

## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 1 e 2 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

### Sexagem de embriões bovinos via Nested-PCR

Steven Ribeiro Leal<sup>1</sup>, Reginaldo da Silva Fontes<sup>2</sup>, Valéria Cristina Lopes Marques<sup>3</sup>, Célia Raquel Quirino<sup>2</sup>, Gonçalo Apolinário de Souza Filho<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Doutorando do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal - UENF/Campos dos Goytacazes (RJ). Bolsista UENF. e-mail: steveenleal@yahoo.com.br

<sup>2</sup>Laboratório de Reprodução e Melhoramento Genético Animal (LRMGA) - UENF/Campos dos Goytacazes (RJ)

<sup>3</sup>Núcleo de Análise Genômica (NAG) - UENF/Campos dos Goytacazes (RJ)

**Resumo:** A sexagem de embriões é fundamental para o controle do sexo da descendência na indústria de transferência de embriões, sendo que no Brasil a demanda por esta biotecnologia vem se tornando cada vez maior. O presente trabalho teve como objetivo estabelecer um protocolo para a sexagem de embriões bovinos via *Nested-PCR*. Nos ensaios de sexagem foram utilizadas amostras de DNA de 35 embriões. Nos ensaios com amostras de 5 µL de DNA embrionário foi observada uma eficiência de 84% nas reações, com 85% de concordância entre os diagnósticos realizados. As amostras que falharam para a amplificação nas reações com 5 µL de DNA embrionário foram submetidas a novas reações com 2,5 µL e 1,25 µL de DNA embrionário. No ensaio com amostras de 2,5 µL de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 89% nas reações, enquanto que no ensaio com amostras de 1,25 µL de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 78% nas reações. Os resultados apresentados evidenciam que o protocolo de sexagem de embriões desenvolvido neste trabalho tem um grande potencial para ser aplicado em futuros ensaios com amostras biopsiadas de embriões bovinos.

**Palavras-chave:** amelogenina, bovino, embriões, Nested-PCR, sexagem

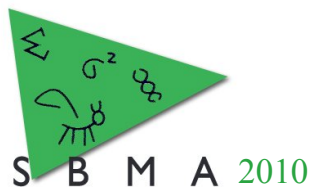
### Bovine embryo sexing via Nested-PCR

**Abstract:** Embryo sexing is fundamental to controlling the sex of offspring in the embryo transfer industry. In Brazil, the demand for this biotechnology is becoming increasingly. The objective of the present study was to establish a protocol for bovine embryo sexing via Nested-PCR. DNA samples from 35 embryos were used in the embryo sexing experiments. In the experiments with 5 µL samples of embryo DNA, there was 84% efficiency in the reactions, with 85% agreement among the diagnoses made. The samples that failed for amplification in the reactions with 5 µL embryo DNA were submitted to new reactions with 2.5 µL and 1.25 µL embryo DNA. In the experiment with 2.5 µL samples of embryo DNA, there was 89% efficiency in the reactions, while in the experiment with 1.25 µL samples of embryo DNA, 78% efficiency was obtained in the reactions. The results presented indicates that the protocol of embryo sexing developed has great potential to be applied in future experiments with biopsied samples from cattle embryos.

**Keywords:** amelogenin, bovine, embryo, Nested-PCR, sexing

### Introdução

O uso de biotecnologias da reprodução, acopladas aos programas de melhoramento genético, ganhou crescente posição de destaque nos sistemas de produção de ruminantes nas últimas décadas. A criopreservação de espermatozoides e a inseminação artificial, associadas à transferência de embriões e à produção de embriões *in vitro*, marcaram fase importante e decisiva para o melhoramento genético dos animais de produção. Mais recentemente, graças ao acelerado desenvolvimento tecnológico, a seleção genética entrou em nova fase na qual a avaliação fenotípica passou a contar com o auxílio da avaliação genômica dos animais, pelo uso de ferramentas da genética molecular. A sexagem de embriões, os estudos de expressão gênica diferencial, a identificação de QTL's (*Quantitative Trait Loci*) e de marcadores genéticos específicos, são partes integrantes da atual tecnologia que está a disposição da seleção animal. A demanda pela sexagem de embriões por PCR no Brasil vem se tornando cada vez maior (Garcia, 2001; Garcia 2006). O gene da amelogenina, o qual está presente nos cromossomos X (*AMELX*) e Y (*AMELY*), é um dos marcadores genéticos que podem ser utilizados de forma eficiente



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 1 e 2 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

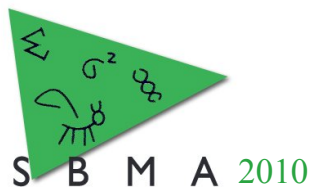
visando à determinação do sexo em animais de produção (Fontanesi *et al.*, 2008). A maior vantagem da utilização de tal gene é que ele também funciona como um controle interno para as reações, visto que é necessário somente um par de *primers* para amplificar fragmentos de tamanhos diferentes a partir dos seus dois alelos. Ainda existem poucos relatos da utilização do gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem de embriões, provavelmente devido à maior dificuldade em se amplificar seqüências de cópia única em embriões. Esta situação pode ser contornada com a introdução de um segundo passo de reação, através da técnica de *Nested-PCR*. A técnica de *Nested-PCR* consiste em dois passos de reação, sendo que no primeiro passo é feita a amplificação de um fragmento maior, o qual vai ser utilizado como molde no segundo passo. No segundo passo das reações utiliza-se um par de *primers* interno a seqüência amplificada anteriormente, o que impede que seqüências inespecíficas geradas no primeiro passo sejam amplificadas novamente. O principal objetivo da técnica de *Nested-PCR* é aumentar a sensibilidade e a especificidade das reações (Almodin *et al.*, 2005). Neste sentido, este trabalho foi conduzido com a finalidade de estabelecer um protocolo para a sexagem de embriões bovinos. Para isto, foram desenvolvidos novos *primers* para a amplificação de regiões do *intron 5* do gene da amelogenina bovina via *Nested-PCR*.

### Material e Métodos

Ovários de vacas mestiças cíclicas em idades variadas foram obtidos em abatedouros da região do município de Campos dos Goytacazes (RJ). Os complexos *cumulus*-oócitos (COCs) foram aspirados de folículos com diâmetro de 2-6 mm. O meio de maturação *in vitro* utilizado foi o TCM 199 com sais de EARLE e L-glutamina, suplementado com 10% de SFB, 0,5 µg/ml de FSH, 5 µg/mL de LH e antibióticos. A seleção dos espermatozoides para a fecundação *in vitro* (FIV) foi feita segundo a técnica de gradiente de Percoll. O meio de fecundação *in vitro* utilizado foi o TALP-FIV, suplementado com 2 mM de penicilamina, 1 mM de hipotaurina, 250 mM de epinefrina, e 20 µg/mL de heparina. Dois meios de cultivo foram utilizados para a produção *in vitro* dos embriões, o meio TCM 199 com sais de EARLE e L-glutamina, suplementado com 10% de SFB e antibióticos; e o meio SOF (Nutricell®). A extração de DNA dos embriões foi executada de acordo com a metodologia descrita por Pomp *et al.* (1995). O programa de PCR consistiu em um passo inicial de desnaturação a 94°C por 15 minutos, seguido por 40 ciclos de amplificação, sendo que em cada ciclo foi estabelecido um tempo de 60 segundos para a desnaturação da dupla fita a 94°C, 60 segundos para o anelamento dos *primers* (conjunto F2R3/F3R4), e 120 segundos para a síntese da nova fita a 72°C. Após o último ciclo, as reações tiveram um passo final de 7 minutos a 72°C para a extensão final das fitas. Para o primeiro passo das reações foi desenvolvido o conjunto de *primers* F2R3 (par externo), enquanto que para o segundo passo foi desenvolvido o conjunto de *primers* F3R4 (par interno). A mistura das reações foi constituída de: água ultrapura autoclavada, MgCl<sub>2</sub> (2 mM), tampão para PCR [10 mM Tris-HCl (pH 8.3) e 50 mM KCl], dNTP's (200 µM de cada), *Taq* DNA polimerase (0,5 U), um par de *primers* externo (20 p/mol de cada), e 5 µL de solução de DNA embrionário, totalizando um volume final de 25 µL. Aliquotas de 0,5 µL dos produtos amplificados no primeiro passo das reações foram utilizadas como DNA molde no segundo passo das reações (*Nested-PCR*), onde foi utilizado um par de *primers* interno (20 p/mol de cada) a seqüência amplificada anteriormente. Os parâmetros empregados no segundo passo das reações foram os mesmos empregados no primeiro passo das reações, com exceção da temperatura de anelamento dos *primers* (45°C no primeiro passo, e 43°C no segundo passo). Os produtos amplificados foram detectados através de eletroforese em gel de agarose (2%), contendo 0,5 µg/mL de brometo de etídio. Após a eletroforese, os géis foram fotografados em um transiluminador equipado com luz ultravioleta, sendo posteriormente analisados.

### Resultados e Discussão

Amostras de DNA de 35 embriões foram utilizadas nos ensaios de sexagem. Os embriões (intactos) tiveram o seu DNA extraído em um volume de 100 µL de solução tampão para PCR, de modo que amostras de 5 µL de DNA foram empregadas nas reações. Nos ensaios com amostras de 5 µL de DNA embrionário foi obtida uma eficiência de 84% nas reações, com 85% de concordância entre os diagnósticos realizados (ensaios realizados em duplicata). No primeiro ensaio 31 amostras foram diagnosticadas, enquanto que 4 amostras falharam para a amplificação (89% de eficiência). No segundo



## VIII Simpósio Brasileiro de Melhoramento Animal

Maringá, PR – 1 e 2 de julho de 2010

Melhoramento Animal no Brasil: UMA VISÃO CRÍTICA

ensaio 28 amostras foram diagnosticadas, enquanto que 7 amostras falharam para a amplificação (80% de eficiência). A amplificação de apenas um fragmento de DNA de 398 pb (AMELX) foi assumida como diagnóstico indicador de fêmea para a amostra; e a amplificação de dois fragmentos de DNA, um de 398 pb (AMELX) e outro de 281 pb (AMELY), foi assumida como diagnóstico indicador de macho para a amostra. Em duas situações, as amostras foram diagnosticadas somente através da amplificação do fragmento de 281 pb. De acordo com os resultados obtidos no primeiro ensaio, 19 embriões foram identificados como machos (61%), e 12 embriões foram identificados como fêmeas (39%). De acordo com os resultados obtidos no segundo ensaio, 16 embriões foram identificados como machos (57%), e 12 embriões foram identificados como fêmeas (43%). Como os controles negativos não apresentaram nenhuma amplificação, a possibilidade de contaminação das reações com DNA exógeno foi desconsiderada. As amostras de embriões que falharam para a amplificação em pelos menos um dos ensaios com amostras de 5 µL de DNA embrionário (amostras referentes a nove embriões), foram submetidas a novas reações com amostras de 2,5 µL e 1,25 µL de DNA embrionário. Nas reações com amostras de 2,5 µL de DNA embrionário foi observada uma eficiência de 89%, sendo que somente uma amostra falhou para a amplificação. Já nas reações com amostras de 1,25 µL de DNA embrionário foi observada uma eficiência de 78%, sendo que duas amostras falharam para a amplificação. A escolha do gene da amelogenina como marcador genético para a sexagem foi justificada pelo fato dele funcionar como um controle interno para as reações, sem a necessidade de utilizar um par de *primers* adicional. Visto que o gene da amelogenina possui apenas uma cópia em cada cromossomo sexual, a eficiência da técnica de PCR pode ser comprometida. Tal situação torna-se ainda mais grave no caso de embriões, onde a quantidade de DNA disponível para as reações é limitada. Para aumentar a eficiência e a sensibilidade da técnica de PCR convencional, as reações foram executadas em dois passos (*Nested-PCR*). O conjunto de primers F2R3/F3R4 apresentou uma alta especificidade, visto que nenhuma amplificação inespecífica foi observada nos ensaios realizados. Como a sequência alvo é especificada por dois pares de *primers*, a técnica de *Nested-PCR* reduz consideravelmente a amplificação de fragmentos inespecíficos, o que pode ser evidenciado pelos resultados obtidos no presente trabalho.

### Conclusões

O conjunto de *primers* F2R3/F3R4 é específico para a amplificação de um fragmento de DNA de 398 pb do alelo *AMELX*, e de um fragmento de DNA de 281 pb do alelo *AMELY*, a partir da região do *intron 5* do gene da amelogenina bovina.

As taxas de eficiência obtidas nos ensaios com amostras de DNA embrionário são um grande indicativo de que a técnica de *Nested-PCR* desenvolvida neste trabalho poderá ser aplicada com sucesso em ensaios com amostras biopsiadas de embriões bovinos.

### Referências Bibliográficas

- ALMODIN C.G., MORON A.F., KULAY JR. L., MINGUETTI CÂMARA V.C., MORAES A.C., TORLONI M.R. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility** 84: 895-899, 2005.
- FONTANESI L., SCOTTI E., RUSSO V. Differences of the porcine amelogenin X and Y chromosome genes (AMELX and AMELY) and their application for sex determination in pigs. **Molecular Reproduction and Development** 75(11): 1662-8, 2008.
- GARCIA J.F. Practical considerations of embryo manipulation: Preimplantation genetic typing. **Theriogenology** 56: 1393-1399, 2001.
- GARCIA J.F. Utilização de marcadores moleculares para a seleção. In: 2º Simpósio Internacional de Reprodução Animal, Londrina-PR, **Anais: 195-201**, 2006.
- POMP D., GOOD B.A., GEISERT R.D., CORBIN C.J., CONLEY A.J. 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.** 73: 1408-1415, 1995.