

Sexagem molecular em aves silvestres

Molecular sexing in wild birds

J.N. Vieira^{1,3}, E.G.A. Coelho², D.A.A. Oliveira²

¹Curso de Pós-Graduação, Departamento de Zootecnia, Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, Belo Horizonte, MG, Brasil

³Correspondência: nobrevieira.j@gmail.com

Resumo

A identificação do sexo em aves silvestres é imprescindível para a produção e comercialização destas em criadouros conservacionistas ou comerciais. Estima-se que cerca da metade das espécies existentes no mundo não possui dimorfismo sexual e, quando existe, é geralmente sutil, podendo ocorrer somente a partir do período de maturidade sexual. Por meio da técnica da PCR, é possível realizar a sexagem pela detecção dos genes CHD-Z e CHD-W, que estão localizados nos cromossomos sexuais de todas as aves. O CHD-W, localiza-se no cromossomo W, somente nas fêmeas, e o gene CHD-Z é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos. A técnica é simples, conveniente, barata, rápida e segura, podendo apresentar várias vantagens, como: reduz custos de manutenção de aves jovens, evita a formação de casais do mesmo sexo, ou entre parentes próximos ou casais ao acaso, facilita o manejo genético em criações com sistema de produção de aves por separação por sexo.

Palavras-chave: identificação do sexo em aves, PCR, CHD-W e CHD-Z.

Summary

Sex identification in wild birds is essential for the production and marketing of these in conservation or breeding business. It is estimated that approximately half of the species in the world has no sexual dimorphism, and where there is usually subtle and may only occur from the period of sexual maturity. Through the technique of PCR is possible to detect the genes CHD-Z and CHD-W, located in the sexual chromosomes of all the birds. The gene CHD-W is located on the W chromosome, only in females and the gene CHD-Z is found on the Z chromosome occurring in both sexes. The technique is simple, convenient, cheap, fast and safe and may provide several advantages, such as reduction costs of maintenance of young birds to prevent the formation of same-sex couples, or between close relatives or couples at random, to facilitate management in genetic creations with poultry production system for separation for sex.

Keywords: avian sex identification, PCR, CHD-W and CHD-Z.

Introdução

Segundo o Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos (CBRO), o Brasil possui cerca de 1.801 espécies de aves, que representam 20% das 9.000 espécies existentes no mundo. É o terceiro país em diversidade de aves (atrás apenas da Colômbia e do Peru). No entanto, é o primeiro em número de espécies em extinção. Das 1.212 aves ameaçadas no mundo, 120 estão no país (Espécies ..., 2009). Também é considerado como um dos países com maior porcentagem de espécies endêmicas (10%), o que o torna um dos mais importantes em relação a investimentos em preservação de aves (Allgayer e Cziulik, 2007).

A crescente degradação do meio ambiente provocada por desmatamentos, construções de barragens, poluição química produzida por indústrias e por acidentes com derramamentos de óleo, assim como o próprio desenvolvimento de centros urbanos ocupando áreas progressivamente maiores, vêm causando redução e fragmentação de inúmeros ecossistemas. Como consequência direta desses fatos, muitas espécies de aves caminham para a extinção (Almeida, 2003), como é o caso das duas espécies já extintas no Brasil, o Mutum do nordeste (*Mitu mitu*) e a Ararinha azul (*Cyanopsitta spixii*) (Espécies ..., 2009).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), por meio das Portarias 117 e 118, de 15 de outubro de 1997, que normatizam a criação em cativeiro de espécies nativas e a comercialização de animais vivos e abatidos, além de partes e produtos da fauna nativa, propiciou que, nos últimos anos, houvesse um incremento na criação legal desses animais. Essas portarias visam colaborar com a conservação da fauna brasileira e combater o comércio clandestino de animais silvestres. Acredita-se que o comércio ilegal deverá reduzir progressivamente à medida que exista a possibilidade de aquisição de animais de maneira lícita e confiável, com documentação correta, saúde, origem controlada e nascimento em cativeiro. A regulamentação de criadouros conservacionistas pelo IBAMA trouxe uma nova visão do conceito de reprodução

e manutenção de aves silvestres em cativeiro (Allgayer e Cziulik, 2007).

A sexagem das aves é uma prática de extrema importância, visto que pelo menos metade das aves existentes no mundo não possui dimorfismo sexual e, quando existe, é geralmente sutil, podendo ocorrer somente a partir do período de maturidade sexual. O dimorfismo sexual é uma característica fenotípica observada entre machos e fêmeas de uma mesma espécie, diferenciando-os em alguns aspectos como tamanho ou coloração das penas e/ou bicos (Pough e Harvey, 1999). Dentre as aves que não apresentam dimorfismo sexual, estão o Fura-barreira (*Hylocryptus rectirostris*) (Faria et al., 2007), o Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva*), o Periquito/Maritaca (*Aratinga* sp.), a Arara (*Ara* sp.) e o Tucano (*Ramphastos* sp.) (Miyaki et al. 1998; Allgayer e Cziulik, 2007). Já entre as que apresentam o dimorfismo, estão o Tangarazinho (*Ilicura militaris*), cujos machos adultos são reconhecidos por sua plumagem (Anciães e Nassif Del Lama, 2002), e o Galito (*Alectrurus tricolor*), cujo macho possui coloração alvinegra, um “V” branco no lado superior e uma faixa peitoral negra incompleta, e a fêmea é parda, com asas e cauda mais escuras e garganta branca (Cestari, 2006). Entretanto, na maioria dos casos, o sexo é determinado pela identificação dos cromossomos sexuais (Griffiths et al., 2002).

Os vertebrados apresentam duas categorias de cromossomos, os autossomos e os sexuais. A maioria dos cromossomos em um genoma é de autossomos, que constam de cópias materna e paterna destes e, portanto, são idênticos. Os cromossomos sexuais são formados por apenas um par, mas são bem distintos entre si (Ohno, 1967, citado por Griffiths, 2000; Griffiths et al., 2002).

Nas aves, os cromossomos sexuais Z e W apresentam os genes CHD-Z e CHD-W (CHD: *chromo-helicase-DNA-binding*). O gene CHD-Z é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos, e o gene CHD-W localiza-se no cromossomo W, presente somente nas fêmeas (Griffiths et al., 1998). O cromossomo Z tem o tamanho muito uniforme para todas as espécies, mas o cromossomo W varia de tamanho na maioria delas (Fridolfsson e Ellegren 2000; Ezaz et al., 2006). Apenas nas aves ratitas (Ordem Struthioniforme), os cromossomos sexuais Z e W são morfologicamente similares aos autossomos, mostrando pequena diferença no tamanho (Tagaki et al., 1972, citados por Griffiths et al., 1998; Ansari et al., 1988). Nessas espécies, a única diferença existente entre os cromossomos sexuais está na ausência do gene DMRT1 (*Doublesex and Mab-3 Related Transcription Factor 1*) no cromossomo W, pois ambos os cromossomos têm o gene IREBP (*Iron-responsive element-binding protein*). Já nas outras espécies de aves, além da diferença do tamanho dos cromossomos, o W tem somente o gene CHD-W, enquanto o Z tem o DMRT1, o IREBP e o CHD-Z (Ezaz et al., 2006; Fig. 1). O gene DMRT1 foi mapeado na região do braço curto do cromossomo Z e codifica proteínas que controlam o desenvolvimento sexual bem como o fenótipo dos machos. Já o gene IREBP, que possui uma proteína responsável pela regulação do ferro no mRNA, está localizado na região do braço longo dos cromossomos Z em todas as espécies e também no W em ratitas (Ellegren, 2002).

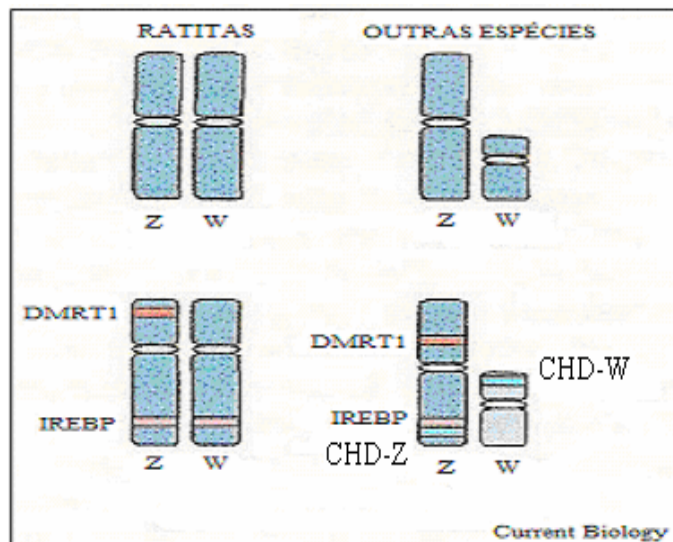


Figura 1. Morfologia dos cromossomos sexuais de aves (ratitas e outras espécies de aves).

Fonte: Ezaz et al. (2006).

Evolução e determinação dos cromossomos sexuais

As espécies de aves e mamíferos apresentam os cromossomos sexuais bem diferenciados na sua base filogenética (Artoni et al., 2000). A hipótese da evolução dos cromossomos sexuais de vertebrados é que o sistema XY de mamíferos pode ter sido originado diretamente do sistema ZW do ancestral réptil e não do

ambiente. Portanto, faz-se necessário um importante e relevante estudo de cromossomos sexuais de vertebrados dos sistemas XY de mamíferos e ZW de serpentes e de aves, bem como de algumas espécies de peixes, anfíbios e répteis a ambos os sistemas (Modi e Crews, 2005; Ezaz et al., 2006).

A maioria dos vertebrados tem os indivíduos separados sexualmente, mas o sexo é determinado por dois diferentes caminhos, pelo ambiente e pelo genótipo (Ezaz et al., 2006). Muitas espécies de peixes e répteis utilizam a temperatura/ambiente para a determinação do sexo (Ezaz et al., 2006; Uller et al., 2007). No entanto, em outras espécies dessas mesmas classes de vertebrados bem como em todos os anfíbios, aves e mamíferos, o sexo é determinado geneticamente (Ezaz et al., 2006). A transição entre a determinação genética do sexo e a determinação pela temperatura/ambiente pode ocorrer rapidamente e durante o estágio intermediário/transitório, sendo que tanto os fatores genéticos quanto os ambientais influenciam na determinação de sexo (Uller et al., 2007).

A árvore filogenética de determinação do sexo, Fig. 2, mostra que espécies de peixes, quelônios e lagartos têm o sexo determinado tanto de forma genética quanto temperatura-dependente, podendo ser pelos sistemas XY ou ZW, enquanto os anfíbios possuem o sexo determinado apenas geneticamente e também apresentam ambos os sistemas. Os crocodylianos têm a determinação do sexo temperatura-dependente, enquanto serpentes e aves (sistema ZW) e mamíferos (sistema XY) têm o sexo definido geneticamente (Modi e Crews, 2005). Entre as espécies que usam a genética como determinante do sexo, os machos podem ser heterogaméticos (XY) ou homogaméticos (ZZ), enquanto as fêmeas podem ser homogaméticas (XX) e heterogaméticas (XY) (Griffiths et al., 1998; Modi e Crews, 2005; Ezaz et al., 2006). As espécies com cromossomos sexuais heterogaméticos têm níveis iguais da expressão de cada gene, pois um sexo tem somente uma cópia, ZW ou XY, e o outro sexo tem duas cópias de um cromossomo em particular, ZZ ou XX (Modi e Crews, 2005). Os cromossomos sexuais Y e W, determinantes do sexo masculino e feminino, respectivamente (Schartl, 2004), são altamente heterocromáticos e, conseqüentemente, menores que os X e Z, respectivamente (Ellegren, 2000; Duan e Fuerst, 2001; Charlesworth e Charlesworth, 2005; Ezaz et al., 2006).

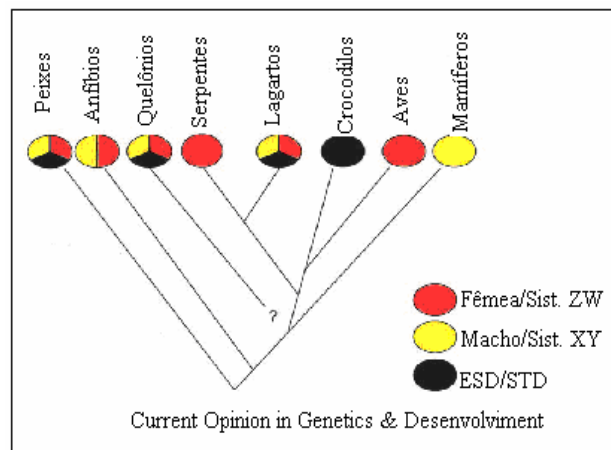


Figura 2. A filogenia dos vertebrados que ilustra as formas da determinação de sexo. “Fêmea” e “macho” têm a determinação genética do sexo (GSD) com fêmeas e machos heterogaméticos, respectivamente. O ESD/STD representa a determinação de sexo temperatura-dependente.

Fonte: Modi e Crews (2005).

Importância da sexagem

A identificação do sexo em aves monomórficas é fundamental para o sucesso reprodutivo de espécies silvestres mantidas em cativeiro (Raso e Werther, 2004), sendo também uma ferramenta valiosa para os estudos comportamentais e populacionais em espécies sem dimorfismo sexual aparente, assim como em criatórios conservacionistas e comerciais (Faria et al., 2007). A sexagem apresenta várias vantagens, como: reduz custos de manutenção de aves jovens, uma vez que a identificação do sexo poucos dias após o nascimento facilita sua comercialização; evita a formação de casais do mesmo sexo, ou entre parentes próximos ou casais ao acaso; facilita o manejo em criações com sistema produção de aves por separação por sexo (Grando, 2002).

O manejo das aves significa não apenas a condução da criação em si (acasalamento, postura, alimentação), mas também o manejo genético (seleção de casais visando a melhores resultados) (Silva, 2005). Para tanto, há necessidade de se tomar o cuidado com a formação de futuros casais, pois a endogamia pode

provocar a diminuição da heterozigose e, conseqüentemente, aumento da homozigose, que pode ocorrer tanto em genes dominantes quanto em recessivos, sendo necessário que haja a seleção se estes são preferidos em relação aos heterozigotos. Ao reduzir a heterozigose, pode-se favorecer a ocorrência de genes recessivos indesejáveis ou de efeitos deletérios. A perda da variabilidade genética em populações pequenas tende a ocorrer aleatoriamente, causando mudanças nas frequências alélicas e genotípicas, fixando alguns alelos e eliminando outros, processo este denominado deriva genética. A maioria desses genes está relacionada com redução da fertilidade, aumento da mortalidade, aumento de doenças devido à diminuição da resistência e do vigor híbrido e aumento do valor genético adaptativo (Falconer, 1970; Pereira, 2004). Portanto, a manutenção das características genéticas é de suma importância.

Para a realização do teste de sexagem em aves silvestres via técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), faz-se a extração do DNA de penas e/ou de sangue, seguindo os protocolos de Sambrook et al. (1989) e Rudbek e Dissing (1998), respectivamente. É importante ressaltar que a coleta das penas e/ou do sangue das aves é minimamente invasiva (Griffiths et al., 1998).

Os produtos da PCR dos genes CHD-Z e CHD-W podem ser discriminados pela presença ou ausência de sítios de restrição específicos por meio da enzima ou pela extensão de seus *introns* (Anciães e Nassif Del Lama, 2002). Embora o DNA codificante seja conservado, os comprimentos dos DNAs não codificantes diferem entre si. Como os tamanhos dos dois produtos da PCR do CHD-W e do CHD-Z são diferentes, machos e fêmeas são facilmente identificados. No caso da extensão de seus *introns*, a fêmea que possui os dois cromossomos diferentes, W e Z, mostrará duas bandas no gel, característica de heterozigoto; enquanto o macho, possuindo apenas um tipo de cromossomo, o Z, mostrará uma única banda, pois é homozigoto (Griffiths et al., 1998; Fridolfsson e Ellegren, 2000; Griffiths, 2000). É importante observar que o tamanho dos pares de base (pb) em relação aos alelos do sexo pode variar de espécie para espécie, como é mostrado na Fig. 3. Quando se usa a enzima de restrição, a fêmea apresenta três bandas, e o macho duas (Griffiths et al., 1998; Anciães e Nassif Del Lama, 2002). Isso porque a enzima corta o gene CHD-Z que está localizado no cromossomo Z.

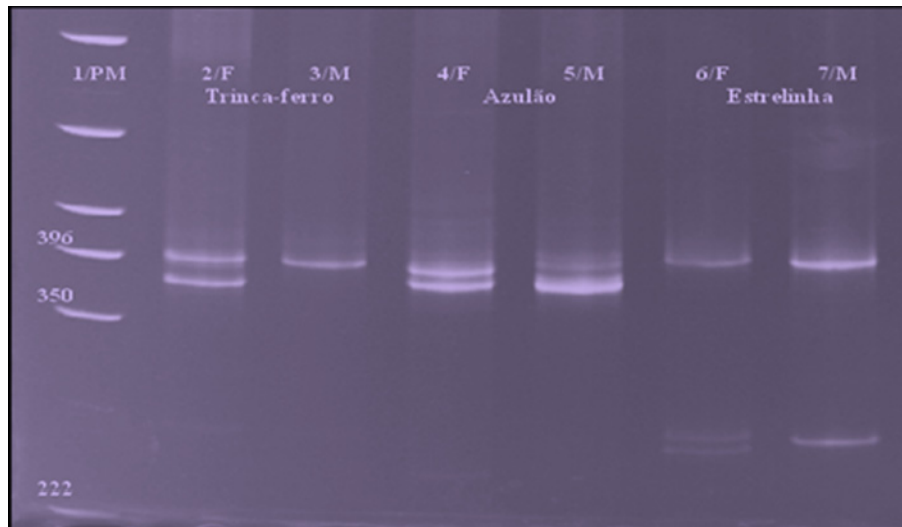


Figura 3. Gel de poliacrilamida 8%, mostrando o resultado da sexagem em aves via PCR pela extensão dos *introns*: um alelo representa o macho/M (n^{os} 3, 5 e 7), e dois alelos a fêmea/F (n^{os} 2, 4 e 6). Na canaleta 1, está o peso molecular/PM *pGEM*[®] (Promega).

A PCR é uma técnica simples, conveniente, barata, rápida, sensível e eficaz para identificar o sexo das aves e dependente de pequena amostra de DNA (Griffiths et al., 1998; Griffiths, 2000). Após o material chegar ao laboratório, o resultado pode ser obtido em apenas dois dias e com um custo que oscila entre R\$10,00 e R\$20,00, dependendo do laboratório de escolha e da quantidade de exames solicitado. Já o preço das aves pode ser bastante elevado. Para se ter uma ideia sobre o valor comercial das aves silvestres ou exóticas, pode-se citar o caso das aves canoras, cujo preço pode variar de espécie para espécie e dentro da própria espécie em função da idade, sexo, tipo de canto e filiação. Por exemplo, um Azulão macho (*Passerina brissonii*) chega a custar R\$500,00, e a fêmea R\$200,00. O preço dos Bicudos (*Oryzoborus c. maximiliani*) e Curiós (*Oryzoborus angolensis*) pode variar entre R\$800,00 e R\$10.000,00, dependendo do tipo de canto. A variação de preços de Trinca-ferro (*Saltator similis*) e Sabiá-laranjeira (*Turdus rufiventris*) é de R\$200,00 a R\$3.000,00. Em diversas espécies da ordem Psittaciforme, a oscilação de preços é de R\$600,00 a R\$15.000,00, podendo alcançar valores superiores. Como o valor do teste é baixo, torna-se frequente a identificação do sexo em 100% das aves de um criador por meio da PCR, pois um erro na sexagem tradicional pode comprometer toda a história individual, bem como a do casal pré-determinado.

Referências bibliográficas

- Allgayer MC, Cziulik M.** Reprodução de psitacédeos em cativeiro. *Rev Bras Reprod Anim*, v.31, p.344-350, 2007. Disponível em: www.cbra.org.br/publicacoes/rbra.do
- Almeida MA.** *Influências dos sistemas artificial e natural de incubação e criação de Emas (Rhea americana) nos índices produtivos de criadouros do estado de São Paulo.* 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, São Paulo, SP.
- Anciães M, Nassif Del Lama S.** Sex identification in pin-tailed manakins (*Ilicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies. *Ornitol Neotrop*, v.13, p.159-165, 2002.
- Ansari H, Takagi N, Sasaki M.** Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. *Cytogenet Cell Genet*, v.47, p.185-188, 1988.
- Artoni RF, Vicari MR, Bertollo LAC.** Citogenética de peixes neotropicais: Método, resultados e perspectivas. *Biol Health Sci*, v.6, p.43-60, 2000.
- Cestari C.** Primeiro registro documentado de *Alectrurus tricolor* para o Pantanal, Brasil. *Rev Bras Ornitol*, v.14, p.155-156, 2006.
- Charlesworth D, Charlesworth B.** Sex chromosomes: Evolution of the weird and wonderful. *Curr Biol*, v.15, p.129-131, 2005.
- Duan W, Fuerst PA.** Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes. *J Hered*, v.92, p.392-397, 2001.
- Ellegren H.** Dosage compensation: Do birds do it as well? *Trends Genet*, v.18, p.25-28, 2002.
- Ellegren H.** Evolution of the avian Sex chromosomes and their role in sex determination. *Tree*, v.15, p.188-192, 2000.
- Espécies novas descritas para o Brasil.** Disponível em: <http://www.cbro.org.br/CBRO/ultim.htm>. Acessado em: 2 dez. 2009.
- Ezaz T, Stiglec R, Veyrunes F, Graves JAM.** Relationships between vertebrate ZW and XY sex chromosome systems: Review. *Curr Biol*, v.16, p.R736-R743, 2006.
- Falconer DS.** *Introducción a la genética cuantitativa.* México, DF: Continental, 1970. 430p.
- Faria LP, Carrara LA, Rodrigues M.** Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). *Rev Bras Zool*, v.24, p.207-212, 2007.
- Fridolfsson AK, Ellegren H.** Molecular evolution of the avian *CDHI* genes on the Z and W Sex chromosomes. *Genetics*, v.155, p.1903-1912, 2000.
- Grando AP.** *Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual.* 2002. 107f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos, São Carlos, SP.
- Griffiths AJF, Miller JH, Suzuki DT, Lewontin RC, Gelbarth WM.** *Introdução à genética.* 7.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794p
- Griffiths R.** Sex identification in birds. *Semin Avian Exotic Pet Med*, v.9, p.14-26, 2000.
- Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG.** A DNA test to sex most birds: Short communication. *Mol Ecol*, v.7, p.1071-1075, 1998.
- Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A.** Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol*, v.17, p.415-423, 1998.
- Modi WS, Crews D.** Sex chromosomes and sex determination in reptiles. *Curr Opin Genet Dev*, v.15, p.660-665, 2005.
- Pereira JCC.** *Melhoramento genético aplicado à produção animal: Aplicação da biotecnologia reprodutiva no melhoramento animal.* 4.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004. p.195-221.
- Pough J, Harvey F.** *A vida dos vertebrados.* 2.ed. São Paulo: Atheneu, 1999. 798p.
- Raso TF, Werther K.** Sexagem cirúrgica em aves silvestres. *Arq Bras Med Vet Zootec*, v.56, p.187-192, 2004.
- Rudbek L, Dissing J.** Rapid simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. *Biotechniques*, v.25, p.588-592, 1998.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** *Molecular cloning: A laboratory manual.* 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989. 3v.
- Schartl M.** Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. *Genomes Evol*, v.14, p.634-641, 2004.
- Silva JFB.** A Formação do plântel. *Rev Brasil Ornitol*, n 58, p.13, 2005.
- Uller T, Pen I, Wapstra E, Beukeboom LW, Komdeur J.** The evolution of sex ratios and sex-determining systems. *Trends Ecol Evol*, v.22, p.292-297, 2007.