

SEXAGEM MOLECULAR DE EMBRIÕES BOVINOS

LUCAS, Caroline¹; HAAS, Cristina Sangoi²; LEON, Priscila Marques Moura de²; COLLARES², Tiago; SEIXAS, Fabiana¹

¹ Laboratório de Genômica Funcional – CDTec/Biotecnologia – UFPel;

² Laboratório de Embriologia e Transgênese Animal – CDTec/Biotecnologia – UFPel;
carol_gl@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de novas técnicas em reprodução animal tem proporcionado o aumento do padrão genético e da produção animal. Estudos relacionados à produção *in vitro* (PIV) de embriões bovinos, vêm promovendo uma melhora na qualidade da produção embrionária (Camargo et al., 2003). No entanto, algumas análises têm demonstrado um desvio na proporção do número de machos e fêmeas nascidos a partir de embriões produzidos *in vitro*, no qual a porcentagem de machos tem sido superior a esperada de 50% (Gutierrez-Adán et al., 2001; van Wagendonk-de Leeuw et al., 2000). Esse fato levou a necessidade da determinação do sexo antes da transferência, visto que os embriões fêmeas são economicamente mais valorizados.

A sexagem de embriões bovinos pela técnica de PCR e Nested-PCR é uma biotécnica que contribuiu diretamente na otimização da eficiência reprodutiva para a melhora da performance produtiva e da lucratividade dos rebanhos bovinos (Khairy M.A. Zoheir et al. 2010). Além de otimizar a criação em propriedades leiteiras, a sexagem possibilita aumentar o número de matrizes geneticamente superiores em um menor período de tempo.

Atualmente, vários marcadores genéticos que possuem como alvo os dois cromossomos sexuais (Weikard et al., 2006) ou somente o cromossomo Y (Alves et al., 2006) são utilizados para a realização de procedimento de identificação de gênero. Dentre os potenciais alvos para a sexagem de embriões destaca-se o gene da amelogenina (AMEL), encontrado em ambos os cromossomos X e Y.

A amelogenina é uma proteína da matriz extracelular que é secretada pelos ameloblastos durante o desenvolvimento do esmalte dos dentes (Sasaki et al., 1995). Os alelos X e Y do gene AMEL possuem grande homologia, porém apresentam diferenças no tamanho e na sequência de nucleotídeos (Lattanzi et al., 2005), que possibilitam distinguir machos de fêmeas. Além disso, a amplificação desse gene pode ser realizada através de um único par de *primers* que tem como alvo a mesma região em ambos os cromossomos sexuais.

Nesse contexto, o objetivo do estudo foi estabelecer um protocolo para a sexagem de embriões através do gene da amelogenina, utilizando as técnicas de PCR, Nested PCR, qRT-PCR e Nested qRT-PCR.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Construção dos primers

Para construção dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado a sequência publicada no GeneBank (AMEL X AB091789.1 e AMEL Y AB091790.1), analisada no software Vector NTI 11.0 (Invitrogen). A região alvo foi amplificada utilizando os seguintes *primers*: *forward* 5'CCAAGTGTGTGYTGTAAGTT3' (Y= C ou T) e *reverse*

5 AACARGTAATWTTTCCTTTAG3' (R= A ou G; W= A ou T). O produto amplificado resulta em uma sequência de 399 pb na fêmea e em duas sequências de 282 pb e 399 pb no macho.

Padronização da sexagem molecular

Para a padronização da técnica de sexagem molecular foi feita a extração de DNA genômico a partir de amostras de sangue de bovinos adultos. A metodologia utilizada na extração de DNA foi baseada no protocolo do kit comercial QIAmp DNA Blood Mini Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA)

Com a finalidade de amplificar o gene da amelogenina foi realizada a PCR utilizando 10 pmol de cada primer, 1 µL de DNA como *template*, 12 µL de Master MIX PCR (Promega®) e água milli-Q, com volume final de 25 µL. A PCR foi realizada sob as seguintes condições: 1 ciclo de desnaturação a 94°C por 5 min; 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 1 min, anelamento a 45°C por 1 min e extensão a 72°C por 1 min, e um ciclo final de extensão a 72°C por 7 min.

Produção in vitro de embriões bovinos

A produção de embriões foi realizada a partir de oócitos aspirados de ovários bovinos provenientes de abatedouros do município de Pelotas/RS, segundo técnica descrita por Pereira et al. 2007. Os complexos cumulus-oócitos (CCO) foram aspirados a partir de folículos com 2 a 8 mm de diâmetro. Após lavagem e seleção, os CCO foram incubados para maturação *in vitro* a 38,5°C e 5% de CO₂ durante 22 horas. Os CCO maturados foram inseminados com sêmen bovino comercial descongelado e submetido a um processo de *swim-up* em meio TL-sêmen (In vitro Brasil, Brasil) suplementado com cafeína (2,4 mM, Sigma, ref. C-0750). Após 20 horas, os embriões foram transferidos para o cultivo *in vitro*, os que atingiram o estágio de blastocisto inicial (BLi), no 7º dia de cultivo *in vitro*, foram selecionados para extração de DNA com finalidade de realizar o diagnóstico de sexagem molecular. Os BLi escolhidos apresentavam grau de qualidade morfológica muito bom (G1) e bom (G2) (Lidner e Wright, 1983).

Os embriões foram colocados individualmente em tubos de microcentrífuga junto a 30 µL de H₂O DNase/RNase free e vitrificados em nitrogênio líquido, onde permaneceram estocados até o momento da extração do DNA.

Sexagem Molecular dos embriões bovinos

Para a extração de DNA dos blastocistos vitrificados/desvitrificados foi adicionado 10µL de proteinase K (6 µg/mL) às amostras, que foram incubadas a 37°C durante 1h, com a finalidade de que a enzima alcançasse sua atividade máxima de lise celular. Posteriormente, as mesmas amostras foram incubadas a 98°C por 10 minutos para que ocorresse a inativação enzimática.

A reação de amplificação do DNA utilizando a técnica de PCR foi realizada com 10 pmol de cada *primer* para o gene da amelogenina, 10 µL de DNA, 12 µL de Master MIX PCR e água, com volume final de 25 µL, sob as seguintes condições já descritas para a padronização da sexagem molecular. A técnica de Nested-PCR foi realizada com o objetivo de re-amplificação do produto amplificado no primeiro *round* de PCR. As condições do segundo *round* para o Nested-PCR foram mantidas conforme descrito, porém o *template* utilizado foi 10 µL do produto amplificado no primeiro round da PCR.

No qRT-PCR, as reações foram preparadas com Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen®, USA), em um volume final de 25 µL. As mesmas

condições de temperaturas da PCR foram aplicadas, utilizando-se 10 uL de DNA genômico e o mesmo par de *primers*. No Nested qRT-PCR, realizado para re-amplificar a primeira reação de qRT-PCR, o procedimento anterior foi repetido, porém foi utilizado como *template* 10 uL do produto da qRT-PCR.

Após, todas as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 1,5% utilizando-se marcador molecular de 1 Kb (Invitrogen®). A presença de apenas uma banda do produto específico para bovino visível no gel indica que o DNA da amostra é de fêmea, enquanto que na presença de duas bandas o embrião é diagnosticado como macho.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A padronização da técnica de sexagem de embriões foi estabelecida com sucesso. Os perfis esperados foram alcançados quando a temperatura de anelamento testada foi de 45°C (Fig. 1).

Na 1ª etapa da PCR nenhuma amplificação foi obtida, porém a técnica de Nested-PCR detectou 40% de fêmeas e 40% de machos. A eficiência apresentada foi de 60%, resultante da ocorrência de 20% de divergência da técnica de qRT-PCR e da falha na amplificação em 20% das amostras (Tab.1).

O procedimento de qRT-PCR também não apresentou resultados na 1ª etapa, já no Nested qRT-PCR foram detectados a porcentagem de 50% machos e 50% fêmeas, com eficiência de 80%, concluída devido a 20% de divergência ocorrida em relação à PCR (Tab. 1). Entretanto, a técnica de Nested qRT-PCR demonstrou ser mais sensível do que a técnica de Nested-PCR, detectando a amplificação em todas as amostras.

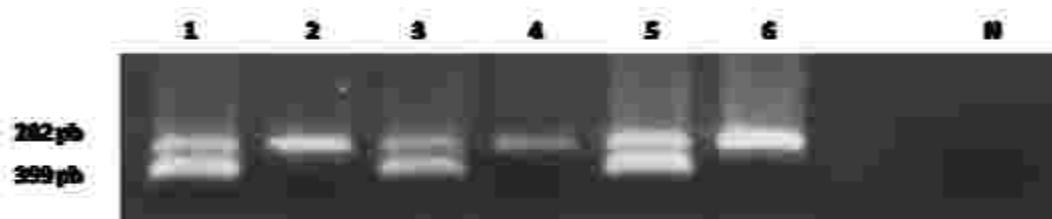


Figura 1. Imagem referente à padronização da sexagem molecular de embriões. N = controle negativo; Amostras 1, 3 e 5 = DNA genômico de macho; Amostras 2, 4 e 6 = DNA genômico de fêmea.

Tabela 1. Resultados obtidos nas técnicas de sexagem molecular através de PCR, Nested-PCR, qRT-PCR e Nested qRT-PCR

Amostras	PCR	Nested-PCR	qRT-PCR	Nested qRT-PCR
Embrião 1	-	-	-	Macho
Embrião 2	-	Fêmea	-	Fêmea
Embrião 3	-	Fêmea	-	Macho
Embrião 4	-	Macho	-	Fêmea
Embrião 5	-	Macho	-	Macho
Embrião 6	-	Macho	-	Fêmea
Embrião 7	-	Macho	-	Macho
Embrião 8	-	Fêmea	-	Fêmea
Embrião 9	-	-	-	Fêmea
Embrião 10	-	Fêmea	-	Macho

As discordâncias encontradas podem ser explicadas pelo DNA utilizado estar pouco concentrado, o que dificultaria a detecção dos fragmentos. No entanto, este fator pode ser contornado através da extração em menor volume final e também através da utilização de embriões em estágios mais avançados de desenvolvimento. Tais alternativas são o alvo de novos ensaios.

4 CONCLUSÃO

Os resultados demonstram que é possível a utilização da sexagem molecular através do gene da amelogenina para determinação do sexo de embriões bovinos. A técnica de Nested qRT-PCR mostrou resultados mais satisfatórios frente ao Nested-PCR. Nossos esforços serão para incrementar a taxa de eficiência na determinação do gênero de embriões bovinos através da utilização da maior concentração de DNA como *template* das reações. Novos ensaios serão realizados utilizando-se o DNA de embriões produzidos a partir de sêmen sexado, para que possamos implementar esse procedimento como rotina em nosso laboratório.

5 REFERÊNCIAS

- ALVES, C.; MAYER, G., TABER, P., EGITO, A., FAGUNDES, V., MCELREAVEY, K., MOREIRA-FILHO, A. Molecular characterization of a bovine Y-specific DNA sequence conserved in taurine and zebu breeds. **DNA Sequence**, v.17, p. 199–202, 2006.
- CAMARGO, L.S.A.; SÁ, W.F.; VIANA, J.H.M.; FERREIRA, A.M.; SERAPIÃO, R.V.; RAMOS, A.A.; MACHADO, M.A.; VALE FILHO, V.R.; ANDRADE, V.J. Identificação do sexo de embriões bovinos fecundados *in vitro* e cultivados com células do *cumulus* na presença de soro. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.27, n.3, p.407-409, 2003.
- GUTIÉRREZ-ADÁN, A.; LONERGAN, P.; RIZOS, D.; WARD, F.A.; BOLAND, M.P.; PINTADO, B.; FUENTE, J. Effect of the *in vitro* culture system on the kinetics of blastocyst development and sex ratio of bovine embryos. **Theriogenology**, v.55, p.1117-1126, 2001.
- LATTANZI W, DI GIACOMO MC, LENATO GM, CHIMIENTI G, VOGLINO G, RESTA N, PEPE G, GUANTI G. A large interstitial deletion encompassing the amelogenin gene on the short arm of the Y chromosome. **Human Genetics**, v. 5, p. 395-401, 2005.
- LINDNER, M and WRIGHT, R. Bovine embryo morphology and evaluation. **Theriogenology**, v. 20, p. 407-41, 1983.
- PEREIRA ,R.; BAPTISTA, M.; VASQUES, M.; HORTA, A.; PORTUGAL, P.; BESSA, R.; CHAGAS E SILVA, J.; PEREIRA, M.; MARQUES, C. Cryo-survival of bovine blastocysts is enhanced by culture with *trans*-10 *cis*-12 conjugated linoleic acid (10t, 12c, CLA). **Animal Reproduction Science**, v.98, p. 293-301, 2007.
- SASAKI, S.; SHIMOKAWA, H. The amelogenin gene. **The international journal of developmental biology**, v. 39, p. 127-33, 1995.
- VAN WAGTENDONK-DE LEEUW, A.M.; MULLAART, E.; ROOS, A.P.W.; MERTON, J.S.; DEN DASS, J.H.G; KEMP, B.; RUIGH, L. Effects of different reproduction techniques: AI, MOET or IVP, on health and welfare of bovine offspring. **Theriogenology**, v.53, p.575-579, 2000.
- ZOHEIR, K.;ALLAM, A. A rapid method for sexing the bovine embryo.**Animal Reproduction Science**, v . 119, p. 92-96, 2010.