

## APLICACIÓN DEL DIAGNÓSTICO GENÉTICO PREIMPLANTACIONAL EN BLASTOCISTOS EQUINOS

Application of preimplantation genetic diagnosis in equine blastocysts

Sicilia T. Grady<sup>1</sup> y Katrin Hinrichs<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Departamento de  
Fisiología y Farmacología  
Veterinaria y

<sup>2</sup> Departamento de Ciencias  
Clínicas de Especies  
Mayores, Facultad de  
Medicina Veterinaria y  
Ciencias Biomédicas,  
Universidad de Texas  
A&M, College Station, TX,  
USA 77843

E-mail: sgrady@cvm.tamu.edu

### RESUMEN

El diagnóstico genético preimplantacional (DGP) es un procedimiento utilizado para examinar embriones producidos *in vitro* o embriones recuperados por medio de lavado uterino para detectar, mediante análisis de ADN, ciertas características genéticas antes de transferir el embrión al útero. Los métodos utilizados para obtener biopsias celulares para DGP de embriones pequeños (mórulas compactas y blastocistos tempranos < 300  $\mu\text{m}$  de diámetro), inicialmente no fueron exitosos en embriones de mayor tamaño (blastocistos expandidos > 300  $\mu\text{m}$  de diámetro). La exitosa biopsia de blastocistos equinos expandidos mediante el uso de micromanipulación, con subsiguientes tasas de preñez normales, fue reportada por primera vez en el año 2010. Para analizar el ADN, se puede utilizar PCR cuando se evalúa solamente un gen, por ejemplo para diagnóstico del sexo, mientras que la amplificación del genoma completo es efectiva para PCR múltiple cuando se analizan varios genes.

**Palabras clave:** equino; embrión; diagnóstico genético preimplantacional.

### ABSTRACT

Pre-implantation genetic diagnosis (PGD) is a procedure used to screen *in vitro* produced embryos or embryos recovered after uterine flush to determine genetic traits by DNA testing prior to transfer into the uterus. Biopsy methods to obtain a sample of cells for genetic analysis before implantation have been successful in small embryos (morulae and blastocysts < 300  $\mu\text{m}$  diameter), but this technique was initially unsuccessful in large embryos (expanded blastocysts > 300  $\mu\text{m}$  diameter). The successful biopsy of expanded equine blastocysts via micromanipulation, with subsequent normal pregnancy rates, was first reported in 2010. Direct PCR may be performed when evaluating only one gene, such as for embryo sexing, while whole genome amplification is effective for subsequent multiplex PCR of multiple genes.

**Keywords:** equine; embryo; preimplantation genetic diagnosis

## INTRODUCCION

Los métodos de biopsia para embriones equinos fueron desarrollados antes del establecimiento de ICSI usando embriones recuperados *in vivo*. Las biopsias celulares pueden ser extraídas de embriones equinos tempranos (< 300  $\mu\text{m}$  diámetro) usando métodos desarrollados para bovinos (Slade *et al.*, 1985, Hochi *et al.*, 1996, Maclellan *et al.*, 2002, Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). Sin embargo, obtener biopsias de embriones equinos de mayor tamaño (blastocistos expandidos > 300  $\mu\text{m}$  diámetro) es más difícil debido a la presencia de la cápsula embrionaria (Slade *et al.*, 1985, Squires *et al.*, 1989, Eldridge-Panuska *et al.*, 2005). El embrión equino ingresa al útero al Día 5 después de la ovulación (Freeman *et al.*, 1991); por lo tanto, es posible recuperar blastocistos tempranos lavando el útero en el Día 6. No obstante, la recuperación de embriones equinos en el Día 6 ha sido asociada con porcentajes de recuperación más bajos que en los Días 7 u 8 (Battut *et al.*, 1997, Jacob *et al.*, 2012). En el año 2010 métodos para extraer biopsias para DGP de blastocistos expandidos fueron desarrollados por primera vez (Choi *et al.*, 2010). Con estas técnicas, ahora es posible extraer biopsias de blastocistos equinos expandidos que han sido recuperados en los Días 7 u 8.

## BIOPSIA EMBRIONARIA

### *Biopsia embrionaria en otras especies*

Inicialmente, las biopsias de embriones para DGP fueron realizadas en blastocistos vacunos para la determinación del sexo. Actualmente, la calidad genética de los embriones vacunos puede ser evaluada antes de transferir los embriones, utilizando micromatrices que evalúan secuencias de nucleótidos relacionados con genotipos de producción (polimorfismos de un solo nucleótido o SNPs). Estos chips de SNP pueden evaluar más de 50,000 SNPs de genotipos de producción incluyendo facilidad de parto, tasa de crecimiento, grasa de la canal, producción de leche, y eficiencia reproductiva. Existen varias micromatrices de SNP para equinos, sin embargo, esta tecnología no ha sido suficientemente desarrollada para la selección de embriones equinos. En humanos, el DGP es utilizado para evaluar embriones cuando los progenitores son portadores de ciertas enfermedades genéticas (Spits y Sermon, 2009). Los embriones humanos producidos *in vitro* también pueden ser examinados para detectar anomalías cromosómicas debido a la elevada tasa de aneuploidía; de esta manera se pueden seleccionar los embriones cromosómicamente normales para ser transferidos al útero (Gardner *et al.*, 2015). Sin embargo, el uso de esta aplicación es limitada en equinos ya que no hay

evidencia de altas tasas de aneuploidía en embriones equinos, y todos los embriones equinos producidos *in vitro* son transferidos a yeguas receptoras ya que la mayoría de los propietarios y criadores quieren obtener el mayor número de potros posible.

### *Biopsia embrionaria en equinos*

Algunas de las aplicaciones del DGP en equinos incluye la determinación del sexo del embrión, lo cual es importante para ciertas disciplinas como el polo, ya que las hembras son deseadas porque son consideradas mejores atletas. El DGP en embriones equinos también es utilizado para determinar la presencia de alelos relacionados a enfermedades que son prevalentes en ciertas razas, como la herencia equina de la astenia dérmica regional (HERDA), deficiencia de ramificación de la enzima glucógena, y parálisis periódica hipercaliémica (HYPP) en Caballos Cuarto de Milla, así como la inmunodeficiencia combinada grave (SCID) y abiotrofia cerebelosa en caballos Árabes. El uso del DGP podría ayudar a eliminar la incidencia de estas enfermedades genéticas. El DGP también se puede utilizar en embriones equinos para determinar el color del pelaje y el linaje.

La biopsia de embriones tempranos recuperados en el Día 6 después de la ovulación fue reportada por primera vez en 1997 (Huhtinen *et al.*, 1997). La biopsia fue obtenida cortando una sección del embrión con una microcuchilla. Este método resultó en una tasa de preñez de 3/14. En el año 2010, otros dos laboratorios reportaron tasas de preñez de 21 a 75% cuando las biopsias fueron extraídas de embriones tempranos usando una microcuchilla o aspirando células con un micromanipulador (Troedsson *et al.*, 2010, Seidel *et al.*, 2010). En todos estos estudios las células obtenidas fueron utilizadas para determinar únicamente el sexo de los embriones. Sin embargo, la biopsia de blastocistos expandidos resultó en tasas de preñez más bajas (Seidel *et al.*, 2010). Para obtener una biopsia de un blastocisto equino expandido es necesario perforar la cápsula embrionaria. A diferencia de los embriones tempranos, los cuales pueden reparar daños a la cápsula, los blastocistos expandidos no tienen esta habilidad lo cual resulta en embriones inviables (Müller y Cikryt, 1989, Mckinnon *et al.*, 1989, Skidmore *et al.*, 1989, Stout *et al.*, 2005).

En el año 2010, el Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M reportó un método para obtener biopsias de blastocistos equinos expandidos (Choi *et al.*, 2010). Evitando la masa celular interna, células de la capa trofoblástica externa fueron aspiradas usando una micropipeta de 8-15  $\mu\text{m}$  de diámetro y un taladro piezoeléctrico. Los blastocistos

expandidos se colapsaron debido a la pérdida de fluido de la cavidad del blastocele, pero el blastocisto se expandió nuevamente después de algunas horas en cultivo. Esta técnica produjo una tasa de preñez normal (10/12). Es posible que los blastocistos colapsados lograron reparar el pequeño agujero que se hizo en la cápsula durante la biopsia, o que el agujero era tan pequeño que no afectó la viabilidad de los embriones. Esta técnica fue exitosa en embriones refrigerados y transportados, y en embriones frescos (ver figura 1).

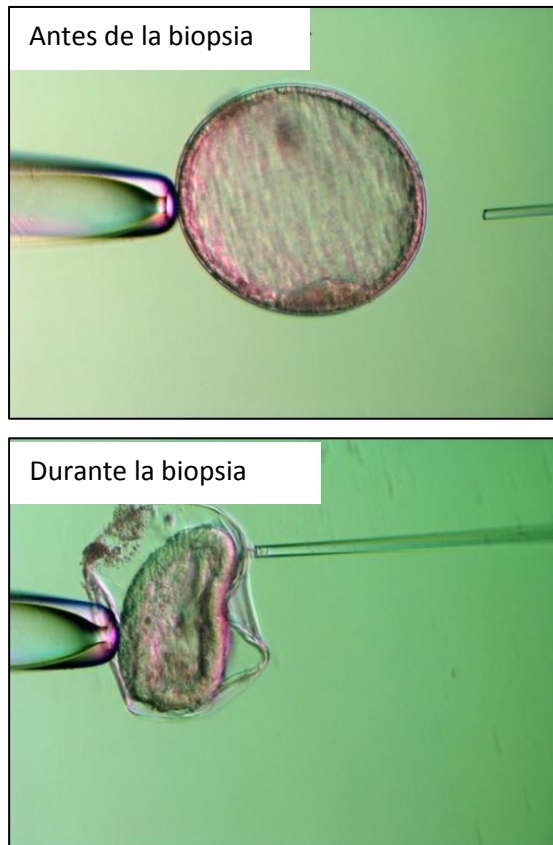


Figura 1. Biopsia de blastocisto equino expandido

Desde el desarrollo de esta técnica, se han reportado exitosas biopsias de blastocistos equinos expandidos utilizando una micropipeta afilada estándar con tasas de preñez resultantes de 53 a 75% (Jarazo *et al.*, 2012, Herrera *et al.*, 2014). Jarazo *et al.* reportaron que el diámetro de los blastocistos no afecta las tasas de preñez (Jarazo *et al.*, 2012). Herrera *et al.* compararon tasas de preñez entre más de 300 blastocistos biopsados y no biopsados en un centro de transferencia de embriones (Herrera *et al.*, 2014). En este estudio no se encontraron diferencias en las tasas de preñez. Dentro del grupo de embriones biopsados no se encontraron diferencias en las tasas de preñez relacionadas con el tiempo entre la biopsia y la transferencia al útero, ni se encontró un efecto del diámetro del blastocisto en la tasa de preñez.

En el año 2015, Herrera *et al.* reportaron que el fluido de la cavidad del blastocele puede aportar suficiente ADN para realizar DGP (Herrera *et al.*, 2015). Aunque el ADN obtenido del fluido aspirado era apoptótico, fue suficiente para determinar el sexo de 15/18 embriones. La aspiración del fluido de la cavidad del blastocele ofrece varias ventajas sobre la biopsia celular incluyendo el uso de una pipeta de menor diámetro y la falta de manipulación del tejido embrionario. Sin embargo, aún debe ser determinado si esta técnica puede ser utilizada para analizar múltiples loci genéticos, además de la determinación de sexo.

### **Análisis genético**

PCR puede ser utilizado para analizar los genes de interés de las células extraídas de los blastocistos. Debido a que durante la biopsia se obtienen cantidades muy pequeñas de ADN, es recomendable amplificar el ADN obtenido antes de analizarlo, especialmente si se van a analizar múltiples genes.

La tasa de eficiencia en la determinación de sexo en embriones equinos usando células obtenidas por biopsia es de 40 a 100% (Huhtinen *et al.*, 1997, Troedsson *et al.*, 2010, Gambini *et al.*, 2012, Herrera *et al.*, 2014). Las tasas de eficiencia más altas han sido reportadas en estudios que también reportan las tasas de preñez más bajas; es probable que esto sea debido a un daño mayor en los embriones durante la extracción de un mayor número de células durante la biopsia. Gambini *et al.* reportaron mayor eficiencia de determinación de sexo en embriones de 350-550  $\mu\text{m}$  que en embriones  $> 550 \mu\text{m}$  (80% vs 42.1%), probablemente debido a que las conexiones celulares son más estrechas en los embriones de mayor tamaño y por lo tanto es más difícil obtener la biopsia (Gambini *et al.*, 2012).

Para la determinación de múltiples genes, la amplificación del genoma completo (WGA) seguido de múltiples PCR es un método muy exacto. El Laboratorio de Embriología Equina de la Universidad de Texas A&M en colaboración con el Laboratorio de Genética Veterinaria de la Universidad de California en Davis encontró diferencias significantes en la precisión de dos métodos de WGA cuando se evaluaron varios loci incluyendo sexo, color de pelaje, mutaciones relacionadas con enfermedades genéticas y la identificación de microsatélites. De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, el kit de Qiagen Repli-g Midi es más preciso que el kit de Illustra Genomiphi V2 (98.2% vs 25.8%; WGA seguido por múltiple PCR) (Choi *et al.*, 2015).

Más adelante, el kit de Repli-g fue utilizado con muestras de biopsia obtenidas de embriones producidos *in vitro* e *in vivo*. La eficiencia de este kit fue mayor a 99% para estos dos grupos de embriones (Choi *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES

La obtención de biopsias de embriones equinos mediante la aspiración de células de la capa trofoblástica externa usando un micromanipulador es una técnica efectiva para obtener muestras para DGP. El efecto en el embrión es mínimo y las tasas de preñez son normales después de transferir los embriones biopsados. La exactitud del análisis genético depende del número de células obtenidas y los métodos de amplificación y de WGA.

## REFERENCIAS

- Battut I, Colchen S, Fieni F, Tainturier D, Bruyas JF. Success rates when attempting to nonsurgically collect equine embryos at 144, 156 or 168 hours after ovulation. *Equine Vet J Suppl.* 1997; (25):60-2.
- Choi YH, Penedo MC, Daftari P, Velez IC, Hinrichs K. Accuracy of preimplantation genetic diagnosis in equine *in vivo*-recovered and *in vitro* produced blastocysts. *Reprod Fertil Dev*, 2015.
- Choi YH1, Gustafson-Seabury A, Velez IC, Hartman DL, Bliss S, Riera FL, Roldán JE, Chowdhary B, Hinrichs K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. *Reproduction.* 2010; 140(6):893-902.
- Eldridge-Panuska WD, di Brienza VC, Seidel GE Jr, Squires EL, Carnevale EM. Establishment of pregnancies after serial dilution or direct transfer by vitrified equine embryos. *Theriogenology.* 2005; 63(5):1308-19.
- Freeman DA, Weber JA, Geary RT, Woods GL. Time of embryo transport through the mare oviduct. *Theriogenology.* 1991; 36(5):823-30.
- Gambini A, Jarazo J, Olivera R, Salamone DF. Equine cloning: *in vitro* and *in vivo* development of aggregated embryos. *Biol Reprod*, 2012. 87(1): 15, 1-9.
- Gardner DK, Meseguer M, Rubio C, Treff NR. Diagnosis of human preimplantation embryo viability. *Hum Reprod Update.* 2015; 21(6):727-47.
- Herrera C, Morikawa MI, Bello MB, von Meyeren M, Centeno JE, Dufourq P, Martinez MM, Llorente J. Setting up equine embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis in a commercial embryo transfer program. *Theriogenology*, 2014. 81(5): 758-63.
- Herrera C, Morikawa MI, Castex CB, Pinto MR, Ortega N, Fanti T, Garaguso R, Franco MJ, Castañares M, Castañeira C, Losinno L, Miragaya MH, Mutto AA. Blastocle fluid from *in vitro* and *in vivo*-produced equine embryos contains nuclear DNA. *Theriogenology*, 2015. 83(3): 415-20.
- Hochi S, Maruyama K, Oguri N. Direct transfer of equine blastocysts frozen-thawed in the presence of ethylene glycol and sucrose. *Theriogenology.* 1996; 46(7):1217-24.
- Huhtinen M, Peippo J, Bredbacka P. Successful transfer of biopsied equine embryos. *Theriogenology.* 1997; 48(3):361-7.
- Jacob JC, Haag KT, Santos GO, Oliveira JP, Gastal MO, Gastal EL. Effect of embryo age and recipient asynchrony on pregnancy rates in a commercial equine embryo transfer program. *Theriogenology.* 2012; 77(6):1159-66.
- Jarazo J, Gambini A, Muredas L, Fernandez-Martin R, Salamone D. 151 horse embryo biopsy: effect on pregnancy rates and successful sex determination depending on the size of the embryo. *Reproduction, Fertility and Development*, 2012. 25(1): p. 224-224.
- Maclellan LJ, Carnevale EM, Coutinho da Silva MA, McCue PM, Seidel Jr. GE, Squires EL. Cryopreservation of small and large equine embryos pre-treated with cytochalasin-B and/or trypsin. *Theriogenology*, 2002. 58(2-4): 717-720.
- McKinnon AO, Carnevale EM, Squires EL, Carney NJ, Seidel Jr. GE. Bisection of equine embryos. *Equine Veterinary Journal*, 1989. 21(S8): 129-133.
- Müller Z, Cikryt P. A simple method for bisecting horse embryos. *Equine Veterinary Journal*, 1989. 21(S8): p. 123-125.
- Seidel GE, Cullingford EL, Stokes JE, Carnevale EM, McCue PM. Pregnancy rates following transfer of biopsied and/or vitrified equine embryos: evaluation of two biopsy techniques. *Anim. Reprod. Sci. S*, 2010. 121: 297-298.
- Skidmore J, Boyle MS, Cran D, Allen WR. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. *Equine Veterinary Journal*, 1989. 21(S8): 126-128.
- Slade NP, Takeda T, Squires EL, Elsdén RP, Seidel GE Jr. A new procedure for the cryopreservation of equine embryos. *Theriogenology.* 1985; 24(1):45-58.
- Spits C, Sermon K. PGD for monogenic disorders: aspects of molecular biology. *Prenat Diagn.* 2009; 29(1):50-6.
- Stout T, Meadows S, Allen W. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival *in vivo*. *Animal reproduction science*, 2005. 87(3): 269-281.