

EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM CAPRINOS E OVINOS ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE PCR**

**RECIFE
2008**

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO

Edivaldo Rosas dos Santos Junior

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM CAPRINOS E OVINOS ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE PCR**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Ciência Veterinária como requisito
para obtenção do título de Mestre.**

UFRPE

Recife – PE, Brasil

2008

Ficha catalográfica

S237i Santos Júnior, Edivaldo Rosas dos
Identificação de sexo em caprinos e ovinos através da
técnica de PCR / Edivaldo Rosas dos Santos Júnior. --
2008.
41 f. : il.

Orientador : Áurea Wischral
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Univer-
sidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.390 824

1. Reprodução
2. Caprinos
3. Ovinos
4. Sexo
5. PCR
- I. Wischral, Áurea
- II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**IDENTIFICAÇÃO DO SEXO EM CAPRINOS E OVINOS ATRAVÉS DA
TÉCNICA DE PCR**

**Dissertação de Mestrado elaborada por
EDIVALDO ROSAS DOS SANTOS JUNIOR**

Aprovada em 12 de fevereiro de 2008

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Aurea Wischral
Orientadora**

Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

**Recife-PE
2008**

*“Caminante, no hay camino,
se hace camino al andar”*

Antônio Machado

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela força e coragem para seguir em frente e superar os obstáculos da vida.

Aos meus pais (Edivaldo e Leonair) pelo amor incondicional, que mesmo distantes fisicamente, não deixaram de se fazer presentes na minha vida.

Aos meus irmãos Brenda Rosas, Eduardo Rosas e Fabrícia Rosas e demais membros da família pelo amor, amizade, apoio nos momentos difíceis e celebrações nas conquistas.

À minha linda mulher (Elayne), mãe da minha amada filha (Letícia), pelo amor, compreensão e companheirismo que me deram suporte na trajetória final deste trabalho e dos quais ainda vou usufruir por muito tempo. Minha querida sogra (Socorro) por ter me acolhido como um filho.

À Profa. Áurea Wischral pela confiança, amizade, ensinamentos e paciência, elementos tão fundamentais para o desenvolvimento deste projeto.

Ao Prof. Manoel Adrião por ter me aceito em seu laboratório, pela amizade e dedicação nos momentos difíceis na bancada do FAMA.

Aos grandes amigos Arthur Nascimento, Cristiano Rocha, Filipe Gondim, Carlos André (Bigode), Maico Henrique, Noêmio, Ismael e Elyelson que fazem parte da minha vida pessoal e acadêmica, sempre compartilhando horas de alegria e de tristezas, tão importantes para a consolidação do caráter e perfil profissional adquirido.

Ao pessoal do FAMA : Glenda, Diogo, Adriano, Clarissa, Érica, Regina, Nathália, entre outros que por lá passaram e que contribuíram para a criação de um perfeito ambiente de trabalho.

Ao pessoal do laboratório de reprodução: Ricardo Chaves, Leopoldo, Pedro, Monteiro e André Mariano pelos conhecimentos científicos trocados e pela amizade. Ao corpo técnico da reprodução: Joana, Alcir e Dona Sônia.

A CAPES pela bolsa concedida e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste projeto.

RESUMO

A utilização de ferramentas moleculares na identificação do sexo genético permite ao produtor um melhor planejamento reprodutivo, elevando o valor dos animais avaliados e facilitando a coordenação de ações que visem racionalizar produção e lucratividade. Objetivou-se com o presente estudo determinar métodos que permitam a identificação do sexo genético das espécies caprina e ovina, utilizando diferentes concentrações de DNA (150, 100, 50, 1, 0,5, 0,2 e 0,1ng) extraído de sangue de ambos os sexos, como uma possibilidade de aplicação em exames embrionários pré-implantacionais, sexagem espermática e identificação do sexo em animais pseudo-hermafroditas. Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para o gene SRY (116pb) encontrado no cromossomo Y, para o gene Aml-X (300pb) encontrado no cromossomo X, além das seqüências correspondentes aos genes ZFX/ZFY que contêm 445 e 447pb respectivamente. A utilização destes métodos apresentou acurácia de 100% nas amostras de sangue caprino e ovino, com eficiência em quantidades de DNA de até 0,2ng (SRY e Aml-X) e 1,0ng (SRY e ZFX/ZFY), o que sugere a viabilidade da técnica para determinação sexual embrionária destas espécies.

ABSTRACT

The use of molecular biology in animal reproduction to identifying the sex genetic allows the producer has better reproductive planning, facilitating the coordination of actions aimed at rationalizing production and profitability. The objective of this study was to determine methods for the identification of the sex of the goats and sheep, using different concentrations of DNA (150, 100, 50, 1, 0.5, 0.2 and 0.1 ng) extracted from blood of both sexes, as a possibility for application in sexing embryos pre-implantating, sperm and animals pseudo-hermaphrodites. It was performed polymerase chain reaction (PCR) multiplex for the SRY gene (116bp) found in the Y chromosome, the gene for Aml-X (300pb) found on the X chromosome, in addition the sequences corresponding to genes ZFX / ZFY containing 445 and 447bp respectively. The use of these methods presented showed accuracy of 100% in samples of blood goat and sheep, in low concentrations, at least 0.2ng (SRY/Aml-X) and 1.0ng (SRY/ZFXZFY), which suggests the feasibility of the technique for determining sexual in these species.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Pág.

Figura 1- Produtos de PCR, a partir de amostras com 100ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes ao Aml-X (300pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3 e 4 as fêmeas e 5, 6, 7 e 8 os machos. A – espécie caprina. B – espécie ovina..... 29

Figura 2 - Produtos de amplificação, a partir de amostras com 0,1 ng de DNA, dos genes Aml-x (300pb) com ausência do SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3, e 4 fêmeas ovinas; 5, 6, 7 e 8 machos ovinos; 9, 10, 11 e 12 fêmeas caprinas e 13, 14, 15 e 16 machos caprinos..... 29

CAPÍTULO 2

Figura 1 – A - Produtos de PCR, a partir de amostras com 150ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes aos segmentos ZFX/ZFY (445/447/pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1 e 2 fêmeas ovinas, 3 e 4 fêmeas caprinas, 5 e 6 machos ovinos e 7 e 8 machos caprinos. B – Produtos de amplificação, a partir de amostras com 0,5ng de DNA não evidenciados..... 38

SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTO.....	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
INTRODUÇÃO.....	10
REVISÃO DE LITERATURA.....	10
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	17
CAPÍTULO 1	24
CAPÍTULO 2	33
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	41

1 INTRODUÇÃO

A caprinovinocultura representa um grande potencial para o desenvolvimento socioeconômico do país, no entanto. A organização do setor produtivo e a adoção de tecnologias que possam contribuir para a melhoria da produtividade dos rebanhos são fatores importantes para acelerar o crescimento desta atividade. Um dos marcos na análise de DNA nas áreas biológicas, entre elas a Medicina Veterinária, foi o desenvolvimento da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - reação em cadeia da polimerase). Como consequência do desenvolvimento desta técnica é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, entre eles a investigação de paternidade, detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da identificação do sexo genético. Considerando a pouca quantidade de material biológico disponível, para pesquisar o sexo em embriões ou espermatozoides, é necessário estabelecer um protocolo que seja seguro, com alta acurácia e que possa ser utilizado com a menor concentração de DNA possível. O DNA sanguíneo é facilmente obtido e pode ser utilizado neste estudo, principalmente devido ao fato do sexo dos animais ser conhecido, sem necessitar de contraprova para os testes. A utilização de ferramentas moleculares na sexagem embrionária ou espermática permite ao produtor um melhor planejamento tanto para adquirir quanto para comercializar animais do próprio rebanho, podendo, na dependência do resultado, elevar ou diminuir o valor dos animais avaliados e facilitar a coordenação de ações que visem racionalizar produção e lucratividade. Este trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a menor concentração de DNA que pode ser utilizada para amplificar regiões dos genes SRY, Aml-X, ZFX/ZFY em ovinos e caprinos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A exploração comercial de pequenos ruminantes domésticos pode contribuir para o desenvolvimento socioeconômico do País, desde que realizada de forma racional. A população brasileira caprina no ano de 2005 era de 10.306.722 cabeças, sendo que 9.542.910 deste efetivo está localizado na região Nordeste com 1.601.522 no Estado de Pernambuco. O rebanho ovino no Brasil possuía 15.588.041 sendo 9.109.668 na região Nordeste, dos quais 1.067.103 em Pernambuco (IBGE, 2006).

Apesar das limitações existentes, tem havido uma crescente demanda por parte da iniciativa privada, por biotécnicas da reprodução que visem à produtividade e a rentabilidade dos rebanhos e das unidades produtivas, agregando valor ao seu produto. Ressalte-se que a

organização e gestão da atividade, em consonância com os princípios do agronegócio e o uso de tecnologias, em regiões subdesenvolvidas ou em desenvolvimento, são muitas vezes penalizadas pela limitada capacidade de investimento do produtor, pelo baixo nível de aceitação e de adoção de tecnologias, bem como pelo pouco grau de instrução do cliente a ser beneficiado (SALLES et al., 2002).

Uma das primeiras biotécnicas desenvolvidas e disponíveis aos produtores foi a inseminação artificial (IA) que se constitui, sem dúvida, na ferramenta mais expressiva para a melhoria do potencial reprodutivo do rebanho. Além da IA, a transferência de embriões (TE), veio contribuir para melhorias do potencial produtivo (GONZALES e OLIVEIRA, 1991), permitindo a multiplicação rápida de indivíduos geneticamente superiores dentro de uma raça, favorecendo também, a redução do intervalo entre gerações por possibilitar a obtenção de embriões de fêmeas doadoras jovens, até mesmo púberes, como descrito por Majumbar et al. (1990) e Salles et al. (1998, 2000), na espécie caprina.

Com o desenvolvimento da TE, técnicas de criopreservação foram desenvolvidas para conservação por tempo indeterminado, mantendo-se a viabilidade do embrião pós-descongelamento, o que favorece a importação e exportação de germoplasmas, dispensando o transporte de animais e o período de quarentena, o que significa redução nos custos e riscos na aquisição de reprodutores. Além disso, destacam-se: a possibilidade da transferência de embriões para fêmeas em estro natural, sem a necessidade de sincronização artificial do estro e da ovulação da receptora; a preservação de embriões colhidos excedentes ao número de receptoras sincrônicas; a adequação da época de partos, independentemente da data da colheita de embriões; a formação de banco de germoplasma, objetivando a preservação de espécie e/ou raça em perigo de extinção e a comercialização, o transporte e disseminação de material genético entre produtores, regiões e países, com o mínimo de risco de introdução e/ou disseminação de doenças (SIMPLÍCIO et al., 2002).

O Brasil, especialmente a região Nordeste tem realizado importações de significativo número de embriões congelados, não só de caprinos, como também de ovinos, de raças especializadas para corte, provenientes da África do Sul (GUSMÃO et al., 2003). Sendo os machos com maior capacidade de ganho corporal e os que são destinados ao abate para obtenção de carcaça, o ideal, para a compra dos embriões ou doses de sêmen, seria saber com antecedência qual o sexo do produto.

A partir de 1910, com a descoberta dos cromossomos sexuais (X e Y), a pré-seleção do sexo seguiu uma direção científica, e ao longo dos anos muitos métodos foram testados e

sugeridos para a identificação do sexo genético (JOHNSON, 1994; HOSSEPIAN DE LIMA, 1998).

Em espermatozóides, até o momento, as técnicas que se baseiam na diferença do conteúdo de DNA, entre os espermatozóides X e Y, são as únicas validadas cientificamente e que podem separá-los eficientemente (JOHNSON, 1994).

A sexagem de espermatozóides, associada a programas de inseminação artificial ou fertilização *in vitro* de embriões, possui um mercado potencial atrativo para bovinos já que o Brasil possui o maior rebanho comercial bovino do mundo (196 milhões de cabeças). Atualmente, considera-se que o desenvolvimento de uma técnica para a sexagem de espermatozóides também beneficiará a reprodução assistida de espécies de animais ameaçados de extinção e animais de companhia (SEIDEL e JOHNSON, 1999). Cenário este que justifica a utilização desta biotécnica em pequenos ruminantes.

A análise da cabeça dos espermatozóides por microinterferometria demonstrou que os espermatozóides X contêm mais DNA e proteína nuclear que os espermatozóides Y e que esta diferença é proporcional à diferença de massa entre os dois tipos de células. Estimou-se que a diferença no conteúdo de DNA entre os espermatozóides X ou Y de bovinos resulta em uma diferença de densidade de pelo menos $7 \times 10^4 \text{ g/cm}^3$ ou 0,06% da densidade em relação a um espermatozóide X (WINDSOR et al., 1993; CHANDLER et al., 1999). Na tentativa de separação dos espermatozóides X e Y por centrifugação em gradiente de densidade utilizou-se Percoll (BLOTTNER et al., 1993 citados por HOSSEPIAN DE LIMA, 1998), e mais recentemente, o Iodixanol, obtendo-se resultados satisfatórios quanto ao desvio da proporção sexual e repetibilidade da técnica (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003).

Em bovinos, desenvolveu-se um processo de separação dos espermatozóides X ou Y em gradientes descontínuos de Percoll com acuidade de cerca de 73%. Quando utilizados para a produção *in vitro* de embriões, foram capazes de fecundar 75% dos oócitos, dos quais 30% desenvolveram-se até o estágio de blastocisto (HOSSEPIAN DE LIMA, 1998; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2000; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 2003). O aprimoramento deste método de centrifugação em gradiente descontínuo de Percoll e Iodixanol, principalmente no que se refere à reprodutibilidade, poderá facilitar a utilização comercial da sexagem de espermatozóides de caprinos e ovinos podendo ser utilizada a amplificação dos genes SRY, Aml-X e ZFX/ZFY como controle para essas técnicas.

Dentre as principais técnicas de biologia molecular aplicadas à reprodução animal, a sexagem de embriões vem se destacando e tem sido amplamente estudada (SCHORÖDER et

al., 1990; PEURA et al., 1991; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 1993; APPARAO et al., 1994; GARCIA, 2001) e utilizada principalmente para fins comerciais (NIVOT e LIEGEOIS, 1991; THIBIER e NIBART, 1995). Em 1989, foi realizada a primeira sexagem de embriões pré-implantados em humanos, utilizando a técnica da reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction – PCR) (HANDYSIDE et al., 1989).

A PCR é o método utilizado para amplificar uma seqüência selecionada de DNA que permite sintetizar em poucas horas milhões de cópias de uma seqüência específica de nucleotídeos da amostra inicial (SAIKI et al. 1988; CHAMPE e HARVEY, 1997). Como consequência do desenvolvimento desta técnica é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, através da análise do DNA, entre eles a investigação de paternidade, detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da identificação do sexo de embriões (GARCIA et al., 2003).

Apesar de invasivo, por requerer uma pequena amostra de células do embrião, a sexagem por PCR foi o primeiro diagnóstico pré-implantacional a ser realizado correntemente em embriões bovinos. Esta técnica possibilitou a identificação do sexo embrionário com alta especificidade (100%) e sensibilidade (entre 95 e 100%) (AASEN e MEDRANO, 1990; HERR et al., 1990; SCHORÖDER, et al., 1990; HERR e REED, 1991; PEURA et al., 1991; BONDIOLI, 1992; UTSUMI et al., 1992; KIRKPATRICK e MONSON, 1993; GARCIA et al., 1997).

Os métodos mais conhecidos envolvem a visualização de cromossomos sexuais a partir da realização do cariótipo (citogenética), ou a detecção de uma seqüência de DNA específica do cromossomo Y, após amplificação por PCR (LUZ et al., 2000).

O gene SRY (região sexo determinante do cromossomo Y), que é localizado próximo a região pseudo-autossômica na porção distal do braço curto do cromossomo Y, foi descoberto como sendo o regulador da formação de estruturas macho-específicas por Goodfellow et al. (1990). O SRY é um dos genes específicos para determinação sexual por codificar a enzima P₄₅₀ aromatase e a substância inibidora de Müller (MIS). A P₄₅₀ aromatase catalisa a conversão de testosterona para estradiol que, no embrião masculino, tem sua expressão reduzida. Reciprocamente, a MIS é expressa no embrião macho para induzir a diferenciação testicular e regressão das estruturas femininas (HAQQ et al., 1993).

São conhecidos vários outros genes importantes para determinação sexual dos mamíferos, como SOX9, AMH, WT1, SF1, DAX1 e DMRT1, por exemplo. Análises destes genes em humanos, usando ensaios *in vitro* com cobaias, revelaram que a determinação do

sexo é o resultado da interferência conjunta desses genes, onde a expressão de cada um resulta na determinação sexual, variando entre os vertebrados, mas tendo sua seqüência e modo de expressão conservados (MORRISH e SINCLAIR, 2002).

O gene amelo (AML gene) existente tanto no cromossomo X quanto no Y, também foi usado para identificar o sexo em bovinos (ENNIS e GALLAGHER, 1994) e em humanos (SULLIVAN et al., 1993). O polimorfismo observado entre o cromossomo X e Y para ovelha e o veado europeu evidenciaram resultados homólogos para as seqüências do gene Aml-X de 96% e 97% e para o Aml-Y de 86% e 90%, para ovelha e veado, respectivamente (PFEIFFER e BRENIG, 2005).

Bredbacka et al. (1995) utilizaram oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) específicos das regiões ZFX e ZFY para a identificação sexual em embriões bovinos, realizando a PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) com a enzima Pst I que cliva o produto correspondente ao cromossomo Y (ZFY) em dois fragmentos, contendo 344pb e 103pb cada, permanecendo o ZFX sem alterações. Pomp et al. (1995) ao estudarem a identificação sexual de mamíferos através de PCR utilizaram os genes ZFX/ZFY como controle positivo e dois desenhos de *primers* do SRY para pesquisa desta região do cromossomo Y, obtendo resultados positivos nas espécies estudadas, entre elas, caprinos e ovinos. Já Gutiérrez-Adán et al. (1997) usaram as regiões ZFX/ZFY como controle positivo para testar o marcador UcdO43 em embriões ovinos.

Em 1997, Makondo e colaboradores recorreram ao NESTED-PCR, o que consiste em uma dupla amplificação, sendo a primeira com *primers* ZFX/ZFY (*forward e reverse*) e a segunda com *primers* específicos para ZFX e para ZFY, visualizando o produto sem utilizar enzimas de restrição. A enzima Sac I foi utilizada em protocolos de NESTED-PCR de *primers* ZFX/ZFY por Kochhar et al. (2000) e El-Gayar e Holtz (2005).

Com relação à eficácia da sexagem embrionária por intermédio da PCR, um total de 110 embriões *Bos taurus* e *Bos indicus* foi submetido à micromanipulação para amostragem embrionária, tendo sido alcançado um índice de 89,8% de amplificações. A acuidade da técnica foi avaliada por meio de exame ultra-sonográfico das 44 prenhez obtidas, realizado aos 55 dias pós-transferência, onde foi observada uma confirmação de 100% de sexagem correta (GARCIA, 1995).

Em ovinos, foram realizadas biópsias de embriões produzidos através de fertilização *in vitro* para a realização de sexagem e em seguida a transferência destes embriões. Foi obtida uma taxa de prenhez de 60% com uma taxa de sobrevivência embrionária de 33%, mas a sexagem por PCR esteve correta em 100% dos carneiros nascidos (KOCHHAR, et al., 2000).

Em 2005, El-Gayar e Holtz dissecaram a zona pelúcida de 24 embriões caprinos e coletaram 5 a 10 blastômeros através de micromanipulação, os quais tiveram seu DNA extraído e amplificado por PCR, a sexagem foi correta em 21 (88%) embriões, pois houve a formação de bandas inespecíficas em dois embriões e no terceiro, o número de células do trofoblasto foi insuficiente devido a perdas ocorridas na manipulação.

A coleta de amostras embrionárias é uma técnica bastante delicada, pois pode comprometer a sua viabilidade, assim, muitos estudos foram conduzidos sem uma contra-prova do resultado obtido. Pomp et al. (1995) identificaram o sexo de embriões em suínos, bovinos, caprinos, ovinos, humanos, eqüinos, caninos, ratos, entre outras espécies, utilizando a técnica de PCR com acurácia de 100%. Luz et al. (2000) utilizaram embriões bovinos inteiros para realização de sexagem por meio da PCR e obtiveram uma taxa de 93,47% de ampliações.

Um outro método utilizado para sexagem de embriões a partir de biópsias é a citogenética, que é um método de visualização dos cromossomos metafásicos do núcleo e identificação do sexo genético após visualização do par sexual através de colorações convencionais (Giemsa, Orceína Acética, reativo de Schiff, hematoxilina/eosina, etc.) (GUERRA, 1988). A análise citogenética foi a primeira técnica pela qual se obtiveram nascimentos de coelhos, bezerros e cordeiros sexados (BETTERIDGE, 1989).

Embora apresente boa exatidão, atualmente esta técnica é pouco usada devido à sua baixa eficiência, que varia de 30% (COTINOT et al., 1991) a 70% (VAN VLIET et al., 1989) decorrente da necessidade de um alto número de células em divisão (10-15) e ao tempo relativamente longo para fazer a sexagem (9 a 14 horas para 12 a 15 embriões). Porém, pela sua precisão (normalmente de 100%) esta técnica é valiosa e continuará sendo usada como método controle para testar a exatidão de outros métodos de sexagem (VAN VLIET et al., 1989).

Entre as técnicas utilizadas para sexagem de embriões, como a cariotipagem ou cultivo de embriões com anticorpos anti-H-Y (AVERY, et al., 1992; GARCIA, 2001; HOSSEPIAN DE LIMA et al., 1993), a PCR destaca-se por ser a única que tem a possibilidade de 100% de acurácia na identificação do sexo (APPARAO et al., 1994), além de ser bastante rápida (SCHORÖDER et al., 1990), conferindo resultados de sexagem em até 5 horas após a biopsia embrionária sem necessidade de congelamento do embrião (THIBIER e NIBART, 1995).

Existem vários estudos que utilizam DNA genômico tendo o sangue como fonte de extração. Gutiérrez-Adán et al. (1997) e Phua et al. (2003) utilizaram DNA a partir de amostras sangüíneas para a realização de pesquisa sobre sexagem em ovinos e em caprinos,

respectivamente. Dentre os métodos usualmente empregados na extração de DNA, o brometo de cetil-trimetil amônio (CTAB) é muito aplicado em tecidos vegetais e a outros materiais biológicos como sêmen, sangue, folículo piloso e tecidos orgânicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998; SOLLÉRO et al., 2004), constituindo assim alternativa prática e viável em laboratórios de biologia molecular.

A amplificação de genes que possam identificar o sexo do indivíduo também representa uma ferramenta molecular para a descoberta do sexo genético em indivíduos pseudo-hermafroditas ou em casos de insensibilidade completa aos andrógenos como exposto por Corrêa et al. (2005).

REFERÊNCIAS

AASEN, E.; MEDRANO, J. F. Amplification of the ZFX and ZFY genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. **Bio/Technology**, New York, v.8, p. 1279-81, 1990.

APPARAO, K.C.B., TONEY, S. M., PAWSHE, C. H. Biopsy of indian zebu and crossbred cattle preimplantation embryos and sexing by polymerase chain reaction. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v. 34, p. 209-16, 1994.

AVERY, B. et al. Morphological development and sex of in-vitro fertilized embryos. **Molecular Reproduction and Development**, New York, v. 32, p. 256-70, 1992.

BETTERIDGE, K. J. Livestock embryo sexing: past, present and future. In: WACHTEL, S. S. (Ed.) **Evolutionary mechanisms in sex determination**. Boca Raton: CRC Press, 1989. p. 279-289.

BONDIOLI, KR. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.2, p. 19-29, 1992. Supplement.

BREDBACKA, P.; KANKAANPÄÄ, A.; PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v.44, p.167-176, 1995.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas 1997. 446 p.

CHANDLER, J. E. et al. Bovine spermatozoal head size variation and evaluation of a separation technique based on this size. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 6, p. 1021-1034, 1999.

CORRÊA, R. V. et al. Insensibilidade completa aos andrógenos em pacientes brasileiras causada pela mutação P766A no gene do receptor androgênico. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, São Paulo, v. 49, n. 1, p. 98-102, 2005.

COTINOT, C.; GIANQUINTO, L.; FELLOUS, M. Le déterminisme du sexe : son contrôle génétique. In: THIBAUT, C.; LEVASSEUR, M. C.; (Ed.). **La reproduction chez les mammifères et l'homme**. Paris: Ellipses, 1991. p. 205-219.

EL-GAYAR, M.; HOLTZ, W. Transfer of sexed caprine blastocysts freshly collect or derived from cultured morulae. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.57, n. 2/3, p.151-156, March, 2005.

ENNIS, S.; GALLAGHER, T. F. A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetics**, Oxford, v.25, p. 425-427, 1994.

FERREIRA, M.E.; GRATAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, 1998. 220p.

GARCIA, J. F. Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR ("Polymerase Chain Reaction") de embriões bovinos. 1995. 76 f. **Tese** (Doutorado em Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCIA, J. F. et al. Pregnancy rates of blastomere biopsed bovine embryos frozen in ethylene glycol. **Theriogenology**, Stoneham, v. 47, n. 1, p. 268, 1997.

GARCIA, J. F. Practical considerations of embryo manipulation: preimplantation genetic typing. **Theriogenology**, Stoneham, v.56, p. 1393-1399, 2001

GARCIA, J. F.; AVELAR, G. A.; DIAS, F. E. F. Aplicação de tecnologias de análise genética no diagnóstico em Medicina Veterinária. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 5., 2003, Recife. **Anais...** [S.l.: s.n.], 2003. p.100-103.

GONZALES, C. I. M.; OLIVEIRA, V. S. Técnicas para incrementar a eficiência reprodutiva de caprinos e ovinos. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, 18., 1991, João Pessoa. **Anais...** João Pessoa: [s.n.] 1991. p. 71-102.

GOODFELLOW, P. et al. A gene mapping to sex-determining region of the mouse Y cromossome is a novel family of embrionically expressed genes. **Nature**, London, v. 346, p.245-250, 1990.

GUERRA, M. **Introdução à citogenética geral**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,1988. p. 142.

GUSMÃO, A. L. et al. Colheita, avaliação e criopreservação de embriões caprinos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 27, n. 2, p. 115-119, 2003.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Ovine-specific Y-cromossome RADP-SCAR marker for embryo sexing. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p. 135-138, 1997.

HAQQ, C. M. et al. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **Biochemistry**, New York. v. 90, pp. 1097-1101, 1993.

HANDYSIDE, A. H.; PENKETH, R. J. A.; WINSTON, R. M. L. Biopsy of human preimplantation embryos and sexing by DNA amplification. **Lancet**, London,v. 18, p. 347-49, 1989.

HERR, C. M. et al. Sex of progeny from bovine embryos sexed with a rapid Y-cromossome – detection assay. **Theriogenology**, Stoneham, v.33, n.1, p.247, 1990.

HERR, C. M.; REED KC. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p.7-17, 1991.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Seleção do sexo em espermatozoides bovinos por centrifugação em gradiente de densidade. 1998. 89f. **Tese** (Doutorado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M. et al. Sex determination of murine and bovine embryos using cytotoxicity and immunofluorescence assays. **Theriogenology**, Stoneham, v. 39, p. 1343-52, 1993.

HOSSEPIAN DE LIMA, V. F. M.; MOREIRA-FILHO, C. A.; RAMALHO, M. F. P. D.-T. Processo de seleção do sexo de espermatozoides mamíferos e métodos de controle de qualidade de doses de sêmen sexado congelado. FAPESP/UNESP/USP, 2003.

HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. et al. Separation of X- and Y-bearing bovine spermatozoa by Percoll density gradient centrifugation. **Theriogenology**, Stoneham, v. 53, n. 1, p. 480, 2000.

IBGE. Sistema IBGE de recuperação automática. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/tabela/>> . Acesso em: 05 nov. 2007.

KIRKPATRICK, B. W.; MONSON, R. L. Sensitive sex determination assay applicable to bovine embryos derived from IVM and IVF. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v.98, p. 335-40, 1993.

KOCHHAR, H. S. et al. Production of sexed lambs after biopsy of ovine blastocysts produced in vitro. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.41, p. 398-400, 2000.

JOHNSON, L.A. Isolation of X- and Y-bearing sperm for sex preselection. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, Oxford, v.16, p.303-326, 1994.

LUZ, M. R. et al. Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro pela técnica de PCR multiplex. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000600006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 Feb 2008. doi: 10.1590/S1413-95962000000600006

MAKONDO, K. et al. Use of the polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 49, p. 125-133, 1997.

MAJUMBAR, A.; MOGHA, I. V.; ANSARJ, M. R. Successful superovulation in prepubertal Barbari goats. **Indian Journal Sciences**, New Delhi, v. 60, n. 11, p. 1304-1306, 1990.

MORRISH, B.C.; SINCLAIR, A.H. Vertebrate sex determination: any means to an end. **Reproduction. Society for Reproduction and Fertility**, North Yorkshire, v.124, p.447-457, 2002.

NIVOT, A.; LIEGEOIS, L. One year's results using bovine embryo sexing process in France and Europe. In: **REUNION A. E. T. E.**, Cambridge, 1991. Reunion, v. 7, p. 180.

PEURA, T. et al. A reliable sex determination assay for bovine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, Stoneham, v. 35, n. 3, p. 547-55, 1991.

PFEIFFER, I.; BRENIG, B. 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**. v.6, n.16. 2005.

PHUA, A. C. Y.; ABDULLAH, R. B.; MOHAMED, Z. A 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**, Tokyo. v. 49, n. 4, p. 307-311, 2003.

POMP, D. et al. Sex identification in mammals with Polymerase Chain Reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or 11 pig embryos. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.73, p. 1408-1415, 1995.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, v. 239, p.487-491, 1988.

SALLES, H. O., SIMPLÍCIO, A. A., SANTOS, D. O. Embryo viability after induction or synchronization in prepubertal and pubertal female goats. In: SCIENTIFIC MEETING OF EUROPEAN EMBRYO TRANSFER ASSOCIATION (AETE), 11., 1998. Veneza, **Proceedings...**Veneza: **AETE**, 1998. p.240.

SALLES, H. O.; SANTOS, D. O.; SIMPLÍCIO, A. A. Superovulação em fêmeas caprinas pré-púberes e púberes da raça Anglo-nubiana. **Ciência Animal**, Fortaleza, v. 10, n. 1, p. 137-138, 2000. Supplement.

SALLES, H. O. et al. **Manual de transferência de embriões em caprinos**. Sobral: Embrapa Caprinos, 2002. p.64 (Embrapa Caprinos. Documentos, 40) 2002.

SCHORÖDER, A. et al. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, New York, v. 1, p. 121-33, 1990.

SEIDEL Jr., G.E.; JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm – overview. **Theriogenology**, Stoneham, v. 52, n. 8, p. 1267-1272, 1999.

SIMPLÍCIO, A. A.; SALLES, H. O.; SANTOS, D. O. Transferência de embriões nos pequenos ruminantes domésticos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v. 5, p. 17-25, out. 2002. Supplement

SOLLÉRO, B.P.; FARIA D.A.; PAIVA, S.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PAIXÃO, D.M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 2004, Brasília. **Anais...** Brasília, DF : Associação Brasileira de Zootecnistas, 2004. v. CD. p. 1-4.

SULLIVAN, K. M. et al. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. **Biotechniques**, Natick, v.15, p. 636-641, 1993.

THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 71-80, 1995.

UTSUMI, K. et al. Sexing of bovine embryos by polymerase chain reaction using Y-specific DNA as primer. In: INTERNATIONAL CONGRESS ON ANIMAL REPRODUCTION, 12., 1992, The Hague. **Anais...** The Hague: [s.n.], 1992. p.757-759.

VAN VLIET, R. A.; GIBBINS, A.M.V.; WALTON, J. S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y-specific DNA probes. **Theriogenology**, Los Altos, v.32, p.421-438, 1989.

WINDSOR, D. P.; EVANS, G.; WHITE, I. G. Sex predetermination by separation of X and Y chromosome-bearing sperm: a review. **Molecular Reproduction and Development**, New York, US, v. 5, p.155-171, 1993.

CAPÍTULO 1

IDENTIFICAÇÃO DO SEXO UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR COMO POSSÍVEL
MÉTODO DE APLICAÇÃO A EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS ATRAVÉS DA
AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SRY E AML-X

IDENTIFICAÇÃO DO SEXO UTILIZANDO A TÉCNICA DE PCR COMO POSSÍVEL
MÉTODO DE APLICAÇÃO A EMBRIÕES CAPRINOS E OVINOS ATRAVÉS DA
AMPLIFICAÇÃO DOS GENES SRY E AMELO-X *

Edivaldo Rosas dos SANTOS JUNIOR^a, Arthur Nascimento de MELO^a, Manoel ADRIÃO^b,
Áurea WISCHRAL^c

^a Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE. edivaldorosas@gmail.com

^b Prof. Adjunto, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

^c Prof. Adjunto, Depto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco,
UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n CEP - 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

Dentre as principais técnicas de biologia molecular aplicadas à reprodução animal, a sexagem de embriões vem se destacando e tem sido amplamente estudada e utilizada principalmente para fins comerciais. Objetivou-se com o presente estudo determinar um método através do qual fosse possível a identificação do sexo genético das espécies caprina e ovina, utilizando diferentes concentrações de DNA extraído de sangue de ambos os sexos, como uma possibilidade de aplicação em exames embrionários pré-implantacionais. Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para o gene SRY (116pb) encontrado no cromossomo Y e para o gene Aml-X (300pb) encontrado no cromossomo X. O uso desta técnica apresentou acurácia de 100% nas amostras de DNA sanguíneo de caprino e ovino, com a quantidade mínima de 0,2ng de DNA, o que sugere a viabilidade da técnica para identificação sexual embrionária destas espécies.

Palavras-chaves: sexagem, extração, multiplex, pequenos ruminantes.

SUMMARY

Polymerase chain reaction is the most sensitive, accurate, rapid and reliable method at date for sex determination. In this study, a PCR-based sex determination method for potential application in small ruminant was developed. Primers were designed to amplify a portion of the X amelogenin gene (Aml-X) on the chromosome X to give a 300bp product and SRY gene on the Y chromosome to give a 116bp product. PCR was performed using different

* Formatado conforme a revista Ciência Animal Brasileira

concentrations of DNA extracted from blood of male and female caprines and ovines. The multiplex reaction showed 100% concordance in both species, and was possible amplify of 0.2ng of DNA at least.

Key words: small ruminants, sex determination, multiplex.

INTRODUÇÃO

Dentre a aplicação de novas tecnologias, a análise de DNA tem se intensificado bastante nos últimos anos, e o desenvolvimento do método de reação em cadeia da polimerase (Polymerase Chain Reaction - PCR) tem sido largamente empregado nas áreas biológicas. Na reprodução animal, a reação em cadeia da polimerase oferece a possibilidade de identificar o sexo da descendência oferecendo vantagens de ordem prática e econômica para a indústria de produção animal (BONDIOLI, 1992).

A descoberta da técnica da PCR por SAIKI et al. (1988) motivou os primeiros estudos direcionados à identificação do sexo de embriões bovinos (SCHORÖDER et al., 1990; HERR e REED, 1991) visando sua exploração comercial (THIBIER e NIBART, 1995).

O uso da PCR para identificação do sexo de embriões baseia-se na multiplicação artificial de pequenas regiões conhecidas de DNA, exclusivas do cromossomo Y, potencialmente presentes nas células da amostra. O propósito de multiplicá-las objetiva torná-las facilmente detectáveis por meio de um corante fluorescente para DNA. A multiplicação é obtida usando uma enzima polimerase e um par de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (BONDIOLI, 1992).

Os segmentos alvos de amplificação para determinação de fragmentos cromossômicos específicos incluem o SRY, que está localizado na fração longa do braço do cromossomo Y, e o Aml-X encontrado no cromossomo X. A possibilidade de uma amplificação simultânea de seqüências correspondentes de ambos os cromossomos permite a sua utilização como método eficiente e reproduzível de se identificar o sexo através do uso de PCR (PHUA et al., 2003).

Este trabalho foi realizado com o objetivo de identificar a menor concentração de DNA que pode ser utilizada em PCR multiplex para a sexagem usando os genes SRY e Aml-X, além de testar a aplicação desta técnica em ovinos, com os mesmos *primers* específicos para caprinos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostras de sangue e extração de DNA

O sangue foi obtido de animais SRD oriundos de abatedouro privado no município de Igarassu – PE. Foram coletadas amostras de 40 animais de cada espécie, sendo 20 machos e 20 fêmeas em tubos contendo EDTA.

As análises de DNA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA/DMFA/UFRPE. O DNA foi extraído utilizando CTAB (Brometo de etiltrimetilamônio)¹ a 10% segundo SOLLÉRO et al. (2004) modificado. Neste procedimento foram utilizados 200µl de sangue total adicionados a 500µl da solução de CTAB a 10% que foram homogeneizados, postos em banho-maria a 65° C por 60 minutos e centrifugados a 15.800g por 10 minutos. Após esse período o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 µl de clorofórmio² : álcool isoamílico³ (24:1), homogeneizados e centrifugados a 15.800g por 15 minutos. Logo após essa etapa o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 250 µl de isopropanol⁴ e mantido em freezer a -20° C por 30 minutos, em seguida centrifugado a 15.800g por 30 minutos, descartado o sobrenadante e o precipitado de DNA, formado no interior do tubo, lavado com 1ml de etanol a 70 e a 100% em centrifugações de 15.800g por dois minutos. Após essa etapa o sedimento foi secado em temperatura ambiente, ressuspenso com água ultra-pura e armazenado em freezer -20° C até o momento da amplificação.

Quantificação e Amplificação do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro⁵ (a 260-280 nm) e com base nas concentrações obtidas, as amostras foram diluídas para conter 100, 50, 01, 0,5, 0,2 e 0,1ng de DNA para cada µl de água ultra-pura.

No processo de PCR, foram amplificadas as seqüências correspondentes ao genes SRY e Aml-X (PHUA et al., 2003). Para cada amostra, a PCR multiplex foi realizado em um volume final de 25µl contendo 1,5mM de MgCl₂, 10pmoles de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 1U de Taq-polimerase⁶, tampão 1X PCR (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂), 1,0µL de DNA e completado o volume com água ultra-pura.

O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 34 ciclos de 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por um minuto; com uma extensão de 72°C por 7 minutos no final do ciclo (PHUA et al., 2003). Nas

¹ Vetec Química Fina LTDA.

² Merck KGaA.

³ Merck KGaA.

⁴ Merck KGaA.

⁵ Eppendorf Mastercycler personal.

⁶ Ludwig Biotec.

amostras de ovinos foi utilizado o mesmo protocolo supracitado, com modificação na concentração do $MgCl_2$ para 3mM.

Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2%, corado com Brometo de etídeo, visualizados em transluminador UV e comparados com marcador de 50pb DNA *ladder* (Invitrogen, USA).

Seqüência dos oligonucleotídeos

Os *primers* utilizados neste experimento seguiram o desenho de PHUA et al. (2003) Aml-X *forward*: 5' CAGTAGCTCCAGCTCCAGCT 3', *reverse*: 5' GTGCATCCCTTCATTGGC 3'; SRY *forward*: 5' ATGAATAGAACGGTGCAATCG 3', *reverse*: 5' GAAGAGGTTTTCCCAAAGGC 3', onde a seqüência correspondente ao gene SRY apresenta produto com 116pb e a do Aml-X apresenta 300pb.

RESULTADOS

Após a extração de DNA, a quantificação das amostras apresentou variadas concentrações, sendo submetidas às diluições com o objetivo de estabelecer um gradiente no qual fosse possível identificar a menor concentração de DNA em que a técnica testada apresentasse eficiência na sexagem.

Os produtos obtidos pela amplificação das seqüências correspondentes aos genes SRY e Aml-X apresentaram tamanho de 116pb e 300pb respectivamente. As amostras oriundas de machos caprinos apresentaram duas bandas, as quais correspondem uma ao segmento sexual e a outra ao controle, enquanto as fêmeas caprinas apresentaram apenas a seqüência controle na PCR multiplex. As amostras obtidas de ovinos adultos não apresentaram distinção dos produtos da amplificação do DNA caprino.

As amostras de animais machos da espécie caprina apresentaram bandas mais fracas quando comparadas às fêmeas da mesma espécie, fato que pode sugerir uma interferência na amplificação dos produtos relativos ao gene SRY (Figura 1A), resultado diferente do encontrado em ovinos (Figura 1B).

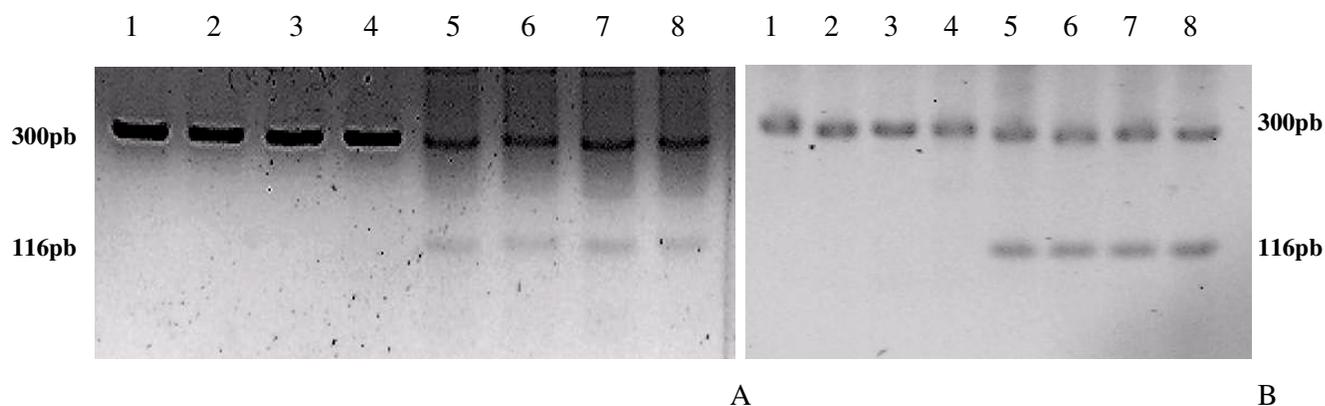


Figura 1 - Produtos de PCR, a partir de amostras com 100ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes ao Aml-X (300pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3 e 4 as fêmeas e 5, 6, 7 e 8 os machos. A – espécie caprina. B – espécie ovina.

As amostras com 0,1ng de DNA não obtiveram produto de amplificação correspondente ao gene SRY, porém o Aml-X ainda continuou a ser visualizado nesta concentração em ambas as espécies (Figura 2).

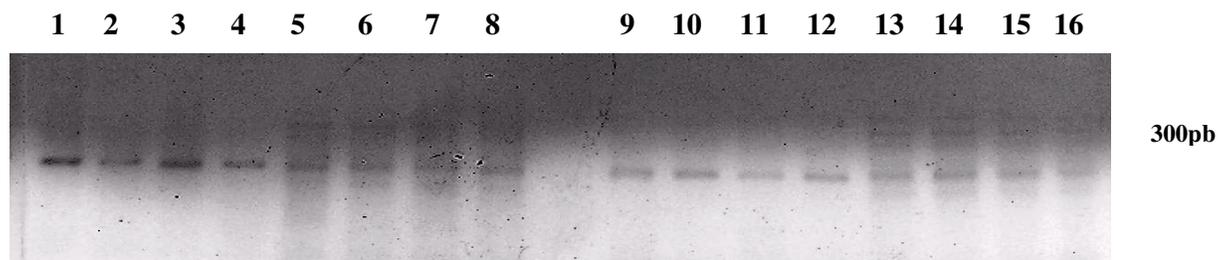


Figura 2 – Produtos de amplificação, a partir de amostras com 0,1 ng de DNA, dos genes Aml-X (300pb) com ausência do SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3, e 4 fêmeas ovinas; 5, 6, 7 e 8 machos ovinos; 9, 10, 11 e 12 fêmeas caprinas e 13, 14, 15 e 16 machos caprinos.

DISCUSSÃO

O recurso da reação em cadeia da polimerase para fins reprodutivos encontra-se amplamente difundido e vem apresentando resultados positivos em várias espécies de mamíferos explorados comercialmente segundo BONDIOLI (1992). Este cenário mundial tem impulsionado a utilização da biologia molecular na reprodução animal, como uma

alternativa de incrementar a produtividade e aproveitar todos os benefícios que uma sexagem embrionária possa acarretar ao criador.

A extração de DNA a partir de sangue total utilizando modificações no protocolo de SOLLÉRO et al. (2004) com CTAB a 10% apresentou o resultado esperado. O CTAB é muito aplicado em tecidos vegetais e em outros materiais biológicos como sêmen, sangue, folículo piloso e tecidos orgânicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998), constituindo assim alternativa prática e viável para extração de DNA sanguíneo em laboratórios de biologia molecular.

Esta pesquisa demonstrou a acurácia e a reprodutibilidade da técnica de PCR multiplex na identificação do sexo genético na espécie caprina, além de configurar uma possível aplicação para diagnóstico embrionário pré-implantacional como descrito por PHUA et al. (2003). A utilização deste método em DNA ovino extraído de sangue total demonstrou igual sucesso, apesar das modificações na concentração de magnésio (1,5mM, 2,0 mM, 2,5mM, 3,0mM, 3,5mM e 4,0mM de $MgCl_2$) realizadas no decorrer do experimento, sendo 3,0mM a concentração com melhor resultado. Este resultado sugere a homologia entre ovinos e caprinos no que diz respeito aos genes SRY e Aml-X, uma vez que a mesma seqüência de oligonucleotídeos foi eficiente para amplificar os genes nas duas espécies estudadas.

No presente estudo, nas amostras de DNA com concentrações superiores a 0,2ng foi possível a amplificação dos genes Aml-X e SRY. As amostras com 0,1ng apresentaram produto correspondente ao Aml-X, porém sem SRY, divergindo assim de PHUA et al. (2003) que não conseguiram amplificação do Aml-X em quantidade abaixo de 0,2ng de DNA.

As amostras do sexo masculino apresentaram uma interferência aparente, sob a forma de bandas fracas, do oligonucleotídeo autossômico na amplificação do gene encontrado no cromossomo Y em concentrações de DNA menores ou iguais a 100ng em caprinos, porém em ovinos esta interferência só pode ser constatada em concentrações abaixo de 0,2ng. Estes achados contrariam os de PHUA et al. (2003) que não encontraram esta suposta interferência ao trabalhar com SRY e Aml-X em DNA sanguíneo de caprinos .

A situação atual da sexagem embrionária em bovinos confere boas expectativas na implementação da técnica em caprinos e ovinos no que diz respeito ao aspecto científico e ao seu aproveitamento comercial.

CONCLUSÃO

A realização de PCR multiplex para identificação sexual em pequenos ruminantes é de fácil execução e de alta acurácia, o que sugere uma possibilidade de aplicação em amostras com baixa concentração de DNA como biópsia embrionária. Desta forma, esta ferramenta molecular poderá trazer benefícios ao criador e ao melhoramento genético deste segmento produtivo.

REFERÊNCIAS

BONDIOLI, KR. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. **Journal of Animal Science**, Champaign, v.70, n. 2, p. 19-29, 1992. Supplement.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética**. Brasília: Embrapa: recursos genéticos e biotecnologia. 1998. 220p.

HERR, C. M.; REED, K.C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination. **Theriogenology**, Stoneham, v.21, n.1, p.7-17, 1991.

PHUA, A. C. Y.; ABDULLAH, R. B.; MOHAMED, Z. A 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**, Tokyo. v. 49, n. 4, p. 307-311, 2003.

SAIKI, R. K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science**, London, v. 239, p.487-491, 1988.

SCHORÖDER, A. et al. Sex determination of bovine embryos using the polymerase chain reaction. **Animal Biotechnology**, New York, v. 1, p. 121-33, 1990.

SOLLÉRO, B.P.; FARIA D.A.; PAIVA, S.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PAIXÃO, D.M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 2004, Brasília. **Anais...** Brasília, DF : Associação Brasileira de Zootecistas, 2004. v. CD. p. 1-4.

THIBIER, M.; NIBART, M. The sexing of bovine embryos in the field. **Theriogenology**, Stoneham, v. 43, p. 71-80, 1995.

CAPÍTULO 2

MÉTODO PARA SEXAGEM DAS ESPÉCIES CAPRINA E OVINA UTILIZANDO PCR
NA AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS REFERENTES AO SRY E ZFX/ZFY

MÉTODO PARA SEXAGEM DAS ESPÉCIES CAPRINA E OVINA UTILIZANDO PCR NA AMPLIFICAÇÃO DAS SEQUÊNCIAS REFERENTES AO SRY E ZFX/ZFY*

Edivaldo Rosas dos SANTOS JUNIOR^a, Arthur Nascimento de MELO^a, Manoel ADRIÃO^b,
Áurea WISCHRAL^c

^a Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE. edivaldorosas@gmail.com

^b Prof. Adjunto, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE.

^c Prof. Adjunto, Depto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n CEP - 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

O avanço da caprinovinocultura tem impulsionado o surgimento de ferramentas moleculares que venham a aperfeiçoar o manejo reprodutivo e aumentar a produtividade deste segmento da pecuária. Objetivou-se com o presente estudo determinar um método através do qual seja possível a identificação do sexo genético das espécies caprina e ovina, utilizando diferentes concentrações de DNA extraído de sangue de ambos os sexos. Foram realizadas reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex com o gene SRY (116pb) encontrado no cromossomo Y e as regiões ZFX/ZFY (445/447pb) foram utilizadas como controle. O uso desta técnica apresentou acurácia de 100% nas amostras de sangue caprino e ovino, em quantidade mínima de 1ng de DNA, o que sugere a viabilidade da técnica para identificação sexual destas espécies.

Palavras-chaves: sexagem, extração, multiplex, pequenos ruminantes.

SUMMARY

The progress of small ruminant livestock has driven the emergence of molecular tools that will improve the reproductive management and increase the productivity of this segment. The objective of the present study was to determine a method by which it is possible to identify the sex of the caprine and ovine species, using different concentrations of DNA extracted from blood of both sexes. Were performed polymerase chain reaction (PCR) multiplex with the gene SRY (116bp) found in the chromosome Y and ZFX / ZFY (445/447bp) were used as control. This technique presented accuracy of 100% in blood

* Formatado conforme a revista Ciência Animal Brasileira

samples of goats and sheep, contend 1ng of DNA, which suggests the feasibility of this method for determining sex of both species.

Key words: small ruminants, sex determination, multiplex.

INTRODUÇÃO

A caprinocultura, bem como a ovinocultura, representa um grande potencial para o desenvolvimento socioeconômico do País, no entanto, a organização do setor produtivo e a adoção de tecnologias que possam contribuir para a melhoria da produtividade dos rebanhos são fatores importantes para acelerar o crescimento desta atividade.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) é o método utilizado para amplificar uma seqüência selecionada de DNA que permite sintetizar em poucas horas de milhões de cópias de uma seqüência de nucleotídeos específica, podendo amplificar a seqüência-alvo com menos de uma parte em um milhão da amostra inicial (CHAMPE e HARVEY, 1997). Como consequência do desenvolvimento desta técnica é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, entre eles a investigação de paternidade, detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da identificação do sexo, tudo isso através da análise do DNA (GARCIA, et al., 2003).

BREDBACKA et al. (1995) utilizaram *primers* que amplificam as regiões ZFX e ZFY para a identificação sexual em embriões bovinos, realizando um PCR-RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) com a enzima Pst I que digere o produto correspondente ao cromossomo Y (ZFY) em dois fragmentos contendo 344pb e 103pb cada, permanecendo o ZFX sem alterações. POMP et al. (1995) ao estudar a identificação sexual de mamíferos através de PCR utilizaram os genes ZFX/ZFY como controle positivo e dois desenhos de SRY para pesquisa desta região do cromossomo Y, obtendo resultados positivos nas espécies estudadas, entre elas, caprinos e ovinos. Já GUTIÉRREZ-ADÁN et al. (1997) usaram as regiões ZFX/ZFY como controle positivo para testar o marcador UcdO43 em embriões ovinos.

Em 1997, MAKONDO e colaboradores recorreram ao NESTED-PCR, o que consiste em uma dupla amplificação, sendo a primeira com *primers* ZFX/ZFY (*forward e reverse*) e a segunda com *primers* específicos para ZFX e para ZFY, visualizando o produto sem utilizar enzimas de restrição. A enzima Sac I foi utilizada em protocolos de NESTED-PCR com *primers* ZFX/ZFY por KOCHHAR et al (2000) e EL-GAYAR e HOLTZ (2005).

Com o presente estudo objetivamos testar a eficácia da sexagem por PCR, baseada nos genes SRY e ZFX/ZFY em sangue de caprinos e ovinos, em diferentes concentrações de DNA.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de sangue e extração de DNA

O sangue foi obtido de animais sem raça definida oriundos de abatedouro privado no município de Igarassu – PE. Foram coletadas amostras de 40 animais de cada espécie, sendo 20 machos e 20 fêmeas em tubos contendo EDTA.

As análises de DNA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA/DMFA/UFRPE. O DNA foi extraído utilizando CTAB (Brometo de etiltrimetilamônio)¹ a 10% segundo SOLLÉRO et al. (2004) modificado. Neste procedimento foram utilizados 200µl de sangue total adicionados a 500µl da solução de CTAB a 10% em micro-tubo graduado de 1,5ml, homogeneizados, postos em banho-maria a 65° C por 60 minutos e centrifugados a 15.800g por 10 minutos. Após esse período o sobrenadante encontrado foi transferido para um novo tubo contendo 500 µl de clorofórmio²: álcool isoamílico³ (24:1), homogeneizados e centrifugados a 15.800g por 15 minutos, logo após essa etapa o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 250 µl de isopropanol⁴. A mistura foi mantida a -20° C por 30 minutos, em seguida centrifugada a 15.800g por 30 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet de DNA, formado no interior do tubo foi lavado com 1ml de etanol⁵ a 70 e a 100% numa centrifugação de 15.800g por dois minutos. Após essa etapa o pellet foi secado em temperatura ambiente, ressuscitado com água ultra-pura e armazenado -20° C até o momento da amplificação.

Quantificação e amplificação do DNA

A quantificação das amostras de DNA foi realizada em espectrofotômetro⁶, a 260-280nm, e com base nas concentrações obtidas as amostras foram diluídas em água ultra-pura formando grupos de 150, 100, 50, 01, 0.5, 0.2 e 0.1ng/µl.

¹ Vetec Química Fina LTDA.

² Merck KGaA.

³ Merck KGaA.

⁴ Merck KGaA.

⁵ Merck KGaA.

⁶ Eppendorf Mastercycler personal.

No processo de PCR, foram amplificadas as seqüências correspondentes ao genes SRY e ZFX/ZFY. Para cada amostra, o PCR multiplex foi realizado em um volume final de 25µl contendo 1,5mM de MgCl₂, 10pmoles de cada *primer*, 200µM de cada dNTP, 1U de Taq-polimerase⁷, tampão 1X PCR (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂), 100ng de DNA e completado o volume com água ultra-pura.

Os *primers* de SRY utilizados neste estudo (SRY - *forward*: 5' ATGAATAGAACGGTGCAATCG 3'; *reverse*: 5' GAAGAGGTTTTCCCAAAGGC 3') foram os mesmo usados por PHUA et al (2003) que trabalharam com SRY e Aml-X em caprinos.

Os oligonucleotídeos combinados para as regiões ZFX/ZFY (ZFX/ZFY - *forward*: 5' ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT 3'; *reverse*: 3' GCACTTCTTTGGTATC TGAGGAAAGT 5') e os *primers* específicos para ZFX (ZFX - *forward* : 5' GACAGCTGAACAAGTGTTACTG 3'; *reverse*: 3' AATGTCACACTTGAATCGCATC) e para ZFY (ZFY- *forward* : 5' GAAGGCCTTCGAATGTGATAAC 3'; *reverse*: 3' CTGACAAAAAGGTGGCGATTTC) foram utilizados por MAKONDO et al. (1997) ao estudarem o sexo fetal a partir de células oriundas de aspiração de liquido amniótico em bovinos utilizando NESTED-PCR.

O protocolo de amplificação consistiu em um ciclo inicial a 95° C por dois minutos, 55° C por um minuto e 72° por dois minutos, seguido de 29 ciclos com 94° C por um minuto, 55° C por um minuto e 72° C por um minuto, com uma extensão final de nove minutos. Os produtos foram visualizados em eletroforese com gel de agarose a 2% (Pomp et al., 1995).

As amostras de DNA sanguíneo contendo 0,5ng foram submetidas ao NESTED PCR, com uma desnaturação inicial a 95° C por dois minutos, seguida de 30 ciclos a 95° C por 30 segundos, 52° C por 45 segundos e 72° C por um minuto. A etapa seguinte possui os cinco primeiros ciclos idênticos ao programa inicial, com aumento da temperatura de anelamento para 60° C nos 25 ciclos restantes (MAKONDO et al., 1997).

Após o NESTED PCR, os produtos da amplificação foram expostos à enzima de restrição *Sac I* a 37° C por uma hora, no protocolo de RFLP utilizado por EL- GAYAR e HOLTZ (2005), e depois expostos a 65° por 30 minutos para a completa inativação da enzima.

RESULTADOS

⁷ Ludwig Biotec

As amostras de sangue caprino e ovino quando submetidas ao protocolo modificado de SOLLÉRO (2004) para extração de DNA utilizando CTAB a 10% apresentaram concentrações que variaram de 20 a 1011ng por μL . Foram realizadas padronizações com o objetivo de estabelecer um gradiente no qual fosse possível identificar a menor concentração de DNA em que a técnica testada apresentasse eficiência na sexagem.

Os produtos obtidos pela amplificação das seqüências correspondentes aos genes SRY e ZFX/ZFY apresentaram tamanho de 116pb e 445/447pb respectivamente. As amostras oriundas de machos ovinos e caprinos apresentaram duas bandas, as quais correspondem aos segmentos sexuais e de controle, enquanto as fêmeas ovinas e caprinas apresentaram apenas a seqüência controle na PCR multiplex (Figura 1A). As amostras com menos de 1,0ng de DNA não obtiveram produtos de amplificação visíveis (Figura 1B).

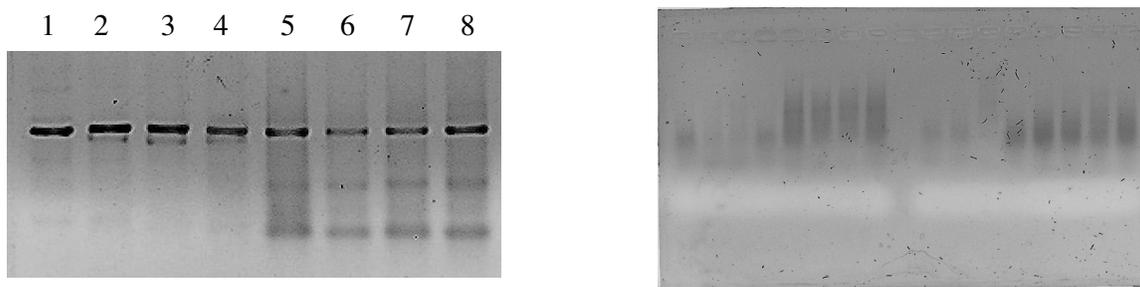


Figura 1 – A - Produtos de PCR, a partir de amostras com 150ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes aos segmentos ZFX/ZFY (445/447pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1 e 2 fêmeas ovinas, 3 e 4 fêmeas caprinas, 5 e 6 machos ovinos e 7 e 8 machos caprinos. B – Produtos de amplificação, a partir de amostras com 0,5ng de DNA não evidenciados.

DISCUSSÃO

A extração de DNA sanguíneo utilizando CTAB a 10%, segundo o protocolo de SOLLÉRO (2004) modificado, resultou em amostras de DNA com concentrações variadas e quando submetidas a PCR apresentaram os produtos desejados. Esta observação transforma a técnica de extração utilizada em uma alternativa válida para uso prático em laboratórios de biologia molecular.

Os achados deste estudo concordaram com POMP et al. (1995) ao conseguir distinguir os sexos utilizando SRY e como controle *primers* para ZFX/ZFY, porém com desenho de *primers* diferentes, utilizando o mesmo protocolo para ovinos e caprinos. A amplificação

similar indica a alta homologia entre as espécies no que diz respeito às seqüências oligonucleotídicas correspondentes aos genes SRY e ZFX/ZFY.

No presente estudo, as amostras com DNA em concentrações menores que 1.0 ng não apresentaram o produto correspondente ao SRY e nem às seqüências ZFX/ZFY. Não foi possível obter produto de amplificação visível nas amostras a partir de 0,5 ng de DNA, mesmo recorrendo ao NESTED-PCR, seguindo o protocolo de MAKONDO et al. (1997) com a enzima de restrição *Sac I* (RFLP), segundo EL-GAYAR e HOLTZ (2005). O que indica que nesta concentração de DNA a reação de PCR aplicada não é eficiente.

CONCLUSÃO

A realização de PCR multiplex para identificação do sexo em pequenos ruminantes é de fácil execução e de alta acurácia, concentrações de DNA iguais ou superiores a 1ng/μl, permitindo a sua aplicação em embriões como uma ferramenta molecular que trará benefícios ao criador e ao melhoramento genético deste segmento produtivo.

REFERÊNCIAS

BONDIOLI, KR. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. **Journal of Animal Science**, v.70, n.2, p. 19-29, 1992. Supplement.

BREDBACKA, P.; KANKAANPÄÄ, A.; PEIPPO, J. PCR-sexing of bovine embryos: A simplified protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v.44, p.167-176, 1995.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A. **Bioquímica ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. 446p.

EL-GAYAR, M., HOLTZ, W. Transfer of sexed caprine blastocysts freshly collect or derived from cultured morulae. **Small Ruminant Research**. Amsterdam, v.57 n. 2/3, p.151-156, March, 2005.

GARCIA, J. F.; AVELAR, G. A.; DIAS, F. E. F. Aplicação de tecnologias de análise genética no diagnóstico em Medicina Veterinária. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 5., 2003. Recife. **Anais...** [S.l.:s.n.], 2003. p. 100-103.

GUTIÉRREZ-ADÁN, A. et al. Ovine-specific Y-chromosome RADP-SCAR marker for embryo sexing. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p. 135-138, 1997.

KOCHHAR, H.S. et al. Production of sexed lambs after biopsy of ovine blastocysts produced *in vitro*. The **Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.41, n.5, p.398-400, May 2000.

MAKONDO, K. et al. Use of the polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. **Animal Reproduction Science**. Amsterdam, v. 49, p. 125-133, 1997.

PHUA, A. C. Y.; ABDULLAH, R. B.; MOHAMED, Z. A 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**, v. 49, n. 4, p. 307-311, 2003.

POMP, D.; GOOD, B. A.; GEISERT, R. D.; CORBIN, C. J.; CONLEY, A. J. Sex identification in mammals with Polymerase Chain Reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or 11 pig embryos. **Journal of Animal Science**. Champaign, v.73, p. 1408 – 1415, 1995.

SOLLÉRO, B.P.; FARIA D.A.; PAIVA, S.R.; GUIMARÃES, S.E.F.; LOPES, P.S.; PAIXÃO, D.M. Método rápido de extração de DNA utilizando CTAB em tecidos musculares de suínos. In: CONGRESSO NACIONAL DE ZOOTECNIA, 2004, Brasília. **Anais...** Brasília, DF : Associação Brasileira de Zootecnistas, 2004. v. CD. p. 1-4.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A aplicação da biologia molecular na criação de pequenos ruminantes pode trazer inúmeros benefícios a este setor da pecuária. A realização de PCR multiplex, com o objetivo de identificar o sexo genético de caprinos e ovinos, usando o mesmo par de *primers* em ambas espécies, permite uma economia de tempo e dinheiro na realização do diagnóstico laboratorial. Ao trabalhar com quantidades reduzidas de DNA nas amostras iniciais como 1,0ng de DNA, os *primers* utilizados durante este estudo se mostraram eficazes na amplificação dos segmentos genômicos desejados, permitindo assim uma correta sexagem. A importância desses achados se concentra na precocidade inerente a sexagem espermática e pré-implantacional, podendo o produtor rural optar pelo melhor manejo e escolha do sexo de progênie mais adequado para a produtividade de seu rebanho.

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](#)