

COMPARAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA PARA SEXAGEM MOLECULAR EM AVES*

Juliana Nobre Vieira¹
Eduardo Geraldo Alves Coelho²
Denise Aparecida de Andrade Oliveira³

RESUMO

Este estudo avaliou o método de análise molecular para a identificação do sexo das aves utilizando três diferentes técnicas de extração de DNA de penas e de sangue. Foi empregado o par de *primers* alelo-específico, P₂/P₈, para o gene CHD, localizado nos cromossomos sexuais (Z e W) das aves, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). As três técnicas de extração de DNA foram eficazes a todas as 16 espécies analisadas, entretanto, não houve diferença na amplificação dos alelos quando comparados no gel. Porém, a extração de DNA pelo método PFE, mostrou maior tempo de conservação do DNA em relação às outras técnicas e melhor custo benefício.

Palavras-chave: Extração de DNA, determinação do sexo, aves.

COMPARISON OF THREE TECHNIQUES FOR DNA EXTRACTION FOR MOLECULAR SEXING BIRDS

ABSTRACT

This study evaluated the method of molecular analysis to the identification of the sex of birds using three different techniques of DNA extraction, from feathers and blood. A pair of allele-specific pair of *primers*, P₂/P₈, for gene CHD, located on the sexual chromosomes (Z and W) of birds was used, for polymerase chain reaction (PCR). The three DNA extraction techniques were efficient to all the 16 species analyzed. No difference in the amplification of the alleles when compared to gel was found. However, the DNA extraction by PEF showed a longer time of conservation of DNA in relation to the other techniques, having the better cost-benefit-ratio.

Key words: Extraction of DNA, sex determination, birds.

COMPARACIÓN DE TRES TÉCNICAS DE EXTRACCIÓN DE DNA PARA DETERMINACIÓN DEL SEXO DE LAS AVES POR EL MÉTODO DE ANÁLISIS MOLECULAR

RESUMEN

Este estudio evaluó el método de análisis molecular para identificar el sexo de las aves con tres distintas técnicas de extracción de DNA, de las plumas y sangre. Se utilizó un par de

* CAPES - Entidade financiadora da bolsa de estudos.

¹ Bióloga, Esp. Biotecnologia, Mestre em Zootecnia, Área de Concentração: Genética e Melhoramento Animal, Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6625 - Pampulha - Caixa Postal 567, 30.312-970, Belo Horizonte, MG, Fone: 55 31 3409-2206 - nobrevieira.j@gmail.com (autor para correspondência).

² Doutor, Analista do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG - eduardogacoelho@yahoo.com.br

³ Pós-doutora em Genética, Professora Associada, Chefe e Responsável Técnica do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da UFMG - denise@vet.ufmg.br

iniciadores alelo-específicos, P₂/P₈, para el gene CHD, que se encuentra en los cromosomas sexuales (Z y W) de las aves, para la técnica de reacción en cadena de la polimerase (PCR). Las tres técnicas de extracción de DNA fueron efectivas para las 16 especies analizadas, pero no hubo diferencia en la amplificación de los alelos en comparación en el gel. Sin embargo, el método de extracción de DNA por PFE mostró mayor tiempo de conservación de DNA con mejor relación costo-beneficio.

Palabras-clave: Extracción de DNA determinación del sexo, aves.

INTRODUÇÃO

A sexagem molecular em aves é necessária naquelas espécies que não possuem dimorfismo sexual, pois é uma ferramenta valiosa nos estudos de comportamento, de conservação e de populações (1, 2). Ela pode ser determinada pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) que é a técnica mais significativa na área de Biologia Molecular, pois é rápida, simples, segura e sensível (3). Tem sido utilizada com precisão superior a 99% (4).

Em aves, o sexo é determinado por cromossomos sexuais Z e W. Os genes CHD-Z e CHD-W (*chromo-helicase binding protein*, helicase dependente de cromo), estão localizados nos cromossomos sexuais de todas as aves. O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W, somente nas fêmeas, enquanto o CHD-Z é encontrado no cromossomo Z e em ambos os sexos (2, 4, 5). Deste modo, as fêmeas são heterogaméticas, ZW, e os machos, homogaméticos, ZZ.

Este trabalho teve como objetivo comparar três diferentes técnicas de extração de DNA de sangue e penas para a determinação do sexo em aves pela PCR. Para tanto foi utilizado *primers* específicos, P₂/P₈ que estão relacionados com o gene sexual CHD localizado nos cromossomos sexuais (Z e W) de todas as aves.

MATERIAL E MÉTODOS

As amostras de sangue e penas foram colhidas de 164 aves de criatórios comerciais e conservacionistas, totalizando 16 espécies a seguir: Estrelinha-de-poupa (*Regulus regulus* (Linnaeus, 1758)), Azulão (*Cyanoloxia brissonii* (Lichtenstein, 1823)), Trinca-ferro-verdadeiro (*Saltator similis* d'Orbigny & Lafresnaye, 1837), Bicudo (*Sporophila maximiliani* (Cabanis, 1851), Canário-da-terra-verdadeiro (*Sicalis flaveola* (Linnaeus, 1766)), Tico-tico (*Zonotrichia capensis* (Statius Muller, 1776)), Pintassilgo (*Sporagra magellanica* (Vieillot, 1805)), Canário Belga (*Lentinus canaria* Linnaeus, 1758), Graúna, também conhecido por Pássaro-preto (*Gnorimopsar chopi* (Vieillot, 1819)), Pixoxó, também conhecido como Catatau, Chanchão e Estalador (*Sporophila frontalis* (Verreaux, 1869)), Sabiá (*Turdus* sp.), Tucanuçu ou Tucano (*Ramphastos toco* Statius Muller, 1776), Papagaio-verdadeiro (*Amazona aestiva* (Linnaeus, 1758)), Periquito/Maritaca (*Aratinga* sp.), Pombo-correio ou doméstico (*Columba livia* Gmelin, 1789) e Cardeal-do-nordeste (*Paroaria dominicana* (Linnaeus, 1758)).

O sangue foi obtido pelo corte de unha e armazenado em papel filtro estéril (Marca *Whatman*, 55mm). As penas foram coletadas do peito das aves e armazenadas em envelope. Todas as amostras foram mantidas a temperatura ambiente.

Para a extração de DNA de sangue foram utilizadas duas técnicas, uma pelo fenol/clorofórmio com digestão pela enzima proteinase K (6) e outra pela tecnologia (modificada) de cartões FTA da *Whatman* (7) utilizando especificamente o papel filtro estéril (Marca *Whatman*, 55mm), aqui denominada técnica do PFE. O método de extração alcalina

simples rápida (8) foi usado para a extração do DNA do bulbo de penas que continham ou não sangue. As amostras extraídas pela técnica do PFE foram aliqüotadas a temperatura ambiente, enquanto que as das outras duas metodologias foram armazenadas sob refrigeração, a 4°C.

Foi utilizado um par de *primers* alelo-específicos, P₂/P₈, por amplificarem especificamente os alelos relacionados aos cromossomos sexuais. O *primer* P₂ (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') hibrida-se ao gene CHD-W enquanto o P₈ (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') o CHD-Z, havendo substituição R=A/G e Y=T/C (5). Para a amplificação, via PCR, das três diferentes técnicas de extração de DNA, foi utilizado o protocolo adaptado de Griffiths et al. (4). Após amplificação, foram realizadas corridas eletroforéticas (gel de poliacrilamida 10%), a fim de separar os alelos dos produtos da PCR, para a determinação do sexo das aves. É importante saber que o tamanho dos pares de bases (pb) em relação aos alelos do sexo varia de espécie para espécie (9).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Após corrida eletroforética, observou-se que houve diferença no tamanho dos pares de bases (pb) entre as espécies, isto demonstra a relação espécie-específica do tamanho dos pb dos cromossomos sexuais das aves. O tamanho dos pb variou de 246 a 396 para o alelo Z e de 254 a 412 para o W.

As penas podem ser novas ou velhas, contendo ou não bulbo vascularizado, podendo ser coletadas de qualquer parte do corpo das aves.

Os três diferentes métodos de extração de DNA foram eficientes. Porém, o método do PFE, foi o que conservou por maior tempo o DNA em relação às outras duas técnicas. Em média, a conservação durou um mês para o método de extração alcalina rápida (8), oito meses para o método extração com fenol/clorofórmio (6), ambos armazenados a 4 °C. Há relato científico onde foi observado que o DNA não degradou em um período de três a nove meses, porém armazenado a -20 °C (10). Para a técnica do PFE (7), a conservação foi de 20 meses, sendo armazenado a temperatura ambiente (Tabela 1).

Tabela 1. Tempo de extração, número de reagentes gastos e tempo de conservação do DNA das três técnicas de extração de DNA.

Técnica de extração	Tempo da extração	Nº de reagentes	Tempo conservação DNA
P	40 mins.	02	01 mês
S _{PFE}	2 horas	01	20 meses (em média)
S _S	2 a 3 dias	08*	08 meses

P: pena/extração alcalina simples rápida (7); S_{PFE}: sangue/extração modificada de cartões FTA (10), utilizando papel filtro estéril-PFE (Marca *Whatman*, 55mm); S_S: sangue/extração fenol/clorofórmio (8); * um dos reagentes é a enzima proteinase K que tem alto custo.

O tempo de conservação do DNA é de grande valia ao banco de dados do laboratório, uma vez que estes materiais serão os controles para a determinação do sexo das diferentes espécies de aves. Como também para a realização de contra-prova quando assim for necessário.

Entretanto, há uma diferença de tempo de extração que varia de 40 minutos a três dias para que se possa realizar a PCR (Tabela 1). Como não houve diferença na amplificação dos alelos, a melhor opção de amostras de sangue, seria a técnica do PFE, pois é rápida.

Outro aspecto relevante que se deve levar em consideração, além do tempo de extração do DNA, é a quantidade de reagentes que são gastos, aumentando, assim o custo da técnica. Gasta-se apenas um reagente para a extração do PFE, dois para a extração de penas e oito para a técnica do fenol/clorofórmio, sendo que um destes reagentes é a enzima proteinase K que possui maior custo (Tabela 1).

CONCLUSÕES

1. Tanto o sangue quanto as penas são amostras viáveis para a extração de DNA, podendo a pena ser nova ou velha, com bulbo vascularizado ou não.
2. Os três métodos de extração foram eficientes para a sexagem molecular de aves. Entretanto, a extração de DNA pela técnica do PFE mostrou maior tempo de conservação do DNA em relação às outras técnicas e apresenta o melhor custo benefício.

AGRADECIMENTOS

Aos Criatórios e ao IBAMA por possibilitarem a coleta dos materiais das aves.
À CAPES pela concessão da Bolsa de Estudos de Mestrado.

REFERÊNCIA

1. Allgayer MC, Cziulik M. Reprodução de psitacídeos em cativeiro [Captive psittacines breeding]. Rev Bras Reprod Anim. 2007; 31: 344-50.
2. Faria LP, Carrara LA, Rodrigues M. Dimorfismo sexual de tamanho no fura-barreira *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae) [Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae)]. Rev Bras Zool. 2007; 24: 207-12.
3. Ferreira ME, Grattapaglia D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em genética. 3. ed. Brasília: Embrapa-Cenargem; 1998.
4. Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJ. A DNA test to sex most birds. Mol Ecol. 1998; 7: 1071-5.
5. Namekawa SH, Lee JT. XY and ZW: is meiotic sex chromosome inactivation the rule in evolution? PLoS Genet. 2009 May 5;5:e1000493. doi:10.1371/journal.pgen.1000493.
6. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: CSHL Press; 1989.
7. Morrison LJ, McCormack G, Sweeney L, Likeufack AC, Truc P, Turner CM, et al. Use of multiple displacement amplification to increase the detection and genotyping of *Trypanosoma* species samples immobilized on FTA filters. Am J Trop Med Hyg. 2007; 76: 1132-7.

8. 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*. 1998; 25: 588-92.
9. Vieira JN, Coelho EGA, Oliveira DAA. Sexagem molecular em aves silvestres [Molecular sexing in wild birds]. *Rev Bras Reprod Anim*. 2009; 33: 66-70.
10. Coelho EGA. Análise quali-quantitativa de técnicas para extração de DNA de sangue, sêmen e pêlos. [dissertação]. Belo Horizonte: Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais; 2001.

Recebido em: 09/09/2009

Aceito em: 23/06/2010