V: Voltios.

µg: Microgramos.

µl: Microlitros.

ANEXO 2. DETERMINACIÓN DEL SEXO

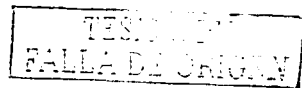
El sexo de un individuo es el proceso de desarrollo donde inicialmente las gónadas embrionarias bipotenciales se diferencian en testículo u ovario, dando lugar a la adquisición del fenotipo sexualmente dimórfico que es un evento crítico en el desarrollo de mamíferos a través de la maduración de la función sexual y sucesos reproductivos después del nacimiento. Temporalmente, estos pasos pueden ser divididos en dos fases: la determinación sexual, evento inicial que determina si las gónadas se desarrollarán como testículos u ovarios; y la diferenciación sexual, evento subsiguiente que produce finalmente cualquier fenotipo sexual de hembra o macho (Müller, 1992). Durante la fase indiferenciada del desarrollo sexual, los ovarios y los testículos no pueden ser distinguidos histológicamente y por lo tanto son llamados "gónadas bipotenciales o indiferentes". Las gónadas bipotenciales se levantan de la cresta urogenital, una estructura derivada del mesodermo intermedio, que contiene células precursoras que ayudan a la formación de los mesonefros, corteza adrenal, gónadas y riñones (Veitia *et al.*, 1997b). Existen cuatro líneas celulares bipotenciales que ayudan al desarrollo de las gónadas: células germinales originadas extragonadalmente y 3 tipos de células somáticas. Los componentes somáticos derivan de los mesonefros y del epitelio celómico que cubren la cresta urogenital, incluyendo el soporte precursor celular, capaz de diferenciar las células de Sertoli y células foliculares (ambos tipos de células precursoras de las células esteroideogénicas que contribuyen a la formación de células de Leydig en el macho y células de la teca o intersticiales en la hembra); y finalmente las células del tejido conectivo que desarrollan el tejido vascular, túnica y células peritubulares en testículos, y células del estroma y túnica en ovarios (Veitia *et al.*, 1997a). El tracto urogenital inicialmente también es indistinguible en los embriones masculinos y femeninos. Durante la etapa indiferente, los embriones masculinos y femeninos tienen dos pares de conductos establecidos: los conductos Mülllerianos y los conductos Wolffianos (mesonéfricos).

En términos genéticos, el espermatozoide es el que determina el sexo ya que al penetrar un espermatozoide (X o Y) en el ovocito, se da la fertilización y en ese mismo momento queda fijo el

sexo genético de un cigoto. El sexo gonadal y fenotípico se determinan posteriormente, pero sólo rara vez, éstos difieren del sexo genético. Page (1989) menciona que al tener un cierto número de cromosomas X por célula y con la presencia de un cromosoma Y se desarrollaran testículos XY, XXY y XXXY; y en la ausencia de Y se desarrollarán ovarios XO, XX, XXX y XXXX. Por lo que el papel del fenotipo sexual (masculino o femenino) está correlacionado con la presencia (en machos) o la ausencia (en hembras) del cromosoma Y. De esta manera, el fenotipo masculino de mamíferos puede ser considerado una característica genética dominante ligada al cromosoma Y con una correlación de genotipo-gónada-fenotipo. Esto lleva al supuesto de que sobre el cromosoma Y se encuentra el "factor determinante testicular (TDF; siglas en inglés de Testes Determining Factor). Anteriormente, esto había sido propuesto por Buhler (1980) y por Davis (1981) al realizar estudios en humanos, donde demostraron que Y juega un papel fundamental en la diferenciación testicular. Con esto, Vergnaud *et al.* (1986) definen TDF como la "región que determina el sexo".

Originalmente, se sostenía que el antígeno de histocompatibilidad H-Y era el responsable de la determinación del sexo en mamíferos. Anderson (1987) menciona la existencia del antígeno específico del macho que inicialmente fue propuesto por Eichwald y Silmsen en 1955, donde se observó que hembras de ratones rechazaban los injertos de piel de machos de la misma línea al realizar todas las combinaciones sexuales: macho/macho, hembra/hembra y macho/hembra. Igualmente, Anderson menciona que por experimentos subsecuentes, en 1960 fue dado el nombre de "antígeno de histocompatibilidad" localizado sobre el cromosoma Y y expresado únicamente en embriones masculinos de varias especies de mamíferos. Por lo tanto, H-Y fue denominado como el TDF (Wachtel *et al.*, 1975). Subsecuentemente se demostró que el antígeno H-Y no podría ser el factor determinante porque no se requiere de su expresión para el desarrollo testicular y su presencia no garantiza que la gónada XX se someta al desarrollo testicular (McLaren *et al.*, 1984).

Consecutivamente, se sugirió que el gen ZFY (gen que codifica la proteína de dedos de zinc) podría ser considerado como TDF (Page *et al.*, 1987). Este gen tiene un homólogo que se encuentra en el cromosoma X llamado ZFX, y ambos genes pueden codificar el mismo activador de transcripción. Sin embargo, la función actual de este gen todavía no es conocida. Actualmente, se ha eliminado la idea de que sea TDF (Palmer *et al.*, 1989), ya que ninguno de estos genes se encuentran en los cromosomas sexuales de marsupiales y por ende, la diferenciación sexual depende de otro gen del cromosoma Y (Sinclair *et al.*, 1988). La expresión de ZFY en ratones, ocurre en las células



germinales testiculares; sin embargo, no son requeridos para iniciar el desarrollo testicular (Koopman *et al.*, 1989; Brandbury *et al.*, 1990); y el *locus ZFY* en humanos, no ha sido mapeado en la misma posición para definirlo como la región determinante de testículos (Müller, 1992).

Posteriormente, se determinó que el cromosoma Y presenta una región donde se localizan uno o más genes específicos para la determinación del sexo. Esta región fue mapeada, encontrando que está constituida por un simple exón y localizada en la parte distal de Yp (Greenfield, 1988; Mitchell *et al.*, 1989). Con esto, se conduce al aislamiento del gen de esta región designado como gen *SRY* (región de Y que determina el sexo); siendo específicamente un gen que actúa como "interruptor maestro" para la expresión consecutiva de otros genes esenciales para la diferenciación sexual del macho (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990; Gubbay *et al.*, 1992; Veitia *et al.*, 1997a; Brennan *et al.*, 1998). Actualmente, se acepta que *SRY* es el TDF en mamíferos, después de la introducción de secuencias de *SRY* (de humano) en embriones de ratón XX que puede resultar en fenotipo de macho (Berta *et al.*, 1990; Koopman *et al.*, 1991). A partir de *Sry* de ratón, se han descrito una serie de genes involucrados en la determinación del sexo, que pudieran controlar o ser controlados por dicho gen para dirigir las gónadas indiferenciadas en testículos u ovarios (Parker *et al.*, 1999).

El gen *SRY* se encuentra ubicado inmediatamente por fuera de la región pseudoautosómica; encontrándose en una región antigua del cromosoma Y que se encuentra presente en mamíferos aproximadamente desde hace 130 millones de años (Tucker and Lundrygan, 1993; Whitfield *et al.*, 1993). *SRY* se expresa en la cresta urogenital antes de la diferenciación testicular (Goodfellow and Lovell-Badge, 1993; Russell *et al.*, 1993) y codifica un producto que interactúa con otros genes que iniciarán el desarrollo del embrión indiferenciado hacia la masculinidad. El producto de *SRY* pertenece a la familia de proteínas llamado "grupo de alta movilidad" (HMG: siglas en inglés de High Mobility Group) que tienen la capacidad de curvar el ADN y facilitar la interacción entre los factores dominados "enhancer", factores basales y promotores localizados a distancia (proteínas que participan en los procesos de transcripción) (Sinclair *et al.*, 1990; Laudet *et al.*, 1993; Cameron and Sinclair, 1997). A través de este mecanismo, las proteínas promoverán la interacción ADN-ADN que desencadenará los eventos que llevarán a la masculinización del embrión indiferenciado. Adicionalmente, Werner *et al.* (1995) y Capel (1998) mencionan que *SRY* regula la expresión de genes a través de efectos "arquitectónicos" que convierten la región promotora en un alto orden de estructura facilitando la acción de otros reguladores transcripcionales. Whitfield *et al.* (1993) y O'Neill

and O'Neill (1999) mencionan que HMG de SRY muestra homología entre especies, y fuera de esta región, presenta una notable ausencia de conservación de secuencias. Un ejemplo de la identidad de las secuencias de HMG SRY es en ovinos con 83.4% y 72.8% con relación a las regiones de humano y de ratón respectivamente (Pomp *et al.*, 1995).

La transcripción de *Sry* se expresa entre los días 10.5 y 12.5 en el embrión de ratón (XY) (Koopman, 1995). Aproximadamente por el día 12 las células de la cresta urogenital llegan organizadas en curvas cilíndricas llamadas "cordones testiculares", debido a la alineación y diferenciación de las células de Sertoli y de células germinales (Sinclair *et al.*, 1990). Palmer y Burgoyne (1991) mencionan que las células de Sertoli son las primeras células específicas del macho que se reconocen en la etapa de la diferenciación sexual. Con esto, se presupone que estas células son el primer sitio donde probablemente se exprese SRY para las subsecuentes etapas de la diferenciación testicular, de esta manera se les define como las "organizadoras del testículo" (Veitia *et al.*, 1997a).

El análisis de las secuencias de SRY abrió la brecha para continuar con el entendimiento de la determinación del sexo, utilizando al ratón macho como modelo en mamíferos que ha sido sujeto de recientes investigaciones (Pelliniemi *et al.*, 1998; Bishop and Mitchell, 1999; Roberts *et al.*, 1999; Swain and Lovell-Badge, 1999).

Durante el desarrollo, la cresta urogenital en ambos sexos está constituida por una superficie intermedia de los mesonefros, que en turno están formados del mesodermo intermedio. La cresta urogenital esta compuesta de una superficie epitelial con mesénquima adyacente. Las células de la cresta urogenital, presumiblemente son determinadas por la posición clave de tejido que puede involucrar la expresión de los genes *SF-1*, *WT-1*, *SOX9*, *LIM1*, *LHX9* y *DMRT1* para la consecutiva expresión de SRY para la determinación sexual masculina o en su ausencia para la determinación sexual femenina (Figura 18) (Pelliniemi *et al.*, 1998).

Específicamente, el gen *DAX-1* del cromosoma X y los genes autosómicos *SF-1*, *WT-1* y *SOX9* juegan un papel crítico en los procesos de la determinación y diferenciación sexual, realizando un complejo de interacciones que involucra señales de regulación positiva y negativa, dependiendo del contexto celular y promotor para su manejo en el proceso de la gonadogénesis (McElreavey and Fellous, 1999). Estos eventos anteceden la determinación del sexo y son independientes del sexo. Un ejemplo, es la interacción entre *SF-1* y *WT-1* para la formación de las crestas urogenitales (Nachtigal *et al.*, 1998). Donde la gónada primitiva es el "estado indiferente" que corresponde a 9.5-

11.5 días en el embrión de ratón. Presumiblemente, si se impide la expresión de *SF-1*, *WT-1*, *LIM1* o *LHX9*, entonces las gónadas del macho no se forman resultando un fenotipo femenino (Luo *et al.*, 1994). Durante esta etapa primordial, las células germinales migran al área de la cresta urogenital, pero no contribuyen en ese momento para la determinación del sexo (Burgoyne *et al.*, 1988).

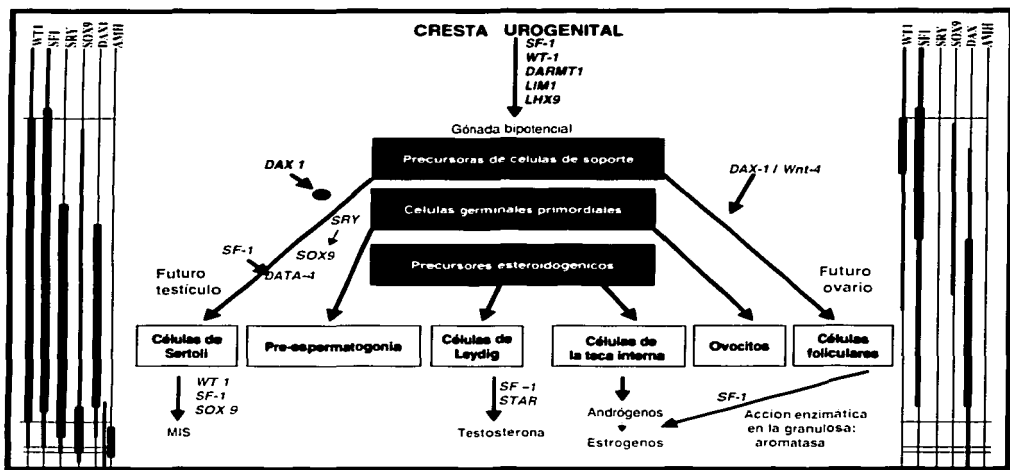


FIGURA 17. REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LA RELACIÓN QUE EXISTE ENTRE LOS GENES PARA LA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE UN INDIVIDUO. La actividad de algunos genes que intervienen durante la diferenciación sexual se representa en las regiones engrosadas de las líneas laterales de la izquierda para macho y de la derecha para hembra.

Bajo la influencia de la proteína *Sry* se incrementa la expresión del gen *SOX9* en las células de Sertoli tempranas. *SOX9* es un activador HMG-box transcripcional, exponiendo secuencias y patrones de expresión que son altamente conservados entre especies de mamíferos, aves y reptiles. Esto sugiere que *SOX9* contribuye a la vía de desarrollo de la gonadogénesis de vertebrados ancestrales desde hace 350 millones de años (Graves, 1998).

El proceso de la determinación del sexo que es regulado por el gen *SRY* finaliza (en el ratón el pico de *Sry* es en el día 11.5 y es suprimido por el día 12.5) e inicia consecutivamente la diferenciación

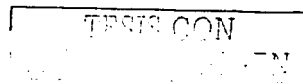
sexual que es un proceso regulado hormonalmente. Durante el desarrollo testicular se producen en mínima cantidad dos hormonas: la Sustancia Inhibidora Mülleriana (MIS siglas en inglés de Müllerian Inhibitory Substance), una proteína de factor de crecimiento; y la testosterona, un esteroide (Shen *et al.*, 1994; Veitia *et al.*, 1997a).

La expresión de MIS es proporcionada por el gen *DATA-4* en las células de Sertoli dentro de los cordones testiculares y ocurre en el ratón por el día 12 (Viger *et al.*, 1998). La proteína MIS se conoce que es el primer producto proteico secretado por las células de Sertoli y su expresión también está regulada por el gen *SF-1* como una respuesta para la regresión de los conductos Müllerianos durante la vida fetal del macho (Shen *et al.*, 1994; Veitia *et al.*, 1997a).

En cambio, la testosterona es el resultado de la expresión del gen *SF-1* durante la diferenciación masculina en las células de Leydig que se encuentran en la región intersticial. Bajo la influencia de la testosterona y de MIS los conductos Wolffianos se diferencian en vesícula seminal, epidídimo, vasos deferentes y conducto eyaculatorio. Sin embargo, en ausencia de testosterona y de MIS los conductos Wolffianos se atrofian y los conductos Müllerianos forman los oviductos, trompas de Falopio y vagina superior (Parker *et al.*, 1999), proceso que está regulado por el gen *Wnt-4* (Vainio *et al.*, 1999); y la actividad enzimática esteroidogénica está regulada por *SF-1* (Lynch *et al.*, 1993). Por lo que *SF-1* es considerado como el gen clave para el desarrollo endocrino involucrado en la esteroidogénesis gonadal (Parker and Schimmer, 1997).

El gen *DAX-1* se encuentra en Xp en dos copias de 160 kb (Kilobases) y es un mediador potencial en el desarrollo de los ovarios. Regula la expresión a través de la interacción de proteínas, actuando primordialmente en la esteroidogénesis postnatal (Crawford *et al.*, 1998); y al igual que *SF-1* se expresa en gónadas, corteza adrenal y pituitaria gonadotrópica (Ikeda *et al.*, 1996). Sin embargo, por la interacción con *SF-1*, puede prevenir el sinergismo de *SF-1* con *WT-1* y actuar *DAX-1* como un represor de la transcripción de *SOX9* y de MIS. Por lo que *DAX-1* puede ser considerado como un factor de feminidad (Zazopoulos *et al.*, 1997; Nachtigal *et al.*, 1998; Yu *et al.*, 1998).

El gen *DMRT1* fue recientemente identificado en la búsqueda de homología entre las secuencias de genes de *Drosophila* y de secuencias expresadas en el humano. *DMRT* se encuentra en el locus genético sobre el cromosoma 9 en el humano que está implicado con el sexo invertido y disgenesia gonadal en el estado de heterocigoto (Vainio *et al.*, 1999; Moniot *et al.*, 2000). Además, *DMRT1* se encontró sobre el cromosoma Z y expresado diferencialmente en la cresta urogenital de machos y



hembras de embriones de pollos; y se ha encontrado que este gen se expresa diferencialmente en embriones de reptiles, desarrollando machos o hembras de acuerdo a cambios de la temperatura ambiental (Raymond *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999). *DMRT1* es una de las primeras moléculas implicadas en la determinación del sexo, mostrando conservación de secuencias entre vertebrados e invertebrados desde hace 600 millones de años. También es uno de los pocos genes que aparecen para tener un patrón de expresión estrictamente gonadal (Raymond *et al.*, 1999).

Otros genes involucrados es el grupo *TSPY* que se localiza en el cromosoma Y que codifica proteínas específicas del testículo. Bishop y Mitchell (1999), mencionan que los genes de este grupo tienen funciones transcripcionales, siendo un grupo conservado sobre cromosomas únicos en la divergencia de euterios, desde hace 80 millones de años. Estos genes están arreglados en racimo sobre el cromosoma Y y se cree que tienen una función en la espermatogénesis temprana (Vogel and Schmidtke, 1998). Schubert *et al.* (2000) mencionan que las familias de genes homólogas de *TSPY* inicialmente fueron descubiertas en el hombre y subsecuentemente en otros primates, incluyendo monos grandes, monos búhos y macacos, entre otros; así como en artiodáctilos como bovinos, caprinos y cerdos.

En el humano, *TSPY* es moderadamente repetitivo con 30-60 copias por cromosoma, sin embargo en el macho bovino el rango del número de copias puede ser desde 50 hasta 200. Los miembros de *TSPY* humano, demuestran una diversidad del 10% de nucleótidos en el nivel genómico, si aparentemente los pseudogenes de no-transcripción están incluidos, los miembros funcionales son sólo el 3% de divergencia. Cada unidad de transcripción representa una extensión aproximada de 28 Kb y consiste de 6 exones y 5 intrones (Vogel and Schmidtke, 1998; Bishop and Mitchell, 1999).

El *TSPY* está expresado exclusivamente en la espermatogonia y sólo para una extensión muy pequeña en los espermatoцитos primarios, sugiriendo que *TSPY* es uno de los varios factores de fertilidad específicos del macho. Vogel *et al.* (1997) indican que en el bovino se presenta un gran número de diferentes miembros de *TSPY* dispersos sobre todo el cromosoma Y; y Vogel and Schmidtke (1998) mencionan que *TSPY* del bovino presenta una homología muy similar al del humano en todos los aspectos de organización y de expresión.

ANEXO 3. PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE SANGRE PERIFÉRICA

El ADN genómico fue extraído de muestras de sangre periférica de hembras y machos de bovino (Holstein y Cebú), ovino, caprino y búfalo (*Bubalu bubalis*). La sangre fue colocada en tubos "Venoject" con EDTA, refrigeradas en hielo para su transporte. Para la purificación del ADN de cada muestra, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. En un tubo eppendorf de 1.5 ml se colocaron 500 μ l de sangre, agregando 2 volúmenes de H_2O_{dd} , se mezcló con Vortex y se centrifugó a 12,000 rpm (revoluciones por minuto) por 10 min.
2. Se decantó y el pellet fue lavado con 500 μ l de H_2O_{dd} , centrifugando a 12,000 rpm por 10 min.
3. Se repitió el paso 2.
4. El pellet recuperado fue resuspendido en 500 μ l de solución de lisis y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min.
5. Después de la incubación, se le agregó RNAsa 20 μ g/ml y se incubó en baño María a 37°C por 1 h.
6. Posteriormente, se le agregó Proteinasa K 100 μ g/ml y se incubó en baño María a 55°C por toda la noche.
7. Después, a la mezcla se le adicionó NaCl 2 M, agitando vigorosamente durante 15 seg y se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min.
8. Para obtener el ADN se recuperó el sobrenadante y se precipitó el ADN con un volumen de isopropanol 100% (ó dos volúmenes de etanol 100%), mezclando suavemente y centrifugando a 12,000 rpm por 5 min.
9. Se recuperó el pellet y este fue lavado con 300 μ l de etanol 70%, para la cual, después de cada lavado se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min.

10. Para quitar restos de etanol, el tubo que contenía el pellet fue colocado a 50°C durante 10 min.
11. El ADN fue resuspendido en 200 µl de H₂Odd.
12. Para conocer la concentración de ADN obtenido por la técnica, este fue cuantificado por fluorómetro (Hoefer Scientific Instruments, Mod. DQ200-115V) .
13. La integridad del ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, usando como buffer de corrida TBE 1X y como marcador molecular ADN λ/BstEII. La valoración se realizó por UV.

ANEXO 4. PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE TEJIDO (HÍGADO)

El ADN genómico fue extraído de muestras de tejido (hígado) de hembras y machos de bovino (Holstein y Cebú), ovino y caprino. Las muestras de tejido fueron colocadas en bolsas de plástico y colocadas en hielo durante su transporte. Para la purificación del ADN de cada muestra, se llevó a cabo el siguiente protocolo:

1. Se colocaron 5 g de tejido en un mortero, deshidratado con nitrógeno líquido y se pulverizó.
2. La muestra pulverizada fue colocada en un tupo falcon de 50 ml y se le colocaron 50 ml de solución de lisis, mezclando suavemente.
3. En el lisado se colocó RNAsa 20 $\mu\text{g/ml}$ y fue incubado en baño María a 37°C por 1 h.
4. Posteriormente, se agregó Proteinasa K 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó en baño María a 55°C por toda la noche.
5. Después de pasado el tiempo de incubación, a la mezcla se le agregó NaCl 2 M, agitando durante 15 seg y se centrifugó a 3,000 rpm a 4°C por 15 min.
6. Se recuperó el sobrenadante y este fue precipitado con un volumen de isopropanol 100% (ó 2 volúmenes de etanol 100%), fue incubado a 4°C por 15 min y centrifugado a 4,000 rpm a 4°C por 15 min.
7. Se decantó y el pellet fue resuspendido en un volumen mínimo de solución de lisis, mezclando suave y completamente.
8. A la mezcla se le realizó una extracción fenólica, agregando 1 volumen de fenol, la cual se agitó vigorosamente y fue centrifugada a 4,000 rpm a 4°C por 15 min.
9. Se obtuvo en un tubo falcon de 15 ml la parte acuosa de la mezcla centrifugada. A esta parte acuosa, se le adicionó un volumen de cloroformo/alcohol isoamílico 24:1, que fue agitada vigorosamente y centrifugada a 4,000 rpm a 4°C por 10 min.
10. Se obtuvo la parte superior del sobrenadante y se repitió el paso 9.

11. Se obtuvo la parte superior del sobrenadante y se agregaron dos volúmenes de etanol 100%, se mezcló, incubando 15 min a 4°C y centrifugando a 4,000 rpm a 4°C durante 10 min.
12. Se decantó y el pellet fue lavado con 10 ml de etanol 70% y centrifugado a 4,000 rpm a 4°C durante 5 min.
13. Se repitió el procedimiento anterior.
14. El pellet de ADN fue colocado por 1 h a 45°C.
15. El pellet fue resuspendido en 4 ml de TE.
16. Para conocer la concentración de ADN obtenido por la técnica, este fue cuantificado por fluorometría.
17. La integridad del ADN se realizó por electroforesis en geles de agarosa 1% teñidos con bromuro de etidio 0.5 µg/ml, usando como buffer de corrida TBE 1X y como marcador molecular ADN λ/BstEII. La valoración se realizó por UV.

ANEXO 5. BUFFER UTILIZADOS

Amortiguador SSC 6 X: NaCl 3 M + Citrato Na 0.3 M pH 7.0

Buffer para *BamHI* (BioLabs): NE Buffer *BamHI* + BSA: NaCl 150 mM + Tris-HCl 10 mM + MgCl₂ 10 mM + Dithiothreitol 1 mM (pH 7.9) + suplemento de BSA 100 µg/ml

Buffer para *EcoRI* (BioLabs): NE Buffer *EcoRI*: NaCl 50 mM + Tris-HCl 100 mM + MgCl₂ 10 mM + Triton X-100 0.025% (pH 7.5.)

Buffer para *HpaI* (BioLabs): NE Buffer 4: Acetato K 50 mM + Tris-acetato 20 mM + Acetato Mg 10 mM + Dithiothreitol 1mM (pH 7.9)

Buffer para *MspI* (BioLabs): NE Buffer 2: NaCl 50 mM + Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM + Dithiothreitol 1 mM (pH 7.9)

Buffer para *PstI* (Gibco): Tris-HCl 10 mM (pH 7.4) + NaCl 50 mM + EDTA 0.1 mM + DTT 1 mM + Glicerol 50% (v/v) + Tritón X-100 0.15% (v/v)

Buffer para *SaI* (BioLabs): NE Buffer *SaI* + BSA: NaCl 150 mM + Tris-HCl 10 mM + MgCl₂ 10 mM + Dithiothreitol 1 mM (pH 7.9) + suplemento con BSA 100 µl/ml

Solución de lavado: SSC 1 X + SDS 0.1%

Solución de lisis (Anexo 3): Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + NaCl 200 mM + EDTA 20 mM + SDS 0.5%

Solución de lisis (Anexo 4): Tris-HCl 50 mM pH 8.0 + EDTA 100 mM + Sarkosyl 0.5%

Solución desnaturalizante: NaCl 1.5 M + NaOH 0.5M

Solución neutralizante: NaCl 1.5 M + Tris-HCl 0.5 M pH 8

Solución de pre-hibridación: SSC 6 X + SDS 1% + Formamida 50% + Blocking 2%

TBE 1 X: Tris + H₃BO₃ + EDTA 0.5 M pH 8.0

TE: Tris 1 M pH 8.0 + EDTA 50 mM pH 8.0).