

WOSNJUK, L. A. C.; SILVA, H. D.; MACHADO, L. S.; ANUNCIACÃO, C. E. Sexagem de Aves Através de Técnicas Moleculares. In: CONGRESSO DE PESQUISA, ENSINO E EXTENSÃO DA UFG – COMPEEX, 3, 2006, Goiânia. **Anais eletrônicos do XIII Seminário de Iniciação Científica** [CD-ROM], Goiânia: UFG, 2005. n.p.

---

## SEXAGEM DE AVES ATRAVÉS DE TÉCNICAS MOLECULARES

WOSNJUK, L. A. C.<sup>1</sup>; ANUNCIACÃO, C. E.<sup>2</sup>

Palavras-chave: aves, sexagem, PCR.

### 1. INTRODUÇÃO

Algumas espécies de aves não apresentam dimorfismo sexual claro. O que torna a determinação sexual baseada apenas em características anátomo-morfológicas difícil e também pouco confiável.

Para estas espécies de aves existem alguns métodos de determinação sexual, como, por exemplo, laparoscopia, exames de toque (ambos de natureza mecânica) e a análise do DNA (técnicas moleculares).

A sexagem de aves através de PCR (reação em cadeia da polimerase), tem sido observada como uma técnica molecular sensível, rápida e de custo relativamente baixo, e efetivamente pode distinguir os machos das fêmeas em qualquer estágio de desenvolvimento, o que a torna apropriada para uso em diagnóstico.

Recentemente foi identificada uma região do genoma das aves relacionada ao controle da transcrição de genes de desenvolvimento sexual, denominada CHD. Esta região pode ser amplificada pelo método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando-se primers específicos e permitindo uma clara separação sexual.

As fêmeas, sexo heterogamético em aves, possuem um cromossomo Z e um W, já os machos possuem dois cromossomos Z. O gene CHD1-Z acontece no cromossomo Z de ambos os sexos, já o CHD1-W é específico das fêmeas. Os íntrons em CHD1-Z e CHD1-W diferem em comprimento, assim, depois da PCR, é possível identificá-los através de técnicas de eletroforese.

A identificação do sexo pelo DNA confere 99,9% de certeza ao diagnóstico, precisão não alcançada por técnicas de natureza mecânica, e não causa estresse nem lesões no animal, pois são necessários apenas uma ínfima quantidade de sangue ou penas para a análise.

A procura por esse diagnóstico geralmente é de criadores, zoológicos e proprietários de unidades de conservação privadas, mas, no Brasil, apenas alguns centros especializados tem oferecido este exame. A correta sexagem permite, também, além de melhorar a produção, garantia da reprodução de espécies silvestres criadas em cativeiro ou até as ameaçadas de extinção.

### 2. Metodologia

#### 2.1 Coleta de amostras:

Amostras de sangue de diferentes pássaros foram coletadas (com EDTA) e mantidas a -20°C até serem utilizadas. Amostras de sangue da coleção do laboratório de diagnóstico genético e molecular – ICB II – UFG, também foram

utilizadas. E também amostras de sangue coletadas de animais mortos (neste caso sem EDTA), que foram doadas pelo zoológico de Goiânia e estavam coagulados.

Também foram testadas amostras de DNA extraídos de penas de aves. Uma pena de Ema, uma de Emu e uma de Papagaio.

## 2.2 Extração do DNA:

O DNA das amostras de sangue foram extraídos pela técnica de fenol-clorofórmio, na qual é utilizada 100µL da amostra para cada extração, segundo SAMBROOK et al., 1990. No caso das amostras de sangue coagulado a enzima proteinase K foi utilizada durante a extração, e a mostra foi incubada à 37°C com proteinase K pelo período de uma noite (aproximadamente 12 horas). O DNA extraído foi quantificado e diluído apropriadamente e, então, submetido à técnica de PCR.

O DNA das amostras de pena foram extraídos por dois métodos, o que garantiu a duplicata de tais amostras. Os métodos foram, fervura para lise e fenol-clorofórmio.

## 2.3 Amplificação pela PCR e Eletroforese:

Foram realizadas PCRs com os primers W1F e W2R (GRIFFITHS et. al.), e também os primers P2 e P8 (GUTIRREZ-CORCHERO et. al.) para que pudesse ser feita uma padronização da técnica, observando qual seria o melhor primer para ser utilizado.

Após a PCR o material foi submetido à eletroforese, quantificada em gel de agarose a 0,8%, corado com brometo de etídio em tampão TEB a 1X. O DNA pode ser visualizado sob luz ultravioleta.

O resultado esperado se baseava na técnica de Intron – PCR (ELLEAREN et. al.). Se a amostra analisada fosse de uma ave fêmea, seria obtido um padrão com duas bandas, mas, se fosse macho, seria observada apenas uma banda. Padrão este que pode ser observado na figura 1.

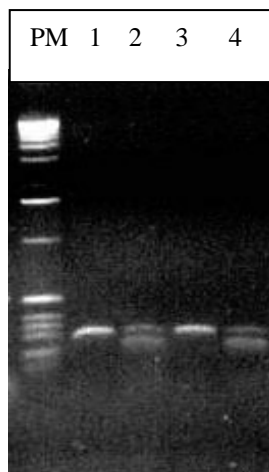


Figura 1. Gel de agarose, onde pode ser observado: na coluna 1, peso molecular DNA  $\lambda$ -Hind III, nas colunas 2 e 4 , amostra de ave macho, e, nas colunas 3 e 4, amostra de DNA de aves fêmeas. Fonte: KLOET et. al.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Nas amostras de DNA de avestruz e emu, analisadas com os *primers* W1F e W2R, foram observados os padrões de banda esperados, ou seja duas bandas

para aves fêmeas e uma banda para machos, semelhantes aos obtido por KLOET et. al., exemplificados na figura 01.

Nas outras amostras, que agora incluem sangue coagulado de ema ( que foi adquirido após a morte da ave), sangue coagulado de emu (que foi adquirido após a morte da ave), penas de ema, emu e papagaio, analisadas com os primers W1R e W2F e também com os primers P2 e P8, não foram observados os padrões de banda esperados. Apesar de que em algumas amostras bandas claras puderam ser observadas. Os motivos mais prováveis são: a mudança de reagentes da PCR com a utilização de reagentes caseiros, ou o fato da técnica de extração não ter sido eficiente para as amostras de sangue coagulado e de penas, pois as técnicas de extrações para tais amostras ainda estão em fase de padronização.

Atualmente novos reagentes estão sendo comprados para o Laboratório, e novas técnicas estão sendo testadas para padronização da técnica de sexagem molecular de aves

#### **4. CONCLUSÃO**

A técnica de fenol-clorofórmio se mostrou eficiente na extração de DNA de sangue de aves, porém as técnicas que utilizam proteinase K e as técnicas de extração de DNA do bulbo das penas ainda necessitem de padronização.

A técnica de PCR se mostrou eficaz, rápida e barata, porém é muito sensível às condições dos reagentes que utiliza, o que sugere cuidado e treinamento das pessoas envolvidas com essa reação.

Acredita-se que o projeto deva ter uma continuidade para, assim a técnica ser realmente padronizada, demonstrando objetividade e acurácia no diagnóstico.

#### **5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:**

GRIFFITHS, R.; ORR, K. The use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) in the isolation of sex-specific markers. **Molecular Ecology**, v.8, p.671-674, 1999.

GUTIRREZ-CORCHERO, F.; VICTORIA ARRUGA, M.; SANZ, L.; GARCÊA, C.; HERNANDEZ, M. A.; CAMPOS, F. Using FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. **Molecular Ecology notes**. v. 2, p.75-77, 2002.

KLOET, S. R. DE; Development of a CAPS (cleaved amplified polymorphics sequence) assay for sex identification of the emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.273-275, 2001.

Fonte de Financiamento: CNPq

---

<sup>1</sup>Aluna de Iniciação Científica – Laboratório de Diagnóstico Genético e Molecular / ICB2 / UFG, lua@biologia.grad.ufg.br

<sup>2</sup>Orientador/Instituto de Ciências Biológicas / UFG, carlose@icb.ufg