

Sexagem fetal de Bovinos através do DNA extraído de plasma materno

Alex Silva da CRUZ ^{1,2*}, Aparecido Divino da CRUZ ^{1,2}; Emília Oliveira Alves COSTA ²

¹ Programa de Pós-Graduação em Biologia Molecular e Celular, Campus Samambaia, Instituto de Ciências Biológicas 4. Goiânia, GO. Brazil. Phone/Fax: 5562 3521 1203.

² Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia, Núcleo de Pesquisas Replicon. Rua 235, n. 40, Departamento de Biologia, Bloco L, Área IV. Setor Universitário. Goiânia, GO.

* correspondência: a.silva.cruz@hotmail.com

Palavras-chave: Bovino; Determinação sexual; DNA; PCR.

1. Introdução

A utilização da ultrassonografia como ferramenta de sexagem fetal está restrita ao estágio de desenvolvimento gestacional inferior a 165 dias que resultam em uma variação substancial nos resultados esperados, com limitações que diminuem a eficiência dos métodos na prática rotineira (Lima Neto, *et al.* 2009), sendo assim, não existe metodologias de determinação do sexo genéticos em estágios gestacional em bovinos (Viana, *et al.* 2000).

O estudo inicial em humanos de Lo e colaboradores (Lo *et al.*, 1997), realizado no final da década de 90, foi pioneiro ao mostrar a presença de alta concentração de DNA fetal livre no plasma. O DNA fetal circulante no sangue materno apresentou qualidade suficiente para ser usado como molde para amplificação pela técnica de PCR. Naquele mesmo estudo, os autores demonstraram também a sensibilidade e a especificidade da determinação do sexo do concepto pela amplificação de DNA fetal circulante em plasma materno em 676 gravidezes, com identificação correta do sexo do concepto em 96% (344/359) e 100% (317/317) para meninas e meninos, respectivamente. O estudo foi conduzido em mulheres com idade gestacional variando de 5 a 40 semanas, utilizando-se diferentes seqüências do cromossomo Y.

O aprimoramento e difusão das técnicas de inseminação artificial, transferência de embrião e sexagem embrionária, evoluíram a partir da demanda de sistemas de produção mais eficientes (Souza, *et al.* 2008). É nesse contexto, que a proposta de desenvolvimento de uma ferramenta técnica que possibilite a identificação precoce do sexo do concepto bovino apresenta sua inovação. Quanto mais precocemente se conhece o sexo dos conceptos, mais eficientes serão as decisões tomadas acerca do manejo do rebanho, um fator importante no sucesso da atividade.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Implementar uma metodologia simples, sensível e econômica para determinação precoce do sexo dos conceptos de bovino, fundamentalmente importante para a otimização do manejo reprodutivo e de recria em programas de seleção e melhoramento animal e em toda a cadeia produtiva.

2.2. Objetivos Específicos

- Realizar estudos de genética molecular aplicados ao diagnóstico precoce dos conceptos bovinos, de maneira semelhante aos mecanismos observados em humanos;
- Avaliar a capacidade de amplificação de DNA fetal presente em plasma materno bovino no decorrer da gestação;
- Avaliar a sensibilidade da sexagem fetal mediante simulação das condições de circulação de DNA fetal nas vacas com gestação em curso;
- Propor uma nova técnica de PCR para a determinação precoce do sexo genético de bovinos por volta da 5^a semana de gestação;
- Difundir a técnica de sexagem fetal para pecuaristas e comunidade interessada junto à FAEG - Federação da Agricultura e Pecuária de Goiás, com o objetivo de promover o aumento qualitativo e quantitativo da produção animal na região.
- Publicar artigos científicos, divulgando o trabalho desenvolvido às comunidades científica e de pecuaristas.
- Formar um mestre com plena capacidade de contribuição e atuação junto as comunidades interessadas na capacitação técnica e no uso da estratégia proposta.
- Ampliar o conhecimento a respeito da sexagem fetal de bovinos e promover a inovação com a divulgação de novas estratégias e metodologias aplicadas às atividades zootécnicas e veterinárias.
- Contribuir para a geração de conhecimento e formação de pessoal qualificado, visando o desenvolvimento científico e tecnológico do país, sobretudo na região Centro-Oeste.

3. Metodologia

O presente estudo de Sexagem fetal de bovinos será conduzido no Núcleo de Pesquisas Replicon (NPR) do Departamento de Biologia da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC Goiás) e no Lacen (Laboratório de saúde Pública Dr. Giovanni Cysneiro). Serão coletadas amostras de sangue periférico de 35 vacas prenhas em idades gestacionais variando 5 a 35 semanas de gestação, junto ao Departamento de Zootecnia da PUC Goiás, sendo transportadas em tubos heparinizados. Essas amostras serão obtidas através de punção da veia caudal com seringas heparinizadas e encaminhadas ao NPR da PUC Goiás onde serão processadas, separando-se o plasma do componente celular por centrifugação (1000 rpm/ 10 min.).

O DNA circulante no plasma materno será isolado e purificado com a utilização de um Kit comercial *lustra Blood GenomicPrep Mini Spin*® (GE Healthcare,UK), conforme instruções do fabricante. Serão utilizados, conjuntos de primers (oligonucleotídeos iniciadores) descritos por Resende e colaboradores (2008).

As amplificações serão feitas em um termociclador, Swift Maxi Gradient Thermal Cycler (ESCO® EUA). Para a 1ª PCR utilizando dois primers, um passo inicial a 94°C por 5min, 40 ciclos a 94°C por 1min de desnaturação, anelamento a 58°C por 30seg e síntese a 72°C por 1min, e uma extensão final de 7min a 72°C. Para PCR com apenas o primer y-específico, um passo inicial de 94°C por 5min, 38 ciclos a 94°C por 1min de desnaturação, anelamento a 58°C por 1min e síntese a 72°C por 1min e uma extensão final de 7min a 72°C, total de 38 ciclos.

Todo o experimento descrito no presente estudo foi realizado em triplicata. As reações de PCR serão preparada para um volume final de 25µL. Para as amostras testadas serão usados 10µL de solução aquosa contendo DNA bovino.As condições de PCR incluíram 0,150pmolesde cada conjunto de primers, 5µL de tampão de PCR Gold STR® (Promega Corporation, EUA), 50mM de cloreto de magnésio e 0,5 µL de Taq DNA polimerase (5U/ µL). Os produtos amplificados serão separados em gel de agarose a 1,5%, mediante corrida eletroforética em campo elétrico constante de 10 V/cm por 2 horas. Os fragmentos serão revelados mediante coloração com brometo de etídio (0.5 µg/mL). As imagens dos géis serão obtidas, arquivadas e analisadas com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (VDS®, Amersham Biosciences, EUA).

4. Resultados parciais e discussão

Ate o presente momento foi realizado um teste de sensibilidade para a sexagem fetal de bovinos, em amostras de DNA diluídas seriadamente, conforme descrito na tabela 1.

Tabela 1. Quantificação e diluição de DNA isolado de sangue de bovinos, usado para se estimar a sensibilidade da PCR para amplificação de regiões cromossômicas autossômicas e alossômicas de bovinos.

Amostras	Diluições ^{DNA} /água	Quantidade de DNA* (ng)
A	—	400
1	1:10 ³	4x10 ⁻¹
2	1:10 ⁶	4x10 ⁻⁴ *
3	1:10 ⁹	4x10 ⁻⁷ *
4	1:10 ¹²	4x10 ⁻¹⁰ *
5	1:10 ¹⁴	4x10 ⁻¹² *
6	1:10 ¹⁶	4x10 ⁻¹⁴ *

AC: amostra controle, *: Estimada matematicamente, pois as amostras foram diluídas a ponto de ultrapassar o limite mínimo de detecção de DNA pelo método fluorimétrico.

A amplificação por PCR das amostras da diluição seriada em macho e fêmea comportaram-se de forma semelhante. Assim, foi possível inferir que a sensibilidade de amplificação da região autossômica de bovinos foi possível até a concentração de 4x10⁻¹² de DNA e a amplificação da região Y-específico foi possível até a quantidade de 4x10⁻⁴ ng/μl de DNA.

5. Conclusão

Nesse sentido, os resultados do presente ensaio demonstraram que a amplificação de amostras misturadas contendo regiões genômicas Y-específico de macho diluída em amostra de fêmea é possível. Os dados gerados deste experimento foram encaminhado para o Arq. Bras. Med. Vet. Zotec. Na forma de uma comunicação e até a presente data estão em fase de publicação. (Protocolo de submissão em anexo).

Os resultados da diluição seriada reforçam a hipótese de que a região Y-específico em amostra sanguínea de vacas prenhas pode ser convenientemente usada como ferramenta de sexagem fetal. Estão em andamento, experimentos laboratoriais de sexagem fetal por PCR a partir do DNA extraído de vacas prenhas, em diferentes estágios gestacionais, pelo nosso grupo.

6. Referências Bibliográficas

1. LIMA NETO, H.R.; BERGMANN, J.A.G.; GONÇALVES, T.M.; ARAÚJO, F.R.C.; BEZERRA, L.A.F.; SAIZ, R.D.; LÔBO, R.B.; SILVA, M.A. Parâmetros genéticos para características de carcaça avaliadas por ultrassonografia em bovinos da raça Guzerá. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. Belo Horizonte, v. 61, n. 1, Feb. 2009 .
2. LO, Y.M.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P.F. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. Lancet. 350:485-7. 1997.
3. RESENDE, M.V.; MOREIRA-FILHO, C.A.; LEAL, C.L.V.; RAMALHO, M.F.P.D.; ALMEIDA A.O.; VANTINI, R.; HOSSEPIAN DE LIMA, V.F.M. Falha na sexagem por inibição do desenvolvimento de embriões bovinos produzidos in vitro com anticorpos anti H-Y. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. v.60, n°.3, p.594-599, 2008.
4. SOUZA, A.H.; SALES, J.N.S.; CREPALDI, G.A.; TEIXEIRA, A.A.; BARUSELLI, P.S. Effect of type of semen (sexed vs non-sexed) and time of AI (60h vs 64h) on pregnancy rates of postpartum Nelore cows inseminated
5. VIANA, J.H.M.; VIANA, A.K.M.; FERREIRA, A.M. Sexagem fetal por meio de ultra-sonografia em receptoras inovuladas com embriões da raça holandesa. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE ZOOTECNIA, Anais. Viçosa: SBZ. p.186. 2000.

Anexo

FUNDAÇÃO ESTUDO PESQUISA EM MEDICINA VETERINÁRIA FEP MVZ EDITORA

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

CNPJ: 16.629.388/0001-24 Insc. Municipal: 302856.001-3
Av. Antônio Carlos, 6627 - Caixa Postal 567 - 30123-970 – Belo Horizonte – MG
Fone: (31) 3409-2042 Fax: (31) 3409-2041
http://journal.vet.ufmg.br E-mail: journal@vet.ufmg.br

Sr.(s): Alex Silva da Cruz, Emília Oliveira Alves Costa, Aparecido Divino da Cruz,
Cumpramos informar-lhe(s) que o artigo:

Sensibilidade da PCR na amplificação do DNA bovino em diluição seriada e mistura de amostra macho e fêmea

enviado para publicação nesta revista, será encaminhado para análise do Corpo Editorial desde que não haja manifestação contrária de qualquer autor do trabalho e que a taxa de submissão esteja quitada.

REG.: 3995/2010

Atenciosamente,

Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia