

Identificação do sexo em caprinos e ovinos com quantidade reduzida de DNA

Sexing of goat and sheep using reduced quantities of DNA

E.R. Santos Junior¹, A.N. Melo², G.M.L. Holanda², M. Adrião³, A. Wischral^{4,5}

¹Unidade Acadêmica de Serra Talhada, Universidade Federal Rural de Pernambuco(UFRPE/UAST), Fazenda Saco, Serra Talhada, PE, Brasil.

²Aluno do Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

³Depto. de Morfologia e Fisiologia Animal, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

⁴Depto. de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Recife, PE, Brasil.

Correspondência: aurea@dmv.ufrpe.br

Resumo

A identificação do sexo tem sido estudada principalmente para fins de manejo ou comerciais. O presente estudo visou determinar a menor quantidade de DNA extraída com CTAB a 10%, necessária para identificar o sexo genético das espécies caprina e ovina, sendo usados diferentes protocolos de reações em cadeia da polimerase (PCR) multiplex para os genes SRY, Aml-X e regiões ZFX/ZFY. O DNA foi extraído do sangue de 20 animais de cada espécie. A PCR foi realizada utilizando-se SRY na identificação do cromossomo Y e tanto Aml-X quanto ZFX/ZFY como controles. As amostras com quantidades acima de 1,0 ng apresentaram 100% de ampliações nos protocolos empregados, o que sugere a viabilidade das técnicas utilizadas para identificação sexual, que futuramente poderão ser utilizadas em biópsias embrionárias ou em espermatozoides.

Palavras-chave: extração de DNA, pequenos ruminantes, PCR multiplex, sexagem.

Abstract

The identification of the sex has been studied mostly for handling and commercial finalities. This study aimed to determine the smallest amount of DNA possible (extracted with 10% CTAB) to identify the genetic sex of goat and sheep using different multiplex polymerase chain reaction (PCR) protocols for genes SRY and Aml-X and regions ZFX/ZFY. The DNA was extracted from the blood of 20 animals of both species. The PCR was carried out for each species using SRY to identify chromosome Y, while both Aml-X and ZFX/ZFY were used as control. The samples with quantities higher than 1.0 ng showed 100% amplifications in the protocols used, which suggests the viability of these techniques for sexing, and they can be used in the future in embryo biopsies and sperma.

Keywords: DNA extraction, multiplex PCR, sex determination, small ruminants.

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 possibilita identificar o sexo da descendência, oferecendo vantagens de ordem prática e econômica para a indústria de produção animal (Bondioli, 1992).

São conhecidos vários genes importantes para determinação sexual dos mamíferos, como SOX9, AMH, WT1, SF1, DAX1 e DMRT1, por exemplo. Análises destes genes em humanos, usando-se ensaios *in vitro* com cobaias, revelaram que a determinação do sexo é o resultado da interferência conjunta desses genes, em que a expressão de cada um resulta na determinação sexual, variando entre os vertebrados mas tendo sua sequência e modo de expressão conservados (Morrish e Sinclair, 2002).

A amplificação de genes que possam identificar o sexo embrionário em diagnósticos pré-implantacionais e a sexagem de espermatozoides possuem um mercado potencialmente atrativo para bovinos e pequenos ruminantes, podendo também beneficiar a reprodução assistida de espécies de animais ameaçados de extinção e animais de companhia (Seidel e Johnson, 1999). Indivíduos pseudo-hermafroditas ou em casos de insensibilidade completa aos andrógenos também podem ser beneficiados por esta ferramenta molecular (Corrêa et al., 2005).

A utilização de animais adultos permite exercer um controle de qualidade sobre a técnica de PCR, tendo em vista o conhecimento prévio do sexo do animal. Sendo assim, este trabalho objetivou testar a viabilidade da sexagem por PCR em pequenas quantidades de DNA extraídas com CTAB a 10%, permitindo, no futuro, identificar o sexo genético das espécies caprina e ovina, utilizando pequenas amostras como biópsias

embrionárias ou espermatozoides em diferentes protocolos de PCR multiplex para os genes SRY, Aml-X e regiões ZFX/ZFY.

Material e Métodos

Amostras de sangue e extração de DNA

O sangue foi obtido de caprinos e ovinos sem raça definida (SRD), oriundos de abatedouro privado no município de Igarassu, PE. Foram coletadas amostras sanguíneas de 20 animais de cada espécie, sendo 10 machos e 10 fêmeas, em tubos contendo EDTA.

As análises de DNA foram realizadas no Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA/DMFA/UFRPE. O DNA genômico foi extraído do sangue utilizando-se CTAB (brometo de etiltrimetilamônio; Vetec Química Fina, Ltda.) a 10%, segundo Solléro et al. (2009) modificado. Neste procedimento, foram utilizados 200 µL de sangue total adicionados a 500 µL da solução de CTAB a 10%, os quais foram homogeneizados, postos em banho-maria a 65°C por 60 minutos e centrifugados a 15.800 g por 10 minutos. Após esse período, o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 500 µL de clorofórmio: álcool isoamílico (Merck, KGaA; 24:1), homogeneizado e centrifugado a 15.800 g por 15 minutos. Logo após essa etapa, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 250 µL de isopropanol (Merck, KGaA) e mantido em *freezer* a -20°C por 30 minutos; em seguida, centrifugado a 15.800 g por 30 minutos e, depois, descartado. O precipitado de DNA, formado no interior do tubo, foi lavado com 1 mL de etanol a 70 e a 100% em centrifugações de 15.800 g por dois minutos. Após essa etapa, o sedimento foi seco em temperatura ambiente, ressuspendido com água ultrapura e armazenado em *freezer* -20°C até o momento da amplificação.

Quantificação e amplificação do DNA

As amostras de DNA foram quantificadas em espectrofotômetro (Eppendorf Mastercycler Personal) (260-280nm) e, com base nas concentrações obtidas, foram diluídas em 100, 50, 1, 0,5, 0,2 e 0,1 ng de DNA para cada µL de água ultrapura.

Para cada amostra, a PCR multiplex foi realizada em um volume final de 25µL contendo 1,5mM de MgCl₂, 10pmoles de cada *primer*, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq-polimerase (Ludwig Biotec), tampão 1X PCR (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50 mM de KCl, 2 mM de MgCl₂), 1,0 µL de DNA, sendo completado o volume com água ultrapura.

O protocolo de amplificação para a PCR multiplex utilizando os *primers* SRY e Aml-X consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por cinco 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 a 72°C por sete minutos no final do ciclo (Phua et al., 2003). Nas amostras de ovinos, foi utilizado o mesmo protocolo supracitado, com modificação na concentração do MgCl₂ para 3mM.

Na PCR multiplex com SRY e ZFX/ZFY, o protocolo de amplificação consistiu em um ciclo inicial a 95°C por dois minutos, 55°C por um minuto e 72°C por dois minutos, seguido de 29 ciclos a 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 0,5 ng, que não apresentaram amplificação nos protocolos anteriores, 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 submetidos à ação da 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°C por 30 minutos para a completa inativação da enzima.

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), utilizando-se como controles negativos amostras sem DNA.

Sequência dos oligonucleotídeos

Os *primers* de SRY (SRY - *forward*: 5' ATGAATAGAACGGTGAATCG 3'; *reverse*: 5' GAAGAGGTTTTCCCAAAGGC 3') e Aml-X (Aml-X *forward*: 5' CAGTAGCTCCAGCTCCAGCT 3', *reverse*: 5' GTGCATCCCTTCATTGGC 3';) foram os mesmos usados por Phua et al. (2003).

Os oligonucleotídeos combinados para as regiões ZFX/ZFY (ZFX/ZFY - *forward*: 5' ATAATCACATGGAGAGCCACAAGCT 3'; *reverse*: 3' GCACTTC TTTGGTATCTGAGGAAAGT 5') (Aasen e Medrano, 1990) e os *primers* específicos para ZFX (ZFX - *forward* : 5' GACAGCTGAACAAGTGTTACTG 3'; *reverse*: 3' AATGTCACACTTGA ATCGCATC) e para ZFY (ZFY-*forward* : 5' GAAGGCCTTCGAATGTGATAAC 3'; *reverse*: 3' CTGACAAAAGGTGGCGATTTC) foram

utilizados por Makondo et al. (1997).

Resultados

As amostras de sangue caprino e ovino, quando submetidas ao protocolo modificado de Solléro et al. (2009) para extração de DNA utilizando CTAB a 10%, apresentaram concentrações que variaram de 20 a 1011 ng/μL. Foram realizadas padronizações com o objetivo de estabelecer uma diluição na qual fosse possível identificar a menor concentração de DNA em que a técnica testada apresentasse eficiência na sexagem.

A amplificação das sequências correspondentes aos genes SRY e Aml-X apresentaram tamanho de 116 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 sequência controle na PCR multiplex.

As amostras obtidas de ovinos adultos não apresentaram distinção dos produtos da amplificação do DNA caprino para esses genes, no entanto foram necessárias modificações na concentração de magnésio (1,5 mM, 2,0mM, 2,5mM, 3,0mM, 3,5mM e 4,0mM de MgCl₂) para ajustar as técnicas utilizadas no decorrer do experimento nas amostras de ovinos, sendo 3,0mM a concentração com melhor resultado.

As amostras de animais machos da espécie caprina apresentaram bandas menos intensas quando comparadas às fêmeas da mesma espécie, fato que pode sugerir uma interferência dos *primers* específicos para AML-X na amplificação dos produtos relativos ao gene SRY (Fig. 1A), resultado diferente do encontrado em ovinos (Fig. 1B).

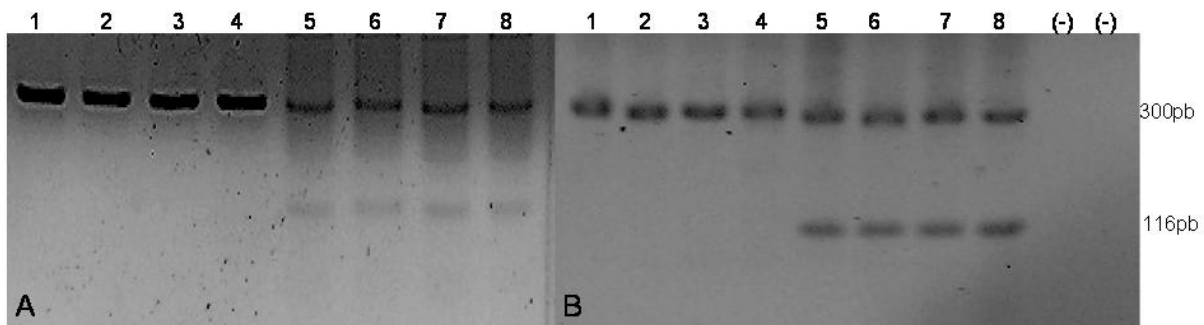


Figura 1. Produtos de PCR, a partir de amostras com 100 ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes ao Aml-X (300pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3 e 4 as fêmeas e 5, 6, 7 e 8 os machos, (-) controle negativo. A – espécie caprina. B – espécie ovina.

As amostras com 0,1 ng 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 (Fig. 2).

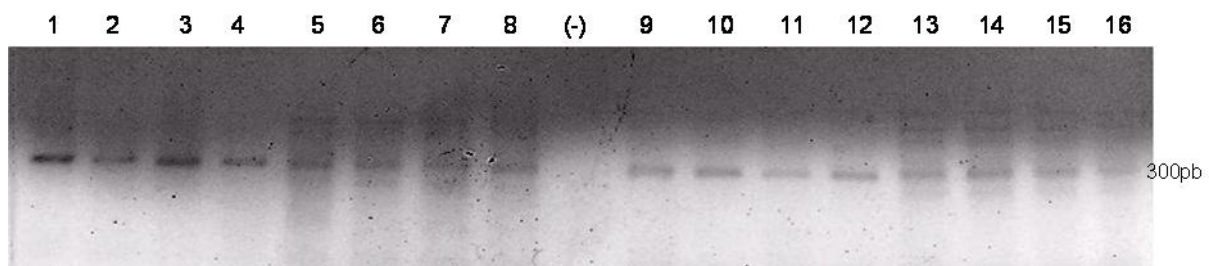


Figura 2. Produtos de amplificação, a partir de amostras com 0,1 ng de DNA, dos genes Aml-X (300pb) com ausência do SRY (116pb), sendo as amostras 1, 2, 3, e 4 fêmeas ovinas; 5, 6, 7 e 8 machos ovinos; 9, 10, 11 e 12 fêmeas caprinas e 13, 14, 15 e 16 machos caprinos, (-) controle negativo.

Os produtos obtidos pela amplificação das sequências correspondentes aos genes SRY e ZFX/ZFY apresentaram tamanho de 116 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 sequência controle no PCR multiplex (Fig. 3). As amostras com menos de 1,0 ng de DNA não obtiveram produtos de amplificação visíveis. Os controles negativos também não apresentaram produtos visíveis em todas as PCR realizadas no experimento (Fig. 1, 2 e 3).

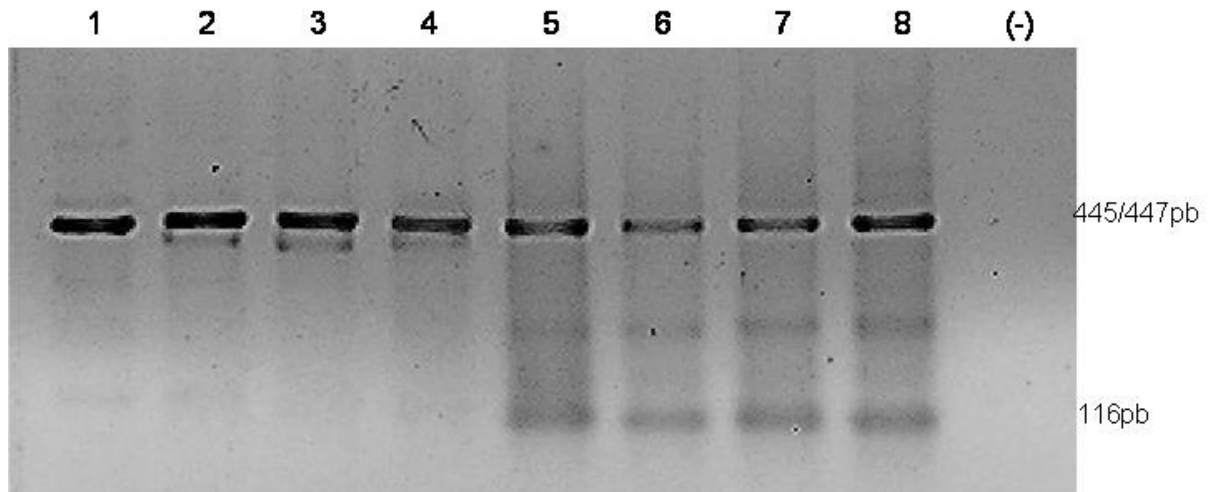


Figura 3. Produtos de PCR, a partir de amostras com 150 ng de DNA, apresentando as bandas correspondentes aos segmentos ZFX/ZFY (445/447/pb) e ao SRY (116pb), sendo as amostras 1 e 2 fêmeas ovinas, 3 e 4 fêmeas caprinas, 5 e 6 machos ovinos e 7 e 8 machos caprinos, (-) controle negativo.

Discussão

O CTAB é muito aplicado em tecidos vegetais e em outros materiais biológicos como sêmen, folículo piloso e tecidos orgânicos (Ferreira e Grattapaglia, 1998). A metodologia de extração utilizando CTAB a 10%, segundo Solléro et al. (2009) modificado, configura-se uma alternativa prática e viável para extração de DNA sanguíneo em laboratórios de biologia molecular.

Nas amostras de DNA com concentrações superiores a 0,2 ng, foi possível a amplificação dos genes Aml-X e SRY. As amostras com 0,1 ng 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 0,2 ng de DNA. Este resultado sugere a homologia entre ovinos e caprinos no que diz respeito aos genes SRY e Aml-X, uma vez que a mesma sequência de oligonucleotídeos foi eficiente para amplificar os genes nas duas espécies.

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

Utilizando os *primers* para SRY e ZFX/ZFY, este estudo, apesar de possuir desenho de *primers* diferentes e usar o mesmo protocolo para ovinos e caprinos, corrobora com Pomp et al. (1995) ao conseguir distinguir os sexos utilizando SRY e como controle *primers* para ZFX/ZFY. A amplificação similar indica a alta homologia entre as espécies no que diz respeito às sequências oligonucleotídicas correspondentes às regiões ZFX/ZFY.

As amostras com DNA em concentrações menores que 1.0 ng não apresentaram o produto correspondente ao SRY e nem às sequências 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, segundo 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, o protocolo para a reação de PCR aplicada não foi eficiente.

Com base nestes resultados, conclui-se que as técnicas de PCR multiplex utilizadas, para identificação do sexo em pequenos ruminantes, são de fácil execução e de alta acurácia, em concentrações de DNA iguais ou superiores a 1 ng/ μ L, permitindo, no futuro, identificar o sexo genético destas espécies, usando pequenas amostras como biópsias embrionárias ou espermatozoides.

Referências bibliográficas

- Aasen E, Medrano JF. Amplification of the ZFX and ZFY genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. *Bio/Technol*, v.8, p.1279-1281, 1990.
- Bondioli KR. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. *J Anim Sci*, v.70, p.19-29, 1992.
- Corrêa RV, Wey JC, Billerbeck AEC, Melo KFS, Mendonça BB, Wey MV, Arnhold IJP. Insensibilidade

completa aos andrógenos em pacientes brasileiras causada pela mutação P766A no gene do receptor androgênico. *Arq Bras Endocrinol Metabol*, v.49, p.98-102, 2005.

El-Gayar M, Holtz W. Transfer of sexed caprine blastocysts freshly collect or derived from cultured morulae. *Small Rumin Res*, v.57, p.151-156, 2005.

Ferreira ME, Grattapaglia D. *Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética*. Brasília: Embrapa/Cenargen, 1998. 220p.

Makondo K, Amiridis GS, Jeffcoate IA, O'Shaughnessy PJ, Boyd JS, Paterson C, Robertson C. Use of the polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. *Anim Reprod Sci*, v.49, p.125-133, 1997.

Morrish BC, Sinclair AH. Vertebrate sex determination: any means to an end. *Reproduction*, v.124, p.447-457, 2002.

Phua ACY, Abdullah RB, 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. *J Reprod Dev*, v.49, p.307-311, 2003.

Pomp D, Good BA, Geisert RD, Corbin CJ, Conley AJ. Sex identification in mammals with Polymerase Chain Reaction and its use to examine sex effects on diameter of day-10 or 11 pig embryos. *J Anim Sci*, v.73, p.1408-1415, 1995.

Seidel Jr, GE, Johnson LA. Sexing mammalian sperm - overview. *Theriogenology*, v.52, p.1267-1272, 1999.

Solléro BP, Paiva SR, Faria DA, Guimaraes SEF, Castro S, Egito AA, Albuquerque MSM, Piovezan U, Bertani GR, Mariante AS. Genetic diversity of Brazilian pig breeds evidenced by microsatellite markers. *Livest Sci*, v.123, p.8-15, 2009.
