

## Sexagem de embriões bovinos fecundados *in vitro* pela técnica de PCR multiplex

### Sexing of *in vitro* fertilized bovine embryos by multiplex PCR

Marcelo Rezende LUZ<sup>1</sup>; Yeda Fumie WATANABE<sup>2</sup>; Jesus Aparecido FERRO<sup>1</sup>;  
Maria Inês T. FERRO<sup>1</sup>; Sônia Marli Singaretti de MAURO<sup>1</sup>;  
Vera Fernanda Martins HOSSEPIAN DE LIMA<sup>1</sup>; Paulo Henrique FRANCESCHINI<sup>1</sup>

CORRESPONDÊNCIA PARA:  
Marcelo Rezende Luz  
Setor de Reprodução Animal e  
Obstetrícia  
Faculdade de Ciências Agrárias da  
UNESP  
Hospital Veterinário – Campus II  
Rodovia Raposo Tavares, km 572 –  
Limoeiro – SP  
e-mail: luzmr@uol.com.br

1-Setor de Reprodução Animal e  
Obstetrícia da Faculdade de Ciências  
Agrárias e Veterinárias da UNESP –  
Campus II, Limoeiro – SP  
2-Faculdade de Medicina de Ribeirão  
Preto da USP – SP

#### RESUMO

Neste trabalho, a técnica de PCR ("polymerase chain reaction") foi utilizada para a sexagem de 92 embriões bovinos fertilizados *in vitro*. Os embriões originaram-se de fertilização *in vitro* de oócitos aspirados de ovários de fêmeas bovinas, provenientes de abatedouros comerciais. Os oócitos foram maturados, fertilizados e cultivados até o estágio de blastocisto. Os embriões foram lavados em solução de PBS, transferidos para tubos de polipropileno contendo água ultrapura, e imediatamente congelados a -196°C. Os embriões foram descongelados sobre isopor contendo gelo picado e tratados com proteinase K. Para a reação de PCR, utilizaram-se alíquotas de 34 µl de cada tudo, onde foram acrescentados dois pares de primers, seqüência BC1.2 e seqüência satélite 1.715, desoxinucleotídeos, MgCl<sub>2</sub>, tampão PCR 10X, TaqDNA polimerase e água, em um volume final de 50 µl. As amostras foram amplificadas e a eletroforese realizada em gel de poliacrilamida a 8%. Os géis foram corados com solução de brometo de etídio e analisados em transiluminador de luz ultravioleta. Um índice de 93,47% de amplificação foi atingido, com 41 embriões (47,67%) machos e 45 (52,32%) embriões fêmeas. O uso de gel de poliacrilamida a 8% foi eficaz na separação de fragmentos de DNA muito próximos.

UNITERMOS: Sexagem; Embrião; Bovino; PCR.

#### INTRODUÇÃO

O controle da proporção dos sexos nas espécies domésticas é, potencialmente, de grande interesse comercial para a agropecuária. Embora a sexagem de espermatozoides possa ser a maneira mais vantajosa para a seleção do sexo nos animais por ocasião da inseminação artificial, até o presente momento esta tecnologia não está disponível<sup>16</sup>. Entre as metodologias utilizadas para sexagem de sêmen, a única que tem resultado em significantes alterações da taxa de sexo em espermatozoides é a citometria de fluxo, baseada nas diferenças de quantidade de DNA entre espermatozoides portadores de cromossomo X ou Y<sup>17</sup>.

Dentre as principais técnicas biotecnológicas aplicadas à reprodução animal, a sexagem de embriões vem se destacando e tem sido amplamente estudada<sup>2,5,8,12,14</sup> e utilizada para fins comerciais<sup>10,15</sup>.

Em 1989, foi realizada a sexagem pioneira de embriões humanos pré-implantados, com o uso da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)<sup>7</sup>. A descrição da sexagem

de embriões bovinos pela PCR, com a utilização de biópsias contendo de uma a três células com seis ou sete dias de desenvolvimento, foi um passo marcante no desenvolvimento da técnica<sup>14</sup>.

Com relação à eficiência da sexagem embrionária por intermédio da técnica de PCR, um total de 110 embriões *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus* foi submetido a micromanipulação para amostragem embrionária, tendo sido alcançado um índice de 89,8% de amplificação. A acuidade da técnica foi avaliada por meio do exame ultra-sonográfico das 44 prenhez obtidas, realizado aos 55 dias pós-transferência, onde foi observado um acerto de 100% na sexagem<sup>5</sup>.

Em embriões, os métodos mais precisos de sexagem (acuidade de 100%) são invasivos, ou seja, requerem que uma pequena amostra de células seja removida do embrião. Estes métodos envolvem a visualização dos cromossomos sexuais a partir da realização de cariótipo, ou a detecção de uma seqüência de DNA, específica do cromossomo Y, após amplificação em termociclador por PCR.

Dados da literatura demonstram que a porcentagem de embriões sexados por citogenética é de 81%<sup>6</sup> e que, por intermédio da técnica de detecção do antígeno H-Y, 88%<sup>8</sup>. Face ao exposto, o presente trabalho teve como objetivos: (1) padronizar a técnica de PCR para sexagem de embriões bovinos fecundados *in vitro*, (2) verificar o índice de amplificação de DNA de embriões bovinos inteiros sexados pela técnica de PCR empregando as seqüências BC1.2 e 1.715 e (3) identificar o sexo de embriões bovinos inteiros fecundados *in vitro* pela técnica de PCR.

## MATERIAL E MÉTODO

Utilizaram-se 92 embriões produzidos *in vitro*. Os oócitos foram aspirados de vacas mestiças encaminhadas ao abate, acondicionados em frascos contendo solução salina a 0,9% acrescida de antibióticos, e mantidos em caixa térmica a 32°C. No laboratório, os ovários foram lavados em solução salina antes da aspiração folicular e somente os oócitos com cumulus compacto completo, citoplasma de coloração marrom e de aspecto homogêneo foram utilizados.

Os oócitos selecionados foram lavados duas vezes em meio de colheita (H199) e uma vez em meio de maturação (B199), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 5 mg de FSH/ml<sup>a</sup> e 5 ml de LH/ml<sup>b</sup>, antes de seguirem para a maturação *in vitro*. Ao término do cultivo a 39°C, 5% de CO<sub>2</sub> em ar e com máxima umidade, durante 23 a 25 horas, os oócitos maturados *in vitro* foram lavados duas vezes em meio de colheita sem soro antes de seguirem para fecundação *in vitro*.

Sêmen congelado de um touro da raça Nelore foi utilizado para a fecundação *in vitro*. A fração contendo espermatozoides móveis foi obtida mediante a técnica de gradiente de Percoll. O sêmen de uma palheta de 0,5 ml foi depositado sobre o gradiente de Percoll e, a seguir, centrifugado por 30 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao sedimento, foram adicionados 200 µl de meio para fecundação (TALP).

Foi adicionado um volume do sedimento nas placas de fecundação<sup>c</sup> para obtenção de uma concentração espermática de 2 a 4 x 10<sup>6</sup> células/ml. Cada placa permaneceu em incubação, com os oócitos, em atmosfera gasosa de 5% de CO<sub>2</sub> em ar a 39°C, durante 18 a 20 horas.

Após o término da incubação com os espermatozoides, os zigotos foram transferidos para as placas de cultivo, em monocamada de células Vero de linhagem pre-estabelecida, em meio B2 (Menezes) suplementado com 10% de SFB, durante 7 a 9 dias, para atingirem o estágio de blastocisto (dia 0 = dia da fecundação). As condições de co-cultura foram 5% de CO<sub>2</sub> em

ar a 39°C, por 7 a 9 dias consecutivos. Realizou-se a troca do meio de cultivo após o terceiro dia de cultivo e no dia do co-cultivo com os embriões, ou seja, duas a três horas antes de os zigotos serem colocados para cultivo.

A extração de DNA de sangue total de bovinos machos e fêmeas foi realizada<sup>9</sup> e, após espectrofotometria, o DNA foi alíquotado em tubos plásticos contendo 1.250 pg para controle interno das reações e simulação da quantidade de DNA de um blastocisto. Noventa e dois embriões fecundados *in vitro* foram submetidos a sexagem pela técnica de PCR<sup>14</sup>, com as modificações descritas a seguir. Cada embrião foi lavado dez vezes em solução de PBS e transferido para um tubo de polipropileno contendo 100 µl de água deionizada e autoclavada, imediatamente congelado a -196°C em nitrogênio líquido e armazenado a -20°C até o momento da sexagem.

Os embriões foram descongelados, mantendo-se os tubos sobre um isopor com gelo picado. Em cada tubo foram adicionados 6 µg de proteinase K<sup>d</sup>. Os embriões foram incubados a 37°C por 60 minutos, e, posteriormente, a 98°C por 10 minutos, para inativação da enzima. Foram utilizadas alíquotas de 34 µl de cada amostra, às quais foram acrescidos dois pares de primers. O primeiro par utilizado foi derivado da seqüência BC1.2<sup>4</sup>, específica do cromossomo Y bovino, sendo BC1.2a 5' - ATC AGT GCA GGG ACC GAG ATG-3' e BC1.2b 5' - AAG CAG CCG ATA AAC ACT CCT T3'. O segundo par, 1.715a 5' - TGG AAG CAA AGA ACC CCG CT - 3' e 1.715b 5' - TCG TGA GAA ACC GCA CAC TG -3', específico para regiões autossômicas bovinas, a seqüência microssatélite 1.715<sup>13</sup>, foi utilizado para controle interno das reações. O padrão de amplificação para DNA de sangue total de fêmeas e de machos foi de 216 e 196 pares de bases, respectivamente.

Foram adicionados 200 µM de cada dNTP<sup>e</sup>, 2 µM de MgCl<sub>2</sub><sup>f</sup>, 5,0 µl de tampão PCR 10X (100 mM Tris-HCl, pH 8,3; 500 mM KCl; 15 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,01% w/v gelatina)<sup>f</sup>, 2 picomoles de cada primer e 0,5 UI de *Taq* DNA polimerase<sup>f</sup>, em um volume final de 50 µl.

As amostras foram submetidas a amplificação em termociclador<sup>g</sup> por 30 ciclos, com desnaturação a 94°C por 1 minuto, anelamento a 56°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 1 minuto. Ao final, as amostras permaneceram incubadas a 72°C por 10 minutos, para a extensão final do DNA.

Para a visualização dos fragmentos de DNA, alíquotas dos produtos de PCR foram submetidas a eletroforese, em gel de poliacrilamida (PAGE) a 8%, a uma tensão constante de 200 Volts, por 50 minutos. Após a eletroforese, os géis foram imersos em solução corante de brometo de etídio a 0,5 µg/mL por 15 minutos. As análises dos géis foram procedidas em câmara escura sobre transiluminador de luz ultravioleta<sup>h</sup>.

<sup>a</sup> PLUSET-SERONO.

<sup>b</sup> LH-NOBL.

<sup>c</sup> NUNCLON.

<sup>d</sup> LIFE TECHNOLOGIES

<sup>e</sup> PROMEGA

<sup>f</sup> PERKIN ELMER

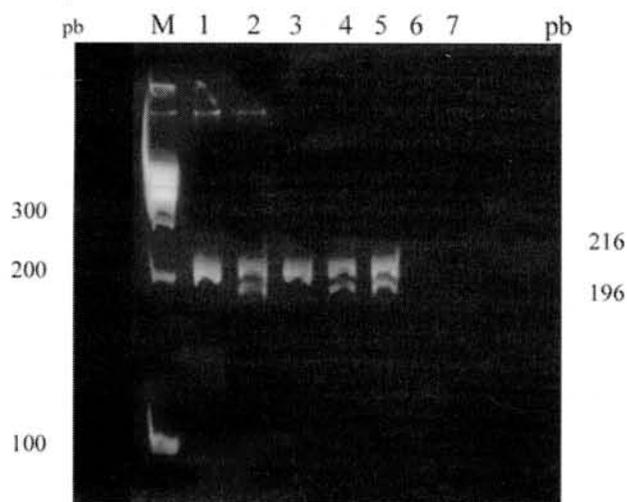
<sup>g</sup> MJ RESEARCH

<sup>h</sup> FOTODYNE

## RESULTADOS

De um total de 92 embriões bovinos fecundados *in vitro*, submetidos a amplificação pela técnica de PCR, 86 (93,47%) embriões tiveram seu sexo determinado. Destes, oito tiveram que ser reamplificados, em função de terem mostrado fragmentos fracos na primeira reação de PCR, o que deixou dúvidas sobre o diagnóstico do sexo. Porém, em todas as reações em duplicata, realizadas com alíquotas de DNA armazenadas posteriormente à prévia utilização de 34 µl para a primeira reação, o sexo verificado esteve de acordo com aquele de maior suspeita na primeira reação.

Não houve diferenças no padrão de amplificação por PCR dos ácidos nucleicos oriundos de leucócitos ou de células embrionárias. O padrão de amplificação, por PCR, do DNA de leucócitos e de células embrionárias de bovinos mestiços machos e fêmeas pode ser visto na Fig. 1. Nas amostras com DNA de fêmea, pôde-se evidenciar apenas um fragmento de 216 pares de bases, referente à seqüência satélite 1.715. Por outro lado, nas amostras com DNA de macho, puderam-se evidenciar dois fragmentos de DNA, referentes à seqüência BC1.2 (196 pares de bases) e à seqüência microssatélite 1.715 (216 pares de bases).



**Figura 1**

Produtos de amplificação de DNA de leucócitos e de células embrionárias de bovinos mestiços machos e fêmeas, separados em gel de poliacrilamida 8% e corados com brometo de etídio. (M) marcador de peso molecular em escada de 100 pares de bases; (1) DNA de leucócitos de bovino fêmea (1.250 pg); (2) DNA de leucócitos de bovino macho (1.250 pg); (3) DNA de embrião bovino fêmea; (4) e (5) DNA de embrião bovino macho; (6) e (7) controles negativos sem DNA.

## DISCUSSÃO

Entre as técnicas utilizadas para sexagem de embriões, como a cariotipagem ou o cultivo de embriões com anticorpos

anti-H-Y<sup>3,6,8</sup>, a PCR destaca-se por ser a única que oferece possibilidade de 100% de acurácia na determinação do sexo<sup>2</sup>, além de ser bastante rápida<sup>14</sup>, conferindo resultados de sexagem em até 5 horas após a biopsia embrionária sem necessidade de congelamento do embrião<sup>15</sup>.

O índice de amplificação obtido neste trabalho (93,47%) foi semelhante<sup>3,5,11</sup> aos índices obtidos por outros autores. No entanto, no presente trabalho utilizaram-se embriões inteiros, e não células embrionárias para a determinação do sexo.

A falha de amplificação em seis amostras foi atribuída à ausência de material genético dos embriões nos tubos dessas amostras<sup>1</sup>, o que pode ser devido à perda dos embriões durante a transferência do meio de cultivo para o tubo de polipropileno.

O uso de gel de poliacrilamida a 8% foi eficiente na separação dos fragmentos de DNA de tamanho muito próximo, apesar de seu uso na sexagem embrionária não ter sido relatado na literatura. Embora o uso de acrilamida seja uma técnica mais trabalhosa do que o uso de gel de agarose, foi utilizada por possuir alta resolução para separar os fragmentos muito próximos.

O fato de o fragmento de DNA encontrado com o uso dos oligonucleotídeos BC1.2 não ter sido do tamanho esperado (49 pares de bases) pode ser explicado pela seqüência estar em "tandem", de acordo com a citação do uso do mesmo primer com o encontro de fragmentos macho-específicos de, aproximadamente, 150 pares de bases, e atribuição de tal fato a um possível trîmero da seqüência BC1.2<sup>14</sup>.

É enfatizada a necessidade do uso de um par de primers para controle das reações de PCR, considerando que os resultados das reações somente são confiáveis quando tal procedimento é adotado<sup>15</sup>, de acordo com o realizado no presente trabalho. A ausência de fragmento com o uso de primer para controle interno da reação revela problema na amplificação ou ausência de material a ser amplificado na amostra<sup>15</sup>.

Embriões biopsiados e submetidos a sexagem pela técnica de PCR, em embriões bovinos da raça Simental, mostraram uma taxa de gestação de 61,5% para os embriões micromanipulados, o que não diferiu estatisticamente dos 67,5% do grupo controle não-micromanipulado<sup>5</sup>.

## CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitiram concluir que (1) embriões bovinos fecundados *in vitro* podem ter seu sexo determinado com acurácia de 100%, pela técnica de PCR; (2) o uso da seqüência microssatélite 1.715 é essencial para a detecção da ausência de material genético; (3) o gel de poliacrilamida é eficiente na separação de fragmentos de DNA amplificados tanto de leucócitos quanto de células embrionárias, quando são de tamanhos similares.

### SUMMARY

In the present study the polymerase chain reaction (PCR) was used for sexing ninety-two *in vitro* fertilized bovine embryos. The embryos were obtained after *in vitro* fertilization of oocytes from slaughterhouses. The oocytes were matured, fertilized, and cultured until the blastocyst stage. The embryos were washed in PBS solution, and transferred to polypropylene tubes with containing ultrapure water and immediately frozen at -196°C. The embryos were thawed on ice and treated with proteinase K. For the PCR reaction, aliquots of 34 µl from each tube were mixed to the primers BC1.2 and microsatellite sequence 1715, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, 10X PCR buffer, *Taq* DNA polymerase and water in a final volume of 50 µl. The samples were amplified and the PCR products separated by electrophoresis in a 8% polyacrylamide gel. The gels were stained in ethidium bromide solution and visualized under UV-light. The amplification rate was 93.47%, with 41 (47.67%) male embryos and 45 (52.32%) female embryos. The use of 8% polyacrylamide gel was efficient for separating DNA fragments of very similar size.

**UNITERMS:** Sexing; Embryo; Bovine; PCR.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1- AGRAWALA, P.L.; WAGNER, V.A.; GELDERMANN, H. Sex determination and milk protein genotyping of preimplantation stage bovine embryos using multiplex PCR. **Theriogenology**, v.38, p.969-78, 1992.
- 2- APPA RAO, K.C.B.; TOTTEY, S.M.; PAWSHE, C.H. Biopsy of indian zebu and crossbred cattle preimplantation embryos and sexing by polymerase chain reaction. **Animal Reproduction Science**, v.34, p.209-16, 1994.
- 3- AVERY, B.; JORGENSEN, C.B.; MADISON, V.; GREVE, T. Morphological development and sex of in-vitro fertilized embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v.32, p.265-70, 1992.
- 4- COTINOT, C.; KIRSZENBAUM, M.; LEONARD, M.; GIANQUINTO, L.; VAIMAN, M. Isolation of bovine Y-derived sequence: potential use in embryos sexing. **Genomics**, v.10, p.646-53, 1991.
- 5- GARCIA, J.F. **Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction") de embriões bovinos**. São Paulo, 1995. 76p. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo.
- 6- GARCIA, J.M. **Sexagem de embriões murinos e suínos através da análise citogenética**. Botucatu, 1993. 172p. Tese (Doutorado em Genética) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual Paulista.
- 7- HANDYSIDE, A.H.; PENKETH, R.J.A.; WINSTON, R.M.L. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, v.18, p.347-49, 1989.
- 8- HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M.; MOREIRA-FILHO, C.A.; DE BEM, A.R.; JORGE, W. Sex determination of murine and bovine embryos using cytotoxicity and immunofluorescence assays. **Theriogenology**, v.39, p.1343-52, 1993.
- 9- JOHN, S.W.M.; WEITZNER, G.; ROZEN, R. A rapid procedure for extracting genomic DNA from leucocytes. **Nucleic Acid Research**, v.2, n.19, p.408, 1990.
- 10- NIVOT, A.; LIEGEOIS, L. One year's results using bovine embryo sexing process in France and in Europe. *In: RÉUNION A.E.T.E.*, Cambridge, 1991. Réunion. v.7, p.180.
- 11- PEIPPO, J.; BREDBACKA, P. Sex-related growth rate differences in mouse preimplantation embryos *in vivo* and *in vitro*. **Molecular Reproduction and Development**, v.40, p.56-61, 1995.
- 12- PEURA, T.; HYTTINEN, J.M.; TURUNEN, M.; JÄNNE, J. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.35, n.3, p.547-55, 1991.
- 13- PLUCIENNICZAK, A.; SKOWRONSKY, J.; JAWORSKY, J. Nucleotide sequence of bovine 1715 satellite DNA and its relation to other bovine satellite sequences. **Journal of Molecular Biology**, v.158, p.293-304, 1982.
- 14- SCHRÖDER, A.; MILLER, J.R.; THOMSEN, P.D.; ROSCHLAU, K.; AVERY, B.; POULSEN, P.H.; SCHMIDT, M.; SCHWERIN, M. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, v.1, p.121-33, 1990.
- 15- THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, v.43, p.71-80, 1995.
- 16- VAN VLIET, R.A.; VERRINDER GIBBINS, A.M.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**, v.32, n.3, p.421-38, 1989.
- 17- WELCH, G.R.; JOHNSON, I.A. Sex preselection: Laboratory validation of the sperm sex ratio of flow sorted X- and Y-sperm by sort reanalysis for DNA. **Theriogenology**, v.52, n.8, p.1343-52, 1999.

Recebido para publicação: 02/06/1999  
Aprovado para publicação: 30/11/2000