

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS *PRIMERS* PARA A  
DETERMINAÇÃO DO SEXO EM BOVINOS VIA *NESTED-PCR***

**STEVEEN RIBEIRO LEAL**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE - UENF  
CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO - 2007**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**DESENVOLVIMENTO DE NOVOS *PRIMERS* PARA A  
DETERMINAÇÃO DO SEXO EM BOVINOS VIA *NESTED-PCR***

**STEVEEN RIBEIRO LEAL**

**"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Animal."**

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo da Silva Fontes  
Co-orientador: Prof. Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho

CAMPOS DOS GOYTACAZES - RJ  
MAIO - 2007

# DESENVOLVIMENTO DE NOVOS *PRIMERS* PARA A DETERMINAÇÃO DO SEXO EM BOVINOS VIA *NESTED-PCR*

**STEVEEN RIBEIRO LEAL**

"Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense, como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Produção Animal."

Aprovada em 09 de maio de 2007

**Comissão examinadora:**

---

Luiz Sérgio de Almeida Camargo (Doutor em Ciência Animal) - EMBRAPA

---

Prof<sup>a</sup>. Célia Raquel Quirino (Doutora em Ciência Animal) - UENF

---

Prof. Angelo José Burla Dias (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF

---

Prof. Gonçalo A. de Souza Filho (Doutor em Biociências e Biotecnologia) - UENF  
(Co-Orientador)

---

Prof. Reginaldo da Silva Fontes (Doutor em Ciência Veterinária) - UENF  
(Orientador)

“Pedras no caminho? Guardo todas,  
um dia vou construir um castelo.....”

Fernando Pessoa

Aos

meus pais e a minha irmã por todo  
apoio e carinho

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF) e ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias (CCTA) pelo oferecimento deste curso.

A UENF e a FAPERJ pela concessão da bolsa de estudo.

Ao professor Reginaldo da Silva Fontes pela orientação, e por ter acreditado na minha capacidade.

Ao professor Gonçalo Apolinário de Souza Filho, por me ensinar e orientar de forma brilhante, e pelo apoio e incentivo nos momentos difíceis.

A professora Célia Raquel Quirino pelas sugestões, pelo carinho e incentivo, e por seu esforço em melhorar cada vez mais o curso de pós-graduação.

Ao professor Angelo José Burla Dias pelas críticas e colaborações de grande importância.

Ao professor Victor Martin Quintana Flores por sempre estar disposto a ajudar.

A amiga Valéria Cristina Lopes Marques, em especial, pelo seu companheirismo, dedicação, e ajuda durante todo o trabalho.

Aos amigos do Núcleo de Análise Genômica (NAG) e do Laboratório de Biotecnologia (LBT): Valéria, Verônica, Alessa, Ana Bárbara, Adriana, Adriane, Giselda, Sabrina, Samuel, Bia, Aline, Janice, Vinícius, Alan, Leandro, Wellington, Güinevere, Patrícia, Mariana, Roberta e Ana Lídia. Muito obrigado pela convivência, paciência, apoio, amizade e carinho. Sem vocês a conclusão deste trabalho teria sido impossível.

Aos amigos do Laboratório de Reprodução Animal, em especial, Carla, Bianca, Helga, Georgina, Kelen, Layla e Vítor, pela amizade e por todo o auxílio durante a realização do trabalho.

Ao Dr. Luís Fonseca Matos pelas sugestões, e pela ajuda na coleta de sangue dos animais.

Ao professor Messias Gonzaga Pereira por liberar o uso do transiluminador de luz ultravioleta, e a todos do seu laboratório.

A todos os colegas e professores do curso de pós-graduação, pelo convívio e amizade.

A todos os membros da Coordenação do Programa de Pós-Graduação Animal e da secretaria do Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA), pelo carinho e boa vontade.

## **BIOGRAFIA**

STEVEEN RIBEIRO LEAL, filho de Oscar Gomes Leal e Rita de Cássia Ribeiro Leal, nasceu em 22 de março de 1978, na cidade de Carangola - MG.

Em janeiro de 2004 concluiu o curso de Ciências Biológicas na Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF).

Foi admitido em agosto de 2004 no Curso de Pós-Graduação em Produção Animal, Mestrado, Melhoramento Animal e Biotecnologia da Reprodução, da Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), em Campos dos Goytacazes - RJ, submetendo-se à defesa de dissertação para conclusão do curso em maio de 2007.

## CONTEÚDO

<b>RESUMO</b> .....	ix
<b>ABSTRACT</b> .....	xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	4
<b>3. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	5
3.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR) .....	5
3.2 O gene da amelogenina .....	6
3.3 Aplicação da técnica de PCR na sexagem de embriões .....	7
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	17
4.1 Produção <i>in vitro</i> de embriões .....	17
4.2 Preparação das amostras e extração do DNA .....	19
4.3 Amplificações .....	20
4.4 Detecção dos produtos amplificados .....	21
<b>5. RESULTADOS</b> .....	22
5.1 Desenvolvimento dos <i>primers</i> .....	22
5.2 Sexagem de embriões .....	29

<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>38</b>
<b>7. CONCLUSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>47</b>

## RESUMO

**LEAL, Steveen Ribeiro**, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense; Maio de 2007; Desenvolvimento de novos *primers* para a determinação do sexo em bovinos via *Nested-PCR*; Professor Orientador: Dr. Reginaldo da Silva Fontes. Professor Co-orientador: Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

A sexagem de embriões é fundamental para o controle do sexo da descendência na indústria de transferência de embriões. A eficiente sexagem de embriões através da técnica de PCR requer o desenvolvimento de *primers* confiáveis capazes de realizar a distinção entre os sexos. O presente trabalho teve como objetivo desenvolver novos *primers* para a determinação do sexo em bovinos via *Nested-PCR*. Para alcançar esta meta, foram projetados *primers* para a amplificação de regiões do *ítron* 5 do gene da amelogenina bovina. Inicialmente, os ensaios foram realizados com amostras de DNA de animais adultos, sendo que os *primers* projetados foram testados em várias combinações. O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 apresentou os melhores resultados, com 100% de eficiência nas reações e 100% de precisão nos diagnósticos realizados. O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 foi projetado visando a amplificação de um fragmento de DNA de 398 pb do alelo *AMELX*, e a amplificação de um fragmento de DNA de 281 pb do alelo *AMELY*. Nos ensaios de sexagem de embriões foram utilizadas amostras de DNA de 35 embriões. Nos ensaios com amostras de 5 µl de DNA embrionário foi observada uma eficiência de 84% nas reações, com 85% de concordância entre os diagnósticos realizados. As amostras que falharam para a amplificação nas reações

com 5 µl de DNA embrionário foram submetidas a novas reações com 2,5 µl e 1,25 µl de DNA embrionário. No ensaio com amostras de 2,5 µl de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 89% nas reações, enquanto que no ensaio com amostras de 1,25 µl de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 78% nas reações. Os resultados apresentados neste trabalho comprovam a confiabilidade do conjunto de *primers* F2R3/F3R4 para a determinação do sexo em bovinos. As taxas de eficiência obtidas nas reações com amostras de DNA embrionário são um grande indicativo de que a técnica de *Nested-PCR* desenvolvida neste trabalho poderá ser aplicada com muito sucesso em futuros ensaios com amostras biopsiadas de embriões bovinos.

Palavras chave: amelogenina, bovino, embrião, *Nested-PCR*, sexagem.

## ABSTRACT

**LEAL, Steveen Ribeiro**, M.S., Universidade Estadual do Norte Fluminense; 2007 may; Development of new primers for determination sex in bovine via Nested-PCR; Professor Advisor: Dr. Reginaldo da Silva Fontes. Professor Co-advisor: Dr. Gonçalo Apolinário de Souza Filho.

Embryo sexing is fundamental to controlling the sex of offspring in the embryo transfer industry. Efficient embryo sexing by the PCR technique requires the development of primers capable of distinguishing between the sexes. The objective of the present study was to develop new primers to determine the sex in cattle by *Nested-PCR*. To reach this objective, primers were designed to amplify the *intron 5* region of the bovine amelogenin gene. The experiments were first carried out with DNA samples from adult animals, and the primers designed were tested in several combinations. The F2R3/F3R4 primers set presented the best result, with 100% efficiency in the reactions and 100% precision in the diagnoses. The F2R3/F3R4 primers set was designed to amplify a DNA fragment of 398 pb of the *AMELX* allele and a DNA fragment of 281 pb of the *AMELY* allele. DNA samples from 35 embryos were used in the embryo sexing experiments. In the experiments with 5 µl samples of embryo DNA, there was 84% efficiency in the reactions, with 85% agreement among the diagnoses made. The samples that failed for amplification in the reactions with 5 µl embryo DNA were submitted to new reactions with 2.5 µl and 1.25 µl embryo DNA. In the experiment with 2.5 µl samples of embryo DNA there was 89% efficiency in the reactions, while in the experiment with 1.25 µl samples of embryo DNA, 78%

efficiency was obtained in the reactions. The results presented in this study prove the reliability of the F2R3/F3R4 primers set to determine sex in cattle. The efficiency rates obtained in the reactions with embryo DNA samples are very promising for the successful application of the Nested-PCR technique developed in this study in future experiments with biopsied samples from cattle embryos.

Key words: amelogenin, bovine, embryo, Nested-PCR, sexing.

## 1. INTRODUÇÃO

Avanços na tecnologia do DNA têm aberto novas perspectivas para a seleção de animais domésticos visando o aumento da produtividade. Nos últimos anos, pesquisas na área da transferência de embriões têm tido como objetivo o estabelecimento do diagnóstico pré-implantativo (DPI). O diagnóstico pré-implantativo é a biotécnica que torna possível uma análise genética de células de embriões que se encontram nos estádios iniciais de desenvolvimento, antes da sua transferência e implantação no útero das receptoras. Estes testes são de grande importância econômica e zootécnica, haja vista a possibilidade de precocemente descartar o embrião portador de alguma anomalia e evitar o nascimento de animais com características genéticas indesejáveis. O diagnóstico pré-implantativo também permite determinar o sexo dos embriões anteriormente à sua transferência para as receptoras. A sexagem de embriões foi a primeira, e até hoje é a mais importante aplicação do diagnóstico pré-implantativo em animais domésticos (REICHENBACH *et al.*, 2002).

A idéia de pré-determinar o sexo de animais de produção tem sido a meta de vários grupos de pesquisa nas últimas décadas. Tal objetivo pode ser alcançado através da separação de espermatozoides portadores do cromossomo X e Y, ou pela análise do embrião (McEVOY, 1992). Várias metodologias como a análise citogenética, determinação enzimática, abordagem imunológica, e mais recentemente a hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) têm sido relatadas para a sexagem de embriões (VAN VLIET *et al.*, 1989; LEE *et al.*, 2004). Estas

metodologias cumprem o seu objetivo em alguns aspectos, mas falham principalmente com relação à precisão e/ou rapidez, pré-requisitos fundamentais para sua utilização na sexagem, tanto em nível comercial como na rotina de campo.

O desenvolvimento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) fez com que a sexagem de embriões se tornasse de fato uma realidade, passando a ser amplamente utilizada comercialmente a partir da década de 90 (THIBIER e NIBART, 1995; SHEA, 1999). Vários estudos têm comprovado o grande potencial da técnica de PCR para a sexagem de embriões (PEURA *et al.*, 1991; BREDBACKA *et al.*, 1994; CHEN *et al.*, 1999; KAGEYAMA *et al.*, 2004; ALMODIN *et al.*, 2005; LU *et al.*, 2007). Embora não seja ideal em todos os aspectos (é preciso fazer uma biópsia para a retirada de células do embrião), a sexagem por PCR tem quase 100% de precisão, e é um procedimento que pode ser realizado em poucas horas (BREDBACKA *et al.*, 1995). Outro ponto a favor da técnica de PCR é a sua grande sensibilidade, permitindo que a determinação do sexo seja feita a partir da análise de uma única célula embrionária (PARK *et al.*, 2001; TOMINAGA e HAMADA, 2004).

Nos últimos anos, a demanda pela sexagem de embriões por PCR no Brasil vem se tornando cada vez maior. A implantação de sistemas de sexagem de embriões bovinos no Brasil se faz necessária em três circunstâncias: em rebanhos de produção intensiva de leite onde a transferência de embriões já é empregada rotineiramente, em rebanhos de elite de gado europeu onde as fêmeas têm menor valor, e em rebanhos de elite de raças zebuínas onde as fêmeas têm atingido recentemente preços elevados em comparação com aqueles dos machos (GARCIA, 2001). Desta forma, a sexagem de embriões aparece como uma grande alternativa para impedir o nascimento de animais com sexo indesejado, diminuindo assim os custos com o processo de produção.

A maior parte dos protocolos disponíveis atualmente para a determinação do sexo em animais de produção se baseia na co-amplificação de seqüências específicas do cromossomo Y e seqüências autossômicas. Entretanto, a utilização conjunta de mais de um par de *primers* em uma mesma reação pode provocar interferência ou incompatibilidade na co-amplificação dos fragmentos de DNA, diminuindo assim a eficiência e a precisão da técnica de PCR. O gene da amelogenina, o qual está presente nos cromossomos X (*AMELX*) e Y (*AMELY*), também vem sendo utilizado como marcador genético para a determinação do sexo

em animais de produção (CHEN *et al.*, 1999). A maior vantagem do gene da amelogenina é que ele também funciona como um controle interno para as reações, visto que é necessário somente um par de *primers* para amplificar fragmentos de tamanhos diferentes nos seus dois alelos.

Ainda existem poucos relatos da utilização do gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem de embriões bovinos, provavelmente devido a maior dificuldade em se amplificar seqüências de cópia única em embriões. Esta situação pode ser contornada com a introdução de um segundo passo de reação, através da técnica de *Nested-PCR*. Neste sentido, esta dissertação foi conduzida com a finalidade de estabelecer um protocolo para a sexagem de embriões bovinos. Para isto, foram desenvolvidos novos *primers* para a amplificação de regiões do *íntron 5* do gene da amelogenina bovina via *Nested-PCR*.

## 2. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo desenvolver novos *primers* para a determinação do sexo em bovinos via *Nested-PCR*.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolvimento de *primers* específicos para a amplificação de regiões do *ítron 5* do gene da amelogenina bovina.
- Avaliação da eficiência e da precisão da técnica de *Nested-PCR* em ensaios com amostras de DNA de animais adultos.
- Avaliação preliminar da eficiência e da precisão da técnica de *Nested-PCR* em ensaios com amostras de DNA embrionário.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

Uma das mais marcantes contribuições ao estudo de marcadores genéticos foi o desenvolvimento da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR). A técnica de PCR foi desenvolvida por Mullis em 1983 (MULLIS e FALOONA, 1987), mas sua importância só ficou demonstrada com a publicação dos primeiros trabalhos de aplicação da PCR no diagnóstico de doenças (SAIKI *et al.*, 1985).

A técnica de PCR consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase, sendo usualmente realizada com o objetivo de amplificar seqüências específicas dentro do DNA. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP), e de oligonucleotídeos sintéticos complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Estes oligonucleotídeos, denominados “iniciadores” ou *primers*, funcionam como ponto de início para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde, que se estende a partir da extremidade 3' de cada *primer*. Cada ciclo de PCR envolve: a desnaturação da molécula de DNA alvo a uma temperatura de 94°C; o anelamento dos *primers* a uma temperatura que pode variar entre 35°C e 60°C; e a síntese da nova fita de DNA a 72°C. Ao final de vários ciclos obtém-se um acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelos *primers* (COUTINHO e REGITANO, 2001).

Uma das etapas fundamentais da técnica de PCR é o desenvolvimento de um par de *primers* adequado para a região que se pretende amplificar.

O desenvolvimento de *primers* requer o conhecimento prévio da seqüência de nucleotídeos, ou pelo menos das extremidades do gene ou do segmento de DNA a ser amplificado. Este pré-requisito vem se tornando menos restritivo com o desenvolvimento de métodos automatizados de seqüenciamento e com o crescente desenvolvimento de programas de seqüenciamento do genoma de diversas espécies. Em virtude da conservação evolutiva dos genomas, quando a informação não é disponível para a espécie foco do trabalho, é possível utilizar informações de espécies relacionadas, optando-se pelo desenvolvimento de *primers* para as seqüências de nucleotídeos mais conservadas entre duas ou mais espécies (COUTINHO e REGITANO, 2001).

Em algumas situações a quantidade de DNA disponível para as amplificações é muito pequena, como por exemplo, na análise de biópsias de embriões ou de espermatozoides individuais. Nestes casos, a eficiência da técnica de PCR convencional pode ser muito comprometida. Uma forma de superar tal obstáculo é o emprego de uma técnica denominada *Nested-PCR*. A técnica de *Nested-PCR* consiste em dois passos de reação, sendo que no primeiro passo é feita a amplificação de um fragmento maior, o qual vai ser utilizado como molde no segundo passo. No segundo passo das reações utiliza-se um par de *primers* interno a seqüência amplificada anteriormente, o que impede que seqüências inespecíficas geradas no primeiro passo sejam amplificadas novamente (BREDBACKA, 2001). O principal objetivo da técnica de *Nested-PCR* é aumentar a sensibilidade e a especificidade das reações. Muitos trabalhos têm alcançado ótimos resultados com o emprego da técnica de *Nested-PCR* na sexagem de embriões (KIRKPATRICK e MONSON, 1993; APPA RAO e TOTEY, 1998; GREENLEE *et al.*, 1998).

### **3.2 O gene da amelogenina**

A amelogenina é uma proteína altamente conservada nos mamíferos. Esta proteína é sintetizada pelos ameloblastos e está diretamente envolvida no processo de mineralização dos dentes, representando cerca de 90% do conteúdo protéico do esmalte do dente. Em muitas espécies de mamíferos a amelogenina é codificada por dois genes alelos, um localizado no cromossomo X (*AMELX*), e o outro localizado no cromossomo Y (*AMELY*). Os alelos da amelogenina apresentam grande homologia, no entanto possuem diferenças no tamanho, e na seqüência de nucleotídeos (CHEN

*et al.*, 1999; YAMAUCHI *et al.*, 2000; HASEGAWA *et al.*, 2000; BRADLEY *et al.*, 2001; LATTANZI *et al.*, 2005; PFEIFFER e BRENIG, 2005).

A estrutura do gene da amelogenina bovina (bAMEL) é constituída por 9,7 Kb de comprimento, apresentando seis *éxons* e cinco *íntrons*. As maiores diferenças entre os alelos da amelogenina bovina estão presentes na região do *íntron* 5, que apresenta apenas 45,1% de homologia entre os alelos. A região do *íntron* 5 do alelo *AMELY* apresenta uma série de deleções em relação à mesma região do alelo *AMELX* (CHEN *et al.*, 1999). Esta diferença de tamanho entre os dois alelos faz do gene da amelogenina um marcador genético com grande potencial para ser utilizado na sexagem de embriões bovinos (ENNIS e GALLAGHER, 1994; CHEN *et al.*, 1999). Além disso, o gene da amelogenina também vem sendo usado para a determinação do sexo em outras espécies domésticas, como por exemplo, eqüinos (HASEGAWA *et al.*, 2000), caprinos (PHUA *et al.*, 2003) e ovinos (PFEIFFER e BRENIG, 2005).

### **3.3 Aplicação da técnica de PCR na sexagem de embriões.**

O primeiro trabalho a utilizar a técnica de PCR para a sexagem de embriões foi realizado em 1989 por HANDYSIDE *et al.* em embriões humanos. Um ano depois, a técnica de PCR foi empregada pela primeira vez na sexagem de embriões bovinos (SCHRÖEDER *et al.*, 1990). Desde então, a sexagem de embriões por PCR ganhou grande aceitação, passando a ser muito utilizada para fins comerciais (THIBIER e NIBART, 1995; SHEA, 1999).

Uma grande variedade de marcadores genéticos tem sido utilizada para a sexagem de animais de produção através da técnica de PCR. Usando-se esta técnica machos e fêmeas vêm sendo identificados através da amplificação de seqüências específicas do cromossomo Y (SHEA, 1999; GARCIA *et al.*, 1999; LOPES *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2003), ou de seqüências presentes nos dois cromossomos sexuais, como o gene da amelogenina (ENNIS e GALLAGHER, 1994; CHEN *et al.*, 1999; WEIKARD *et al.*, 2006) e o gene ZFX/ZFY (AASEN e MEDRANO, 1990; KIRKPATRICK e MONSON, 1993; ALMODIN *et al.*, 2005).

Em animais de produção, a maioria dos protocolos disponíveis para a determinação do sexo envolvem a amplificação de seqüências repetitivas específicas do cromossomo Y. A escolha de tais seqüências é em geral justificada

pelo fato de que por serem altamente repetitivas, o número de cópias obtidas ao final das reações tende a ser maior, principalmente em relação à amplificação de seqüências de cópia única. A utilização de seqüências repetitivas é muito vantajosa no caso de embriões, onde a quantidade de DNA disponível para as amplificações é limitada (PARK *et al.*, 2001). Em contrapartida, alguns trabalhos têm mostrado que seqüências repetitivas consideradas específicas do cromossomo Y podem apresentar um pequeno número de cópias em cromossomos autossômicos, o que pode afetar muito a precisão da técnica de PCR (BRADBURY *et al.*, 1990; BREDBACKA *et al.*, 1995; HOCHMAN *et al.*, 1996).

Além disso, a utilização de seqüências específicas do cromossomo Y apresenta outras desvantagens, como a ausência de um controle interno para as reações. Desta forma, se torna muito difícil separar um diagnóstico de fêmea, que é caracterizado pela ausência do sinal de amplificação; de uma falha na reação, o que também é caracterizado pela ausência do sinal de amplificação. Conseqüentemente, a taxa de erro nos embriões identificados como fêmeas tende a ser maior (LOPES *et al.*, 1999). Tal fato pode ser observado nos resultados obtidos por GARCIA (2001), onde a taxa de acerto nos embriões identificados como machos foi de 93,7%, contra 75,9% de acerto nos embriões identificados como fêmeas.

Tal problema pode ser em parte resolvido com a utilização de um controle interno para as reações. Desta maneira, juntamente com a amplificação da seqüência específica do cromossomo Y se faz também a amplificação de uma seqüência presente nos dois sexos (geralmente uma seqüência autossômica). A amplificação de seqüências autossômicas funciona como um controle interno para as reações, possibilitando assim que machos e fêmeas sejam discriminados com uma maior precisão (LOPES *et al.*, 2001). Deste modo, quando for observada a amplificação de apenas um fragmento de DNA (específico da espécie), o embrião será identificado como fêmea; e quando for observada a amplificação de dois fragmentos de DNA (um específico do cromossomo Y e outro específico da espécie), o embrião será identificado como macho. A ausência do sinal de amplificação indica que houve uma falha na reação, diminuindo assim a taxa de erro nos diagnósticos (LOPES *et al.*, 1999).

Contudo, a utilização conjunta de mais de um par de *primers* em uma mesma reação pode diminuir a eficiência e a precisão da técnica de PCR. Basicamente, alguns marcadores podem ser co-amplificados em uma mesma

amostra, mas na prática isso é muito difícil, uma vez que as condições da reação podem variar para cada amplificação. Além disso, a amplificação de um dado marcador pode interferir com a amplificação de outro marcador, dificultando assim a interpretação dos resultados (CHEN *et al.*, 1999; KAGEYAMA *et al.*, 2004).

Neste sentido, algumas alternativas vêm sendo empregadas com o objetivo de minimizar a interferência na co-amplificação de seqüências específicas do cromossomo Y e seqüências autossômicas. PARK *et al.* (2001) realizaram a determinação do sexo em embriões bovinos através da co-amplificação da seqüência BOV97M (específica do cromossomo Y) juntamente com a seqüência satélite 1.715 (autossômica). As duas seqüências são repetitivas e apresentam um número diferente de cópias no DNA, o que inicialmente resultou em uma amplificação preferencial da seqüência satélite 1.715, de forma que a precisão dos diagnósticos foi prejudicada. Para contornar tal problema, foi necessário fazer algumas modificações na técnica de PCR convencional. Desta maneira, nos 10 primeiros ciclos de reação foi feita apenas a amplificação da seqüência BOV97M, sendo realizados mais 23 ciclos de amplificação para as duas seqüências. Esta técnica foi chamada de *Consecutive and multiplex PCR*, e resultou em uma co-amplificação satisfatória das duas seqüências. As reações apresentaram uma eficiência de 92%, 94,3% , 96,3% , e 100%, empregando respectivamente, 1, 2, 4 e 8 células para as amplificações. Foi obtida uma taxa de precisão de 90%, quando apenas uma célula foi utilizada nos ensaios.

No trabalho realizado por LOPES *et al.* (2001), o sexo dos embriões bovinos também foi determinado através da co-amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y juntamente com uma seqüência autossômica (satélite 1.715). Tais autores utilizaram uma técnica denominada *pit-stop PCR* (LOPES *et al.*, 1999). Através da técnica de *pit-stop PCR*, a seqüência específica do cromossomo Y foi amplificada sozinha nos 4 primeiros ciclos de reação, sendo realizados mais 36 ciclos para a co-amplificação das duas seqüências. Foi observada uma eficiência de 94% nas reações, com 100% de precisão nos diagnósticos, o que foi constatado após o nascimento dos animais. LOPES *et al.* (2001) também determinaram o sexo dos embriões através da amplificação de uma outra seqüência específica do cromossomo Y (BRY.1), mas sem a utilização de um controle interno para as reações. A eficiência das reações foi de 90%, no entanto a taxa de precisão foi

de 79%. Este resultado reforça a necessidade da utilização de um controle interno para a técnica de PCR.

É importante destacar que a taxa de eficiência se refere ao número de diagnósticos que se pode fazer após as reações, ou seja, uma eficiência de 90% quer dizer que em 90% das reações realizadas foi possível diagnosticar o sexo dos embriões. Quando os produtos amplificados são inespecíficos, ou quando as amostras falham para a amplificação, não é possível realizar qualquer diagnóstico. Já a taxa de precisão é calculada somente a partir dos diagnósticos realizados. O mais adequado é que a taxa de precisão seja calculada após ultra-sonografia (45-60 dias de gestação), ou após o nascimento dos animais.

Apesar da dificuldade de se amplificar mais de uma seqüência em uma mesma reação, muitos trabalhos têm alcançado resultados satisfatórios, mesmo utilizando a técnica de PCR convencional. No trabalho executado por PEURA *et al.* (1991) a determinação do sexo foi realizada em 12 embriões bovinos. Cada embrião foi seccionado em 4 partes, sendo que cada parte ainda foi dividida em duas amostras. Desta forma, cada uma das partes do embrião seccionado foi submetida a dois protocolos de sexagem, um para a amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y (BRY.1), e outro para a co-amplificação de uma outra seqüência específica do cromossomo Y (BRY.4a) juntamente com uma seqüência autossômica (satélite 1.715). Em todos os ensaios a eficiência das reações foi de 100%, e a concordância entre os diagnósticos também foi muito próxima de 100%. No estudo realizado por SHEA (1999) foi observada uma eficiência de 90% nas reações, com 93% de precisão na determinação do sexo de embriões bovinos, o que foi constatado após ultra-sonografia. CARBONNEAU *et al.* (1997) também alcançaram uma eficiência de 90% nos ensaios de determinação do sexo em embriões bovinos.

THIBIER e NIBART (1995) também realizaram a determinação do sexo de embriões bovinos através da co-amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y (BC 1.2.) juntamente com uma seqüência autossômica. A seqüência BC 1.2 possui de 2000 a 2500 cópias no cromossomo Y. Os autores relataram uma eficiência de 95% nas reações, com 98% de precisão nos diagnósticos realizados. ROSCHLAU *et al.* (1997) observaram uma eficiência de 91% nas reações, com taxas de precisão variando entre 83% e 96%. MACHÁTY *et al.* (1993) alcançaram 95% de eficiência, com a utilização de apenas uma célula nas reações.

KAGEYAMA *et al.* (2004) co-amplificaram uma seqüência específica do cromossomo Y (S4) juntamente com uma seqüência controle, entretanto, com a utilização de apenas um par de *primers*. Os *primers* utilizados neste trabalho foram projetados somente para a amplificação da seqüência S4, contudo, foi observada a amplificação de um fragmento adicional em todas as amostras. Tal amplificação não era esperada, mas passou a ser utilizada como controle interno para as reações. Desta forma, foi obtida uma eficiência de 91.6% nas reações, com 96% de precisão na sexagem de embriões bovinos. WEIKARD *et al.* (2001) também empregaram apenas um par de *primers* para co-amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y (FBNY) juntamente com uma seqüência autossômica (FBN17). Tais autores observaram uma eficiência de 90% nas reações, com 100% de precisão na determinação do sexo de embriões bovinos.

No trabalho realizado por APPA RAO e TOTTEY (1998), o sexo de embriões bubalinos foi determinado através da técnica de *Nested-PCR*. No primeiro passo das reações foram utilizados *primers* desenvolvidos para a amplificação da seqüência BRY.1 de bovinos (PEURA *et al.*, 1991). Com base no seqüenciamento dos fragmentos amplificados no primeiro passo, foi desenvolvido um par de *primers* para ser usado no segundo passo das reações. Com o emprego de 1-2 células nas reações, foi observado 100% de eficiência e de precisão na sexagem.

ALVES *et al.* (2003) utilizaram embriões intactos (sem biópsia) nos ensaios de sexagem. Após a extração, o DNA embrionário foi dividido em duas alíquotas. A primeira alíquota foi empregada para a co-amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y juntamente com uma seqüência específica do cromossomo X (controle interno). A segunda alíquota foi utilizada somente para a amplificação de uma outra seqüência específica do cromossomo Y (BC 1.2). Os dois ensaios tiveram 100% de eficiência, sendo que os diagnósticos tiveram 100% de concordância.

Vários esforços têm sido realizados com o objetivo de simplificar a sexagem por PCR, e com isso facilitar a sua aplicação em condições de campo. BREDBACKA *et al.* (1995) desenvolveram um protocolo onde a detecção dos produtos amplificados é feita através da exposição direta dos tubos de reação a luz ultravioleta, eliminando o passo de eletroforese. Neste trabalho foi realizada a amplificação de uma seqüência que tem aproximadamente 60000 cópias no cromossomo Y (btDYZ-1), sendo observado 100% de eficiência e de precisão na

sexagem de embriões bovinos. Para avaliar a precisão do método de detecção utilizado, o gene ZFX/ZFY foi amplificado em um outro ensaio, sendo que a detecção dos produtos amplificados foi realizada através de eletroforese. Os resultados dos dois ensaios tiveram 100% de concordância.

Em um trabalho do mesmo grupo de pesquisa (BREDBACKA *et al.*, 1996) foi relatada uma eficiência de 100% nas reações, com 93% de precisão na determinação do sexo de embriões bovinos. A taxa de precisão foi calculada após o nascimento dos animais. Os produtos da reação também foram detectados pela exposição direta dos tubos de reação a luz ultravioleta. Este método de detecção requer a adição prévia do corante de DNA (brometo de etídio) na mistura das reações. A principal desvantagem deste procedimento é a impossibilidade de utilizar um controle interno para as reações (BREDBACKA, 1998). Com o emprego do mesmo método de detecção, HASLER *et al.* (2002) alcançaram ótimos resultados na determinação do sexo de embriões bovinos. Foi relatada uma taxa de precisão de 98,7% nos embriões identificados como machos, e de 94,4% nos embriões identificados como fêmeas. As taxas de precisão foram calculadas após o nascimento dos animais.

O gene SRY também vem sendo usado como marcador genético para a determinação do sexo de espécies domésticas. O gene SRY está envolvido com o processo de diferenciação sexual nos mamíferos, sendo específico do cromossomo Y (SINCLAIR *et al.*, 1990). LU *et al.* (2007) obtiveram 100% de eficiência e de precisão na sexagem de embriões bovinos, através da amplificação do gene SRY. A precisão dos diagnósticos foi comprovada após o nascimento dos animais. MARA *et al.* (2004) determinaram o sexo de embriões ovinos através da co-amplificação do gene SRY juntamente com uma seqüência autossômica (satélite 1.715). Foi observada uma eficiência de 100% nas reações, com 87,5% de precisão nos diagnósticos. Neste trabalho foram utilizados *primers* desenvolvidos para a sexagem de embriões bovinos (PEURA *et al.*, 1991). Quando as seqüências amplificadas por MARA *et al.* (2004) foram submetidas ao banco de dados (*GeneBank*), foi constatada uma homologia de 100% para o gene SRY e de 98% para a seqüência satélite 1.715, entre bovinos e ovinos.

McCLIVE *et al.* (2001) realizaram a determinação do sexo através da co-amplificação do gene SRY juntamente com uma seqüência autossômica. Tais autores obtiveram uma eficiência de 98%, com 100% de precisão na sexagem de

embriões murinos. POMP *et al.* (1995) empregaram o gene SRY como marcador genético para a sexagem de embriões suínos. Estes autores obtiveram 100% de eficiência nas reações.

Um outro gene específico do cromossomo Y que também está sendo utilizado como marcador para a determinação do sexo em bovinos é o gene TSPY. LEMOS *et al.* (2005) alcançaram 100% de eficiência e de precisão na sexagem de animais adultos, através da amplificação do gene TSPY.

Muitos trabalhos também têm utilizado o gene da amelogenina e o gene ZFX/ZFY como marcadores genéticos para a sexagem de espécies domésticas. Estes genes possuem dois alelos, um alelo presente no cromossomo X, e outro alelo presente no cromossomo Y. A maior vantagem da utilização do gene da amelogenina e do gene ZFX/ZFY na sexagem é que eles também atuam como um controle interno para as reações, possibilitando assim que machos e fêmeas sejam discriminados com uma maior precisão. Além disso, vários problemas decorrentes da utilização de mais de um par de *primers* em uma mesma reação são evitados (CHEN *et al.*, 1999; SHEA, 1999).

CHEN *et al.* (1999) determinaram o sexo de embriões bovinos através da amplificação do gene da amelogenina. Estes autores relataram 100% de eficiência nas reações, com 100% de precisão nos diagnósticos realizados. A taxa de precisão foi calculada após o nascimento dos animais. ENNIS e GALLAGHER (1994) também utilizaram o gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem de embriões bovinos, sendo observada uma eficiência de 81% nas reações. No mesmo trabalho foi obtido 100% de eficiência e de precisão nos ensaios realizados com amostras de DNA de animais adultos. O gene da amelogenina também vem sendo empregado para a sexagem de outras espécies domésticas. PFEIFFER e BRENIG (2005) utilizaram o gene da amelogenina como marcador para a determinação do sexo de ovinos adultos. Tais autores relataram 100% de eficiência e de precisão nos ensaios. Neste trabalho foram utilizados os mesmos *primers* desenvolvidos por ENNIS e GALLAGHER (1994) para a determinação do sexo em bovinos.

Os trabalhos que realizam a sexagem por PCR em animais adultos têm como objetivo principal otimizar os protocolos de reação para a posterior aplicação em ensaios com embriões. Neste sentido, vários trabalhos têm sido executados com animais de muitas espécies domésticas, dentre estas, bovinos (HORNG *et al.*, 2004;

LEMOS *et al.*, 2005), suínos (SATHASIVAM *et al.*, 1995), bubalinos (HORNG *et al.*, 2004), eqüinos (HASEGAWA *et al.*, 2000), caprinos (PHUA *et al.*, 2003) e ovinos (PFEIFFER e BRENIG, 2005). Na maior parte dos estudos realizados com animais adultos as amostras de DNA são obtidas a partir de células sanguíneas.

A utilização do gene da amelogenina e do gene ZFX/ZFY como marcadores genéticos para a determinação do sexo de embriões apresenta uma desvantagem, que é o fato de tais genes apresentarem somente uma cópia em cada cromossomo sexual. Da mesma forma, o gene SRY apresenta somente uma cópia no cromossomo Y. Neste sentido, muitos trabalhos têm empregado a técnica de *Nested-PCR* com o objetivo de aumentar a sensibilidade da técnica de PCR convencional.

GREENLEE *et al.* (1998) relataram uma eficiência de 95,8% nas reações, com 100% de precisão na sexagem de embriões murinos. Neste trabalho, os genes SRY e ZFY foram co-amplificados juntamente com uma seqüência específica do cromossomo X (DXNds3), através da técnica de *Nested-PCR*. ALMODIN *et al.* (2005) empregaram a técnica de *Nested-PCR* para a amplificação do gene ZFX/ZFY em ensaios com embriões bovinos. A taxa de eficiência obtida nas reações com amostras de biópsias embrionárias foi de 62%. Os embriões biopsiados também foram submetidos às reações, sendo observada uma eficiência de 82%. Outros dois estudos também utilizaram a técnica de *Nested-PCR* para a amplificação do gene ZFX/ZFY. LEONI *et al.* (2000) relataram 100% de eficiência e de precisão na sexagem de embriões ovinos, enquanto que SCHMOLL e SCHELLANDER (1996) alcançaram uma eficiência de 89% em ensaios com embriões bovinos.

No estudo executado por KIRKPATRICK e MONSON (1993) o sexo dos embriões bovinos também foi determinado através da amplificação do gene ZFX/ZFY pela técnica de *Nested-PCR*. No primeiro passo das reações foram utilizados *primers* desenvolvidos por AASEN e MEDRANO (1990). Para o segundo passo das reações foram desenvolvidos dois pares de *primers*, um par específico para a amplificação do alelo ZFX, e um par específico para a amplificação do alelo ZFY. Com esta estratégia os autores eliminaram a necessidade de utilizar a técnica de RFLP após as reações de amplificação. Um total de 20 embriões foi utilizado nos ensaios, com as biópsias sendo realizadas em duplicata. Os diagnósticos realizados em amostras de 18 embriões foram comparados, de modo que em 17 casos os resultados foram concordantes.

A realização da técnica de RFLP é um passo obrigatório na maioria dos protocolos que empregam o gene ZFX/ZFY como marcador genético para a sexagem (AASEN e MEDRANO, 1990; SCHMOLL e SCHELLANDER, 1996). Em tais protocolos, a determinação do sexo se baseia exclusivamente em diferenças existentes na seqüência de nucleotídeos dos alelos ZFX e ZFY. Desta maneira, os fragmentos amplificados têm que ser digeridos com enzimas de restrição, previamente a eletroforese. As enzimas de restrição são endonucleases que clivam o DNA em pontos específicos, gerando assim fragmentos de tamanhos diferentes, os quais variam de acordo com a localização do sítio de reconhecimento da enzima. Esta técnica recebe o nome de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP). No trabalho realizado por KIRKPATRICK e MONSON (1993) não foi necessário o uso da técnica de RFLP, já que para o segundo passo das reações foram desenvolvidos *primers* específicos para a amplificação de cada alelo.

Uma outra variante da técnica de PCR que vem sendo utilizada para a determinação do sexo é uma técnica chamada PEP-PCR. Esta técnica tem como princípio a junção da PCR convencional a uma técnica denominada *primer extension preamplification* (PEP) (ZHANG *et al.*, 1992; BARRETT *et al.*, 1995). Basicamente, se faz uma amplificação de DNA utilizando vários *primers*, anteriormente a PCR específica para cada loco. Desta maneira, além da sexagem, a análise de vários outros genótipos pode ser realizada a partir de uma única célula embrionária. A técnica de PEP-PCR apresenta um grande potencial para o diagnóstico pré-implantativo, principalmente em estudos de seleção assistida por marcadores (MAS).

Com o emprego da técnica de PEP-PCR, HOCHMAN *et al.* (1996) utilizaram três marcadores genéticos para a determinação do sexo de embriões bovinos (BOV97M, BRY.1 e ZFX/ZFY). As freqüências genotípicas da Kappa-caseína e da proteína CD-18 também foram determinadas através da técnica de PEP-PCR. Todas as amplificações apresentaram uma eficiência superior a 90%, com exceção da seqüência BRY.1 (87%). CHRENEK *et al.* (2001) também utilizaram a técnica de PEP-PCR em ensaios com embriões bovinos. Neste estudo foram determinados os genótipos da Kappa-caseína, do hormônio de crescimento (GH) e da prolactina, com 88%, 89% e 91% de eficiência, respectivamente. O sexo dos embriões foi determinado através da amplificação de uma seqüência específica do cromossomo Y (91% de eficiência).

HASSUN *et al.* (1999) empregaram a técnica de PEP-PCR somente para a determinação do sexo de embriões bovinos. Em um primeiro experimento realizado com embriões produzidos *in vitro* foi obtida uma eficiência de 96% nas reações, com 94% de precisão nos diagnósticos realizados. As amostras de biópsias embrionárias e os embriões biopsiados foram submetidos às reações, sendo que a taxa de precisão foi determinada por comparação entre os diagnósticos realizados. Em um segundo experimento realizado em condições de campo, foi obtida uma eficiência de 70% nas reações, com 100% de precisão nos diagnósticos (embriões produzidos *in vivo*). A taxa de precisão foi calculada após ultra-sonografia. Nos dois experimentos a determinação do sexo foi realizada através da amplificação da seqüência BOV97M (específica do cromossomo Y).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Produção *in vitro* de embriões

#### Coleta de ovários e obtenção dos COCs

Ovários de vacas mestiças cíclicas em idades variadas foram obtidos em abatedouros da região do município de Campos dos Goytacazes, RJ. Após a coleta, os ovários foram imediatamente colocados em frascos contendo solução salina estéril (NaCl 0,9%) acrescida de antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, Sigma<sup>®</sup>), em temperatura ambiente. No laboratório os ovários foram lavados por mais duas vezes com solução salina estéril, para então dar início ao processo de punção folicular. O intervalo entre a coleta dos ovários e o início da punção folicular variou entre 1-2 horas.

Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de folículos com diâmetro de 2-6 mm usando uma agulha descartável 18 “G” acoplada a uma seringa de 10 ml. O líquido folicular contendo os COCs foi depositado em tubos cônicos de 50 ml e mantido em repouso para decantação por 10 minutos. Após este período, o sedimento foi transferido para uma placa de Petri (Corning, 100 x 20 mm) onde foi feita a recuperação e a seleção dos COCs, com auxílio de estereomicroscópio. Somente os COCs classificados como grau I e II (DE LOOS *et al.*, 1989), contendo três ou mais camadas de células do *cumulus* e citoplasma uniforme, foram utilizados para os experimentos.

Os COCs selecionados foram lavados em meio de manipulação antes de serem transferidos para o meio de maturação. O meio de manipulação utilizado foi o TCM 199 com sais de EARLE, L-glutamina e 25 mM de HEPES (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco<sup>®</sup>) e antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, Sigma<sup>®</sup>). O tempo de intervalo entre a aspiração, seleção e transferência dos COCs para o meio de maturação foi de aproximadamente 2 horas.

### **Maturação *in vitro***

Os COCs foram transferidos para gotas de 100 µl de meio de maturação (até 20 COCs por gota) sob óleo mineral (Sigma<sup>®</sup>) em placa de Petri (Corning, 35 x 10 mm), e mantidos por 22 horas a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. O meio de maturação *in vitro* utilizado foi o TCM 199 com sais de EARLE e L-glutamina (Sigma<sup>®</sup>), suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/ml de FSH (Follitropin-V<sup>®</sup>), 5 µg/ml de LH (Lutropin<sup>®</sup>) e antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina).

### **Fecundação e cultivo *in vitro***

A seleção dos espermatozoides para a fecundação *in vitro* (FIV) foi feita segundo a técnica de gradiente de Percoll (Pharmacia<sup>®</sup>). Em um tubo cônico foram adicionados 1 ml de Percoll 90% e, em seguida, 1 ml de Percoll 45%. O gradiente foi mantido na estufa de CO<sub>2</sub> até o momento de sua utilização. O sêmen foi descongelado a uma temperatura de 37°C (por 30 segundos) e, em seguida, adicionado na porção superior do gradiente de Percoll e centrifugado a 1800 x *g* por 8 minutos. Após a retirada do sobrenadante, uma nova centrifugação de 2 minutos a 900 x *g* com 5 ml de TALP-SP foi realizada para remover o excedente de Percoll.

Após a maturação os COCs foram lavados em meio de fecundação, sendo posteriormente transferidos para gotas de 100 µl de meio de fecundação (até 20 COCs por gota) sob óleo mineral, em placa de Petri (Corning, 35 x 10 mm). A concentração final de espermatozoides foi ajustada para 2 x 10<sup>6</sup>/ml. O co-cultivo (espermatozoides e COCs) foi realizado em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a uma temperatura de 38,5°C, durante 18 horas. O meio de fecundação *in vitro*

utilizado foi o TALP-FIV, suplementado com 2 mM de penicilamina (Sigma<sup>®</sup>), 1 mM de hipotaurina (Sigma<sup>®</sup>), 250 mM de epinefrina (Sigma<sup>®</sup>), e 20 µg/ml de heparina (Sigma<sup>®</sup>).

Após o período de fecundação, os supostos zigotos foram lavados em meio de cultivo para remoção parcial das células do *cumulus* e dos espermatozóides. Em seguida, foram transferidos para gotas de 100 µl de meio de cultivo (até 20 zigotos por gota) sob óleo mineral, e mantidos por 8-10 dias a 38,5°C, em atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub>. Dois meios de cultivo foram utilizados para a produção *in vitro* dos embriões, o meio TCM 199 com sais de EARLE e L-glutamina, suplementado com 10% de SFB e antibióticos (100 UI/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina); e o meio SOF (Nutricell<sup>®</sup>).

## 4.2 Preparação das amostras e extração do DNA

### Amostras de DNA de animais adultos

Amostras de sangue (aproximadamente 5 ml por animal) foram obtidas de 20 bovinos (mestiços), sendo 10 machos e 10 fêmeas. O sangue foi coletado a partir da veia caudal dos animais, em tubos Vacutainer<sup>®</sup> de 10 ml contendo 25 µl de anticoagulante (EDTA, Sigma<sup>®</sup>). As amostras coletadas foram mantidas a 4°C até o momento de realizar a extração do DNA. O intervalo entre a coleta de sangue e a extração do DNA foi de aproximadamente 24 horas. Para a extração do DNA foi utilizado o *BLOODCLEAN DNA Purification Kit* (Biotools - B & M Labs, S. A. - Spain). O DNA obtido (em solução) foi armazenado a -20°C até o momento da execução das reações de amplificação.

### Amostras de DNA embrionário

Embriões no estágio de blastocisto foram transferidos individualmente do meio de cultivo para placas de Petri (Corning, 100 x 15 mm), onde foram lavados em meio PBS (livre de Ca<sup>2+</sup> e Mg<sup>2+</sup>) suplementado com 0,4% de BSA livre de ácidos graxos. Posteriormente, os embriões foram acondicionados em microtubos (0,2 ml) contendo 100 µl de solução tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) e 50 mM KCl, Fermentas<sup>®</sup>], e armazenados a -20°C até o momento da extração do DNA. Para a extração do DNA foram adicionadas às amostras 1 µl de proteinase K

(100 mg/ml, Promega<sup>®</sup>), Tween 20 (Usb<sup>®</sup>) a 0,5%, e Nonidet P-40 (Usb<sup>®</sup>) a 0,5% (POMP *et al.*, 1995). As amostras foram incubadas a 55°C por 1 hora para a ação da proteinase K, e posteriormente incubadas a 95°C por 10 minutos para a inativação da proteinase K. Em seguida, as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da execução das reações de amplificação. Amostras de DNA obtidas de 35 embriões foram utilizadas nos ensaios de sexagem.

### 4.3 Amplificações

As amplificações foram executadas em um Termociclador PTC-100<sup>TM</sup> (MJ Research, Inc.). O programa de PCR consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo foi estabelecido um tempo de 60 segundos para a desnaturação da dupla fita a 94°C, 60 segundos para o anelamento dos *primers*, e 120 segundos para a síntese da nova fita a 72°C. Após o último ciclo, as reações tiveram um passo final de 7 minutos a 72°C para a extensão final das fitas. Este programa foi utilizado nos dois passos das reações.

A mistura das reações foi constituída de: água ultrapura autoclavada, MgCl<sub>2</sub> (2 mM, Fermentas<sup>®</sup>), tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) e 50 mM KCl, Fermentas<sup>®</sup>], dNTP's (200 µM de cada, Fermentas<sup>®</sup>), *Taq* DNA polimerase (0,5 U, Fermentas<sup>®</sup>), um par de *primers* externo (20 p/mol de cada, MWG-Biotech AG<sup>®</sup>), e 5 µl de solução de DNA embrionário, totalizando um volume final de 25 µl. Alíquotas de 0,5 µl dos produtos amplificados no primeiro passo das reações foram utilizadas como DNA molde no segundo passo das reações (*Nested-PCR*), onde foi utilizado um par de *primers* interno (20 p/mol de cada, MWG-Biotech AG<sup>®</sup>) a seqüência amplificada anteriormente. Os parâmetros empregados no segundo passo das reações foram os mesmos empregados no primeiro passo das reações, com exceção da temperatura de anelamento dos *primers*. As seqüências dos *primers*, assim como as temperaturas de anelamento estabelecidas para cada par de *primers* são descritas nas Tabelas 1 e 2 (página 23).

Todos os parâmetros da técnica de *Nested-PCR* utilizados nos ensaios com amostras de DNA embrionário, foram primeiramente otimizados em ensaios com amostras de DNA de animais adultos. Todas as condições consideradas como sendo ótimas para as amplificações com amostras de DNA de animais adultos foram

utilizadas nas ampliações com amostras de DNA embrionário, com exceção do tempo inicial de desnaturação (5 minutos). Nas ampliações com amostras de DNA de animais adultos, alíquotas de 0,5 µl de solução de DNA foram utilizadas no primeiro passo das reações. Para o segundo passo foram utilizadas alíquotas de 0,2 µl dos produtos amplificados no primeiro passo.

Paralelamente às reações com amostras de DNA, foram realizadas reações de controle negativo para a técnica de *Nested-PCR*. O controle negativo foi preparado com os mesmos reagentes utilizados em todas as reações, com exceção da amostra de DNA, que foi substituída pelo mesmo volume de água ultrapura autoclavada.

#### **4.4 Detecção dos produtos amplificados**

Alíquotas de 9 µl das amostras amplificadas por *Nested-PCR* foram misturadas com tampão de amostra 10X [tampão TAE 10X, 30% de Glicerol (Pharmacia<sup>®</sup>), 0,02% de Azul de bromofenol (Sigma<sup>®</sup>)] e submetidas à eletroforese em gel de agarose 2% (Sigma<sup>®</sup>), contendo 0,5 µg/ml de brometo de etídio (Sigma<sup>®</sup>). A diluição da agarose foi feita em tampão TAE 1X [0,08 mM de Tris base (pH 7,6) (Synth<sup>®</sup>), 4 mM de Ácido acético (Merck<sup>®</sup>), 0,02 mM de EDTA (pH 8,0) (Sigma<sup>®</sup>)], por aquecimento em forno microondas. Como padrão de peso molecular foi utilizado o *1Kb DNA Ladder* (Fermentas<sup>®</sup>). As migrações eletroforéticas foram realizadas sob campo elétrico de 120 volts, por aproximadamente 1 hora, em tampão TAE 1X. Após a eletroforese, os géis foram fotografados em um transiluminador equipado com luz ultravioleta (equipamento EagleEye II), sendo posteriormente analisados.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Desenvolvimento dos *primers*

Sete *primers* foram projetados para a amplificação de regiões do *ínton* 5 do gene da amelogenina bovina (bAMEL), descrito por CHEN *et al.* (1999) (Tabela 1). A região do *ínton* 5 do alelo *AMELY* apresenta uma série de deleções em relação à mesma região do alelo *AMELX*, presente no cromossomo X. Neste sentido, cada par de *primers* foi projetado visando a amplificação de fragmentos de DNA de tamanhos diferentes nos dois alelos (Figura 1). Desta forma, a amplificação de apenas um fragmento de DNA referente ao alelo *AMELX* indicaria o diagnóstico de fêmea para a amostra; já a amplificação de dois fragmentos de DNA, um referente ao alelo *AMELX* e outro referente ao alelo *AMELY*, indicaria o diagnóstico de macho para a amostra.

Inicialmente, os ensaios de sexagem foram realizados com amostras de DNA de animais adultos. Esta estratégia teve como objetivo avaliar a especificidade dos conjuntos de *primers* e a precisão da técnica de *Nested-PCR*, assim como otimizar os parâmetros das reações visando os ensaios com amostras de DNA embrionário. A primeira etapa do trabalho consistiu em determinar quais conjuntos de *primers* seriam específicos para a amplificação de regiões do *ínton* 5 do gene da amelogenina bovina. Nesta etapa foram utilizadas amostras de DNA de dois animais adultos (um de cada sexo), sendo que os sete *primers* projetados foram utilizados em todas as combinações possíveis, totalizando 18 conjuntos de *primers* (Tabela 2).

Tabela 1. Seqüências dos *primers*

<i>Primers</i>	Seqüências
1. Amel5For1 (F1)	5' - ACAACASTTATGAAAAT - 3'
2. Amel5For2 (F2)	5' - TCTCTCACAGTCCAAGRCCTA - 3'
3. Amel5For3 (F3)	5' - CCAAGTGTGTGYTGTAAGTT - 3'
4. Amel5Rev1 (R1)	5' - AAYTTACAAATATTMYTAG - 3'
5. Amel5Rev2 (R2)	5' - ATYCAGGTYATTTCTACC - 3'
6. Amel5Rev3 (R3)	5' - CASASAARTGAGGGTTTA - 3'
7. Amel5Rev4 (R4)	5' - AACARGTAATWTTCCCTTTAG - 3'

Tabela 2. Conjuntos de *primers*

Conjuntos de <i>Primers</i>	Temperaturas de anelamento		Tamanho dos fragmentos de DNA a serem obtidos	
	1ºPasso	2ºPasso	<i>AMELX</i>	<i>AMELY</i>
F1R1/F2R2	30°C	45°C	798 pb	633 pb
F1R1/F2R3	30°C	45°C	682 pb	543 pb
F1R1/F2R4	30°C	43°C	462 pb	335 pb
F1R1/F3R2	30°C	45°C	735 pb	580 pb
F1R1/F3R3	30°C	45°C	619 pb	490 pb
F1R1/F3R4	30°C	43°C	398 pb	281 pb
F1R2/F2R3	35°C	45°C	682 pb	543 pb
F1R2/F2R4	35°C	43°C	462 pb	335 pb
F1R2/F3R3	35°C	45°C	619 pb	490 pb
F1R2/F3R4	35°C	43°C	398 pb	281 pb
F1R3/F2R4	35°C	43°C	462 pb	335 pb
F1R3/F3R4	35°C	43°C	398 pb	281 pb
F2R1/F3R2	30°C	45°C	735 pb	580 pb
F2R1/F3R3	30°C	45°C	619 pb	490 pb
F2R1/F3R4	30°C	43°C	398 pb	281 pb
F2R2/F3R3	45°C	45°C	619 pb	490 pb
F2R2/F3R4	45°C	43°C	398 pb	281 pb
F2R3/F3R4	45°C	43°C	398 pb	281 pb

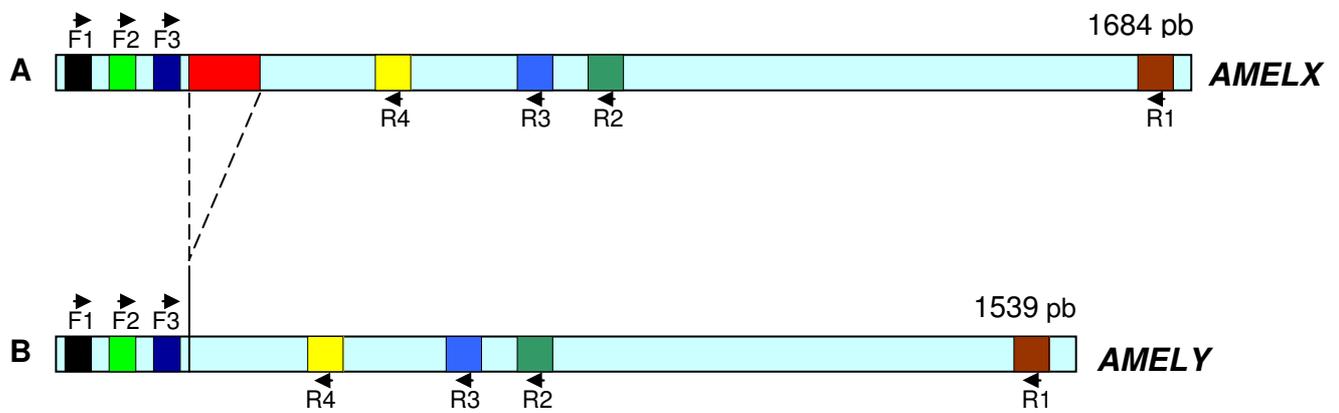


Figura 1. Esquema ilustrativo da região do *íntron* 5 do gene da amelogenina bovina. A e B. Os sítios de pareamento para os sete *primers* projetados são indicados nos alelos *AMELX* e *AMELY*. Os traços pontilhados indicam uma região de aproximadamente 100 pb que está presente no alelo *AMELX*, e ausente no alelo *AMELY*.

De acordo com os resultados obtidos, oito conjuntos de *primers* foram específicos para a amplificação de regiões do *íntron* 5 do gene da amelogenina bovina. Em todos os casos, os diagnósticos realizados foram correspondentes ao sexo fenotípico dos animais. Três conjuntos de *primers* apresentaram ampliações muito consistentes (F2R2/F3R3, F2R2/F3R4 e F2R3/F3R4), enquanto cinco conjuntos de *primers* apresentaram ampliações menos consistentes (F1R2/F2R4, F1R2/F3R4, F1R2/F3R3, F1R3/F2R4 e F1R3/F3R4) (Figuras 2 e 3). Visto que a finalidade deste ensaio foi selecionar os conjuntos de *primers* que apresentam maior especificidade, somente os conjuntos de *primers* F2R2/F3R3, F2R2/F3R4 e F2R3/F3R4 foram selecionados para o próximo ensaio.

Com o objetivo de avaliar a confiabilidade dos três conjuntos de *primers* selecionados, foram realizadas reações com amostras de DNA de 10 animais adultos (cinco de cada sexo). Neste ensaio, o conjunto de *primers* F2R3/F3R4 apresentou os melhores resultados, com ampliações muito consistentes (Figura 4). Foi observado 100% de eficiência nas ampliações com o conjunto de *primers* F2R3/F3R4, de modo que todos os diagnósticos realizados foram correspondentes ao sexo fenotípico dos animais (100% de precisão). Com relação aos conjuntos de *primers* F2R2/F3R3 (resultados não mostrados) e F2R2/F3R4, a precisão dos diagnósticos também foi de 100%. Entretanto, a eficiência das ampliações foi de 80%. Além disso, as ampliações foram menos consistentes em comparação com o conjunto de *primers* F2R3/F3R4. O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 foi projetado visando a amplificação de um fragmento de DNA de 398 pb do alelo *AMELX*, e de um fragmento de DNA de 281 pb do alelo *AMELY* (Figura 5).

Um último teste com amostras de DNA de animais adultos foi realizado com o objetivo de comprovar a confiabilidade do conjunto de *primers* F2R3/F3R4, e desta forma justificar a sua utilização nos ensaios com amostras de DNA embrionário. Os ensaios foram realizados com amostras de DNA de 20 animais adultos (10 de cada sexo). Nas primeiras reações, foi observado que amostras de DNA referentes a três machos específicos falharam para a amplificação do fragmento de 398 pb (*AMELX*). Entretanto, tal fato não prejudica a precisão dos diagnósticos, visto que o fragmento de 281 pb (específico do cromossomo Y) não falhou para amplificar em nenhuma das amostras. Mesmo assim, algumas medidas foram tomadas para tentar eliminar as falhas observadas quanto à amplificação do fragmento correspondente ao cromossomo X. Primeiramente, o tempo de extensão das fitas

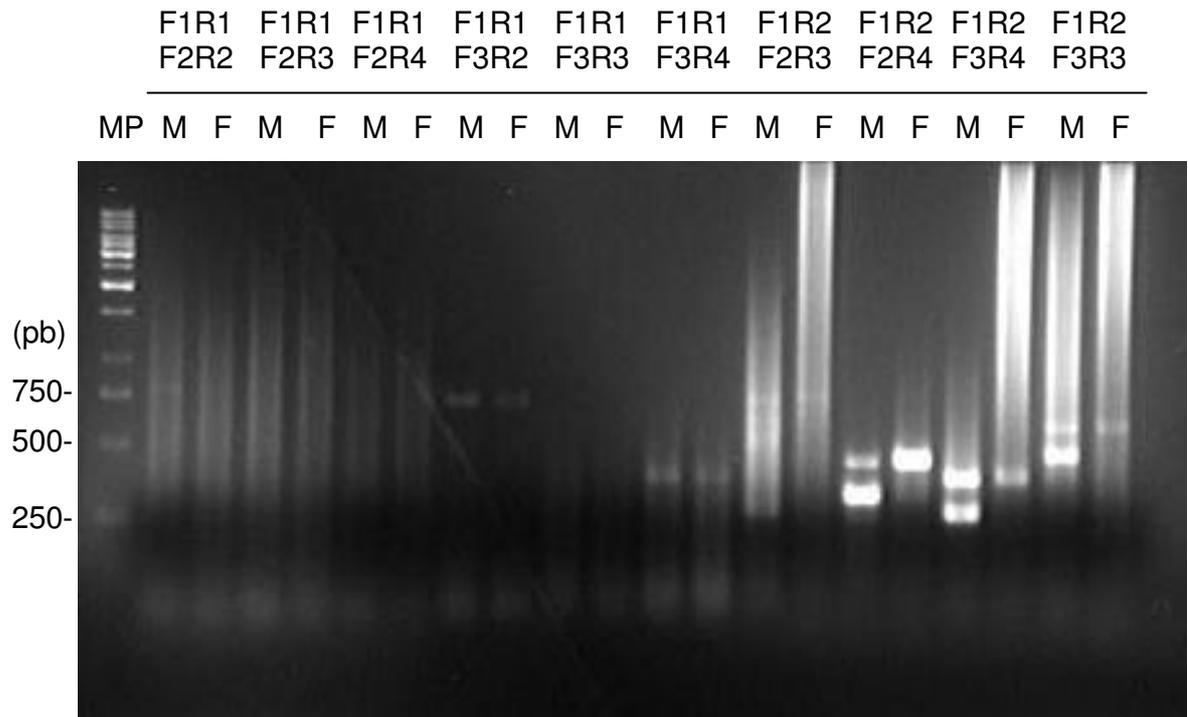


Figura 2: Eletroferese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*, com diferentes conjuntos de *primers*. MP: marcador de peso molecular (1Kb). M: Macho; F: Fêmea. Os conjuntos de *primers* utilizados são indicados.

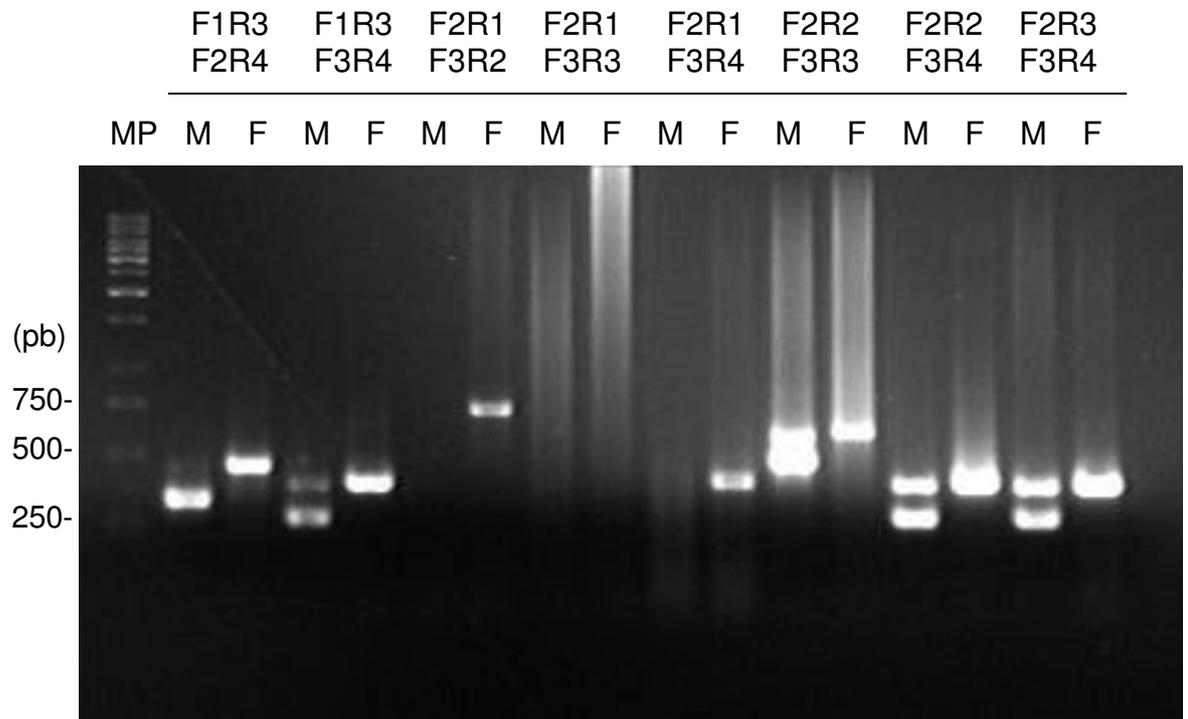


Figura 3: Eletroferese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*, com diferentes conjuntos de *primers*. MP: marcador de peso molecular (1Kb). M: Macho, F: Fêmea. Os conjuntos de *primers* utilizados são indicados.

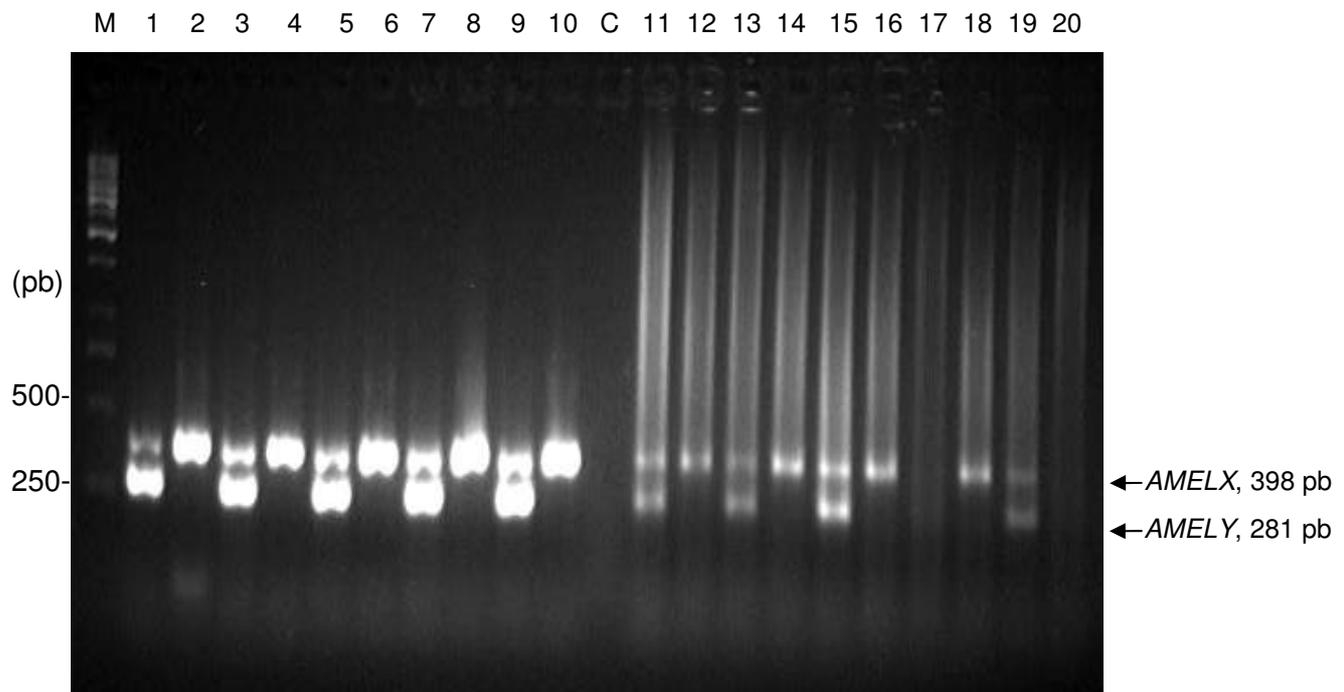


Figura 4: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo (F2R3/F3R4). Linhas 1 a 10: amostras de DNA obtidas de 10 animais, amplificadas com o conjunto de *primers* F2R3/F3R4; Linhas 11 a 20: amostras de DNA obtidas de 10 animais, amplificadas com o conjunto de *primers* F2R2/F3R4. Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

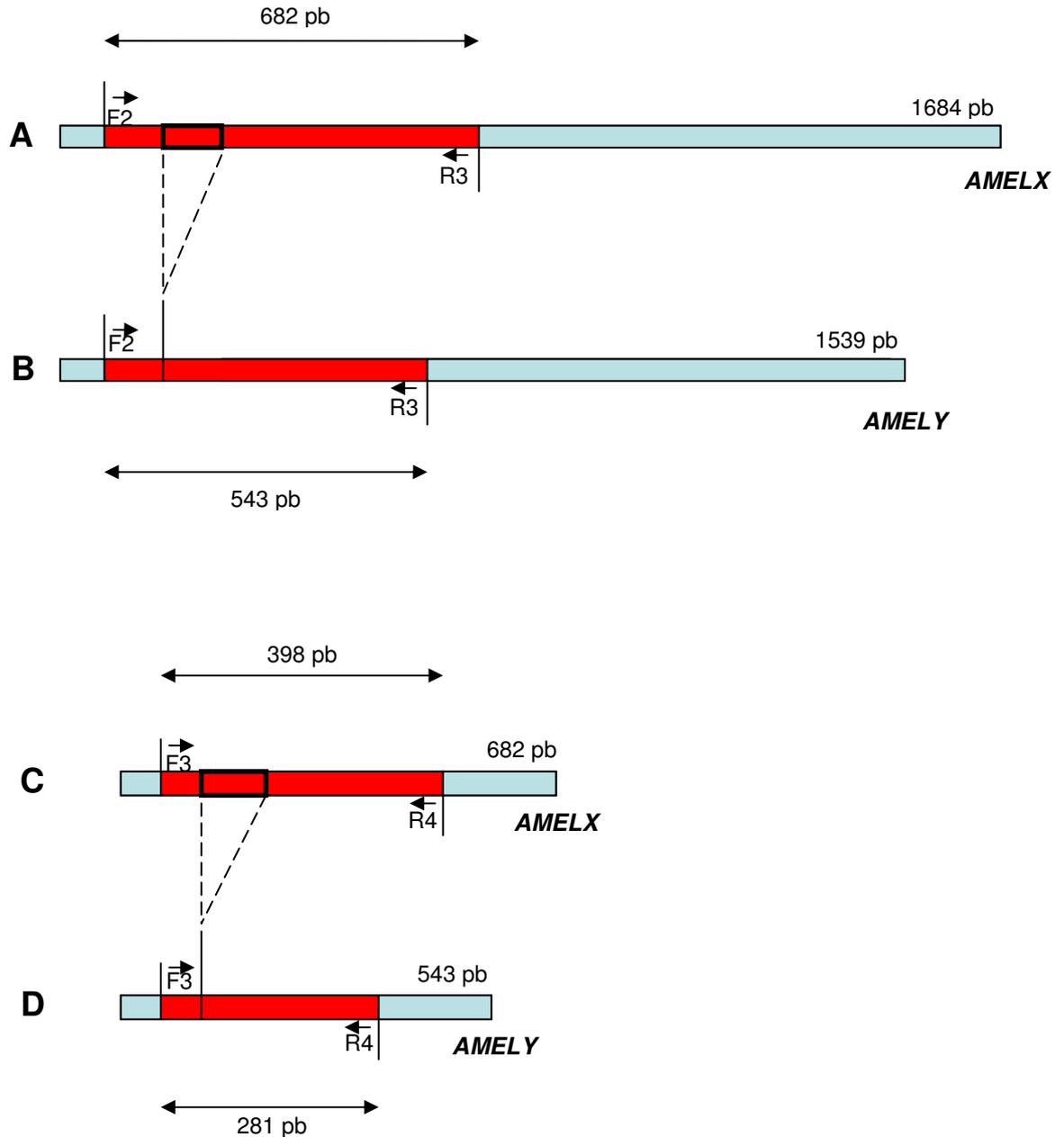


Figura 5. Esquema ilustrativo dos fragmentos a serem amplificados pelo conjunto de *primers* F2R3/F3R4 a partir da região do *íntron* 5 do gene da amelogenina bovina. A e B. Os sítios de pareamento para os *primers* F2 e R3 (par externo) são indicados na região do *íntron* 5 dos alelos AMELX e AMELY, bem como os tamanhos em pares de bases dos fragmentos a serem amplificados no primeiro passo das reações. C e D. Os sítios de pareamento para os *primers* F3 e R4 (par interno) são indicados nos fragmentos a serem obtidos no primeiro passo das reações, bem como os tamanhos em pares de bases dos fragmentos a serem amplificados no segundo passo das reações. A, B, C e D. Os traços pontilhados indicam uma região de aproximadamente 100 pb que está presente no alelo AMELX, e ausente no alelo AMELY.

que era de 90 segundos foi aumentado para 120 segundos, em todas as reações. Em segundo lugar, especificamente para as amostras que apresentaram falhas na amplificação do fragmento de 398 pb (*AMELX*), foi usada uma menor alíquota de DNA nas reações. Nestes casos, foi utilizada uma alíquota de 0,2 µl de solução de DNA no primeiro passo das reações, enquanto que no segundo passo das reações foi utilizada uma alíquota de 0,1 µl dos produtos amplificados no primeiro passo.

A partir destas modificações, as reações foram realizadas em duplicata. Nos dois ensaios foi observada uma eficiência de 100% nas reações, visto que todos os diagnósticos realizados foram correspondentes ao sexo fenotípico dos animais (100% de precisão). As fêmeas foram identificadas através da amplificação do fragmento de 398 pb (*AMELX*), enquanto que os machos foram identificados através da amplificação dos fragmentos de 398 pb (*AMELX*) e 281 pb (*AMELY*) (Figuras 6, 7, 8 e 9). Apenas no segundo ensaio, uma amostra voltou a falhar para a amplificação do fragmento de 398 pb, sendo identificada somente pela amplificação do fragmento de 281 pb (específico do cromossomo Y) (Figura 9, linha 15). Como os controles negativos não apresentaram nenhuma amplificação, a possibilidade de contaminação das reações com DNA exógeno foi desconsiderada.

## 5.2 Sexagem de embriões

Amostras de DNA de 35 embriões foram utilizadas nos ensaios de sexagem. Os embriões (intactos) tiveram o seu DNA extraído em um volume de 100 µl de solução tampão para PCR, de modo que amostras de 5 µl de DNA foram empregadas nas reações. Nos ensaios com amostras de 5 µl de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 84% nas reações, com 85% de concordância entre os diagnósticos realizados. No primeiro ensaio 31 amostras foram diagnosticadas, enquanto que 4 amostras falharam para a amplificação (89% de eficiência) (Figuras 10 e 11). No segundo ensaio 28 amostras foram diagnosticadas, enquanto que 7 amostras falharam para a amplificação (80% de eficiência) (Figuras 12 e 13).

A amplificação de apenas um fragmento de DNA de 398 pb (*AMELX*) foi assumida como diagnóstico indicador de fêmea para a amostra; e a amplificação de dois fragmentos de DNA, um de 398 pb (*AMELX*) e outro de 281 pb (*AMELY*), foi assumida como diagnóstico indicador de macho para a amostra. Em duas situações, as amostras foram diagnosticadas somente através da amplificação do fragmento de

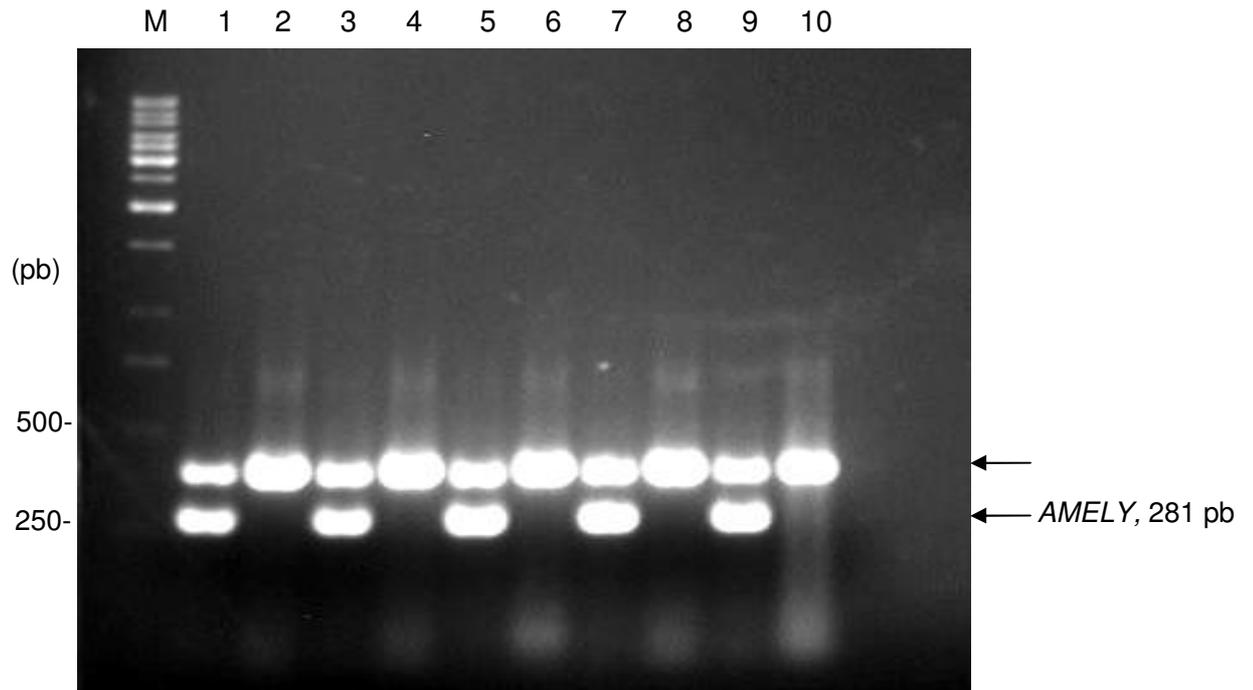


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb). Linhas 1 a 10: amostras de DNA obtidas de 10 animais (1º Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

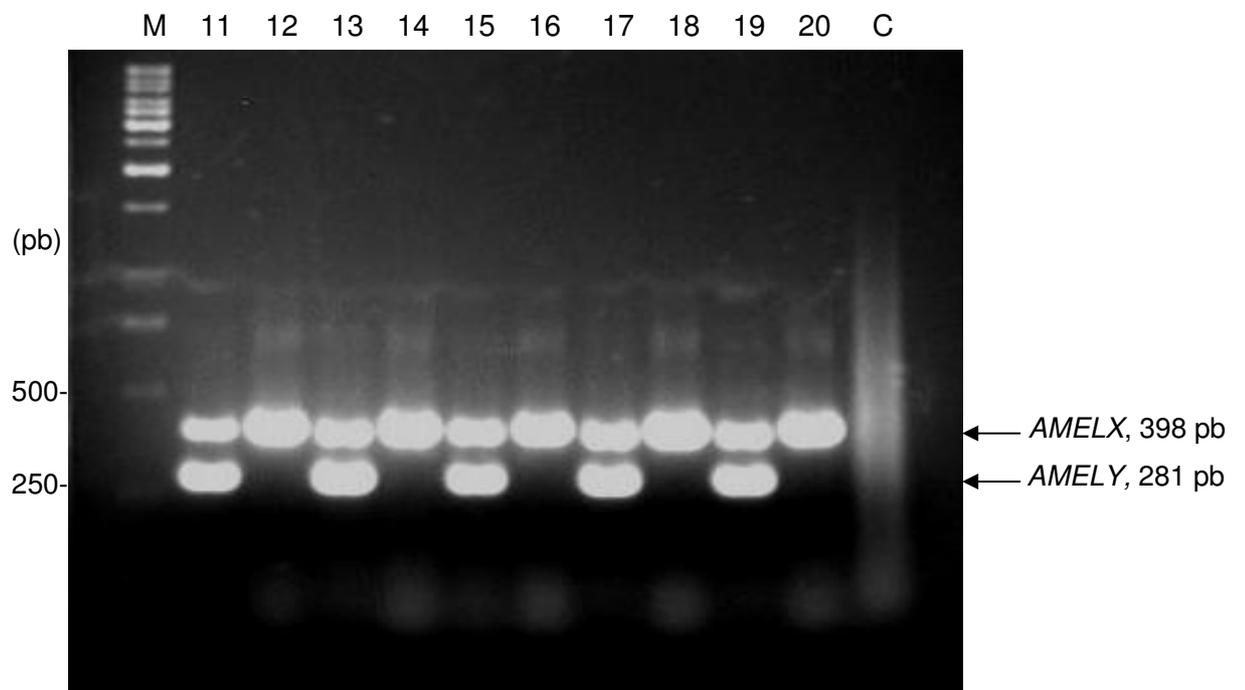


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo. Linhas 11 a 20: amostras de DNA obtidas de 10 animais (1º Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

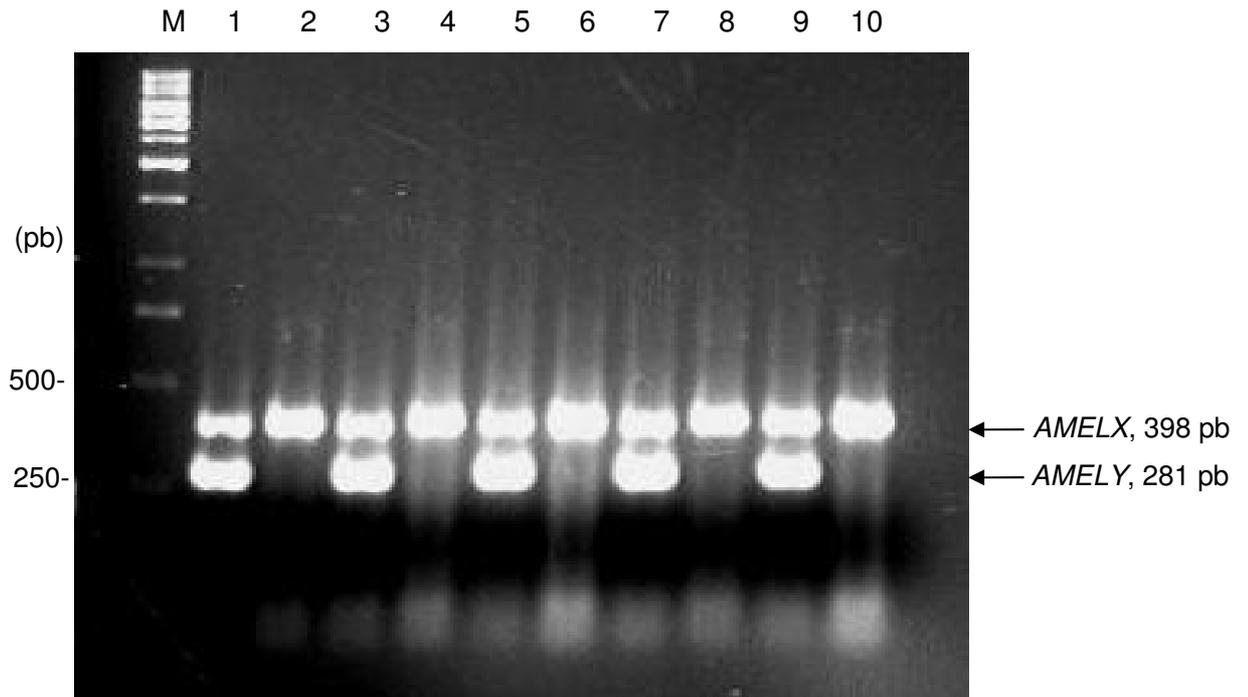


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb). Linhas 1 a 10: amostras de DNA obtidas de 10 animais (2<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

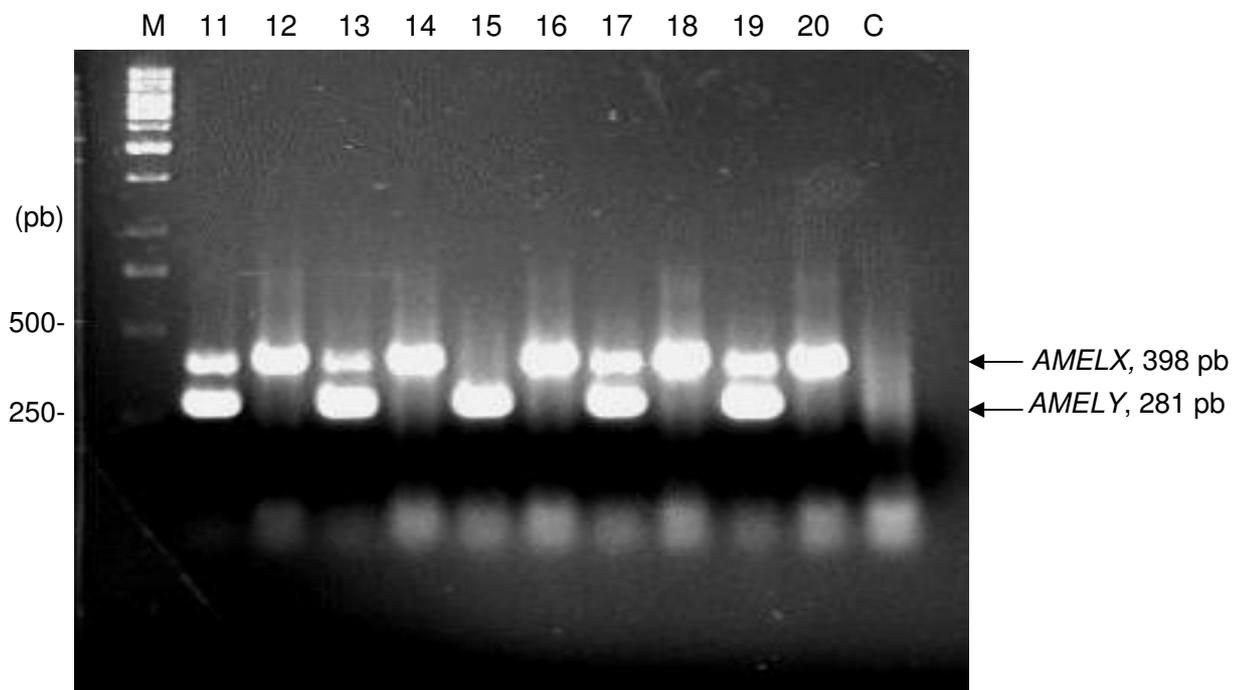


Figura 9: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo. Linhas 11 a 20: amostras de DNA obtidas de 10 animais (2<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

281 pb (Figura 10, linha 4; Figura 12, linha 1). De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio, 19 embriões foram identificados como machos (61%), e 12 embriões foram identificados como fêmeas (39%). De acordo com os resultados obtidos no segundo ensaio, 16 embriões foram identificados como machos (57%), e 12 embriões foram identificados como fêmeas (43%). Como os controles negativos não apresentaram nenhuma amplificação, a possibilidade de contaminação das reações com DNA exógeno foi desconsiderada.

A taxa de eficiência das reações foi calculada de acordo com o número de diagnósticos realizados. Portanto, em 84% das reações foi possível diagnosticar o sexo dos embriões. Nas demais reações não foi possível fazer qualquer diagnóstico, uma vez que tais amostras falharam para a amplificação. Já a taxa de precisão é calculada somente a partir dos diagnósticos realizados.

A precisão da técnica de *Nested-PCR* foi determinada através da comparação dos diagnósticos realizados nos ensaios com amostras de 5 µl de DNA embrionário. Esta comparação só pôde ser feita nos casos em que amostras de um mesmo embrião foram diagnosticadas nos dois ensaios. Desta forma, foi possível comparar os diagnósticos realizados em amostras relativas a 26 embriões. Os resultados de 22 embriões foram concordantes, enquanto que os resultados de 4 embriões foram discordantes, o que corresponde a 85% de concordância entre os diagnósticos realizados. Os embriões número 5 e 17 foram identificados como fêmeas no primeiro ensaio, e como machos no segundo ensaio (Figuras 10 e 12). Já os embriões número 24 e 33 foram identificados como machos no primeiro ensaio, e como fêmeas no segundo ensaio (Figuras 11 e 13).

Os resultados obtidos nos ensaios com amostras de DNA de animais adultos demonstraram que a utilização de uma menor quantidade de DNA nas reações pode ser suficiente para corrigir falhas nas amplificações das amostras. Desta forma, foram realizados novos ensaios utilizando amostras de 2,5 µl e 1,25 µl de DNA embrionário. Nestes ensaios foram utilizadas somente amostras de embriões que não tiveram o sexo identificado em pelo menos um dos ensaios com amostras de 5 µl de DNA embrionário (embriões 7, 9, 11, 14, 18, 20, 21, 23 e 25).

No ensaio com amostras de 2,5 µl de DNA embrionário foi observada uma eficiência de 89% nas reações. Oito amostras foram diagnosticadas, sendo que somente a amostra referente ao embrião 25 falhou para a amplificação (Figura 14). No ensaio com amostras de 1,25 µl de DNA embrionário foi observada

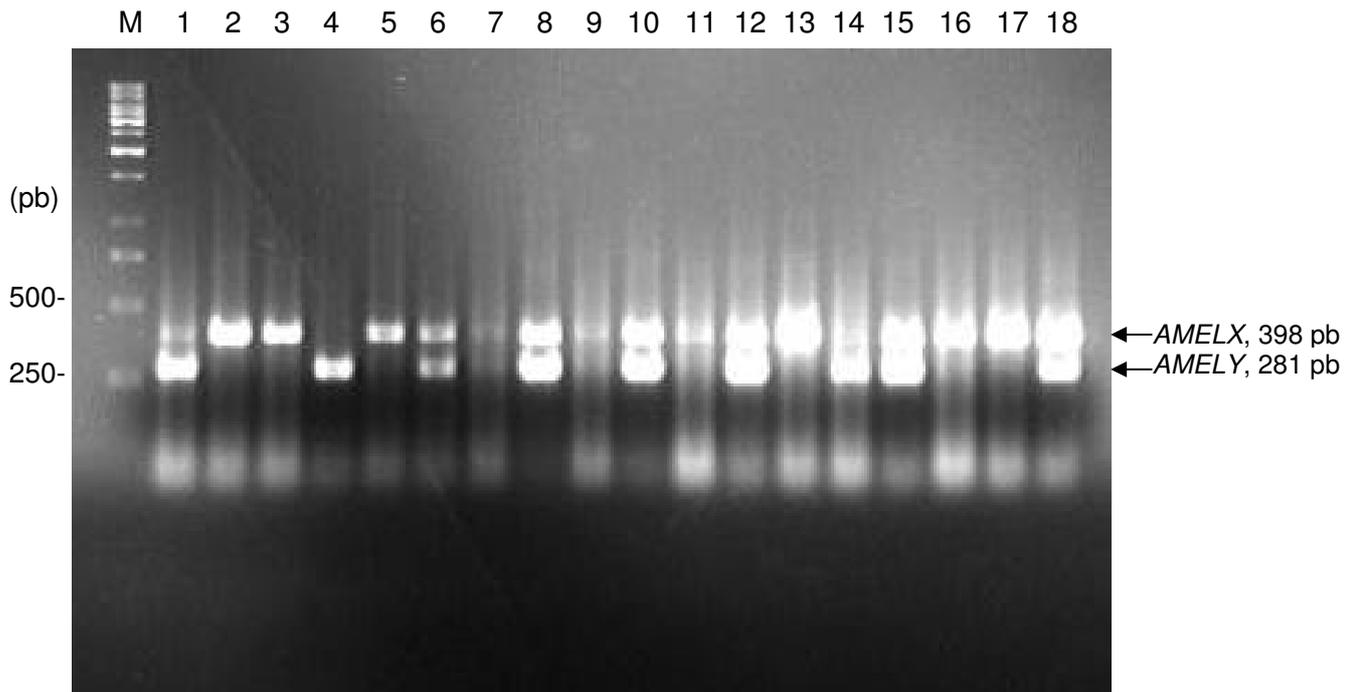


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb). Linhas 1 a 18: amostras de 5  $\mu$ l de DNA obtidas de 18 embriões (1<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas

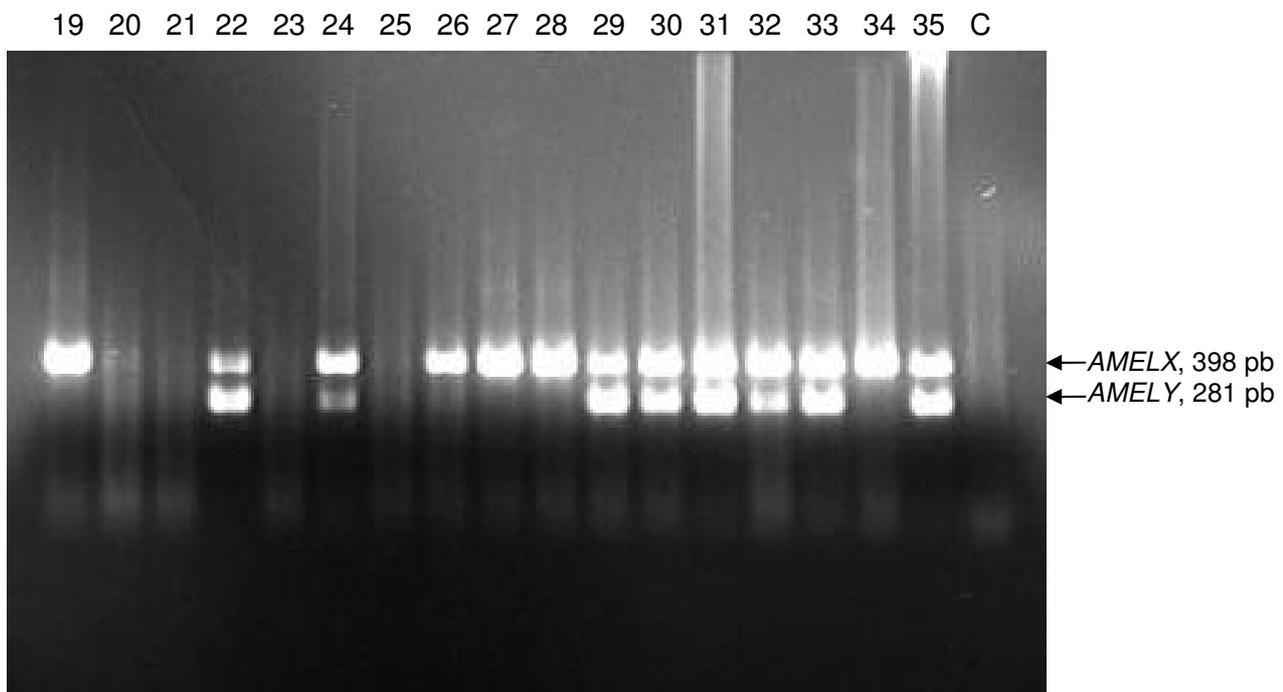


Figura 11: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. C: controle negativo. Linhas 19 a 35: amostras de 5  $\mu$ l de DNA obtidas de 17 embriões (1<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

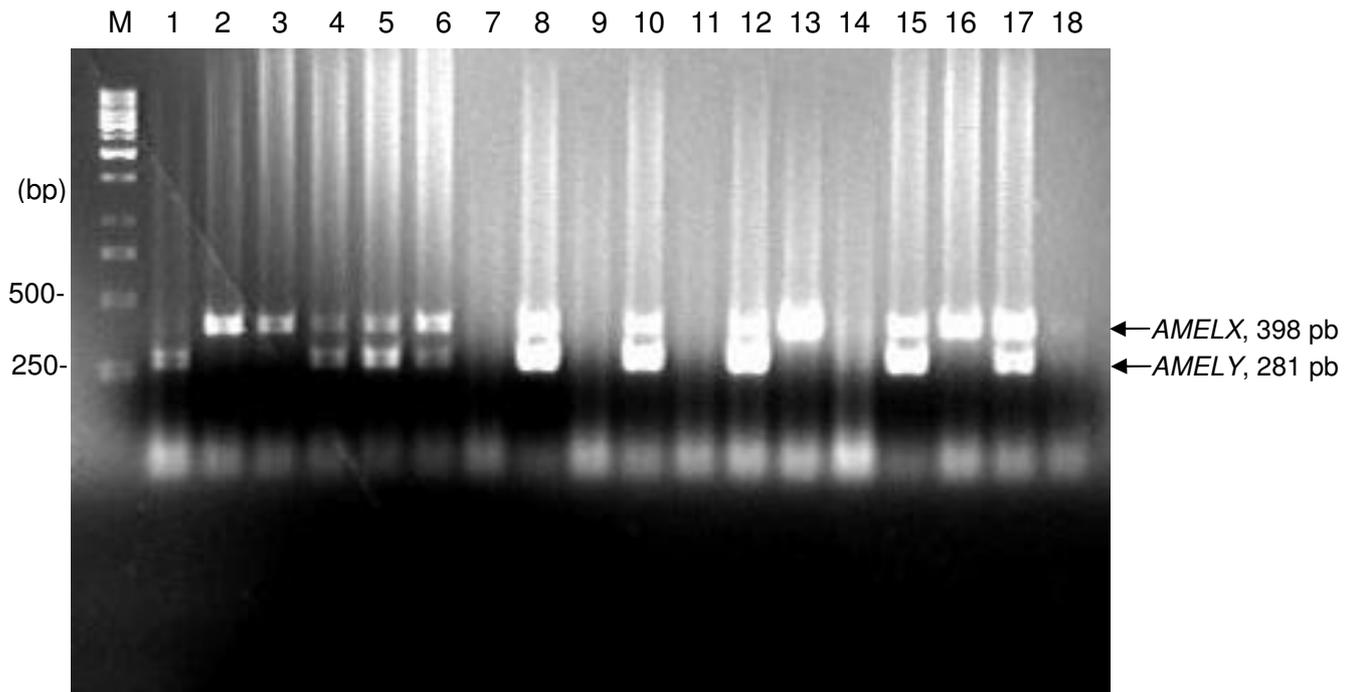


Figura 12: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb). Linhas 1 a 18: amostras de 5  $\mu$ l de DNA obtidas de 18 embriões (2<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

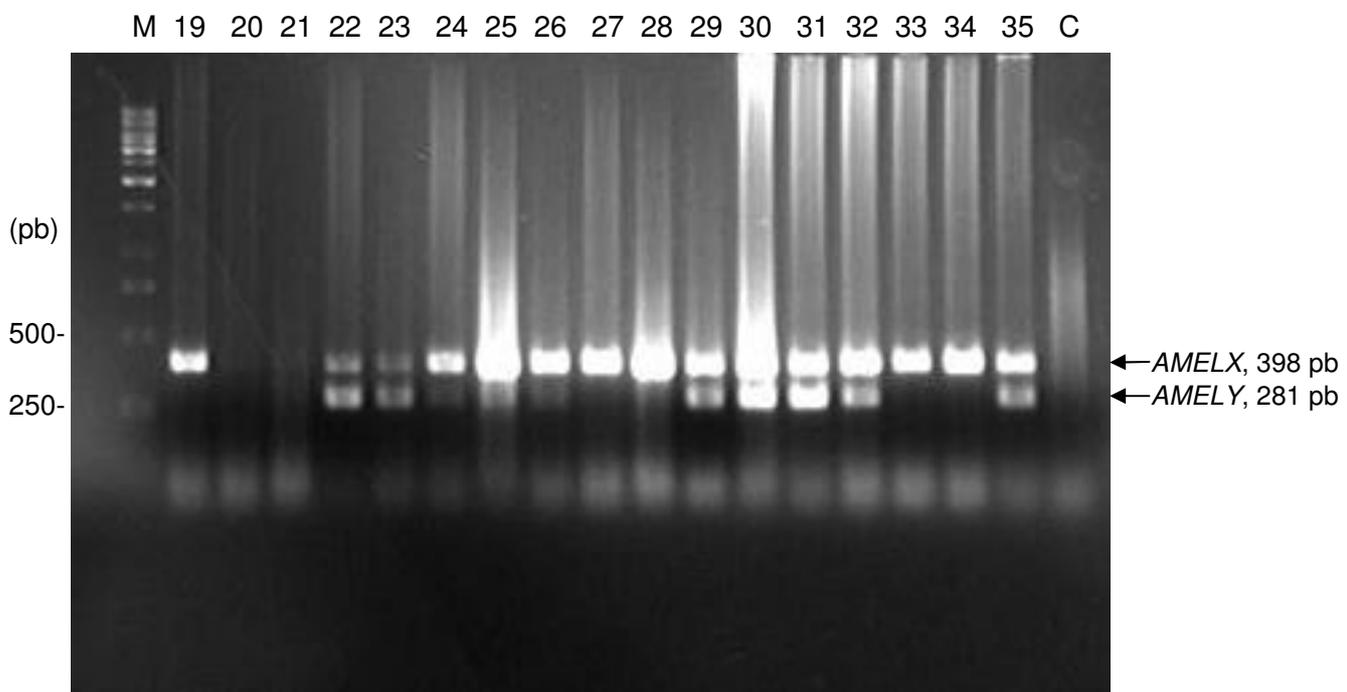


Figura 13: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo. Linhas 19 a 35: amostras de 5  $\mu$ l de DNA obtidas de 17 embriões (2<sup>o</sup> Ensaio). Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

uma eficiência de 78% nas reações. Sete amostras foram diagnosticadas, enquanto que as amostras referentes aos embriões 18 e 21 falharam para a amplificação (Figura 15). A concordância entre os diagnósticos realizados nos ensaios com amostras de 2,5  $\mu$ l e 1,25  $\mu$ l de DNA embrionário foi de 83%. Somente os diagnósticos realizados nas amostras referentes ao embrião 11 foram discordantes. A concordância entre os diagnósticos realizados nos ensaios com amostras de 5  $\mu$ l de DNA, e os diagnósticos realizados nos ensaios com amostras de 2,5  $\mu$ l e 1,25  $\mu$ l de DNA foi de 75%. Dos doze diagnósticos comparados, nove diagnósticos foram concordantes, enquanto três diagnósticos foram discordantes (embriões 11, 18 e 25) (Figuras 10-15).

Nos ensaios com amostras de DNA de animais adultos foi observada uma precisão de 100% nos diagnósticos, sendo que nos ensaios com amostras de 5  $\mu$ l de DNA embrionário a concordância entre os diagnósticos realizados foi de 85%. Desta forma, um teste foi realizado com o objetivo de avaliar se a precisão dos diagnósticos é afetada pela reduzida quantidade de DNA utilizada nas reações com amostras de DNA embrionário. Para isto, foram realizadas reações com amostras de DNA de seis animais adultos (três de cada sexo), mas em concentrações 50 e 100 vezes menor em relação àquelas utilizadas anteriormente. A taxa de eficiência nas reações com amostras de DNA diluídas foi baixa, sendo que das doze amostras diluídas apenas quatro amostras resultaram em amplificação (Figura 16, linhas 2, 8, 9 e 18). Apesar da eficiência das reações com amostras de DNA diluídas ter sido baixa, é importante salientar que a precisão dos diagnósticos foi de 100%.

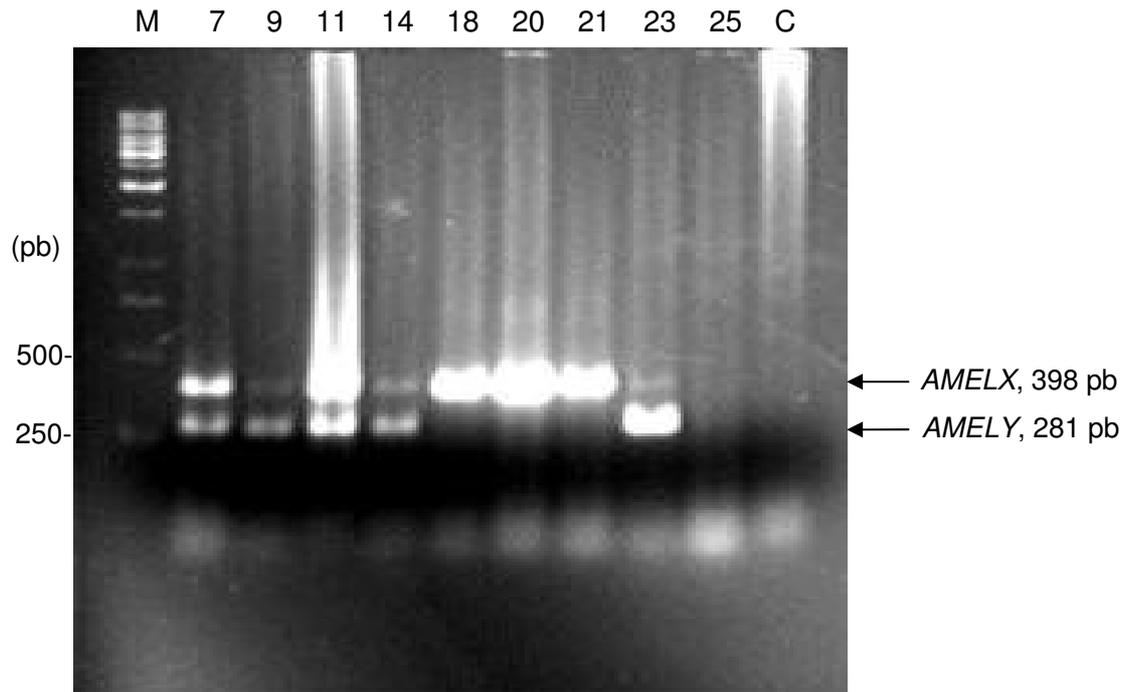


Figura 14: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo. Linhas 7-25: Amostras de 2,5 µl de DNA obtidas de 9 embriões. Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

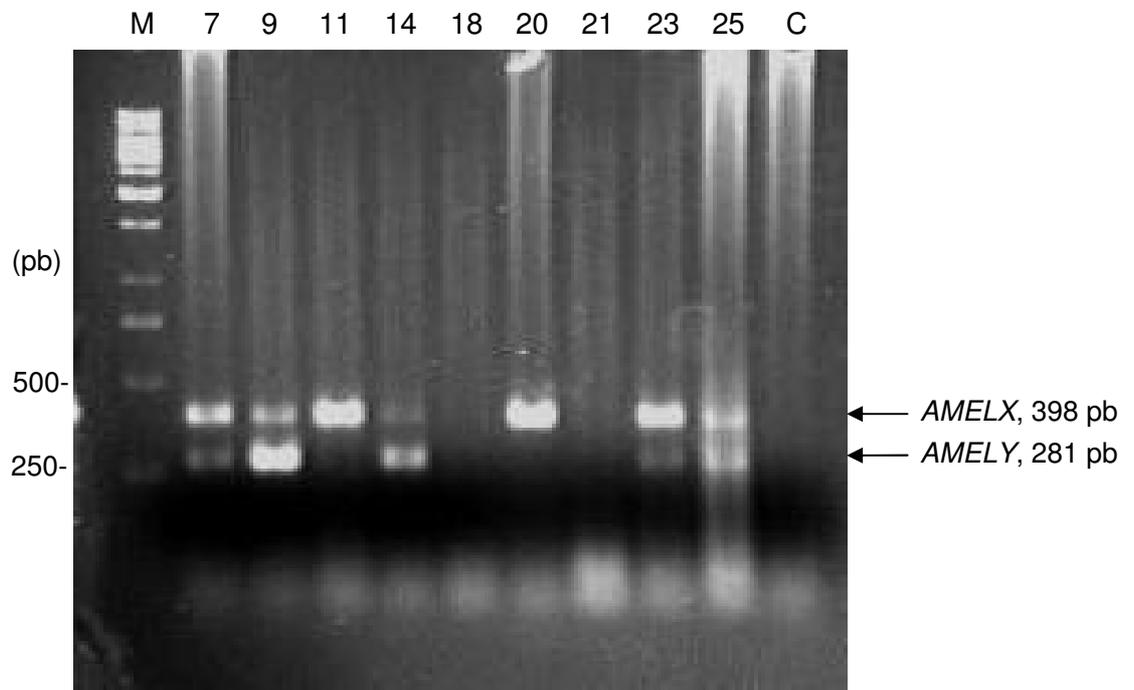


Figura 15: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: marcador de peso molecular (1Kb), C: controle negativo. Linhas 7-25: Amostras de 1,25 µl de DNA obtidas de 9 embriões. Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

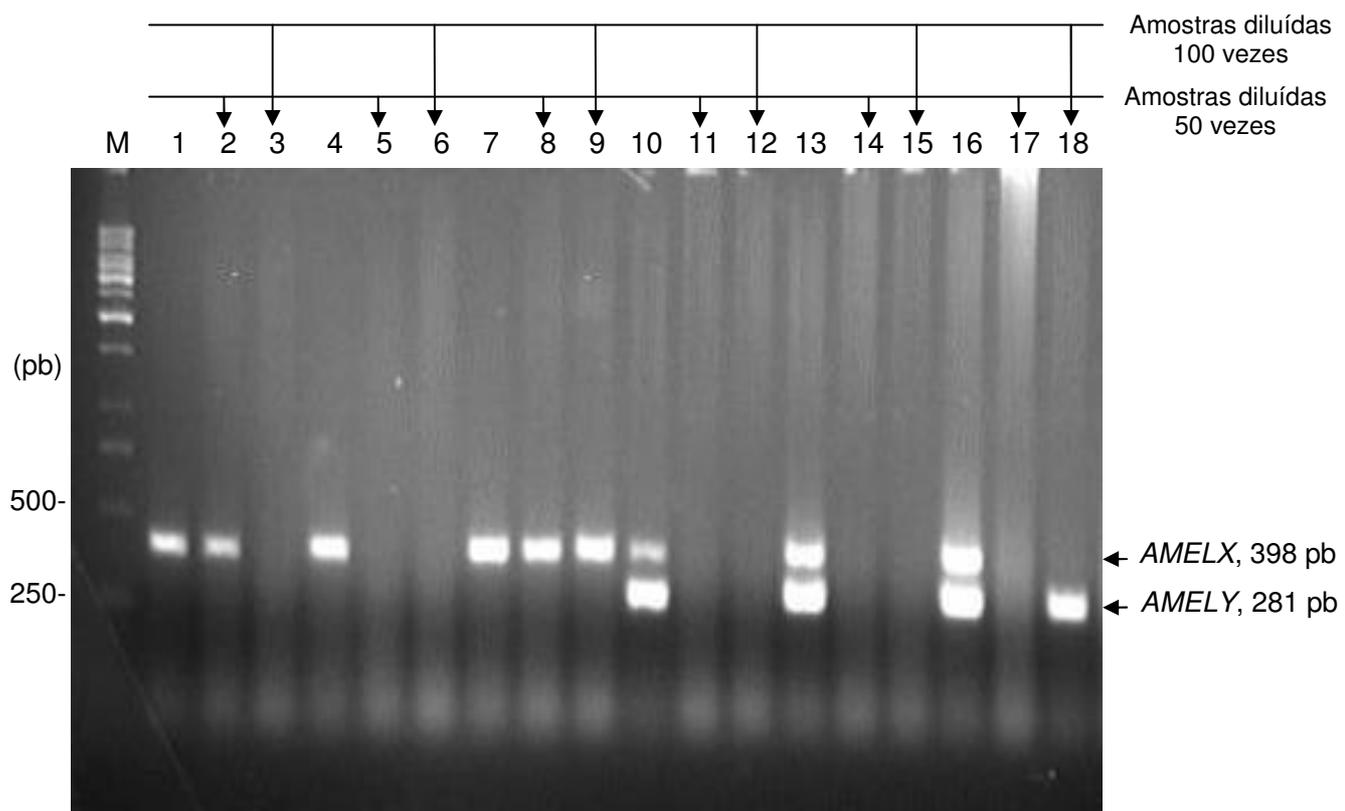


Figura 10: Eletroforese em gel de agarose de fragmentos do gene da amelogenina bovina amplificados por *Nested-PCR*. M: Marcador de peso molecular (1 Kb). Linhas 1, 4, 7, 10, 13 e 16: Amostras de DNA obtidas de 6 animais (controle positivo). Três números consecutivos correspondem a amostras de um mesmo animal. Os fragmentos amplificados são indicados pelas setas.

## 6. DISCUSSÃO

No presente estudo, o sexo dos embriões bovinos foi determinado através da amplificação de regiões do *ítron* 5 do gene da amelogenina bovina (bAMEL) pela técnica de *Nested-PCR*. A escolha do gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem foi justificada pelo fato dele funcionar como um controle interno para as reações, sem a necessidade de utilizar um par de *primers* adicional. Visto que o gene da amelogenina possui apenas uma cópia em cada cromossomo sexual, a eficiência da técnica de PCR pode ser comprometida. Tal situação torna-se ainda mais grave no caso de embriões, onde a quantidade de DNA disponível para as reações é limitada. Para aumentar a eficiência e a sensibilidade da técnica de PCR convencional, as reações foram executadas em dois passos (*Nested-PCR*). No primeiro passo um fragmento maior foi amplificado e, no segundo passo, foi utilizado um par de *primers* interno à seqüência amplificada anteriormente. Como a seqüência alvo é especificada por dois pares de *primers*, a técnica de *Nested-PCR* reduz consideravelmente a amplificação de fragmentos inespecíficos (KUNIEDA *et al.*, 1992; BREDBACKA, 2001).

O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 apresentou uma alta especificidade, visto que nenhuma amplificação inespecífica foi observada nos ensaios realizados. Cabe ressaltar que após a conclusão de todos os ensaios deste trabalho, foi constatado através da literatura que os *primers* TCTCTCACAGTCCAAGRCCTA (F2) e AAATTCTCTCACAGTCCAAG (CHEN *et al.*, 1999), e os *primers* AACARGTAATWTTTCCTTTAG (R4) e CAACAGGTAATTTTCCTTTAG (CHEN *et al.*,

1999), foram projetados a partir das mesmas regiões do *íntron* 5 do gene da amelogenina bovina, entre os nucleotídeos 71-95 do alelo *AMELX* e 70-94 do alelo *AMELY*, e entre os nucleotídeos 517-537 do alelo *AMELX* e 389-409 do alelo *AMELY*, respectivamente (CHEN *et al.*, 1999). Esta coincidência comprova que estas regiões são muito adequadas para o desenvolvimento de *primers*, visto que dois trabalhos realizados de forma independente desenvolveram *primers* a partir destas regiões. Os *primers* F2 e R4 são muito similares aos *primers* desenvolvidos por CHEN *et al.* (1999), porém não são idênticos. Além do mais, dois novos *primers* foram desenvolvidos no presente trabalho (F3 e R3), o que possibilitou a introdução de um segundo passo de reação a partir da técnica de PCR convencional. Desta forma, uma nova técnica de sexagem foi desenvolvida neste trabalho. Os nossos resultados evidenciam a especificidade e a sensibilidade da técnica de *Nested-PCR*.

No presente estudo, a extração do DNA embrionário foi feita em um volume de 100 µl de solução tampão para PCR, sendo que amostras de 5 µl de DNA foram utilizadas nas reações. Apesar de não ser possível estimar com uma precisão exata a quantidade de DNA empregada nas reações, acredita-se que esta seja correspondente a um número que pode variar entre 3 e 9 células. Se forem considerados os resultados observados nos ensaios com amostras de 2,5 µl e 1,25 µl de DNA, a sensibilidade da técnica pode ser ainda maior. Estas estimativas foram baseadas nos estudos realizados por PARK *et al.* (2001) e TOMINAGA e HAMADA (2004).

PARK *et al.* (2001) realizaram uma contagem de células em blastocistos expandidos, e blastocistos eclodidos (ambos intactos), sendo que os embriões apresentaram um número médio de 142 células, podendo este número variar entre 112 e 172 células. TOMINAGA e HAMADA (2004) observaram um número médio de 101 células em blastocistos iniciais (intactos), podendo este número variar entre 58 e 144 células. No presente trabalho, foram utilizadas amostras correspondentes a blastocistos iniciais, blastocistos expandidos, e blastocistos eclodidos, para as ampliações. Os resultados obtidos por PARK *et al.* (2001) e TOMINAGA e HAMADA (2004) demonstram que existe uma grande variação entre o número de células presentes nos embriões. Tal fato pode explicar a variação observada no padrão das ampliações obtidas nas reações com amostras de DNA embrionário. Em contrapartida, nas reações com amostras de DNA de animais adultos pôde-se

observar uma grande uniformidade no padrão das amplificações, visto que para todas as amostras o DNA foi obtido a partir de um mesmo volume de sangue.

Variações na extração do DNA podem afetar consideravelmente a eficiência da técnica de PCR (BREDBACKA, 2001). ALMODIN *et al.* (2005) observaram 62% de eficiência em reações com amostras biopsiadas de embriões. Segundo os autores, o excesso de citoplasma celular nas amostras utilizadas teve grande influência nos resultados. Além do mais, todos os métodos utilizados para a extração podem danificar o DNA (BREDBACKA, 2001; ALMODIN *et al.*, 2005).

Com relação ao presente trabalho a possibilidade de variações no processo de extração do DNA também não pode ser desconsiderada. Tal afirmativa baseia-se no fato de que todas as amostras que falharam para a amplificação nas reações com 5 µl de DNA embrionário, apresentaram amplificações nas reações com 2,5 µl e 1,25 µl de DNA embrionário. Nos dois ensaios realizados com amostras de 5 µl de DNA embrionário, um total de 11 amostras referentes a 9 embriões falharam para a amplificação. No entanto, quando amostras de 2,5 µl e 1,25 µl de DNA destes embriões foram utilizadas nas reações, foi observada uma eficiência de 89% e 78%, respectivamente. Tais resultados indicam que realmente podem ter ocorrido variações na extração do DNA dos embriões, de maneira que uma maior quantidade de contaminantes pode ter permanecido em determinadas amostras. Conseqüentemente, uma diminuição na quantidade de DNA utilizada, também diminui a quantidade de contaminantes nas amostras a serem amplificadas, aumentando assim a eficiência das reações. Os resultados observados nas reações com amostras de 2,5 µl e 1,25 µl demonstram a grande sensibilidade da técnica de *Nested-PCR* desenvolvida neste trabalho.

Um outro indício da presença de contaminantes nas amostras é o fato de que, em alguns casos, o sexo dos embriões foi identificado somente pela amplificação do fragmento de 281 pb (referente ao alelo *AMELY*). Tal fato foi observado em amostras correspondentes a dois embriões (Figura 10, linha 4; Figura 12, linha 1), e também já havia sido observado em amostras de animais adultos (Figura 9, linha 15). No caso da extração do DNA de células sanguíneas, o principal cuidado deve ser com a completa eliminação da hemoglobina, uma vez que as porfirinas possuem ação inibitória sobre a enzima *Taq* DNA polimerase (HIGUCHI, 1989).

A presença de contaminantes torna mais difícil a amplificação de fragmentos maiores, de modo que pode ter ocorrido uma amplificação preferencial do fragmento correspondente ao alelo *AMELY* (281 pb) em relação ao fragmento correspondente ao alelo *AMELX* (398 pb). No entanto, a precisão da técnica não é afetada, visto que o alelo *AMELY* é específico do cromossomo Y. É importante destacar que, mesmo durante o período de otimização da técnica, nunca foi observada uma amplificação preferencial do alelo *AMELX* em relação ao alelo *AMELY*.

Visto que os ensaios com amostras de 5 µl de DNA embrionário foram realizados em duplicata, foi possível comparar os diagnósticos realizados em amostras relativas a 26 embriões. Em 22 casos houve concordância, enquanto que em 4 casos os resultados foram discordantes, o que corresponde a 85% de concordância entre os diagnósticos realizados. Estes dados confrontam os resultados fornecidos pelos ensaios realizados com amostras de DNA de animais adultos, onde se verificou uma taxa de precisão de 100%, sendo que mesmo durante o período de otimização da técnica todos os diagnósticos realizados foram correspondentes ao sexo fenotípico dos animais. Os resultados obtidos nos ensaios com amostras de DNA de animais adultos atestam a confiabilidade do nosso protocolo de sexagem. Neste sentido, é possível inferir que a contaminação das amostras pode ter sido a causa dos diagnósticos discordantes realizados em algumas amostras de DNA embrionário.

Nos ensaios com amostras de DNA de animais adultos nenhuma amostra apresentou uma amplificação mais robusta do fragmento de 398 pb (*AMELX*) em relação ao fragmento de 281 pb (*AMELY*) (Figuras 6, 7, 8 e 9). Tendo como base estas observações, as amostras de DNA embrionário que apresentaram uma amplificação mais robusta do fragmento de 398 pb em relação ao fragmento de 281 pb podem ser consideradas suspeitas de contaminação.

Através da técnica de PCR um grande número de seqüências alvo podem ser produzidas a partir de uma única cópia de DNA. No entanto, a grande sensibilidade da técnica tem como desvantagem o fato de que pequenas contaminações podem interferir nos resultados, aumentando assim a taxa de erro nos diagnósticos (KUNIEDA *et al.*, 1992; BREDBACKA, 1998).

Durante a produção *in vitro* de embriões, espermatozoides utilizados no processo de fertilização podem ficar aderidos à zona pelúcida dos embriões, e conseqüentemente resultar em uma fonte de contaminação para as amostras

(HERR e REED, 1991; PARK *et al.*, 2001; ALMODIN *et al.*, 2005). Em um estudo realizado com embriões produzidos *in vivo*, DALTON *et al.* (2000) observaram espermatozóides aderidos à zona pelúcida em 41% dos embriões analisados. Células do *cumulus* também podem ficar aderidas à zona pelúcida dos embriões, resultando em uma fonte de contaminação para as amostras (KIRKPATRICK e MONSON, 1993).

A digestão enzimática da zona pelúcida pode diminuir consideravelmente o risco de contaminação das amostras. No presente trabalho, tal procedimento não foi executado. Além disso, durante o processo de eclosão dos blastocistos ocorre a liberação de células e *debris* celulares no meio de cultivo, o que pode ter contaminado amostras de outros embriões. Tal risco poderia ter sido eliminado por uma extensiva lavagem dos embriões, entretanto os embriões foram lavados em apenas 2 ou 3 gotas de meio PBS, o que pode ter sido insuficiente para evitar a contaminação das amostras.

É importante destacar que a contaminação das amostras com espermatozóides portadores do cromossomo Y e células de embriões masculinos é mais grave, visto que nestas situações a precisão dos diagnósticos pode ser muito afetada. A contaminação com células do *cumulus*, espermatozóides portadores do cromossomo X e células de embriões femininos não prejudica a precisão dos diagnósticos. No entanto, tais contaminações podem fazer com que alguns diagnósticos sejam considerados suspeitos, dificultando assim a interpretação dos resultados.

Uma outra fonte de contaminação para as amostras pode ter sido a utilização da BSA no meio de lavagem dos embriões. No presente estudo, os embriões foram lavados em meio PBS acrescido de 0,4% de BSA. A suplementação do meio PBS com BSA tem como objetivo impedir que o embrião venha a se aderir à placa, facilitando assim a manipulação dos embriões. Segundo HERR e REED (1991), a BSA pode ocasionalmente estar contaminada com DNA bovino, sendo mais adequada a utilização da OSA (albumina sérica ovina) nos meios de lavagem e de micromanipulação de embriões bovinos. No trabalho realizado por KIRKPATRICK e MONSON (1993) foi adotada a substituição da BSA pela OSA no meio de micromanipulação dos embriões, no entanto quando a OSA foi usada na concentração de 0,6%, amplificações foram detectadas no controle negativo. Tal problema foi contornado com a utilização da OSA em concentrações

menores (0,1-0,3%). AGCA *et al.* (1998) e CHRENEK *et al.* (2001) também adotaram a substituição da BSA pela OSA no meio de lavagem dos embriões.

Muitos trabalhos têm usado o meio PBS suplementado com BSA, tanto no meio de lavagem (PEURA *et al.*, 1991; GILARD *et al.*, 2004) quanto no meio de micromanipulação de embriões bovinos (THIBIER e NIBART, 1995; GARCIA *et al.*, 1997; HASSUN *et al.*, 1999; PARK *et al.*, 2001). Em nenhum dos trabalhos citados foi relatada qualquer possibilidade de contaminação em virtude da utilização da BSA. Além disso, alguns trabalhos têm empregado a BSA na mistura das reações (CHEN *et al.*, 1999; WEIKARD *et al.*, 2001). Tais estudos relataram 100% de precisão na sexagem de embriões bovinos, de modo que a taxa de precisão foi calculada após o nascimento dos animais. Apesar dos dados fornecidos por CHEN *et al.* (1999) e WEIKARD *et al.* (2001), não se pode descartar a possibilidade da BSA ter contribuído para a contaminação das amostras de DNA embrionário.

Os testes realizados com amostras de DNA de animais adultos diluídas 50 e 100 vezes, indicam que os diagnósticos imprecisos realizados em algumas amostras de DNA embrionário não estão relacionados com a reduzida quantidade de DNA empregada nas reações. Cabe ressaltar que a eficiência das reações com amostras de DNA diluídas foi baixa, no entanto o cálculo das diluições pode ter sido feito de forma incorreta. Segundo ENNIS e GALLAGHER (1994), em 0,1  $\mu$ l de sangue estão presentes de 10 a 20 linfócitos. As amostras de DNA de animais adultos que foram utilizadas nos ensaios são relativas a 0,1  $\mu$ l de sangue. Desta forma, as diluições podem ter sido superestimadas, sendo que uma quantidade de DNA correspondente a 10-20 células foi diluída 50 e 100 vezes.

Tal fato também pode explicar a amplificação isolada do fragmento de 281 pb (específico do cromossomo Y) na amostra de um animal macho que foi diluída 100 vezes. Como a amostra utilizada na reação foi muito diluída, a região genômica onde o alelo *AMELX* está situado pode ter ficado ausente da reação. Neste sentido, não seria surpreendente se um macho tivesse sido identificado como fêmea, no entanto, seria impossível uma fêmea ser identificada como macho. Nas reações com amostras de 1,25  $\mu$ l de DNA, embriões originalmente machos também poderiam ter sido identificados como fêmeas, já que as amostras foram muito diluídas. Porém, o número de embriões identificados como machos foi consideravelmente maior e, além disso, os dois embriões identificados como fêmeas já haviam sido considerados fêmeas em outros ensaios. Os resultados discutidos

acima são um grande indicativo de que a contaminação das amostras foi a provável causa dos diagnósticos discordantes realizados em algumas amostras de DNA embrionário.

A maior parte dos testes disponíveis para a determinação do sexo em humanos envolve a amplificação do gene da amelogenina. A determinação do sexo em humanos é particularmente importante no campo da medicina forense (STEINLECHNER *et al.*, 2002; THANGARAJ *et al.*, 2002), mas também vem sendo muito utilizada no diagnóstico pré-implantativo, principalmente em famílias com casos de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X (RAY *et al.*, 2002). Nestes casos, um diagnóstico errado pode ter conseqüências desastrosas, o que justifica a utilização do gene da amelogenina em protocolos de determinação do sexo em humanos, uma vez que este marcador fornece uma grande confiabilidade aos exames.

Ainda existem poucos relatos da utilização do gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem de embriões bovinos (ENNIS e GALLAGHER, 1994; CHEN *et al.*, 1999; WEIKARD *et al.*, 2006). Tal situação se deve provavelmente a grande dificuldade de se amplificar seqüências de cópia única em embriões. Além disso, um segundo passo de reação aumenta consideravelmente o tempo consumido nos ensaios. No presente trabalho, o tempo total consumido nas reações foi de aproximadamente oito horas. Algumas medidas, como por exemplo, a diminuição do número de ciclos das reações, devem ser testadas no sentido de diminuir o tempo consumido nos ensaios.

A utilização de protocolos mais rápidos é importante principalmente quando os exames são realizados em embriões produzidos *in vivo* e transferidos a fresco (BREDBACKA *et al.*, 1995; HASLER *et al.*, 2002). O cultivo *in vitro* de tais embriões por um período superior a seis horas pode comprometer as taxas de prenhez. THIBIER e NIBART (1995) avaliaram as taxas de prenhez obtidas após a transferência de embriões produzidos *in vivo* e cultivados *in vitro* em diferentes condições. Quando os embriões foram cultivados por 6 horas foi obtida uma taxa de prenhez de 56%, no entanto quando os embriões foram cultivados por 24 horas foi obtida uma taxa de prenhez de 40%.

Contudo, o congelamento de embriões é obrigatório na maioria dos sistemas de transferência de embriões do mundo, já que os custos com a manutenção de um alto número de receptoras são proibitivos (GARCIA, 2001). A eficiência de um

sistema de produção animal torna-se muito maior quando as receptoras são preparadas somente para o número de embriões do sexo desejado (HERR e REED, 1991). Além do mais, o congelamento permite que os embriões sejam comercializados entre fazendas, regiões ou países, o que potencializa o impacto da técnica de sexagem.

A expansão do diagnóstico pré-implantativo na indústria de transferência de embriões não está restrita somente a avanços no campo da biologia molecular. A carência de técnicas eficientes para o congelamento de embriões produzidos *in vitro* e biopsiados representa um obstáculo para o sucesso de sistemas de produção animal baseados no diagnóstico pré-implantativo.

Os resultados obtidos no presente trabalho comprovam a confiabilidade do conjunto de *primers* F2R3/F3R4 para a determinação do sexo em bovinos. Este conjunto apresentou uma alta especificidade, visto que nenhuma amplificação inespecífica foi observada nos ensaios realizados. As taxas de eficiência observadas nos ensaios com amostras de 5  $\mu$ l de DNA embrionário estão muito próximas das que são relatadas na literatura. Além do mais, todas as amostras que falharam para a amplificação nas reações com 5  $\mu$ l de DNA embrionário, apresentaram amplificações nas reações com 2,5  $\mu$ l e 1,25  $\mu$ l de DNA embrionário. Estes resultados são um grande indicativo de que a técnica de *Nested-PCR* desenvolvida neste trabalho poderá ser aplicada com muito sucesso em futuros ensaios com amostras biopsiadas de embriões bovinos.

## 7. CONCLUSÕES

1. O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 é específico para a amplificação de um fragmento de DNA de 398 pb do alelo *AMELX*, e de um fragmento de DNA de 281 pb do alelo *AMELY*, a partir da região do *ítron* 5 do gene da amelogenina bovina.
2. A confiabilidade do conjunto de *primers* F2R3/F3R4 foi comprovada através dos ensaios com amostras de DNA de animais adultos, onde todos os diagnósticos realizados foram correspondentes ao sexo fenotípico dos animais.
3. As taxas de eficiência obtidas nos ensaios com amostras de DNA embrionário são um grande indicativo de que a técnica de *Nested-PCR* desenvolvida neste trabalho poderá ser aplicada com sucesso em ensaios com amostras biopsiadas de embriões bovinos.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AASEN E., MEDRANO J.F. (1990) Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technology* 8: 1279-1281.
- AGCA Y., MONSON R.L., NORTHEY D.L., PESCHEL D.E., SCHAEFER D.M., RUTLEDGE J.J. (1998) Normal calves from transfer of biopsied, sexed and vitrified IVP bovine embryos. *Theriogenology* 50: 129-145.
- ALMODIN C.G., MORON A.F., KULAY JR. L., MINGUETTI CÂMARA V.C., MORAES A.C., TORLONI M.R. (2005) A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. *Fertility and Sterility* 84: 895-899.
- ALVES B.C.A., HOSSEPIAN DE LIMA V.F.M., TEIXEIRA C.M., MOREIRA FILHO C.A. (2003) Use of primers derived from a new sequence of the bovine Y chromosome for sexing *Bos taurus* and *Bos indicus* embryos. *Theriogenology* 59: 1415-1419.
- APPA RAO K.B.C., TOTEY S.M. (1998) Cloning and sequencing of buffalo male-specific repetitive DNA: Sexing of in-vitro developed buffalo embryos using multiplex and nested polymerase chain reaction. *Theriogenology* 51: 785-797.

- BARRETT M.T., REID B.J., JOSLYN G. (1995) Genotypic analysis of multiple loci in somatic cells by whole genome amplification. *Nucleic Acids Research* 23: 17, 3488-3492.
- BRADBURY M.W., ISOLA L.M., GORDON J.W. (1990) Enzymatic amplification of a Y chromosome repeat in a single blastomere allows identification of the sex of preimplantation mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 4053-4057.
- BRADLEY B.J., CHAMBERS K.E., VIGILANT L. (2001) Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conservation Genetics* 2: 179-181.
- BREDBACKA P., VELMALA R., PEIPPO J., BREDBACKA K. (1994) Survival of biopsied and sexed bovine demi-embryos. *Theriogenology* 41: 1023-1031.
- BREDBACKA P., KANKAANPÄÄ A., PEIPPO J. (1995) PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. *Theriogenology* 44: 167-176.
- BREDBACKA P., PEIPPO J., JAAKMA Ü. (1996) A simplified protocol for PCR-sexing of bovine embryos: A field trial. *Theriogenology* 45: 218.
- BREDBACKA P. (1998) Recent development in embryo sexing and its field application. *Reprod. Nutr. Dev.* 38: 605-613.
- BREDBACKA P. (2001) Progress on methods of gene detection in preimplantation embryos. *Theriogenology* 55: 23-34.
- CARBONNEAU G., MORIN N., DUROCHER J., BOUSQUET D. (1997) Viability of bovine IVF embryos biopsied with microsection or microaspiration technique for sexing. *Theriogenology* 47: 266.
- CHEN C.M., HU C.L., WANG C.H., HUNG C.M., WU H.K., CHOO K.B., CHENG W.T.K. (1999) Gender determination in single bovine blastomeres by polymerase chain reaction amplification of sex-specific polymorphic fragments in the amelogenin gene. *Molecular Reproduction and Development* 54: 209-214.

- CHRENEK P., BOULANGER L., HEYMAN Y., UHRIN P., LAURINCIK J., BULLA J., RENARD J. -P. (2001) Sexing and multiple genotype analysis from a single cell of bovine embryo. *Theriogenology* 55: 1071-1081.
- COUTINHO L.L., REGITANO L.C.A. (2001) Introdução à Análise de Marcadores Moleculares. In: Regitano L.C.A., Coutinho, L. L. (eds.) *Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal*. 1. ed. Brasília-DF: Embrapa, p. 11-24.
- DALTON J.C., NADIR S., BAME J.H., NOFTSINGER M., SAACKE R.G. (2000) The effect of time of artificial insemination on fertilization status and embryo quality in superovulated cows. *J. Anim. Sci.* 78: 2081-5.
- DE LOOS F., VAN VILET C., VAN MAURIK P., KRUIP T.A. (1989) Morphology of immature bovine oocytes. *Gam. Res.* 24:197-204.
- ERLICH H.A., GELFAND D., SNINSKY J.J. (1990) Recent advances in the Polymerase Chain Reaction. *Science* 252: 1643-51.
- ENNIS S., GALLAGHER T.F. (1994) A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics* 25: 425-427.
- FORELL, F. (2001) *Produção in vitro, biópsia e sexagem de embriões bovinos*. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Porto Alegre - RS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, 75p.
- GARCIA J.F., NOGUEIRA M.F.G., PUPIM F., PANTANO T., VISINTIN J.A. (1997) Pregnancy rates of blastomere biopsied bovine embryos frozen in ethylene glycol. *Theriogenology* 47: 268.
- GARCIA J.F. (2001) Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. *Theriogenology* 56: 1393-1399.
- GILARD S.G.T., SÁ W.F., CAMARGO L.S.A., FERREIRA A.M., MACHADO M.A., SERAPIÃO R.V., SOARES A.B.M., PINHO T.G., VIANA J.H.M. (2004) Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 56(5): 623-627.

- GREENLEE A.R., KRISHER R.L., PLOTKA E.D. (1998) Rapid sexing of murine preimplantation embryos using a nested, multiplex polymerase chain reaction (PCR). *Molecular Reproduction and Development* 49: 261-267.
- HANDYSIDE A.H., PATTINSON J.K., PENKETH R.J., DELHANTY J.D., WINSTON R.M., TUDDENHAM E.G. (1989) Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. *Lancet*. 18; 1(8634): 347-349.
- HASEGAWA T., SATO F., ISHIDA N., FUKUSHIMA Y., MUKOYAMA H. (2000) Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. *J. Vet. Med. Sci.* 62(10): 1109-1110.
- HASLER J.F., CARDEY E., STOKES J.E., BREDBACKA P. (2002) Nonelectrophoretic PCR-sexing of bovine embryos in a commercial environment. *Theriogenology* 58: 1457-1469.
- HASSUN P.A., MELLO M.R.B., PORTO L.P.C., GARCIA J.F. (1999) Bovine embryo sexing by primer extension preamplification polymerase chain reaction (PEP-PCR). *Theriogenology* 51: 398.
- HERR C.M., REED K.C. (1991) Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. *Theriogenology* 35: 45-54.
- HIGUCHI R. (1989) Simple and rapid preparation of samples for PCR. In: Erlich, H.A. (ed.) *PCR technology: principles and applications for DNA amplification*. UK: Macmillan Publishers, p. 17-22.
- HOCHMAN D., ZARON Y., DEKEL I., FELDMESSER E., MEDRANO J.F., SHANI M., RON M. (1996) Multiple genotype analysis and sexing of IVF bovine embryos. *Theriogenology* 46: 1063-1075.
- HORNG Y-M., CHEN Y-T., WU C-P., JEA Y-S., HUANG M-C. (2004) Cloning of Taiwan water buffalo male-specific DNA sequence for sexing. *Theriogenology* 62: 1536-1543.

- KAGEYAMA S., YOSHIDA I., KAWAKURA K., CHIKUNI K. (2004) A novel repeated sequence located on the bovine Y chromosome: Its application to rapid and precise embryo sexing by PCR. *J. Vet. Med. Sci.* 66(5): 509-514.
- KIRKPATRICK B.W., MONSON R.L. (1993) Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IV. *Journal of Reproduction and Fertility* 98: 335-340.
- KUNIEDA T., XIAN M., KOBAYASHI E., IMAMICHI T., MORIWAKI K., TOYODA Y. (1992) Sexing of mouse preimplantation embryos by detection of Y chromosome-specific sequence using Polymerase Chain Reaction. *Biology of Reproduction* 46: 692-697.
- LATTANZI W., DI GIACOMO M.C., LENATO G.M., CHIMIEN G., VOGLINO G., RESTA N., PEPE G., GUANTI G. (2005) A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. *Hum. Genet.* 116: 395-401.
- LEE J.H., PARK J.H., LEE S.-H., PARK C.S., JIN D.I. (2004) Sexing using single blastomere derived from IVF bovine embryos by fluorescence in situ hybridization (FISH). *Theriogenology* 62: 1452-1458.
- LE MOS D.C., RIOS A.F.L., CAETANO L.C., LÔBO R.B., VILA R.A., MARTELLI L., TAKEUCHI P.L., RAMOS E.S. (2005) Use of the TSPY gene for sexing cattle. *Genetics and Molecular Biology* 28,1: 117-119.
- LEONI G., LEDDA S., BOGLIOLO L., NAITANA S. (2000) Novel approach to cell sampling from preimplantation ovine embryos and its potential use in embryonic genome analysis. *Journal of Reproduction and Fertility* 119: 309-314.
- LOPES R.F.F., SENNA J.P.M., CHIES J.M., RODRIGUES J.L. (1999) Pit-Stop PCR: An approach to increase final product yield of multiplex PCR. *Biotechniques* 26: 638-639.

- LOPES R.F.F., FORELL F., OLIVEIRA A.T.D., RODRIGUES J.L. (2001) Splitting and biopsy for bovine embryo sexing under field conditions. *Theriogenology* 56: 1383-1392.
- LU W., RAWLINGS N., ZHAO J., WANG H. (2007) Amplification and application of the HMG box of bovine SRY gene for sex determination. *Animal Reproduction Science* 100: 186-191.
- MACHÁTY Z., PÁLDI A., CSÁKI Z., VARGA I., KISS Z., BÁRÁNDI Z., VATJA G. (1993) Biopsy and sex determination by PCR of IVF bovine embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 98: 467-470.
- MARA L., PILICHI S., SANNA A., ACCARDO C., CHESSA B., CHESSA F., DATTENA M., BOMBOI G., CAPPAL P. (2004) Sexing of in vitro produced ovine embryos by duplex PCR. *Molecular Reproduction and Development* 69: 35-42.
- McCLIVE P.J., SINCLAIR A.H. (2001) Rapid DNA extraction and PCR-sexing of mouse embryos. *Molecular Reproduction and Development* 60: 225-226.
- McEVOY J.D. (1992) Alteration of sex ratio. *Animal Breeding Abstracts* 60: 97-111.
- MULLIS K.B., FALOONA F.A. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology* 155: 355-350.
- PARK J.H., LEE J.H., CHOI K.M., JOUNG S.Y., KIM J.Y., CHUNG G.M., JIN D.I., IM K.S. (2001) Rapid sexing of preimplantation bovine embryo using consecutive and multiplex polymerase chain reaction (PCR) with biopsied single blastomere. *Theriogenology* 55: 1843-1853.
- PEURA T., HYTTINEN J.-M., TURUNEN M., JÄNNE J. (1991) A Reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. *Theriogenology* 35: 547-555.
- PFEIFFER I., BRENIG B. (2005) X- and Y- chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and european red deer (*Cervus elaphus*). *BMC Genetics* 6: 16.

- PHUA A.C.Y., ABDULLAH R.B., MOHAMED Z.A. (2003) PCR-based sex determination method for possible application in caprine gender selection by simultaneous amplification of the SRY and Aml-X genes. *Journal of Reproduction and Development* 49: 307-311.
- POMP D., GOOD B.A., GEISERT R.D., CORBIN C.J., CONLEY A.J. (1995) 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.* 73: 1408-1415.
- RAY P.F., FRYDMAN N., ATTÍE T., HAMAMAH S., KERBRAT V., TACHDJIAN G., ROMANA S., VEKEMANS M., FRYDMAN R., MUNNICH A. (2002) Birth of healthy female twins after preimplantation genetic diagnosis of cystic fibrosis combined with gender determination. *Molecular Human Reproduction* 8: 688-694.
- REICHENBACH H-D., OLIVEIRA M.A.L., LIMA P.F., FILHO A.S.S., ANDRADE J.C.O. (2002) Marcadores Moleculares em Reprodução Animal. In: Gonsalves P.B.D., Figueiredo J.R., Freitas V.J.F. (eds.) *Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal*. São Paulo-SP: Varela Editora e Livraria, p. 127-177.
- ROSCHLAU K., ROSCHLAU D., ROSELIUS R., DEXNE U., MICHAELIS U., STREHL R., UNICKI P., RINK N. (1997) Over 5 years experience in sexing of bovine morulae and blastocysts during routine embryo transfer. *Theriogenology* 47: 273.
- SAIKI R.K., SCHARF S.J., FALOONA F., MULLIS K.B., HORN G.T., ERLICH H.A., ARNHEIM N. (1985) Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230: 1350-1354.
- SAIKI R.K., GELFAND D.H., STOFFEL S., SCHARF S.J., HIGUCHI R., HORN G.T., MULLIS K.B., ERLICH H.A. (1988) Primer-Directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.

- SATHASIVAM K., KAGEYAMA S., CHIKUNI K., NOTARIANNI E. (1995) Sex determination in the domestic pig by DNA amplification using the HMG-box sequence. *Animal Reproduction Science* 38: 321-326.
- SCHMOLL F., SCHELLANDER K. (1996) Sex determination of porcine embryos by restriction fragments length polymorphism analysis of ZFX/ZFY loci. *Theriogenology* 45: 255.
- SCHRÖEDER A., MILLER J.R., THOMSEN P.D., ROSCHLAU K., AVERY B., PAULSEN P.H., SCHMIDT M., SCHWERIN M. (1990) Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. *Anim. Biotechnology* 1: 121-133.
- SEIDEL JR. G.E. (2003) Economics of selecting for sex: the most important genetic trait. *Theriogenology* 59: 585-598.
- SHEA B.F. (1999) Determining the sex of bovine embryos using polymerase chain results: A six-year retrospective study. *Theriogenology* 51: 841-854.
- SINCLAIR A.H., BERTA P., PALMER M.S., HAWKINS R., GRIFFITHS B.L., SMITH M.J., FOSTER J.W., FRISCHAUF A., LOVELL-BADGE R., GOODFELLOW P.N. (1990) A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244.
- STEINLECHNER M., BERGER B., NIEDERSTÄTTER H., PARSON W. (2002) Rare failures in the amelogenin sex test. *Int. J. Legal Med.* 116: 117-120.
- THANGARAJ K., REDDY A.G., SINGH L. (2002) Is the amelogenin gene reliable for gender identification in forensic casework and prenatal diagnosis? *Int. J. Legal Med.* 116: 121-123.
- THIBIER M., NIBART M. (1995) The sexing of bovine embryos in the field. *Theriogenology* 43: 71-80.
- TOMINAGA K., HAMADA Y. (2004) Efficient production of sex-identified and cryosurvived bovine in-vitro produced blastocysts. *Theriogenology* 61: 1181-1191.

- VAN VLIET R.A., VERRINDER GIBBINS A.M., WALTON J.S. (1989) Livestock embryo sexing: a review of current methods with emphasis on Y-specific DNA probes. *Theriogenology* 32: 421-438.
- WEIKARD R., KÜHN C., BRUNNER R.M., ROSCHLAU D., PITRA C., LAURENT P., SHWERIN M. (2001) Sex determination in cattle based on simultaneous amplification of a new male-sequence specific DNA sequence and an autosomal locus using the same primers. *Molecular Reproduction and Development* 60: 13-19.
- WEIKARD R., PITRA C., KÜHN C. (2006) Amelogenin cross-amplification in the family Bovidae and its application for sex determination The sexing of bovine embryos in the field. *Molecular Reproduction and Development* 73 (10): 1333-7.
- YAMAUCHI K., HAMASAKI S., MIYAZAKI K., KIKUSUI T., TAKEUCHI Y., MORI Y. (2000) Sex determination based on fecal DNA analysis of the amelogenin gene in Sika Deer (*Cervus nippon*). *J. Vet. Med. Sci.* 62(6): 669-671.
- ZHANG L., CUI X., SCHMITT K., HUBERT R., NAVIDI W., ARNHEIM N. (1992) Whole genome amplification from a single cell: implications for genetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 5847-5851.

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)