



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA**

Informe de Trabajo Final presentado para optar al Grado de Médico
Veterinario

Modalidad: Monografía

**“Determinación del sexo de embriones y fetos equinos a partir de
ADN extraído de células del *conceptus* que se encuentran en la
circulación sanguínea de la yegua gestante”**

Nombre del Alumno Julieta Kulik

DNI 37.125.802

Director: Dr. Pablo Tamiozzo

Co-Director: Dr. Javier Aguilar

Río Cuarto – Córdoba

Abril 2018

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA
CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

“Determinación del sexo de embriones y fetos equinos a partir de ADN
extraído de células del *conceptus* que se encuentran en la circulación
sanguínea de la yegua gestante”

Autor: Kulik, Julieta

DNI: 37125802

Director: Dr. Pablo Tamiozzo

Co-Director: Dr. Javier Aguilar

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la Comisión
Evaluadora:

MV. MSc. Natalia Illanes

MV. MSc. Laura Zapata

Fecha de Presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

ÍNDICE

	<u>Páginas</u>
Introducción.....	4-7
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	8
Materiales y métodos.....	9-11
Resultados y discusión.....	12-16
Conclusión.....	17
Bibliografía.....	18-23
Tabla 1	9
Tabla 2	14
Tabla 3	16
Figura 1.....	12
Figura 2.....	12

INTRODUCCIÓN

La eficiencia reproductiva de los equinos se ha beneficiado en los últimos años por la utilización de biotecnologías como la inseminación artificial y la transferencia de embriones. Esta última técnica es útil para reproducir animales con aptitudes morfológicas o funcionales admirables, pero también se puede utilizar como herramienta para corregir problemas de fertilidad en yeguas, reducir la transmisión de enfermedades ya que controla exhaustivamente a los reproductores, entre otras. La transferencia embrionaria además se puede utilizar en aquellas razas que se encuentran en peligro de extinción o amenazadas para conseguir una mayor variabilidad genética de la población. Dicho objetivo se basa en explotar no solo los recursos genéticos del macho (algo que se hace mediante inseminación artificial), sino incrementar la producción reproductiva de la hembra, obteniendo varias crías por año, lo cual es imposible en condiciones naturales de cría (Balerdi, 2012).

En la actualidad, con el advenimiento de otras biotecnologías, aparecen distintas opciones para utilizar en cuanto a la reproducción, las cuales se tornan de gran importancia económica para la producción equina, una de ellas es el sexado prenatal de embriones y/o fetos. Conocer el sexo fetal por adelantado, permite implementar estrategias comerciales dependiendo de las demandas de mercado (Bucca, 2005). Por ejemplo en la raza Polo Argentino, las hembras son preferibles a los machos debido a su facilidad de formación y agilidad (Herrera, 2014).

Dentro de las técnicas de sexado se encuentra la ecografía, mediante la cual de manera transrectal se puede localizar el tubérculo genital que consiste en una estructura lobulada hiperecoica de 2-3mm de longitud, que será el precursor del pene en el macho y del clítoris en la hembra. El tubérculo genital se encuentra hacia las extremidades posteriores fetales entre la cola y el cordón umbilical, y debe ser identificado en relación con otras estructuras anatómicas fetales, ya que posteriormente migra hacia la cola en la hembra y hacia el cordón umbilical en el macho permitiendo la determinación del sexo (McKinnon *et al.*, 2011). Los días de gestación óptimos para realizar su observación, varían desde 55 a 75 días según distintos autores (Curran, 1992; Holder, 2000; Bucca, 2005; McKinnon *et al.*, 2011). Las tasas de éxito de la técnica varían en un amplio rango y dependen mucho en la experiencia del examinador (Holder, 2000; Mari *et al.*, 2002, Bucca, 2005). La ecografía usada de manera transabdominal también se puede utilizar en el sexado a partir del día 100 de gestación, mediante la identificación de los órganos sexuales primarios fetales. Es importante aclarar que ambas técnicas, transrectal y transabdominal, se pueden combinar permitiendo el examen visual de todo el feto con una identificación fiable de los órganos sexuales primarios plenamente desarrollados. Aproximadamente entre los días 120 y 210 de

gestación la precisión de esta combinación de técnicas es alta (Bucca, 2005), pero posteriormente, cada vez es más difícil identificar las estructuras anatómicas.

La ecografía 3D fue utilizada en la especie equina para visualización del feto, la misma se realizó con transductores tridimensionales utilizados en medicina humana. La exploración requiere sólo unos segundos y un examen completo puede llevar 10 minutos en total. La imagen 3D es fácil de restaurar después del examen y se puede girar a cualquier ángulo que el examinador desea. Las estructuras de la superficie fetal, incluyendo la cabeza, el cuerpo, las extremidades y el tubérculo genital, permitieron caracterizar el desarrollo gestacional. Por lo tanto la ecografía 3D del feto equino fue un complemento valioso de la ecografía 2D, y a futuro podría generar nuevas oportunidades para la evaluación de la anatomía fetal normal y la detección de anomalías (Kotoyori *et al.*, 2012). Como se dijo anteriormente, una desventaja de la técnica de ultrasonografía es que se requiere de gran experiencia del personal (Valencia *et al.*, 2011), y si bien no existen registros de que produzca algún trastorno para el feto no se descarta dicha posibilidad (Curran, 1989). A pesar de las desventajas es la metodología más utilizada alrededor del mundo ya que tiene una alta precisión como así también alto nivel de certeza (Curran, 1989).

Existen otras técnicas que se utilizan para la determinación del sexo de manera temprana en los embriones, cuando todavía no ha ocurrido la implantación. A continuación se dará una breve reseña de cada una de ellas.

El método de detección de antígeno específico del sexo consiste en la obtención de embriones equinos en etapa de blastocisto, 6 - 7 días después de la ovulación por lavaje transcervical. Se utilizan anticuerpos específicos diseñados contra el antígeno H-Y que se encuentran en la superficie del embrión macho y luego se evalúa por inmunofluorescencia (Wood *et al.*, 1988). El enfoque inmunológico es beneficioso debido a su carácter no invasivo. La precisión de la predicción sexual mediante la detección del antígeno H-Y en embriones equinos se compara favorablemente con los informes de otras especies (Epstein *et al.*, 1980; Utsumi *et al.*, 1983, 1984; White *et al.*, 1982, 1983, 1987a - c).

Una de las formas de sexar embriones de manera temprana es a través de la detección de secuencias de ADN específicas localizadas en los cromosomas sexuales mediante la amplificación por PCR (Aasen y Medrano, 1990; Peura *et al.*, 1991). Los primeros embriones sexados con la PCR anidada utilizando ADN extraído de sólo dos a cuatro blastómeras fueron en la especie bovina (Kirkpatrick y Monson, 1993). Sin embargo, los embriones equinos son mucho más sensibles a la biopsia de células que los de otras especies, porque el desarrollo con éxito en el entorno uterino depende de una cápsula acelular intacta (Skidmore *et al.*, 1989; Stout *et al.*, 2005). Esta cápsula se desarrolla entre el trofoblasto y la zona pelúcida la cual rodea el embrión equino hasta aproximadamente el día 21 de gestación (Flood, 1975; Flood *et al.*, 1982; Betteridge *et al.*, 1982). Los primeros

intentos para sexado a partir de material celular recuperado de embriones de equinos a través de la disección con microcuchilla y la posterior transferencia de los embriones, resultaron en tasas de preñez muy bajas, de alrededor del 21% (Huhtinen *et al.*, 1997). Resultados recientes demuestran que los embriones biopsiados son capaces de establecer preñeces con la misma eficacia que los embriones no biopsiados y mantener su viabilidad después de esperar en medio de mantenimiento caliente durante varias horas para ser transferidos (Herrera, 2014). En la actualidad la PCR se realiza principalmente para determinar el sexo del embrión con genes específicos localizados en el cromosoma Y. Los genes ZFX y ZFY, que codifican para la proteína cromosomal del “dedo” de zinc (espaciamientos específicos conformados por residuos de cisteínas e histidinas que permiten la unión de cationes Zn^{2+} a la proteína, produciéndose un enlace coordinativo del metal en el centro de ellos, este fenómeno confiere al dominio el aspecto de un dedo), han sido utilizados con éxito para la determinación del sexo del embrión equino (Peippo *et al.*, 1995. Huhtinen *et al.*, 1997). Otro gen utilizado en esta especie, es la región determinante del sexo del cromosoma Y, el SRY (Choi *et al.*, 2010; Jarazo *et al.*, 2012; Beckelmann *et al.*, 2012).

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia de ADN específica durante varios ciclos de temperatura repetidos en los que la secuencia blanco es copiada exactamente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células. Los elementos importantes en la reacción son el templado o molde (ADN), la polimerasa, los cebadores, los desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs: adenina, timina, citosina y guanina), el cloruro de Magnesio, una solución amortiguadora y agua. Todos estos elementos interactúan en tres etapas principales de las que se compone la PCR: desnaturalización, hibridación y extensión. Los equipos en donde se realiza la reacción son llamados termocicladores, los cuales están diseñados para establecer un sistema homogéneo en donde las condiciones de temperatura y tiempo necesarios no se modifiquen en cada uno de los ciclos. Al final de la reacción, para corroborar si se amplificó la secuencia blanco de interés, los productos de la PCR son analizados en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013)

Así como antes se mencionó la detección de secuencias de ADN específicas de los cromosomas sexuales, lo mismo puede aplicarse a secuencias de ARN específico, también utilizando la PCR como técnica base. Las células somáticas femeninas contienen dos cromosomas X y por lo tanto en teoría podría producir el doble de transcripciones X-específicas que las células masculinas (Epstein *et al.*, 1978). Sin embargo, para evitar la sobreexpresión, un cromosoma X se inactiva para compensar la dosis extra de genes ligados

a X en las hembras. La inactivación de X requiere un ARN específico denominado transcripción específica X-inactivado (*Xist*). *Xist* es un ARN largo no codificante que inactiva un cromosoma X mediante el recubrimiento de cada célula de la hembra (Rastan, 1994; Penny *et al.*, 1996). Los resultados demuestran que la expresión de *Xist* está restringida a los embriones equinos femeninos. Todos los embriones equinos negativos a la PCR para *Xist* fueron positivos a la PCR para SRY, confirmando la presencia de un cromosoma Y, perteneciente al sexo masculino (Beckelmann, 2012). Debido a este último hallazgo, a la fragilidad del ARN cuando se trabaja en el laboratorio y a que la técnica de reversa transcriptasa PCR (RT-PCR) requiere de más tiempo y es más laboriosa que una PCR estándar, sería preferible trabajar con PCR directamente a partir de ADN (Sambrook y Russell, 2014)

Se describe en la bibliografía consultada la determinación del sexo fetal, en donde también se realiza la PCR pero esta vez la muestra son células recogidas a través de amniocentesis a partir de fluidos fetales. Esta técnica ha logrado en sexado de embriones bovinos (Kamimura *et al.*, 1997; Makondo *et al.*, 1997) pero no existen registros de que se haya probado para la especie equina.

Otro método para la determinación del sexo fetal en equinos se basa en la identificación por la PCR de ADN de células fetales circulantes (ccffDNA) en la sangre de la yegua gestante. Durante la preñez la circulación materna y fetal están separadas por varias capas tisulares de la placenta. Sin embargo, la lisis celular resultante de daños físicos, inmunológicos y la apoptosis, regulados por el desarrollo de los tejidos fetales le podría permitir al ADN fetal cruzar la membrana placentaria (De León *et al.*, 2012; Aurich y Schneider, 2014).

Vale aclarar que el día 40 de gestación marca la transición entre la etapa embrionaria y la etapa fetal (McKinnon, 2011).

Entonces, dado que la identificación de genes ligados al sexo mediante PCR constituye una buena herramienta para el sexado de embriones y/o fetos equinos, a partir de diferentes tipos de muestras y dado que la determinación del sexo a partir de muestras poco invasivas, que no requieren de complicadas maniobras para el encierro de los animales, ni para la realización de la técnica en sí, el propósito del presente trabajo es evaluar el desempeño de una técnica de PCR para el sexado de *conceptus* equino.

HIPÓTESIS

El sexo del *conceptus* equino puede ser identificado a partir de muestras de sangre de yeguas gestantes utilizando la técnica de PCR.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar el desempeño de la técnica de PCR para el sexado de embriones o fetos equinos a partir de muestras de ADN embrionario o fetal circulante en muestras de sangre materna.

Objetivos específicos:

1. Estandarizar la técnica de PCR para el sexado de embriones o fetos equinos a partir de muestras de sangre materna.
2. Evaluar la eficiencia de la técnica de PCR para determinar el sexo embrionario o fetal en muestras de campo provenientes de yeguas con distintas edades gestacionales a partir de los 27 días.
3. Comparar los resultados de la técnica PCR con los obtenidos mediante ecografía.

MATERIALES Y MÉTODO

Estandarización de la reacción de PCR y controles

Para la estandarización de la técnica se utilizó sangre entera de un padrillo y sangre entera de una yegua que no había sido servida ni había gestado. El tratamiento de las muestras y las condiciones de reacción fueron las mismas que para las muestras a procesar.

Toma de muestras

Se realizó un estudio descriptivo, con muestras de sangre de 17 yeguas preñadas en distintos estadios, a partir de 27 días de gestación, obtenidas entre enero del 2015 y agosto 2016. Las yeguas eran originarias de un haras de polo del sur de la provincia de Córdoba, Argentina. En la tabla 1 se muestra la identificación de las 17 yeguas y el estadio de gestación al momento de la toma de muestras.

Nº de muestra	Edad de gestación (en días)
1	27
2	30
3	31
4	32
5	34
6	35
7	35
8	40
9	48
10	49
11	49
12	56
13	59
14	61
15	62
16	62
17	120

Tabla 1. Identificación de las 17 yeguas y el estadio de gestación (en días) al momento de la toma de muestras.

Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre fueron colectadas con anticoagulante EDTA. Después de la recolección, la sangre fue centrifugada (664 x g durante 10 minutos) para separar plasma de las células sanguíneas y posteriormente a 12.470 x g durante 10 minutos para separar restos celulares. Después de las dos rondas de centrifugación, el plasma fue transferido a tubos estériles de 1,5 ml y congelado a -20°C hasta su procesamiento.

El ADN de las muestras de plasma fue extraído usando un kit puriprep-S (Inbiohighway, Tandil, Argentina) siguiendo las instrucciones del fabricante:

1) Se agregó a un tubo tipo eppendorf de 1,5 ml: 20 µl de solución de proteasa y 200 µl de plasma.

2) Se agregó 200 µl de buffer BL. Se invirtió 3 veces. Después se dió un pulso de 5 segundos en microcentrífuga.

3) Se incubó 30 minutos a 56°C en bloque seco. Al finalizar se dió un pulso de microcentrífuga.

4) Se agregó 200 µl de etanol. Se invirtió 3 veces y se repitió el pulso de microcentrífuga.

5) Se pasó el contenido a una minicolumna ubicada dentro del tubo colector. Se centrifugó a 12.000 x g por 1 minuto o hasta que se escurrió todo el contenido. Se descartó el líquido filtrado. Se colocó nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

6) Se agregó a la minicolumna 500 µl de buffer Blav1. Se centrifugó a 12.000 x g por 1 minuto. Se descartó el líquido filtrado. Se colocó nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

7) Se agregó a la minicolumna 500 µl de buffer Blav2. Se centrifugó a 12.000 x g por 3 minutos. Se descartó el líquido filtrado. Se colocó nuevamente la minicolumna en el tubo colector.

8) Se descartó el tubo colector y se colocó la minicolumna en tubo tipo eppendorf de 1,5 ml rotulado. Se agregó a la minicolumna 200 µl de buffer BE (equilibrado a 70°C) sobre el centro de la membrana de sílica sin tocarla con la punta de la micropipeta. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 2 minutos a 12.000 x g. Se conservó a -20°C hasta el momento de su procesamiento por PCR.

Respecto a la PCR, la secuencia *target* (fragmento del gen SRY) se amplificó mediante una PCR anidada usando los siguientes cebadores: Forward 5' CGCCAGCATAGATCACAGAA '3 y reverso 5' CGCAAGGTAGCTGAAAGACC' 3 (De León *et al.* 2012). Como control interno de la reacción se amplificó un fragmento del gen de la GAPDH (Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa) con los cebadores descritos por los autores (De León *et al.*, 2012): forward 5' GCCGTAACCTTCTGTGCTGTG 3'y reverso 5' AATGAAGGGGTCATTGATGG 3'.

Ambas reacciones se realizaron bajo las mismas condiciones de ciclado (De León *et al.*, 2012), pero por separado, por un lado la PCR anidada del gen SRY y por otro lado la PCR para la amplificación de un segmento del gen GAPDH.

El ensayo se realizó a ciegas, sin acceder a otra información más que el periodo de gestación. El sexo de las muestras utilizadas fue confirmado después de su procesamiento, mediante el sexado por ecografía como prueba de referencia, dichos datos fueron enviados por personal que integra el haras con el cual se trabajó. Cabe aclarar que los operarios encargados del sexado por ecografía contaban con una vasta experiencia en la misma.

Análisis estadístico

Para comparar los resultados obtenidos por la PCR respecto a la ecografía (técnica de referencia) se realizó una tabla de contingencia de 2 x 2 y se calculó el coeficiente *kappa* de Cohen de aquellas muestras en las que se obtuvo resultados por ambas técnicas (PCR y ecografía).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Estandarización de la técnica

La técnica de PCR se estandarizó correctamente utilizando la metodología propuesta. En la figura 1 pueden observarse los resultados obtenidos en la segunda ronda de amplificación del gen SRY con las muestras que se utilizaron para tal fin (de izquierda a derecha: calles 1 y 2, muestras de ADN de sangre de yegua que no recibió servicio hasta el momento de la toma de muestra y calle 3 ADN de sangre de padrillo). En la figura 2 se observan algunos productos de PCR obtenidos en las muestras de campo.

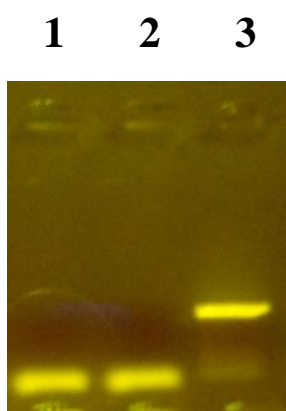


Figura 1. Productos de PCR de ADN de yegua que no recibió servicio hasta el momento de la toma de muestra (calle 1 y 2) y padrillo (calle 3) sembrados en gel de agarosa al 1% teñido con SYBR Green II (Lifetechnologies).

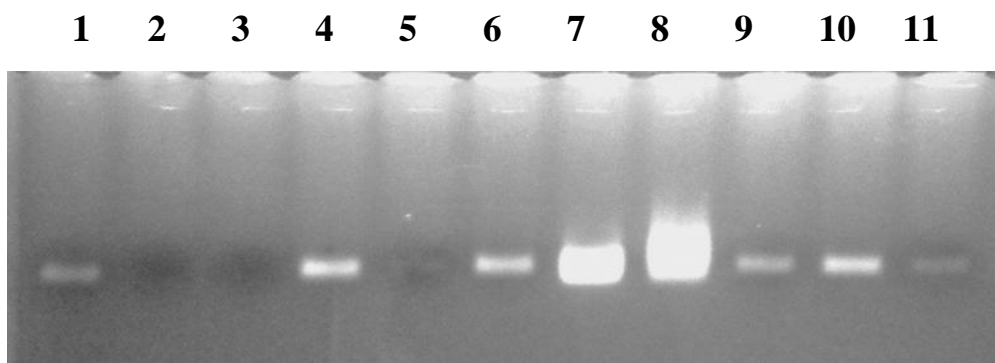


Figura 2. Productos de la segunda reacción de PCR anidada, realizada a partir de ADN de plasma de yeguas con diferentes estadios de gestación y diferentes sexos del *conceptus*. Calles 1, 4, 6, 7, 8, 9, 10 y 11 fueron positivas (macho), calles 2, 3 y 5 negativas (hembras).

Desde el punto de vista metodológico, no hubo mayores inconvenientes en la estandarización de la técnica de PCR utilizada en este estudio y descrita por De León *et al.* (2012), a pesar de haber utilizado otras marcas comerciales de insumos.

Procesamiento de las muestras de campo

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos en el procesamiento de las muestras de plasma de las 17 yeguas gestantes involucradas en el presente estudio. Para una mejor visualización se muestran las filas con diferentes colores. El color amarillo corresponde a las yeguas que están en etapa embrionaria, el color naranja a las que están en la etapa fetal. Con respecto a los demás colores, el color verde indica que el sexado realizado coincidió con el de la ecografía, el color rojo indica que el sexado realizado no coincidió con el de la ecografía y el color violeta indica que no se pudo determinar el sexo mediante la PCR.

A nivel global la técnica de sexado por PCR tuvo un total de 12 aciertos sobre 17 muestras utilizadas, con respecto a la ecografía. En los resultados se puede ver que los sexados realizados en la etapa fetal tuvieron mayor éxito en relación a los obtenidos en la etapa embrionaria, a razón de 8 aciertos sobre 9 muestras *versus* 4 aciertos sobre 8 muestras, en dichas etapas respectivamente.

Esto puede deberse a las diferentes edades de gestación que se utilizaron en el presente trabajo dado que De León *et al.* (2012), trabajaron con yeguas que estaban en el último tercio de gestación, por ende es más probable que células del feto se rompan y el ADN atraviese la placenta y pueda ser detectado en la circulación sanguínea materna, lo que se refleja también en el mayor porcentaje de aciertos obtenido en la etapa fetal *versus* la embrionaria.

En este sentido, la ausencia de secuencias de genes del cromosoma Y en el plasma materno implica que el embrión o feto es de sexo femenino, sin embargo, también puede ser consecuencia de concentraciones indetectables de células provenientes del embrión o feto en presencia de sexo masculino (Wright, 2009). Esto podría explicar el porcentaje de aciertos obtenidos en la etapa embrionaria correlacionándola con el tamaño del *conceptus* y la baja cantidad de células provenientes del mismo, que se encuentran en circulación materna. Una manera de solucionar esto es utilizando una *real time* PCR, que debido a su alta sensibilidad

Nº de muestra	Días de gestación	Gen GAPDH	Gen SRY		Confirmación haras
			1º reacción	2º reacción	
1	27	+	M	M	M
2	30	+	-	H	H
3	31	+	-	M	M
4	32	+	M	M	H
5	34	+	-	H	H
6	35	+	-	M	H
7	35	-	ND	ND	M
8	40	+	-	H	M
9	48	+	M	M	M
10	49	+	M	M	M
11	49	+	-	M	M
12	56	+	-	M	M
13	59	+	-	M	M
14	61	+	H	H	H
15	62	+	M	M	M
16	62	+	H	H	H
17	120	+	H	H	M

Tabla 2. – Resultados de la PCR con la correspondiente confirmación del haras. Referencias: M: macho, H: hembra, ND: no determinado, +: positivo, -: negativo. La amplificación del gen GAPDH se utilizó como control interno para evaluar la integridad del ADN presente en la muestra, ya que se trata de un gen de presente en cualquier muestra de equinos. El gen SRY se amplificó en formato de PCR anidada (por ello se muestran los resultados de la primera y de la segunda reacción), sin embargo el resultado considerado es el de la segunda reacción.

permite la detección de pequeñas cantidades de ADN, lo que indica ser útil para preñeces tempranas (Finning y Chitty, 2008). Se puede visualizar que el sexado fue correcto en la muestra de menos de 30 días de gestación, para tal categoría se sugiere aumentar el número de las misma para investigaciones futuras, ya que en el presente trabajo solo se contó con solo una en dicho período. La mayor proporción de acierto se obtuvo entre los 48 y 62 días de gestación.

Así mismo, y a pesar de que la eficacia obtenida no fue del 100%, el uso de la técnica tiene importante implicancias prácticas dado que para la toma de muestra y realización de la técnica no se necesita encerrar a los animales en un brete (acto necesario para el sexado por ecografía), lo que resulta en una menor manipulación de las hembras gestantes y una toma de muestras fácil, rápida y sin necesidad de complicadas maniobras semiológicas.

Con respecto al resultado clasificado como no determinado, la PCR que amplifica un fragmento del gen GAPDH dio negativa, confirmando la falta de integridad del ADN por lo tanto para poder realizarle el sexado se debería repetir la toma de muestra.

En este sentido, la confiabilidad de los resultados depende de la calidad de la muestra, la cual está directamente relacionada con los métodos utilizados en el proceso de obtención del ADN (Flórez Vargas y Gonzalez Rugeles, 2004). A pesar de que solamente una muestra no arrojó un resultado positivo a la PCR control, que amplifica el gen GAPDH, pudo haber existido inhibición de la reacción. En el presente trabajo se usaron muestras de sangre, y el hierro de la hemoglobina, presenta un efecto inhibidor en la amplificación mediante PCR, sin embargo el ADN fue extraído con kit específico para plasma/sangre por lo que probablemente se deba a otra causa de no amplificación. El EDTA también ha sido informado como inhibidor de la PCR ya que causa quelación del Mg necesario para la actividad de la ADN polimerasa (Al-Soud y Radstrom, 2001), sin embargo todas las muestras restantes amplificaron correctamente a alguna de las PCR utilizadas en este estudio.

En cuanto a los falsos positivos, que en este caso serían las muestras 4 y 6 (que dieron resultado positivos a la PCR, sin embargo eran hembras), podría explicar estos resultados, si bien se tomaron los recaudos pertinentes para evitarlos (Kwok y Higuchi, 1989), como trabajar en tres zonas distintas, utilizar guantes descartables, evitar salpicaduras, etc.

Comparación de los resultados con la técnica de referencia: Ecografía

En la tabla 3 se muestra la concordancia de los resultados de las 16 muestras que dieron resultados a ambas técnicas de sexado (no se incluyó la muestra 7 dado que no arrojó ningún resultado a la PCR). El *Kappa* de Cohen fue de 0,46 (IC 95% 0,019-0,913) con un $p= 0,061$.

		Ecografía		
		Hembra	Macho	Total
PCR	Hembra	4	2	6
	Macho	2	8	10
	Total	6	10	16

Tabla 3. Concordancia entre los resultados obtenidos por la PCR respecto a la técnica de referencia (ecografía).

Un coeficiente *kappa* de 0,46 muestra una concordancia moderada. Este valor indica que el acuerdo en la determinación del sexo del embrión o del feto equino por ambas técnicas es moderado. Sin embargo, probablemente se deba al escaso número de muestras analizadas. Para determinar con certeza el nivel de acuerdo de ambas técnicas, un número mayor de muestras deberían ser analizadas en futuros estudios.

Aunque la prueba de referencia para determinar el sexo del feto es la identificación del mismo en el recién nacido, existe evidencia del altísimo porcentaje de eficacia de la ecografía, siendo de hecho, el método más utilizado mundialmente para tal fin. Así, Renaudin (2000), utilizando la ecografía para la determinación del sexo en la mitad de la gestación, encontró un 100% de concordancia en la determinación del sexo entre los resultados obtenidos por ultrasonografía (n=98) y los obtenidos en el nacimiento.

Resultados de ecografía realizados en gestaciones menos avanzadas (etapa temprana fetal) también han arrojado buenos resultados. Curran y Ginther (1989), determinaron correctamente el sexo fetal en el 97% (138/143) de los diagnósticos de machos y en el 100% (92/92) de los diagnósticos de hembras, atribuyendo los errores incurridos en los primeros caballos examinados a la inexperiencia del operador.

Futuros estudios son necesarios sobre todo para mejorar los resultados de la etapa embrionaria y obtener una técnica de sexado ventajosa frente a otras actualmente disponibles.

CONCLUSIONES

La técnica de PCR se presenta como una prueba rápida, de fácil acceso por parte de los laboratorios y que además no necesita de maniobras semiológicas complicadas para la toma de muestra.

Un coeficiente *kappa* de 0,46 muestra una concordancia moderada. Este valor indica que el acuerdo en la determinación del sexo del embrión o del feto equino por ambas técnicas es moderado. Sin embargo, probablemente se deba al escaso número de muestras analizadas.

Se necesita profundizar a futuro en esta técnica para obtener mejores resultados y una exitosa aplicación.

BIBLIOGRAFÍA

- ✓ AASEN, E., J.F. MEDRANO. 1990. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. **Nature Biotechnology**. Volumen 8 (12): 1279–1281.

- ✓ AL-SOUD, W. A., P. RADSTROM. 2001. Purification and characterization of PCR-inhibitory components in blood cells. **Journal of clinical microbiology**. Volumen 39 (2): 485-493.

- ✓ AURICH, C.; J. SCHNEIDER. 2014. Sex determination in horses – Current status and future perspectives. **Animal Reproduction Science**. Volumen 146 (1): 36-39.

- ✓ BALERDI, A. E. 2012. Transferencia embrionaria en équidos. **Curso de Deontología y veterinaria legal**.- Página 4. Disponible en: <https://core.ac.uk/download/pdf/13325154.pdf>. Fecha de acceso: 25 de febrero de 2017.

- ✓ BECKELMANN, J., S. BUDIK, C. BARTEL, C. AURICH. 2012. Evaluation of Xist expression in preattachment equine embryos. **Theriogenology**. Volumen 78 (7):1429–1436.

- ✓ BETTERIDGE, K.J., M. D. EAGLESOME, D. MITCHELL, P. F. FLOOD, R. BERIAUL. 1982. Development of horse embryos up to twenty two days after ovulation: observations on fresh specimens. **Journal of anatomy**. Volumen 135 (1): 191–209.

- ✓ BUCCA, S. 2005. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**. Volumen 64 (3): 568–571.

- ✓ CHOI, Y.H., A. GUSTAFSON-SEABURY, I. C. VELEZ, D. L. HARTMAN, S. BLISS, F. L. RIERA, J. E. ROLDÁN, B. CHOWDHARY, K. HINRICHS. 2010. Viability of equine embryos after puncture of the capsule

and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **Reproduction**. Volumen 140 (6): 893–902.

- ✓ CURRAN, S. 1992. Fetal sex determination in cattle and horses by ultrasonography. **Theriogenology**. Volumen 37(1): 17–21.
- ✓ CURRAN, S., O. J. GINTHER. 1989. Ultrasonic diagnosis of equine fetal sex by location of the genital tubercle. **Journal of Equine Veterinary Science**. Volumen 9 (2): 77–83.
- ✓ DE LEON, P. et al. 2012. Equine fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**. Volumen 77 (3): 694–698.
- ✓ EPSTEIN, C.J., S. SMITH, B. TRAVIS, G. TUCKER. 1978. Both X chromosomes function before visible X chromosome inactivation in female mouse embryos. **Nature**. Volumen 274: 500–502.
- ✓ EPSTEIN, C.J., S. SMITH, B. TRAVIS. 1980. Expression of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. **Tissue Antigens**. Volumen 15: 63–67.
- ✓ FINNING, K. M., L. S. CHITTY. 2008. Non-invasive fetal sex determination: impact on clinical practice. *Seminars Fetal and Neonatal Medicine*. Volumen 13 (2): 69–75.
- ✓ FLOOD, P.F. 1975. The pre-attachment horse embryo: the structure of its capsule and histochemical evidence of steroid metabolism. **Inf. Vet.** Volumen 18: 36–38.
- ✓ FLOOD, P.F., K. J. BETTERIDGE, M. S. DIOCEE. 1982. Transmission electron microscopy of horse embryos 3–16 days after ovulation. **Journal of reproduction and fertility**. Supplement. Volumen 32: 319–327.
- ✓ FLÓREZ VARGAS O., C. I GONZALEZ RUGELES. 2004. Amplificación por PCR de tejidos de archivo: efecto de los fijadores. **Revista de la Universidad Industrial de Santander, Salud**. Volumen 36(2): 56–64.

- ✓ HERRERA, C. 2014. *Equine* embryo gender determination by preimplantation genetic diagnosis (PGD) on the same day of flushing. **Journal of Equine Veterinary Science**. Volumen 34 (1): 172-173.

- ✓ HOLDER, R.D., 2000. Fetal sex determination in the mare between 55 and 150 days gestation. In Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 46^o: 321–324.

- ✓ HUHTINEN, M., J. PEIPPO, P. BREDBACKA. 1997. Successful transfer of biopsied equine embryos. **Theriogenology**. Volumen 48: 361–367.

- ✓ JARAZO, J., A. GAMBINI, L. MUREDAS, R. FERNANDEZ-MARTIN, D. SALAMONE. 2012. 151 horse embryo biopsy: effect on pregnancy rates and successful sex determination depending on the size of the embryo. **Reproduction, Fertility and Development**. 25(1): 224.

- ✓ KAMIMURA, S., N. NISHIYAMA, S. OOKUTSU, K. GOTO, K. HAMANA. 1997. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. **Theriogenology**. Volumen 47 (8): 1563–1569.

- ✓ KIRKPATRICK, B.W., R. L. MONSON. 1993. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **Journal of reproduction and fertility**. Volumen 98 (2): 335–340.

- ✓ KOTOYORI, Y., N. YOKOO, K. ITO, H. MURASE, F. SATO, K. KOROSUE, Y. NAMBO. 2012. Technical note—three-dimensional ultrasound imaging of the equine fetus. **Theriogenology**. Volumen 77(7): 1480–1486.

- ✓ KWOK, S. A., R. HIGUCHI. 1989. Avoiding false positives with PCR. **Nature**. Volumen 339: 237-238.

- ✓ MAKONDO, K., G. S. AMIRIDIS, I. A. JEFFCOATE, P. J. O'SHAUGHNESSY, J. S. BOYD, C. PATERSON, L. ROBERTSON. 1997. Use of polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. **Animal reproduction science**. Volumen 49 (2): 125–133.

- ✓ MARI, G., C. CASTAGNETT, S. BELLUZZI. 2002. Equine fetal sex determination using a single ultrasonic examination under farm conditions. **Theriogenology**. Volumen 58(6): 1237-1243.

- ✓ McKINNON A.O.; E.L.SQUIRES; W.E.VAALA; D.D.VARNER. 2011. **Equine Reproduction** 2ª Edition. Wiley-Blackwell. Reino Unido y EE.UU. Capitulo 217, página: 2073.

- ✓ McKINNON A.O.; E.L.SQUIRES; W.E.VAALA; D.D.VARNER. 2011. **Equine Reproduction** 2ª Edition. Wiley-Blackwell. Reino Unido y EE.UU. Capitulo 218, página: 2081.

- ✓ McKINNON A.O.; E.L.SQUIRES; W.E.VAALA; D.D.VARNER. 2011. **Equine Reproduction** 2ª Edition. Wiley-Blackwell. Reino Unido y EE.UU. Capitulo 228, página: 2211- 2214.

- ✓ PEIPPO, J., M. HUHTINEN, T. KOTILAINEN. 1995. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**. Volumen 44 (5): 619–627.

- ✓ PENNY, G.D., G. F. Kay, S. A. SHEARDOWN, S. RASTAN, N. BRPCKDORFF. 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. **Nature**. Volumen 379 (6561): 131–137.

- ✓ PEURA T., J. M. HYTTINEN, J. JANNE, J. Aalto. 1991. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**. Volumen 35 (3): 547–555.

- ✓ RASTAN S. 1994. X chromosome inactivation and the Xist gene. **Current opinion in genetics & development**. Volumen 4 (2): 292–297.

- ✓ RENAUDIN, C. D. 2000. Determinación del sexo fetal en equinos mediante ultrasonografía. **International Veterinary Information Service**. Página 5.

- ✓ SAMBROOK J., D. W RUSSELL. 2014. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition)**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, EEUU. Capitulo 18, páginas: 1415-1478

- ✓ SKIDMORE J., M. S. BOYLE, D. CRAN, W. R. ALLEN. 1989. Micromanipulation of equine embryos to produce monozygotic twins. **Equine Veterinary Journal**. Volumen 21(S8): 126-128.

- ✓ STOUT T.A., S. MEADOWS, W. R. ALLEN. 2005. Stage-specific formation of the equine blastocyst capsule is instrumental to hatching and to embryonic survival in vivo. **Animal reproduction science**. Volumen 87 (3): 269–281.

- ✓ TAMAY DE DIOS, L., C. IBARRA, C.VELASQUILLO. 2013. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. **Medigraphic**. Volumen 2(2): 70-78.

- ✓ UTSUMI, K., E. SATOH, M. YUHARA. 1983. Sexing of mammalian embryos exposed to H-Y antisera. **Journal of Reproductive Immunology**. Volumen 5: 59.

- ✓ UTSUMI, K., E. SATOHN, M. YUHARA. 1984. Sexing of goat and cow embryos by rat H-Y antibody. Proceedings of the 10th International Congress on Animal Reproduction and Artificial Insemination.

- ✓ VALENCIA ALAIX F. J.; J. B. LOPEZ ORTIZ; S. E. NARANJO ELORZA. 2011. Analysis of cell-free DNA in equine and bovine maternal plasma - **Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias**. Vol. 24 N°3. En: <http://rccp.udea.edu.co/index.php/ojs>

- ✓ WHITE, K.L., G. M. LINDNER, G.B. ANDERSON, R. H. BONDURANT. 1982. Survival after transfer of "sexed" mouse embryos exposed to H-Y antisera. **Theriogenology**. Volumen 18: 655-662.

- ✓ WHITE, K.L., G. M. LINDNER, G.B. ANDERSON, R. H. BONDURANT. 1983. Cytolytic and fluorescent detection of H-Y antigen on preimplantation mouse embryos. **Theriogenology**. Volumen 19: 701-705.

- ✓ WHITE, K.L., G. M. LINDNER, G.B. ANDERSON, R. H. BONDURANT. 1987a. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. **Biology of reproduction**. Volumen 37: 867-873.
- ✓ WHITE, K.L., G.B. ANDERSON, R. H. BONDURANT, R. L. PASHEN. 1987c. Detection of histocompatibility- Y (H-Y) antigen: identification of sex of preimplantation ovine embryos. **Journal of reproductive immunology**. Volumen 10: 27-32.
- ✓ WHITE, K.L., G.B. ANDERSON, T. J. BERGER, R. H. BONDURANT, R. L. PASHEN. 1987b. Identification of a male-specific histocompatibility protein on preimplantation porcine embryos. *Gamete Research*. Volumen 17: 107-113.
- ✓ WOOD T.C., K. L. WHITE, D. L. THOMPSON Jr., F. GARZA Jr. 1988. Evaluation of the expression of a male-specific antigen on cells of equine blastocysts. **Journal of reproductive immunology**. Volumen 14(1): 1-8.
- ✓ WRIGHT, C. F., H. BURTON. 2009. The use of cell-free fetal nucleic acids in maternal blood for non-invasive prenatal diagnosis. **Human reproduction update**. Volumen 15 (1): 139-151.