

ARTHUR NASCIMENTO DE MELO

**SEXAGEM FETAL EM LÍQUIDO AMNIÓTICO OVINO (*Ovis aries L.*, 1758) POR
PCR**

**Recife- PE
2008**

ARTHUR NASCIMENTO DE MELO

**SEXAGEM FETAL EM LÍQUIDO AMNIÓTICO OVINO (*Ovis aries L.*, 1758) POR
PCR**

**Dissertação apresentada ao programa de Pós-
graduação em Ciência Veterinária da
Universidade Federal Rural de Pernambuco
como parte dos requisitos para obtenção do
Grau de Mestre em Ciência Veterinária**

Área de Concentração:
Reprodução Animal

Profa Orientadora:
Áurea Wischral, PhD

**Recife-Pe
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA

M528s Melo, Arthur Nascimento de
Sexagem fetal em líquido amniótico ovino (*Ovis aries*
L., 1758) por PCR / Arthur Nascimento
de Melo. -- 2008.
50 f. : il.

Orientadora : Aurea Wischral
Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) -- Uni-
versidade Federal Rural de Pernambuco. Departamento de
Medicina Veterinária.
Inclui bibliografia.

CDD 636.308 926

1. Reprodução animal
2. Amniocentese
3. SRY
4. AML – X
5. PCR
6. Fluído aminiótico
7. *Ovis aries*
- I. Wischral, Áurea
- II. Título

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA VETERINÁRIA**

**SEXAGEM FETAL EM LÍQUIDO AMNIÓTICO OVINO (*Ovis aries L.*, 1758) POR
PCR**

Dissertação de Mestrado elaborada por

ARTHUR NASCIMENTO DE MELO

Aprovada pela

BANCA EXAMINADORA

**Profa. Dra. Áurea Wischral
Orientadora**

Profa. Dra. Márcia Bezerra da Silva

Profa. Dra. Ana Lúcia Figueiredo Porto

Prof. Dr. Manoel Adrião Gomes Filho

**Recife-PE
2008**

DEDICATÓRIAS

A Deus Pai, Filho e Espírito Santo, razão da minha vida, pela convivência diária e presença viva em mim...

Aos meus amados pais, Clayton e Socorro, por todo o amor e compreensão que recebo diariamente...

Ao meu irmão Brunno, por todo o apoio, amor e confiança depositados em minha pessoa...

A Deborah e seu amor por mim, por ter dividido comigo momentos difíceis e felizes, me incentivando constantemente a ir sempre além...

Aos amigos que estiveram comigo desde o início da caminhada até aqui, por todo o apoio e amor... Deus os põe em minha vida e o que Ele faz é sempre certo...

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Áurea Wischral, pela acolhida, paciência, atenção, confiança e ensinamentos, principalmente os exemplos de ser humano, os quais me ajudam a acreditar cada vez mais no amor e nas pessoas.

Ao Prof. Dr. Marcos Antônio Lemos de Oliveira, por todos os ensinamentos de vida e profissionais e por todas as oportunidades e confiança depositados em mim desde a Graduação até hoje.

À Universidade Federal Rural de Pernambuco, através do curso de Pós-graduação em Ciência Veterinária, representado pela Profa. Dra. Áurea Wischral, Coordenadora deste curso, por permitir desfrutar dos ensinamentos desta casa.

Ao Prof. Dr. Manoel Adrião, por todo o seu acolhimento e profissionalismo, atenção e dedicação, sempre pronto a ajudar e ensinar.

Aos meus amigos de república estudantil, Edivaldo Rosas e Filipe Queirós, por todos os momentos divididos e apoio prestado uns aos outros, constituindo uma verdadeira família durante estes últimos anos.

Ao meu amigo de Pós-graduação Cristiano Rocha de Aguiar Filho, pela sua honestidade, dignidade e fidelidade, exemplo de ser humano.

Aos companheiros do Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada, pelos momentos de trabalho e alegria compartilhados.

A todos os professores e funcionários da Área de Reprodução Animal, por toda a ajuda fornecida para que este trabalho fosse realizado.

À Escola de Formação e Evangelização Maanaim e às pessoas maravilhosas que a compõem, por me dar a chance de crescer e aprender a amar.

Ao Matadouro Suimax pela receptividade e abertura para realização desta pesquisa.

À família Batista, por todo o amor, confiança, respeito, carinho e acolhimento.

Aos meus amigos, Renata, Isabel, Hugo, Diogo, Natália, Fellype, Sílvio, Pedro, Caio, Marcelo, Mayara, Edlângela, Ellem, Rodrigo, Edízia, André, João, Tarcyla, Johann, Pedro Henrique, Claritita, Virna, Bruno, Liliane, Nerivaldo, Cássia Elayne, Heitor, Flávia, Mariana, Robson, Aline, Bruno Manso, Daniel, Thiago, Dinno, Erick, Guilherme, Ismael, Noêmio, Danillo, Elyelson, André, Rômulo e todos os amigos de Natal, da Igreja e da Universidade, por todos os momentos que vivemos juntos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e confiança depositada.

RESUMO

Com o objetivo de realizar a identificação do sexo fetal em ovinos, foram submetidas à técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), 45 amostras de DNA extraídas do líquido amniótico de úteros prenhes, sendo 24 amostras de machos e 21, fêmeas. O fluido amniótico foi obtido por amniocentese guiada por ultra-sonografia para maior precisão na aspiração, como também para posterior aplicação *in vivo* da técnica, com efeito de simulação. A idade gestacional foi estipulada a partir da medição dos fetos com paquímetro, a qual apresentou variação de 3,3 a 46,5 cm. As amostras foram divididas em três grupos segundo Kadu e Kaikini (1987): Grupo 1 (zero a 8,6cm) da concepção ao 60^o dia de gestação, Grupo 2 (8,7 a 26 cm) entre o 61^o e o 105^o dia e Grupo 3 (26,1 cm em diante) 106^o até o nascimento. O DNA foi extraído através do método fenol-clorofórmio, obtendo-se uma quantidade inferior a 50 ng por μ l ao ser quantificado por comparação através de λ -lambda e visualizado em gel de agarose 1%. Na amplificação do material genético, foram utilizados os “primers” referentes aos genes SRY (116pb), encontrado no cromossomo Y presente apenas em machos, e Aml-X (300pb), de caráter autossômico, presente em ambos os sexos. Em todas as amostras foi possível realizar a sexagem fetal e os primers utilizados demonstraram ser bastante eficientes. O sexo foi confirmado pela análise morfológica dos fetos, com exceção do conceito cujo tubérculo genital ainda não havia migrado, comprovando a eficácia da ferramenta molecular PCR para este exame.

ABSTRACT

In order to achieve the identification of sex in fetal sheep, were subjected to the technique of Polymerase Chain Reaction (PCR), 45 samples of DNA extracted from amniotic fluid of pregnant uterus, 24 samples of males and 21 females. The amniotic fluid was obtained by amniocentesis guided by ultrasound for greater accuracy in aspiration and also for subsequent application of the technique in vivo, as simulation. Gestational age was laid on the measurement of fetuses with caliper, which showed variation of 3.3 to 46.5 cm. The samples were divided into three groups based in Kadu and Kaikini (1987): Group 1 (zero to 8.6 cm) from conception to the 60th day of gestation, group 2 (8.7 to 26 cm) among 61th and 105th day, and Group 3 (26,1 cm on) 106th day until the birth. The DNA was extracted using the method phenol-chloroform, obtaining a quantity of less than 50 ng per μL , quantified by comparing through λ - lambda and visualized in 1% agarose gel. For amplification of genetic material, were used "primers" to the SRY gene (116pb), found in the Y chromosome present only in males, and Aml-X (300pb), autosomal, present in both sexes. In all samples was possible to sex the fetuses and the primers used shown to be quite effective. The sex was confirmed by morphological analysis of fetuses, aside from the concept who genital tubercle still had not moved, proving the effectiveness of the PCR molecular tool for this examination.

LISTA DE FIGURAS**Página**

Figura 1 - Resultado da amplificação por PCR, apresentando bandas correspondentes ao AML-X (300pb) e SRY (116pb) em ovinos machos.....	35
Figura 2 - Resultado da amplificação por PCR, apresentando a banda correspondente ao AML-X (300pb) em ovinos fêmeas.....	35

LISTA DE TABELAS**Página**

Tabela 1 - Número de fetos (n), Tamanho (cm), a Média (M) e o erro padrão da média (EPM) do CCC – paquímetro (cm) em relação à sexagem fetal (M- machos; F – fêmeas).....	36
---	----

SUMÁRIO

	Página
DEDICATÓRIAS.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	ix
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVIÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Embriologia do aparelho reprodutivo.....	4
2.2 Líquido amniótico.....	6
2.2.1 Composição.....	7
2.2.2 Citologia amniótica.....	8
2.2.3 Aspectos físico-químicos do LA.....	9
2.3 Determinação da idade gestacional.....	9
2.4 Reação em cadeia da polimerase.....	10
2.5 Sexagem Fetal.....	12
2.6 Ultra-som.....	16
3 REFERÊNCIAS.....	18
EXPERIMENTO.....	28
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	40

1 INTRODUÇÃO

A moderna produção pecuária deve ser fundamentada na exploração animal em condições de bem estar, respeito ao ambiente e com alta produtividade, visando o atendimento das necessidades da espécie humana (CASTRO e MELO, 2001).

A caprino-ovinocultura na Região Nordeste, que outrora somente apresentava baixo desempenho produtivo decorrente da ausência marcante de tecnologia, tem experimentado na atualidade significativo progresso na qualidade genética dos rebanhos em função do emprego de biotécnicas reprodutivas que têm motivado a substituição do tradicional modelo de criação pelo mais tecnificado que objetiva a produção em escala de agro-negócio (BANDEIRA et al., 2004).

Considerando que a caprino-ovinocultura deve ser racionalmente explorada em função do monitoramento reprodutivo assumir um importante papel na escala produtiva, faz-se necessário implementar a utilização de biotécnicas que maximizem a produtividade do rebanho. Por isso foi gerada, nos últimos anos, uma série de biotécnicas, como a inseminação artificial (IA) e a transferência de embriões (TE) na expectativa de tecnificar a produção das criações mais estruturadas. Na realidade, estas biotécnicas contribuem para aumentar a fertilidade, a prolificidade e acelerar o melhoramento genético dos rebanhos, bem como favorecem os proprietários na tomada de decisões sobre a exploração, já que permitem submeter seus rebanhos a graus maiores ou menores de intensificação (SANTOS, 2003).

A punção da cavidade amniótica pode ser feita pela via abdominal ou pela vaginal. A primeira, mais simples e inofensiva, relegou a segundo plano as que alcançavam o âmnio através do canal cervical. A amniocentese na espécie humana, cujo emprego se difunde cada vez mais, é indicada na pesquisa e na clínica, nas seguintes circunstâncias: 1) Obtenção de líquido amniótico para estudos bioquímicos e citológicos; 2) Para permitir a determinação da pressão amniótica e o estudo da contratilidade uterina; 3) Identificação do grupo sanguíneo fetal; 4) Obtenção de líquido como subsídio ao diagnóstico e ao pronóstico da doença hemolítica perinatal e da gravidez biologicamente prolongada; 5) Na assistência ao polidrâmnio agudo, como tratamento sintomático; no polidrâmnio de evolução progressiva como ensaio de terapêutica fisiopatológica e no trabalho parturiente para melhorar a cinética uterina; 6) Permitindo a injeção de substâncias que provoquem a morte fetal ou induzam o trabalho de abortamento ou de parto (indicação hoje obsoleta); 7) Para injetar contrastes

radioopacos na amniografia; 8) Para determinar o volume amniótico; 9) Nos estudos sobre a circulação do líquido amniótico e a passagem transamniótica de substâncias diversas; 10) Obtenção de líquido para o diagnóstico antenatal do sexo (NAHOUM, 1989).

Em pequenos ruminantes, a determinação precoce do sexo fetal pode contribuir, antes de tudo, para o avanço de diversas áreas da pesquisa fundamental, visando, por exemplo, o diagnóstico prematuro do sexo de fetos após a inseminação artificial com sêmen sexado (CRAN et al., 1997; JOHNSON, 2000; GARNER, 2001), após a transferência de embriões com sexo pré-determinado (GUTIERREZ-ADAN et al., 1997) ou de embriões produzidos *in vitro* pela técnica da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (CATT et al., 1996).

A descoberta da técnica da PCR por Saiki et al. (1988) motivou os primeiros estudos direcionados à identificação do sexo de embriões em bovinos (HERR e REED, 1991) visando sua exploração comercial (THIBIER e NIBART, 1992). A utilização de ferramentas moleculares na sexagem fetal permite, ao criador, a negociação precoce do produto, otimizando assim o programa reprodutivo e conseqüente aumento nos lucros da atividade. Porém, este recurso altamente específico ainda é pouco utilizado, o que estimulou o presente estudo a avaliar sua utilização e colaborar para o estreitamento dessa distância na prática.

Com isso, objetivou-se avaliar a aplicabilidade e a eficiência da PCR multiplex para identificar o sexo de fetos na espécie ovina, utilizando líquido amniótico coletado de úteros gestantes provenientes de matadouro.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Embriologia do aparelho reprodutivo

Os sistemas reprodutores masculino e feminino apresentam a mesma origem embrionária (MARTIN e ALFONSO, 1985). As gônadas são primitivamente formadas por células germinativas (gonócitos) derivadas do interstício gonodal localizado no saco vitelino, de onde migram para a região mesenquimal, chamada crista gonadal (NASCIMENTO e SANTOS, 1997).

A formação da crista gonadal resulta da proliferação do epitélio celômico e da agregação do mesênquima subjacente a esta região (RÜSSE, 1991) e a partir de então ocorre a diferenciação das gônadas em testículos ou ovários num processo que depende dos cromossomos sexuais. Nos embriões de ambos os sexos, as cristas gonadais surgem inicialmente sob a forma de uma pequena proeminência longitudinal na superfície do celoma, a qual está localizada entre a parede do corpo e os órgãos internos (MARTIN e ALFONSO, 1985; MICHEL, 1986), na região dos mesonéfrs. Esta pequena proeminência, também conhecida como rins temporários, forma os ductos eferentes no sexo masculino, enquanto que no feminino existem apenas vestígios rudimentares (SCHNORR, 1989).

Entre o 35^o e o 40^o dia de gestação, o embrião ovino e caprino é, do ponto de vista anatômico, sexualmente indefinido e ambivalente (BÜRSTEL, 2002). A determinação do sexo ocorre no momento da fecundação e influencia o desenvolvimento da gônada indiferenciada. Acredita-se que o fator de diferenciação testicular (TDF), gene localizado no cromossomo Y, conhecido como SRY, corresponde à região determinante do sexo do cromossomo Y. Sendo assim, no caso dos cromossomos sexuais XY, o Y induz a formação dos testículos, determinando o sexo gonádico masculino (WILKENS, 1982).

Com a diferenciação das gônadas em testículos ocorre a formação dos túbulos seminíferos e das células de Leydig, responsáveis pela secreção de testosterona. Esta, por sua vez, estimula tanto a diferenciação do sistema urogenital primitivo em próstata, pênis e bolsa escrotal quanto o desenvolvimento dos órgãos sexuais externos masculinos (SCHNORR, 1989).

No caso das células primordiais possuírem apenas cromossomos sexuais XX, as gônadas indiferenciadas desenvolvem-se em ovários e estabelecem o sexo gonádico feminino (WILKENS, 1982).

O desenvolvimento das vias genitais internas masculinas ocorre a partir dos ductos de Wolf ou ductos mesonéfricos que surgem sob estímulo hormonal da testosterona produzida pelas células intersticiais de Leydig. Parte desse hormônio é metabolizada em diidrotestosterona que estimula o seio urogenital a diferenciar-se nos órgãos genitais masculinos externos. As células indiferenciadas de suporte, presentes na gônada masculina, secretam o Fator Inibidor de Müller (MIF) que inibe o desenvolvimento dos ductos paramesonéfricos, também chamado de ductos de Müller. A genitália interna feminina desenvolve-se na ausência do estímulo da testosterona, não ocorrendo o desenvolvimento dos ductos mesonéfricos e sim dos ductos paramesonéfricos por não haver produção de MIF, enquanto o seio urogenital forma os órgãos sexuais externos femininos devido à ausência da diidrotestosterona (NASCIMENTO e SANTOS, 1997; MOORE e PERSAUD, 2000).

O desenvolvimento embrionário da genitália externa está relacionado com a porção mais externa do seio urogenital e do mesênquima circundante (MARTIN e ALFONSO, 1985). Ao formarem-se as pregas corporais, o mesoderma lateral progride lateral e ventralmente até a cloaca para originar o componente mesodérmico da parede ventral do abdome. Em torno da membrana cloacal este mesoderma forma três estruturas: o tubérculo genital (extremo cranial da membrana cloacal), as pregas cloacais (lateralmente à membrana cloacal) e as eminências genitais ou labioescrotais (lateralmente às pregas cloacais) (NODEN e DE LAHUNTA, 1990). A fusão do septo uroretal (futura musculatura perineal) com a membrana cloacal resulta na divisão desta em membrana anal e urogenital, com conseqüente desenvolvimento das pregas anais e uretrais (RÜSSE e GRUNERT, 1993). Após o rompimento das membranas anal e urogenital formam-se, respectivamente, os orifícios anal e urogenital. No embrião fêmea, a uretra e a vagina abrem-se em uma cavidade comum, chamada de vestíbulo vaginal (NODEN e DE LAHUNTA, 1990).

No embrião macho, sob a influência do hormônio diidrotestosterona produzido pela gônada fetal, o tubérculo genital sofre um acentuado crescimento e assume a forma cilíndrica que origina o pênis. No embrião do sexo feminino, devido à ausência de andrógenos testiculares e a ação provável de esteróides maternos, placentários e ovarianos fetais, o tubérculo genital desenvolve-se pouco e forma o clitóris (WILKENS, 1982; SCHNORR, 1989).

Nas fêmeas, o seio urogenital permanece curto e ao se dilatar origina o vestíbulo vaginal (MICHEL e SCHWARZE, 1970). As pregas urogenitais permanecem separadas para originar os lábios vulvares, cobrindo o tubérculo genital situado no vestíbulo. Com o alongamento do tronco, as eminências genitais situam-se cranialmente ao tubérculo genital (NODEN e DE LAHUNTA, 1990). Nas fêmeas e nos machos, as duas saliências ao redor das pregas uretrais, saliências labioescrotais, irão participar na formação da vulva e do escroto, respectivamente (WILKENS, 1982; SCHNORR, 1989).

2.2 Líquido amniótico

Os animais domésticos possuem os líquidos alantoideano e amniótico, nas respectivas bolsas, diferenciando-se assim do homem, que apresenta como único líquido fetal o fluido amniótico (GRUNERT e BIRGEL, 1982).

A cavidade amniótica é formada cerca de 13 a 16 dias após a concepção em ovelhas e apresenta-se como um saco de camada dupla repleto de líquido e em íntimo contato com o feto (ROBERTS, 1971). A origem dos fluidos fetais (amniótico e alantoideano) e as secreções que para ele contribuem são complexas. Existem pelo menos quatro locais em que podem ocorrer a absorção e a secreção: o sistema respiratório, o urinário, o digestivo e a pele (TONIOLLO e VICENTE, 1995; HAFEZ e HAFEZ, 2004).

No feto ovino, a urina formada nos mesonéfrons passa para dentro da cavidade alantodeana por meio do úraco, até cerca de 90 dias de gestação. Depois disso, a urina passa em quantidades crescentes para a cavidade amniótica devido à oclusão do úraco e à abertura da uretra. Deste modo, a urina fetal forma a maior fonte de fluido amniótico na última fase da gestação em ovinos (HAFEZ e HAFEZ, 2004).

O líquido amniótico (LA) desempenha um papel importante no crescimento e desenvolvimento fetal. Circunda e protege o feto na cavidade amniótica, proporcionando um coxim contra os limites constritivos do útero grávido, permitindo-lhe espaço para movimento e crescimento, protegendo-o de traumatismos externos. Este espaço ao redor do feto é importante para o desenvolvimento e maturação de seus pulmões, assim como o crescimento e desenvolvimento normal de seus membros. O líquido permite flexão e extensão periódicas destes, evitando contraturas articulares, além do que, banhando constantemente o feto, mantém sua temperatura corporal e participa da homeostasia de líquidos e eletrólitos (VELHO et al., 2001).

Para que se mantenha a homeostase fetal é necessário que a quantidade de água excretada pelo feto seja proporcional àquela que se encontra em seu organismo. De uma forma sintética, ao explicar a fisiologia de formação e eliminação do LA, pode-se dizer que no início da gestação, antes que se estabeleçam a micção e a deglutição, o mecanismo provável para formação do LA é o transporte ativo de solutos através do âmnio para o espaço amniótico, o que possibilita a passagem ativa de água em função da diferença de gradiente químico (KLINGENFUSS et al., 1997).

Para obtenção de fluidos fetais, o método eleito é amniocentese transabdominal, sendo um procedimento seguro que pode ser realizado no ambulatório. Em ovinos, Mellor e Slater (1974) indicaram a cateterização para se obter os líquidos fetais; Lovell et al. (1995) recomendaram a ultra-sonografia, em caprinos, como guia da via aspirativa, entre os dias 59 a 65 de gestação, como técnica ideal. Contudo, é possível obter amostras em matadouros, do início ao final da gestação (HERVEY e SLATER, 1967; BAETZ et al., 1976; DOMINGUES et al., 1990; WINTOUR e McFARLANE, 1993).

Através da aspiração de líquido amniótico pela via transvaginal, Makondo et al. (1997) realizaram com sucesso a identificação do sexo fetal em bovinos das raças Holstein-Freisian e Hereford x Freisian utilizando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Em se tratando do líquido amniótico, estes pesquisadores afirmaram ser uma importante ferramenta para o futuro.

2.2.1 Composição

Os fluidos fetais contêm constituintes metabólicos, eletrólitos, enzimas, hormônios, células e outras estruturas (HAFEZ e HAFEZ, 2000). Os principais componentes presentes neste líquido estão em suspensão e em dissolução. Entre os elementos em suspensão encontram-se células esfoliadas do âmnio, principalmente do feto, assim como lanugem e gotículas de gordura. Como elementos de dissolução, são encontradas substâncias orgânicas e inorgânicas. Os eletrólitos representam as substâncias inorgânicas, sendo alguns relacionados com a idade gestacional. Entre os compostos orgânicos estão as proteínas, os aminoácidos, a alfa-fetoproteína, as substâncias nitrogenadas não-protéicas, os lipídios, os carboidratos, as vitaminas, as enzimas, a bilirrubina, os hormônios e as prostaglandinas (REZENDE et al., 1998).

As proteínas do feto são sintetizadas na placenta ou no próprio organismo a partir de aminoácidos da mãe. As membranas fetais são ativas na síntese de proteínas. Nos líquidos

fetais elas têm origem urinária, pois as proteínas plasmáticas não atravessam a membrana fetal em ovinos (HERVEY e SLATER, 1967).

A glicose é o principal açúcar sanguíneo do feto, sendo, portanto, a mais importante fonte de energia. A maior parte da glicose utilizada pelo feto é fornecida pela mãe, sendo mínima a produção endógena. Porém, o conceito pode sintetizar, pela glicogênese: frutose, galactose ou pela neoglicogênese: piruvato, lactato e alanina. A concentração de glicogênio placentário é elevada durante o início da gestação, decrescendo com o seu avanço. À medida que isto ocorre, o feto começa ter sua própria glicogênese e passa a armazenar o glicogênio na forma de reserva hepática (REZENDE E MONTENEGRO, 1995).

A creatinina é um dos elementos bioquímicos mais estudados para determinar a maturidade fetal e suas variações durante a gestação. Sua presença é explicada pela simples difusão, por diferença de gradiente, pelos corioâmnios (cordão umbilical, mucosa digestiva e mucosa bronquial) em ambas as direções. Esta é uma substância nitrogenada não proteica derivada da filtração glomerular, que atravessa totalmente esta membrana, de onde se pode concluir que a maturidade renal aumenta sua concentração no líquido amniótico (VOTTA, 1975).

A literatura específica para a análise bioquímica dos líquidos fetais, segue as mesmas técnicas, já padronizadas, para bioquímica sanguínea que também é um fluido corpóreo (ZOGNO et al., 2004).

2.2.2 Citologia

O LA apresenta-se rico em células escamadas que delimitam a cavidade amniótica e também células provenientes do feto. A base morfológica da citologia amniótica está estritamente relacionada ao feto, decorrendo da necessidade de ser conhecido o desenvolvimento intra-uterino da pele, das mucosas respiratórias e digestivas, das coberturas geniturinárias e dos demais elementos que tenham contato com este líquido. Torna-se necessária ainda, a investigação da fisiologia de cada epitélio, seus ritmos de crescimento e maturação (REZENDE et al., 1998).

Benavides et al. (1983) em estudo para determinar o valor citológico do líquido amniótico no diagnóstico pré-natal do sexo, demonstraram uma significativa diferença na citologia de fetos masculinos e femininos, já que nestes últimos encontraram um maior número de células, com predomínio de células intermediárias basófilas e células naviculares, em comparação com a menor quantidade de células e predomínio de células escamosas

intermediárias e superficiais acidófilas com ausência de células naviculares nos fetos masculinos.

2.2.3 Aspectos físico-químicos

Alguns parâmetros físico-químicos como volume, pH e osmolaridade, são freqüentemente analisados por sua importância.

Para o volume não é conhecido limite mínimo normal dos líquidos fetais; sabe-se, porém, que seu aumento é patológico (polidramnia), não devendo passar de 20 litros para as grandes espécies animais, 5 litros para pequenos ruminantes e 0,5 litro para carnívoros (GRUNERT e BIRGEL, 1982). Sabe-se que a anormalidade no volume do LA (tanto para mais, como para menos) está associada a um aumento significativo nas taxas de morbidade e mortalidade perinatais (ALENCAR JUNIOR, et al., 1995; MERCER, et al., 1984).

Muitas reações intracelulares, inclusive de cadeias metabólicas, são pH dependentes. Assim sua manutenção é essencial e realizada pelos sistemas de tampões sanguíneos, sistema respiratório e renal (STRAYER, 1995).

A osmolaridade é uma determinação da quantidade relativa de solutos em solução. A osmolaridade pode ser um indicativo da capacidade de reabsorção renal, assim como, pode informar sobre a desidratação do organismo ou anormalidades do hormônio antidiurético (STRAYER, 1995).

2.3 Determinação da idade gestacional

Para o diagnóstico preciso da idade fetal, são necessárias algumas medidas morfológicas que mostrem uma taxa rápida de crescimento constante e que seja menos variável em determinada fase. O comprimento do corpo e o desenvolvimento do esqueleto foram utilizados durante anos para estimar a idade fetal (MUFTI et al., 2000).

Richardson et al. (1976) estimaram o desenvolvimento de ovinos da raça Clun Forest e mestiços de Suffolk e observaram, aos 50, 85, 120 e 150 dias, um comprimento céfalo-coccígeo (CCC) médio de 8, 25, 42 e 55,4 cm respectivamente, contudo, nesse estudo, não foi levado em consideração o fato dos fetos serem provenientes de gestação simples ou não. Enquanto Mufti et al. (2000), estudando o desenvolvimento pré-natal em ovinos sem raça

definida (SRD), verificaram CCC médio de 6,7; 10,1; 31,5 e 46,0 cm, nos períodos de 30-60; 61-90; 91-120 e de 120 dias a termo, respectivamente.

O CCC é realizado em muitas espécies para determinar a idade gestacional (BRETZLAFF et al., 1993) e caracteriza-se pelos comprimentos dos embriões e dos fetos, baseando-se na distância anatômica entre a extremidade superior do crânio até a primeira vértebra coccígea (BINGHAM et al., 1990; SOUSA et al., 1997).

Baseado na medida do CCC (cm) obtido através de paquímetro, a idade fetal pode ser estimada e classificada em estágios de 15 dias cada, sendo o estágio 1 (1 a 15 dias), 2 (16 a 30 dias), 3 (31 a 45 dias), 4 (46 a 60 dias), 5 (61 a 75 dias), 6 (76 a 90 dias), 7 (91 a 105 dias), 8 (106 a 120 dias) e 9 (120 até o nascimento) (KADU e KAIKINI, 1987). Utilizando esta classificação, Messias (2002) estimou a idade de 89 embriões/fetos caprinos entre o 3^o e o 7^o estágio de desenvolvimento, obtendo um intervalo de variação entre 2,6 e 26 cm.

2.4 Reação em cadeia da polimerase

Dentre as 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, em especial na Medicina Veterinária. A utilização desta técnica é tão ampla que podem ser editados compêndios sobre a metodologia de PCR em cada especialidade diagnóstica (OLIVEIRA, 2003).

A PCR é um método utilizado para amplificar uma seqüência selecionada de DNA ou RNA que permite sintetizar, em poucas horas, milhões de cópias de uma seqüência de nucleotídeos específica, podendo amplificar a seqüência-alvo em um milhão de vezes da amostra inicial (CHAMPE E HARVEY, 1997). Como consequência do desenvolvimento desta tecnologia, é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, entre eles a investigação de paternidade, detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da determinação do sexo de embriões (GARCIA et al., 2003).

Esta reação permite a amplificação do DNA ou RNA *in vitro*, utilizando-se basicamente de uma reação enzimática catalisada pela polimerase (enzima termoestável) cuja atividade depende de íons Mg⁺⁺, e ocorre em 3 etapas: desnaturação (que consiste na separação da dupla fita do DNA a ser amplificado), anelamento ou hibridização (ligação do

oligonucleotídeo iniciador ou “primer” ao DNA a ser amplificado) e extensão (polimerização propriamente dita) (SAIKI et al., 1988).

Na desnaturação é necessário inicialmente que as duas fitas de DNA a ser amplificadas sejam separadas. A elevação da temperatura entre 90°C a 95°C promove a separação da fita dupla de DNA em duas fitas simples. Muitas vezes a temperatura de desnaturação é determinada empiricamente e depende de alguns fatores como a quantidade de ligações entre guanina (dGTP) e citosina (dCTP) (GC) do fragmento de DNA alvo ou de interesse (OLIVEIRA, 2003).

A polimerase, para realizar a função de anexar as bases complementares, transformando as fitas simples em fitas duplas, necessita de um fragmento de DNA já ligado na região previamente escolhida. Para isto, as extremidades do DNA de interesse nas duas fitas simples são identificados por “primers” ou oligonucleotídeos iniciadores, que são pequenos fragmentos sintéticos de DNA de fita simples, compostos por 20 a 30 bases nitrogenadas. Os “primers” são sintetizados in vitro baseados na seqüência conhecida do DNA a ser amplificado, sendo eles complementares a esta seqüência.

Os oligonucleotídeos iniciadores identificam as regiões escolhidas hibridizando-se às seqüências complementares nas duas fitas simples (no sentido 5'). Nas duas fitas formam-se, assim, pequenos fragmentos de DNA de dupla fita intacta. A hibridização dos “primers”, descrito como “anelamento”, deve ser feita a uma temperatura inferior à da desnaturação (45°C a 60°C) (OLIVEIRA, 2003).

Quando os iniciadores encontram e ligam-se aos segmentos complementares, a enzima DNA polimerase pode assumir sua função, incorporando, a partir daí, os nucleotídeos correspondentes um a um, ligando-os entre si, completando assim as fitas simples e transformando-as em duplas (extensão). A DNA polimerase não reconhece apenas o lócus de início como também consegue diferenciar as duas extremidades dos “primers” (3' e 5'), ela inicia a reação sempre pela extremidade 3' do “primer”, completando a fita simples daí em diante, portanto, sempre na direção do fragmento procurado. Os fragmentos de DNA recém-formados constituem-se em mais moldes para a montagem de novas fitas nos ciclos subsequentes, no entanto, com região já determinada resultando em uma reação em cadeia (OLIVEIRA, 2003).

As durações dos ciclos correspondentes às três etapas da reação e suas temperaturas podem ser programadas em aparelhos especiais para PCR chamados termocicladores. Em cada ciclo, esse material é duplicado conseguindo-se que o número dessas moléculas curtas de DNA multiplique-se em progressão geométrica. Assim, no trigésimo ciclo existirão mais de

260.000.000 moléculas iguais (WATSON et al.,1992). Para observar o resultado da PCR, o DNA multiplicado é corado com brometo de etídio ou outra substância específica, que será visualizado em eletroforese em gel de agarose ou diretamente em tubos.

Na reprodução animal, a PCR oferece a possibilidade de identificar o sexo de embriões (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003), porém para ser comercialmente viável, a técnica de sexagem deve ser reproduzível, barata e rápida o suficiente para permitir avaliar um grande número de embriões em pouco tempo (VAN VLIET et al., 1989). Por enquanto, apenas a técnica da PCR parece obedecer às condições acima assinaladas, sendo a mais indicada na sexagem de embriões de alto valor genético (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

2.5 Sexagem fetal

Dentre as aplicações práticas da sexagem fetal, pode-se destacar sua importância para a produção animal, por permitir um melhor planejamento tanto para adquirir quanto para comercializar animais do próprio rebanho (HAIBEL, 1990) podendo, na dependência do resultado, elevar ou diminuir o valor do animal examinado e facilitar a coordenação de ações que visem racionalizar produção e lucratividade, oferecendo vantagens de ordem prática e econômica à indústria de produção animal (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Este melhor planejamento implica numa coordenação de ações mais efetivas, que proporcionem maior concentração de fêmeas nos rebanhos leiteiros e de machos nos de carne, racionalizando a produção e a lucratividade (REICHENBACH et al., 2004).

Nos últimos anos foi gerada uma série de biotécnicas, como a inseminação artificial (IA), a transferência de embriões (TE) e até a fecundação in vitro (FIV), na expectativa de tecnificar a produção das criações mais estruturadas. Apesar dessas ferramentas contribuírem para aumentar a fecundidade, a prolificidade e acelerar o melhoramento genético dos rebanhos é preciso considerar que a utilização destas biotécnicas requer alto investimento financeiro e necessita de um comércio atraente que assegure rotatividade e retorno do capital investido, pelo menos em médio prazo (BANDEIRA et al., 2004).

A determinação precoce do sexo fetal nos pequenos ruminantes, ainda é de uso limitado, apesar do potencial que apresenta em contribuir para o avanço de diversas áreas da pesquisa fundamental (REICHENBACH et al., 2004).

Para uma série de diagnósticos pré-natais, inclusive com a finalidade de determinar o sexo fetal, foram desenvolvidas, no decorrer dos últimos anos, diversas técnicas invasivas e

não invasivas, sendo as não invasivas as de maior interesse devido à segurança que oferecem tanto para a fêmea gestante quanto para o feto (REICHENBACH et al., 2004).

O uso da PCR para identificação do sexo de embriões baseia-se na amplificação de seqüências de bases exclusivas do cromossomo Y (BONDIOLI, 1992). O propósito de multiplicá-las objetiva torná-las facilmente detectáveis por meio de um corante específico para DNA (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

O gene SRY (região do cromossomo Y determinante do sexo), que é localizado próximo a região pseudo-autossômica na porção distal do braço curto do cromossomo Y, foi descoberto como sendo o regulador da formação de estruturas macho-específicas por Goodfellow et al. (1990). O SRY compreende genes específicos para determinação do sexo que codificam a enzima P₄₅₀ aromatase e a substância inibidora de Müller (MIS). A P₄₅₀ aromatase catalisa a conversão de testosterona para estradiol que, no embrião masculino, tem sua expressão reduzida. Reciprocamente, a MIS é expressa no embrião macho para induzir a diferenciação testicular e regressão das estruturas femininas (HAQQ et al., 1993).

O gene amelo (AML gene) existente tanto no cromossomo X quanto no Y, também foi usado para determinar o sexo em bovinos (ENNIS e GALLAGHER, 1994) e em humanos (SULLIVAN et al., 1993). O polimorfismo observado entre o cromossomo X e Y para ovelha e o veado europeu evidenciaram resultados homólogos para as seqüências do gene Aml-X de 96% e 97% e para o Aml-Y de 86% e 90%, para ovelha e veado, respectivamente (PFEIFFER e BRENIG, 2005).

A partir de DNA obtido de amostras sanguíneas de caprinos, Phua et al. (2003) realizaram a identificação do sexo destes animais utilizando “primers” correspondentes aos genes SRY e AML-X através da técnica de PCR. A descoberta desta técnica por Saiki et al. (1988) motivou os primeiros estudos direcionados à identificação do sexo de embriões bovinos (HERR E REED, 1991) visando sua exploração comercial (THIBIER E NIBART, 1992).

Na eletroforese em gel de agarose (método convencional), o aparecimento de uma banda correspondente ao peso molecular do fragmento de DNA escolhido para ser amplificado, significa que o embrião do qual foi feita a biópsia possuía seqüências de nucleotídeos do cromossomo Y (macho). A ausência da banda pode indicar um embrião feminino ou então ausência da amostra, enquanto que a reação positiva também poderia ser devida à eventual presença de DNA “contaminante” (DNA próprio do operador, ou remanescente de uma amostra anterior). Dessa forma, é indicado correr amostras controles ao lado das amostras a serem sexadas (MC PHERSON et al., 1991).

Como controles, podem ser utilizados DNA obtido de linfócitos ou de outras células corporais de machos e fêmeas (controle de sexos); DNA obtido de células humanas (controle de contaminação); controle de especificidade, que leva todos os reagentes, menos o DNA, e o controle marcador de pesos moleculares conhecidos (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Outra forma de fazer controles para ambos os sexos é realizar simultaneamente duas reações para cada amostra: uma para o cromossomo Y e outra (usando o outro par de primers) para o cromossomo X, ou então para algum gene autossômico. Nesse caso, o aparecimento de uma única banda indica que o embrião é fêmea, e o de duas bandas, macho (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Na técnica de sexagem de embriões direta em tubos, os reagentes, repartidos em duas soluções, são colocados em dois momentos diferentes. Ao final dos ciclos da PCR, a cor rosa, corado com brometo de Etídio, é observada apenas nos tubos com DNA do Y. As vantagens dessa técnica em comparação com a convencional incluem uma maior velocidade na obtenção dos resultados de sexagem, maior praticidade e menor custo por não ter que realizar eletroforese, e menores possibilidades de presença de DNA contaminante, decorrente da menor manipulação das amostras, que permanecem fechadas durante o processo (BREDBACKA et al., 1995). O principal inconveniente desta técnica é que as eventuais reações inespecíficas não são diferenciáveis por não poder ser incluídos outros “primers” (controles) dentro dos tubos das amostras (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003).

Com relação à eficácia da sexagem embrionária por intermédio da PCR, um total de 110 embriões *Bos taurus* e *Bos indicus* foi submetido à micromanipulação para amostragem embrionária, tendo sido alcançado um índice de 89,8% de amplificações. A acuidade da técnica foi avaliada por meio de exame ultra-sonográfico das 44 prenhez obtidas, realizado aos 55 dias pós-transferência, onde foi observada uma confirmação de 100% de sexagem correta (GARCIA, 1995).

Em ovinos, foram realizadas biópsias de embriões produzidos através de fertilização *in vitro* para a realização de sexagem e em seguida a transferência destes embriões. Foi obtida uma taxa de prenhez de 60% com uma taxa de sobrevivência embrionária de 33%, mas a sexagem por PCR foi correta em 100% dos carneiros nascidos (KOCHHAR, et al., 2000).

As técnicas não invasivas de diagnóstico podem ser por imagem de ultra-som (NAN et al., 2001; BÜRSTEL, 2002) ou por métodos laboratoriais baseados em amostras biológicas. Em humanos, por exemplo, existe a possibilidade da determinação do sexo fetal pela análise do sangue materno em função da placenta hemocorial permitir a passagem de um pequeno número de células da circulação fetal para a materna (HONDA et al., 2001; RIJNDERS et al.,

2001). Foi descoberta a presença de uma quantidade significativa de DNA fetal presente no sangue materno que pode ser facilmente investigado através da reação em cadeia de polimerase (PCR) por apresentar alta sensibilidade (LO et al., 1997/1998). Todavia, não é possível separar o DNA fetal do materno, uma vez que este último se encontra em quantidade bem superior. Deste modo, o exame baseia-se na presença do cromossomo Y nos fetos masculinos e a ausência do mesmo nas mães. Portanto, a detecção de DNA do cromossomo Y no sangue da mulher indica que o feto é do sexo masculino e sua ausência que é do feminino (COSTA et al., 2001; LEVI et al., 2003). É interessante notar que o DNA fetal desaparece da circulação materna em poucas horas após o parto e sendo assim, gestações anteriores não interferem no resultado (LEVI et al., 2003).

Bovinos e pequenos ruminantes possuem placenta do tipo epiteliocorial que, praticamente, não permitem a passagem de células ou anticorpos, o que torna este tipo de diagnóstico improvável nestas espécies (RÜSSE e GRUNERT, 1993).

Nos métodos denominados invasivos, a colheita de células fetais ou da placenta é efetuada através de biópsia da vilosidade coriônica ou da obtenção de líquido amniótico por meio da amniocentese (LEIBO e RALL, 1990; KAMIMURA et al., 1997).

O exame das células amnióticas permite evidenciar a cromatina sexual e, portanto, estabelecer o diagnóstico do sexo do feto. Esta massa cromatínica, denominada de cromatina sexual, é proveniente da condensação de um dos cromossomos X das fêmeas que se encontra próximo à parede nuclear (LYON, 1961). Sua presença está relacionada com a expressão do sexo feminino (DERIVAUX e ECTORS, 1984). Além disto, a maturidade fetal é evidenciada pela citologia do fluido amniótico de acordo com a classificação do aspecto morfológico, tamanho, tipos e propriedades tintoriais das células do líquido amniótico (GORDON e BROSENS, 1967).

A aspiração de fluido amniótico via amniocentese vaginal permite a obtenção de células para análise cromossômica. Este método é simples e preciso, fornecendo um diagnóstico seguro para detecção do sexo pré-natal e defeitos citogenéticos em bovinos (BONGSO e BASRUR, 1975).

A concentração de testosterona no líquido amniótico, entre 90 e 150 dias de gestação em bovinos, pode ser utilizada para determinar o sexo fetal. Sendo os valores de 442 ± 20 pg testosterona/mL para feto masculino e 215 ± 8 pg/mL para fetos femininos (BONGSO et al., 1976). As células cianofílicas (basofílicas) pequenas e nucleadas no líquido amniótico são as mais ativas e mitóticas e também podem ser utilizadas para a detecção do sexo e perfil citogenético do feto bovino (BONGSO e BASRUR, 1975). A porcentagem de células

cianofílicas é significativamente maior nas fêmeas do que nos machos. Diferenças significativas, contudo, não foram encontradas para células eosinofílicas e orangeofílicas. Dessa forma a contagem de células cianofílicas pode ser um método de determinação do sexo fetal em bovinos. (MOYA, 2004).

Porém, nenhum dos métodos utilizados para sexagem fetal a partir de amniócitos é tão eficiente e preciso como a PCR, que possui elevada sensibilidade e especificidade (OLIVEIRA, 2003).

2.6 Ultra-som

A utilização de imagens ultra-sonográficas é um procedimento rotineiro na Medicina Veterinária e sua aplicabilidade na reprodução de pequenos ruminantes pode ser uma ferramenta importante no aperfeiçoamento e difusão de algumas biotécnicas (OLIVEIRA et al., 2004).

Por muitos anos, as técnicas ultra-sonográficas utilizaram-se do efeito doppler e do scan modo A, em que as ondas ultra-sônicas refletidas são captadas pelo equipamento e traduzidas por sinais luminosos ou sonoros. A partir da década de 80, passou-se utilizar técnicas que traduzem as ondas refletidas por imagens (modo B) e que, por analogia, permitem a interpretação das estruturas (BICUDO, 2003).

O componente mais importante de um aparelho ultra-sonográfico de tempo real é a sonda por ser responsável pela emissão das ondas que refletirão nos tecidos e se converterão nas imagens. Estas sondas podem ser lineares ou setoriais que formarão imagens, respectivamente, retangulares e cônicas (BUCKRELL, 1988; BICUDO, 2003).

A ultra-sonografia é uma técnica diagnóstica que permite avaliação anatômica da gestação. O método empregado isoladamente (exame de ultra-som) permite o diagnóstico de aproximadamente 70 a 80% das malformações estruturais ou anatômicas do feto, dependendo da acuidade diagnóstica, da experiência do operador, do tempo despendido para a realização do exame e da qualidade técnica do aparelho empregado (SANSEVERINO et al., 2001).

O uso do ultra-som pode ainda auxiliar na realização de outras técnicas como a amniocentese transabdominal, orientando a agulha para o local mais adequado de aspiração do líquido amniótico. Este procedimento é bastante eficiente e já foi anteriormente realizado

com sucesso em eqüinos (SMITH et al. 1997), bovinos (KAMIMURA, 1997; MAKONDO, 1997) e humanos (CASTRO, 2001; LOPES, 2007).

REFERÊNCIAS

ALENCAR JUNIOR, C.A. et al. Técnicas ultra-sonográficas de avaliação do volume de líquido amniótico e sua correlação com o resultado gestacional. **Femina**, Rio de Janeiro, v.23, p.877-880, 1995.

ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. **Boletim da Indústria Animal**, Nova Odessa, v.60, n.2, p.185-196, 2003.

BANDEIRA, D.A. et al. Aspectos gerais da caprino-ovinocultura no Brasil e seu reflexos produtivo e reprodutivo. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.1-8.

BAETZ, A. L.; HUBERT, W. T.; GRAHAM, C. K. Changes of biochemical constituents in bovine fetal fluids with gestational age. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, v.37, p. 1047 – 1052, 1976.

BICUDO, S. D. O diagnóstico ultra-sonográfico de gestação em ovinos. <http://www.fmvz.unesp.br/Informativos/ovinos/repman3.htm>, 2003.

BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K. Prenatal diagnosis of Sex in cattle by amniocentesis. **Veterinary Record**, London, v. 96, n. 6, p. 124 – 126, 1975.

BONGSO, T. A.; BASRUR, P. K.; YOUNGLAI, E. V. Prediction of fetal Sex in cattle by testosterone levels in allantoic fluid. **Journal of Reproduction and Fertility**, Cambridge, v. 46, n. 2, p. 441 – 442, 1976.

BINGHAM, C.M.; WILSON, P.R.; DAVIES, A.S. Real-time ultrasonography for pregnancy diagnosis and estimation on fetal age in farmed red deer. **Veterinary Record**, London, v.3, p. 102-106, feb. 1990.

BONDIOLI, K.R. Embryo sexing: a review of current techniques and their potential for commercial application in livestock production. **Jornal of Animal Science**, Champaign, v.70, n.2, p. 19-29, 1992.

BREDBACKA, P.; KANKAANPAA, A.; PEIPPO, J. PCR sexing of bovine embryos: a simplified protocol. **Theriogenology**, Stoneham, v.44, n.2, p.167-176, 1995.

BRETZLAFF, K. et al. Ultrasonographic determination of pregnancy in ruminants. **Veterinary Medicine**, Lenexa, v.1, p. 12-24, 1993.

BUCKRELL, B.C. Applications of ultrasonography in reproduction in sheep and goats. **Theriogenology**, v.29, p.71-84, 1988.

BÜRSTEL, D. **Untersuchungen zur intrauterinen Geschlechtsfeststellung bei Feten kleiner Wiederkäuer mittels Ultrasonographie**. 2002. 142 f. Tese (Doctor Medicinae Veterinariae) - Institut für Reproduktionsmedizin, Tierärztliche Hochschule Hannover, Hannover.

CASTRO, R.S.; MELO, L.E.H. CAEV e MAEDI-VISNA: Importância na saúde e na produtividade de caprinos e ovinos e a necessidade de controle no Nordeste Brasileiro. **Ciência Veterinária nos Trópicos**, Recife, v.4/3, p.315-320, 2001.

CATT, S.L. et al. Birth of a male lamb derived from an in vitro matured oocyte fertilised by intracytoplasmic injection of a single presumptive male sperm. **Veterinary Record**, London, v.139, p.494-495, 1996.

CASTRO, F.C. et al. Comparação dos Métodos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Belo Horizonte, v.23, n.5, 2001.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 446.

COSTA, J.M. et al. First-trimester fetal sex determination in maternal serum using real-time PCR. **Prenatal Diagnostic**, Paris, v.21, p.1070-1074, 2001.

CRAN, D.G. et al. Production of lambs by low dose intrauterine insemination with flow cytometrically sorted and unsorted semen. **Theriogenology**, Stoncham, v.42, p.267, 1997.

DERIVAUX, J.; ECTORS, F. **Fisiopatología de la gestación y obstetricia veterinaria**. Zaragoza: Acribia, 1984. p. 39-43.

DOMINGUES, M. M.; LIPTRAP, R. M.; BASRUR, P. K. Foetal fluids steroids and their relationship to gonadal steroid secretion in single and twin bovine fetuses. **Theriogenology**, Stoneham, v. 34, p. 57-73, 1990.

ENNIS, S.; GALLAGHER, T. F. A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetics**, Oxford, v.25, p. 425-427, 1994.

GARCIA, J. F. Micromanipulação, criopreservação e sexagem pela técnica de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) de embriões bovinos. 1995. 76 f. Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo.

GARCIA, J.F.; AVELAR, G.A.; DIAS, F.E.F. Aplicação de tecnologias de análise genética no diagnóstico em Medicina Veterinária. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA, VETERINÁRIA, 5., 2003, Recife. **Anais** [S.l.:s.n.] ,2003 p.100-103.

GARNER, D.L. Sex-sorting mammalian sperm: concept to application in animals. **Journal of Andrology**, Philadelphia, v.22, p.519-526, 2001.

GORDON, H.; BROSENS, I. Cytology of amniotic fluid: a new test of fetal maturity. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v. 30, n. 5, p. 652-656, Nov. 1967.

GRUNERT, E.; BIRGEL, E. H. Fisiologia da prenhez. In:_____. **Obstetricia veterinária**. 3. ed. Porto Alegre: Sulina, 1982. p. 27-60.

GUTIERREZ-ADAN, A. et al. Ovine-specific Y-chromosome RAPD-SCAR marker for embryo sexing. **Animal Genetics**, Oxford, v.28, p.135-138, 1997.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E. S. E. Gestation, prenatal physiology and parturition. In:_____.
Reproduction in farm animals. 7. ed. Philadelphia: Lippincott, 2000. p.148-149.

HAFEZ, E. S. E.; HAFEZ, B. Gestação, fisiologia pr -natal e parto. In: **Reprodução Animal**.
7. ed. Barueri: Manole, 2004. p. 141 – 156.

HAIBEL, G.K. Use of ultrasonography in reproductive management of sheep and goat herds.
The Veterinary Clinics of North-America. Food Animal Practice, Philadelphia, v. 6, n. 3,
p.597-613, 1990.

HAQQ, C. M. et al. SRY recognizes conserved DNA sites in sex-specific promoters. Proc.
Natl. Acad. Sci. USA, **Biochemistry**, New York. v. 90, pp. 1097-1101, 1993.

HERR, C.M.; REED, K.C. Micromanipulation of bovine embryos for sex determination.
Theriogenology, Los Altos, v.21, n.1, p.7-17, 1991.

HERVEY, E. J.; SLATER, J. S. The source of sheep foetal fluids in the later stages of
gestation. **Journal of Physiology**, Stuttgart, v. 22, p. 40-41, 1967.

HONDA, H. et al. Successful diagnosis of fetal gender using conventional PCR analysis of
maternal serum.**Clinical Chemistry**, Washington, v.47, p.41-46, 2001.

JOHNSON, L.A. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art.
Animal Reproduction Science, Amsterdam, n.60/61, p.93 - 107, 2000.

KADU, M.S.; KAIKINI, A.S. Prenatal development of caprinos foetus. **Indian Journal of
Animal Science**, New Delhi, v. 57, n. 9, p. 962-969, 1987.

KAMIMURA, S. et al. Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated
by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. **Theriogenology**, Kagoshima, v.47, p.1563-
1569, 1997.

KLINGENFUSS, P.J. et al.. Valores normais do índice do líquido amniótico na gravidez.
Jornal Brasileiro de Ginecologia, Rio de Janeiro, v.107, p.101-117, 1997.

KOCHHAR, H. S. et al. Production of sexed lambs after biopsy of ovine blastocysts produced in vitro. **The Canadian Veterinary Journal**, Ottawa, v.41, p. 398-400, 2000.

LEIBO, S.P.; HALL, W.F. Prenatal diagnosis sex in bovine fetuses by amniocentesis. **Theriogenology**, San Antonio, v.33 p. 531-552, 1990.

LEVI, J.E.; WENDEL, S.; TAKAOKA, D. T. Prenatal fetal gender determination by analysis of DNA from maternal plasma. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.25, n.9, p.687-690, 2003.

LO, Y.M. et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, Oxford, v.350, p.485-487, 1997.

LO, Y.M. et al. Quantitative analysis of fetal DNA in maternal plasma and serum: implications for non-invasive prenatal diagnosis. [The American Journal of Human Genetics](#), Oxford, v.62, p.768-775, 1998.

LOPES, A.C.V. et al. Complicações materno-fetais da biópsia de vilos coriais: experiência de um centro especializado do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, Rio de Janeiro, v.29, n.7, p.360-367, 2007.

LYON, M. F. Gene action in the X – chromosome of the mouse (*Mus musculus*). **Nature**, London, v. 190, p. 372, 1961.

MAKONDO, K. et al. Use of polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. **Animal Reproduction Science**, Amsterdam, v.49, p. 125-133, 1997.

MARTIN, M.; ALFONSO, G. Bases anatómicas : embriología del aparato genital. In : _____. **Fisiopatología de la reproducción con sus bases sinópticas**. Zaragoza: Acribia, 1985. cap. 1, p. 117-136.

Mc PHERSON, M.J.; QUIRKE, P.; TAYLO, G.R. **PCR: a practical approach**. Oxford: Oxford Univ. Press, 1991. p.253.

MERCER, L.J. et al. A survey of pregnancies complicated by decreased amniotic fluid. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, St. Louis, v.149, p.355-361, 1984.

MESSIAS, J. B. Estimativa do peso fetal caprino (*Capra hircus* L., 1758) através de medidas obtidas por ultra-sonografia e paquímetro. 2002. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MICHEL, G. Die Entwicklung der Organe, Organogenese: Die Entwicklung des Geschlechtsapparates. In: _____. **Kompendium der Embryologie der Haustiere**. Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1986. p.223-242.

MICHEL, G.; SCHWARZE, E. **Compendio de anatomia veterinária: embriologia**. Zaragoza: Acribia, 1970. 350p.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. Sistema urogenital. In: _____. **Embriologia clínica**. 6.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 290-331.

MOYA, C.F. Aspectos físico-químicos dos fluidos fetais em ruminantes. 2004. 12p. Monografia (Pós-Graduação em Medicina Veterinária) – Departamento de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu.

MUFTI, A.M. et al. Prenatal development of ovine fetus. **Small Ruminant Research**, Amsterdam, v.38, p.87-89, 2000.

NAN, D.; VAN OORD, H.A., TAVERNE, M.A.M. Determination of foetal gender in sheep by transabdominal ultrasonographic scanning. In: CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION, 5., 2001, Vienna. **Anais...** Viena:ESDAR, 2001. p.70.

NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, R.L. Embriologia do sistema genital e diferenciação sexual. In: _____. **Patologia da reprodução dos animais domésticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p.3-5.

NODEN, D.M.; DE LAHUNTA, A. **The embryology of domestic animals. Developmental mechanisms and malformations**. Baltimore: Williams and Wilkins, p. 330-342, 1990.

NAHOUM, J.C. Amniocentese transabdominal: indicações e técnica. [Femina](#), Rio de Janeiro, v.17, n.8 p.622-629, 1989.

OLIVEIRA, C.J.R. Aplicações teóricas da biologia molecular/engenharia genética em análises clínicas. São Paulo, 2003. p.17-20. Apostila.

OLIVEIRA, M.A.L. et al. Aplicabilidade do scan B na reprodução de pequenos ruminantes. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.85-96.

PFEIFFER, I.; BRENIG, B. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*) **BMC Genetics**, Berlin, v.6, n.16. 2005.

PHUA, A. C. Y.; ABDULLAH, R. B.; 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. **Journal of Reproduction and Development**, Tokyo. v. 49, n. 4, p. 307-311, 2003.

REICHENBACH, H-D. et al. Sexagem fetal na cabra e na ovelha por ultra-sonografia. In: SANTOS, M.H.B.; OLIVEIRA, M.A.L.; LIMA, P.F. **Diagnóstico de gestação na cabra e na ovelha**. São Paulo: Varela, 2004. p.117-136.

REZENDE, J. et al. Obstetrícia. 8.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998. p. 204-209.

REZENDE, J.; MONTENEGRO, C. A. Trocas materno-ovulares. In: REZENDE, J. **Obstetrícia** 7. ed. São Paulo: Guanabara Koogan, 1995. p. 77-89.

RICHARDSON, C.; HERBERT, C.N.; TERLECKI, S. Estimation of the development age of ovine fetus and lamb. **Veterinary Record**, London, v.99, p. 22-26, July. 1976.

RIJNDERS, R.J.P. et al. Fetal sex determination from maternal plasma in pregnancies at risk for congenital adrenal hyperplasia. **Obstetrics and Gynecology**, New York, v.98, p.374-378, 2001.

ROBERTS, S. J. Gestational period and embryology. In: _____. **Veterinary obstetrics and genital diseases**. 2. ed. Michigan: Edwards Brothers, 1971. p. 36 – 46.

RÜSSE, I. Harn- und Geschlechtsorgane. In: RÜSSE, I.; SINOWATZ, F. (Ed.). **Lehrbuch der Embryologie der Haustiere**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1991. p.313-337.

RÜSSE, I.; GRUNERT, E. **Die normale Gravidität**. In: RICHTER, J. et al. **Tiergeburtshilfe**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1993. p.29-64

SAIKI, R.K. et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. **Science, Washington**, v.239, p.487-491, 1988.

SANTOS, M.H.B. **Principais métodos de diagnóstico de gestação em pequenos ruminantes domésticos**. Lavras, 2003. 61f. Monografia (Trabalho de conclusão de curso) Universidade Federal de Lavras, Lavras.

SANSEVERINO, M.T.V. et al. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, Porto Alegre, v.3, p.301-316, 2001.

SCHNORR, B. Entwicklung der Organe: Entwicklung der Geschlechtsorgane. In: _____. **Embryologie der Haustiere: Ein Kurzlehrbuch**. Stuttgart: Verlag Enke, 1989. p.165-180

SMITH, K.C. et al. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero **American Journal of Veterinary Research**, Washington, v.58, p.997-1002, 1997.

SOUSA, D.M.B. Desenvolvimento embrionário e fetal avaliado por ultra-sonografia do 25^o ao 60^o dia de gestação e Nelore (*Bos taurus indicus*). **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, Belo Horizonte, v.21, n. 2, p. 15-21, 1997.

STRAYER, L. **Biochemistry**. 4. ed. New York: W.H. Freeman, 1995. p.1064.

SULLIVAN, K. M. et al. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. **Biotechniques**, Natick, v.15, p. 636-641, 1993.

THIBIER, M.; NIBART M. Bovine embryo sexing by a DNA probe on the field. **Reproduction In Domestic Animals**, Berlin, v.27, p.29-33, 1992.

TONIOLLO, G. H.; VICENTE, W. R. R. Placentas e placentação. In:_____. **Manual de obstetrícia veterinária**. São Paulo: Liv. Varela, 1995. p.31-36.

VAN VLIET, R.A.; GIBBINS, A.M.V.; WALTON, J.S. Livestock embryo sexing: a review of current methods, with emphasis on Y- specific DNA probes. **Theriogenology**, Stoneham, v.32, p.421-438, 1989.

VELHO, M.T.C.; MORAIS, E.N.; ETHUR, A.B.N.; Determinação ultra-sonográfica do índice do líquido amniótico em grávidas normais, da 12a à 42a semana de gravidez. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia** , Rio de Janeiro, v.23 n.4, p. 225-232, 2001.

VOTTA, R. A. Aplicaciones clínicas del estudio de la creatinina del líquido amniótico. In:_____.**Investigaciones clínicas al conocimiento del estado fetal**. México: Panamericana, 1975. p. 59-63.

WATSON, J.; GILMAN, M.; WITKOWSKI, J. Recombinant DNA. 2. ed. New York: W.H. Freeman & Co.,1992. p.626.

WILKENS, H. Embryologie und Anatomie des weiblichen Genitale. In: GRUNERT, E., BERCHTOLD, M. **Fertilitätsstörungen beim weiblichen Rind**. Berlin: Verlag Paul Parey, 1982. p.25-48.

WINTOUR, E. M.; McFARLANE, C. Abnormalities of fetal fluids in sheep: two case reports. **Australian Veterinary Journal**, Brunswich, v. 70, n. 10, p. 276 – 378, 1993.

ZOGNO, M.A.; MIGLINO, M.A.; OLIVEIRA, M.R.; Análise bioquímica dos líquidos fetais e citologia do fluido amniótico da fêmea de Mocó (*Kerodon rupestris*). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v.41, p. 228-235, 2004.

EXPERIMENTO

SEXAGEM FETAL EM LÍQUIDO AMNIÓTICO OVINO POR PCR*

Arthur Nascimento de MELO¹, Edivaldo Rosas dos SANTOS JÚNIOR¹, Glenda Mônica Luna de HOLANDA¹, Manoel ADRIÃO², Aurea WISCHRAL³

¹ Programa de Pós-graduação em Ciência Veterinária, UFRPE. arthurnascimento@msn.com

² Prof. Adjunto, Depto de Morfologia e Fisiologia Animal, Laboratório de Fisiologia Animal Molecular Aplicada – FAMA/DMFA/UFRPE.

³ Prof. Associado, Depto de Medicina Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, UFRPE, Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n CEP - 52171-900, Recife, Pernambuco, Brasil

RESUMO

Foi realizada a identificação pré-natal do sexo em 45 amostras de líquido amniótico ovino, obtidas por amniocentese guiada por ultra-som em úteros prenhes oriundos de animais abatidos em matadouro, com os objetivos de avaliar a aplicabilidade e a eficiência da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para este fim. Foram realizados PCR multiplex com os “primers” referentes aos genes SRY e Aml-X. As amostras amplificadas foram plotadas em gel de agarose 2% para eletroforese e posterior visualização em transluminador de luz ultravioleta. Foram identificadas 24 amostras (53,33 %) como “macho” (116pb e 300pb) e 21 amostras (46,66 %) como “fêmea” (300pb), que foram confirmadas pela avaliação morfológica dos fetos.

Palavras-chave: identificação do sexo, Aml-X, SRY, amniocentese.

ABSTRACT

Pre-natal sexing was undertaken using 45 samples of ovine amniotic fluid obtained through amniocentesis ultrasound-guided from pregnant uteruses of animals killed in a slaughterhouse. The aim was to evaluate the applicability and efficiency of the Polymerase Chain Reaction technique (PCR) for these purposes. Multiplex PCRs were carried out with SRY and Aml-X primers. The amplified samples were plotted in 2% electrophoresis agarose gel and viewed using an ultraviolet transilluminator. 24 samples (53.33 %) were identified as “male” (116bp and 300bp) and 21 samples (46.66 %) as “female” (300bp); this information was confirmed by a morphological analysis of all fetuses.

Keywords: sexing, Aml-X, SRY, amniocentesis.

-
- Trabalho formatado segundo normas da Revista Genetics and Molecular Biology

INTRODUÇÃO

A PCR é um método utilizado para amplificar uma seqüência selecionada de DNA ou RNA que permite sintetizar, em poucas horas, milhões de cópias de uma seqüência de nucleotídeos específica, podendo amplificar a seqüência-alvo em um milhão de vezes da amostra inicial (CHAMPE E HARVEY, 1997). Como consequência do desenvolvimento da PCR é atualmente possível realizar diversos tipos de diagnósticos, entre eles a investigação de paternidade, detecção de doenças genéticas e infecciosas, além da determinação do sexo de embriões, através da análise do DNA (GARCIA et al., 2003).

A possibilidade de selecionar o sexo da descendência oferece vantagens de ordem prática e econômica à indústria de produção animal (ALMEIDA e ALVAREZ, 2003). Os métodos moleculares mais conhecidos para sexagem envolvem a visualização de cromossomos sexuais a partir da realização do cariótipo (citogenética), ou a detecção de uma seqüência de DNA específica do cromossomo Y, após amplificação por PCR (LUZ et al., 2000).

Os segmentos alvos de amplificação para determinação de fragmentos cromossômicos específicos incluem o SRY, que está localizado na fração longa do braço do cromossomo Y, e o Aml-X encontrado no cromossomo X. A possibilidade de uma amplificação simultânea de seqüências correspondentes de ambos os cromossomos permite a sua utilização como método eficiente e reproduzível de se determinar o sexo através do uso de PCR (PHUA et al, 2003).

O gene amelo (AMEL gene), existente no cromossomo X, foi usado para identificar o sexo em bovinos (ENNIS et al., 1994) e em humanos (SULLIVAN et al., 1993).

Para o diagnóstico preciso da idade fetal, são necessárias algumas medidas morfológicas que mostrem uma taxa rápida de crescimento constante e que seja menos variável em determinada fase. O comprimento do corpo e o desenvolvimento do esqueleto foram utilizados durante anos para estimar a idade fetal (MUFTI et al., 2000).

Baseado na medida do CCC (cm) obtido através de paquímetro, a idade fetal pode ser estimada e classificada em estágios de 15 dias cada, sendo o estágio 1 (1 a 15 dias), 2 (16 a 30 dias), 3 (31 a 45 dias), 4 (46 a 60 dias), 5 (61 a 75 dias), 6 (76 a 90 dias), 7 (91 a 105 dias), 8 (106 a 120 dias) e 9 (120 até o nascimento) (KADU e KAIKINI, 1987). Utilizando esta classificação, Messias (2002) estimou a idade de 89 embriões/fetos caprinos entre o 3^o e o 7^o estágio de desenvolvimento, obtendo um intervalo de variação entre 2,6 e 26 cm.

A ultra-sonografia é uma técnica diagnóstica que permite avaliação anatômica da gestação. O método empregado isoladamente (exame de ultra-som) permite o diagnóstico de aproximadamente 70 a 80% das malformações estruturais ou anatômicas do feto, dependendo da acuidade diagnóstica, da experiência do operador, do tempo despendido para a realização do exame e da qualidade técnica do aparelho empregado (SANSEVERINO et al., 2001).

O uso do ultra-som pode ainda auxiliar na visualização de outras técnicas como a amniocentese transabdominal. Este procedimento é bastante eficiente e já foi anteriormente realizado com sucesso em eqüinos (SMITH et al. 1997), bovinos (KAMIMURA, 1997; MAKONDO, 1997) e humanos (CASTRO, 2001; LOPES, 2007).

Células do líquido amniótico foram primeiramente utilizadas para sexagem fetal em humanos por Fuchs e Riis (1956). A partir de então, o procedimento para a amniocentese tem melhorado bastante e foram introduzidos os métodos para cultivo dessas células *in vitro* para análises citogenéticas de anomalias em humanos (STELLE e BREG, 1966). Makondo et al. (1997) realizaram com sucesso a identificação do sexo fetal em bovinos a partir dos líquidos amniótico e alantoideano, utilizando a técnica de PCR. Porém não se tem estudos conhecidos sobre esta técnica em pequenos ruminantes.

Dessa forma, objetivou-se avaliar a aplicabilidade e a eficiência da PCR multiplex para identificar o sexo de fetos na espécie ovina, utilizando líquido amniótico coletado de úteros gestantes provenientes de matadouro.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de líquido amniótico

Os úteros ovinos foram obtidos de animais sem raça definida (SRD) após o abate em matadouro privado no município de Igarassu – PE e conservados em baixa temperatura até serem transportados ao Departamento de Medicina Veterinária da UFRPE.

Após imersão do útero em recipiente contendo água para facilitar a execução e simular uma condição natural de exame, a ultra-sonografia foi realizada com transdutor linear 5,0 MHz acoplado ao monitor da marca FF-Sonic UF, modelo 4500.

Foram coletadas 44 amostras de 10 mL e uma, de 6 mL, de líquido amniótico em 39 úteros (sendo 33 gestações simples e 6 gemelares) e armazenadas em tubos de ensaio

devidamente esterilizados e identificados. O líquido aspirado foi conservado em geladeira por três horas para sedimentação dos amniócitos.

Após amniocentese, os fetos foram retirados do útero, medidos com paquímetro e examinados para análise morfológica do sexo. As amostras foram divididas em três grupos segundo Kadu e Kaikini (1987): Grupo 1 (zero a 8,6cm) da concepção ao 60^o dia de gestação, Grupo 2 (8,7 a 26cm) entre o 61^o e o 105^o dia de gestação e Grupo 3 (26,1 cm em diante) entre o 106^o dia e o nascimento.

Extração de DNA

O DNA foi extraído segundo a técnica de Maniatis et al. (1989) modificada. Foram retirados, em cada amostra, 600 µL de líquido amniótico com sedimentação celular e transferidos para tubos de 1,5 mL e adicionados de 300 µL de TE (Tris, 10 mM - Invitrogen Life Technologies e EDTA, 1 mM pH 8,0- Sigma Chemical Co.) e 300 µL de fenol (Merck) equilibrado (pH 8,0). As amostras foram homogeneizadas por 1 minuto em um vortex (Phoenix) e centrifugada (SIGMA 2K15) a 18.000 g por 5 minutos a 4 °C. Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo ao qual foi adicionado 200 µL de fenol-clorofórmio (1:1), a amostra foi homogeneizada por 1 minuto e centrifugada a 18.000 g por 5 minutos.

O sobrenadante foi transferido para outro tubo onde foram adicionados 300 µL de clorofórmio (Merck), misturados por 1 minuto e centrifugado a 18.000 g por 5 minutos. Novamente em outro tubo, foram adicionados: 30 µL de acetato de amônio 3M (Cromato Produtos Químico LTDA), todo o sobrenadante do tubo anterior (onde encontra-se o DNA) e 300 µL de isopropanol (Merck).

A mistura foi homogeneizada por 1 minuto e incubada por 60 minutos no freezer a – 20 °C, em seguida, centrifugada a 18.000 g por 30 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento lavado com 500 µL de etanol 70% (Merck) por centrifugação a 18.000 g durante 5 minutos a 4°C. O etanol foi retirado e o sedimento deixado em temperatura ambiente e ressuspenso em 30 µL de TE. O DNA extraído foi analisado em gel de agarose (Invitrogen life Technologies) a 1%, com marcador fago-lambda e corado com brometo de etídeo para análise em luz ultravioleta e fotografado (Olympus – Digital Câmara – C-7070 Wide) para verificação de sua qualidade.

Amplificação do DNA

Para cada amostra, foi realizada uma reação em cadeia da polimerase multiplex em um volume final de 25µL contendo 2,5mM de MgCl₂, 10 pmoles de cada primer (Aml-X forward: 5' CAGTAGCTCCAGCTCCAGCT 3'; Aml-X reverse: 5' GTGCATCCCTTCATTGGC 3'; SRY forward: 5' ATGAATAGAACGGTGCAATCG 3'; SRY reverse: 5' GAAGAGGTTTTCCCAA AGGC 3') (PHUA et al., 2003), 200µM de cada dNTP, 1U de Taq-polimerase, tampão 1X PCR (20mM de Tris-HCl pH 8.4, 50mM de KCl, 2mM de MgCl₂), 7µL de DNA e completado o volume com água ultra-pura.

O protocolo de amplificação consistiu em uma desnaturação inicial a 94°C por cinco minutos, seguida de 34 ciclos de 94°C por quarenta e cinco segundos, 58°C por quarenta e cinco segundos e 72°C por um minuto; com uma extensão final de 72°C por sete minutos no final do ciclo. Os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2% e corados com Brometo de Etídeo, visualizados em transluminador UV e comparadas com marcador de 50bp DNA ladder (Invitrogen, USA) (PHUA et al, 2003).

Segundo Almeida e Alvarez (2003), são considerados machos os animais que apresentam a formação de duas bandas, uma com 116 pb, correspondente a amplificação da seqüência do gene SRY presente apenas em machos, e outra com 300 pb correspondente a amplificação da seqüência do gene Aml-X presente em ambos os sexos. São consideradas fêmeas as que apresentam formação apenas da banda com 300 pb (PHUA et al, 2003). A análise estatística utilizada para o tamanho dos fetos foi descritiva.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Não houve dificuldade em visualizar a punção do líquido amniótico, pelo ultrassom, nos úteros que apresentaram gestações gemelares neste tipo de exame realizado diretamente no útero obtido de matadouro, mas podem dificultar a visualização ultrasonográfica *in vivo* como observaram Bürstel et al. (2001) e Santos et al. (2006).

A visualização das amostras de DNA extraídas de células amnióticas, em gel de agarose 1%, apresentaram quantidade inferior a 50ng de DNA por µL quando comparadas na quantificação com fago-lambda, sendo considerada uma baixa quantidade conforme Phua et al. (2003).

Das 45 amostras analisadas, 24 (53,33%) apresentaram a formação de duas bandas, uma com 116 pb e outra com 300 pb, correspondentes à amplificação das seqüências dos genes SRY e Aml-X respectivamente, caracterizando conceptos machos (Figura 1), enquanto 21 (46,66%) amostras amplificaram apenas o seguimento de 300pb correspondente ao gene Aml-X, caracterizando fêmeas (Figura 2).

Em todos os casos o sexo foi confirmado pela análise morfológica dos fetos, com exceção de um conceito cujo tubérculo genital ainda não havia migrado e conseqüentemente não havia dado início à formação de genitália. Este conceito, a fêmea F21, apresentou 3,3cm de comprimento e segundo Kadu e Kaikini (1987) possui idade gestacional inferior a 40 dias de gestação, o que representa uma sexagem fetal de alta precocidade, sugerindo maiores estudos para gestações ainda no primeiro terço.

Santos et al. (2006) afirmam que identificar o sexo fetal em pequenos ruminantes antes do 50^o dia, através da ultra-sonografia, aumenta o percentual de erro no diagnóstico. Essa proposição tem a finalidade de evitar que fetos machos sejam indevidamente sexados como fêmeas, porque existe a possibilidade da migração do tubérculo genital (estrutura responsável pela formação de parte da genitália externa) ocorrer de forma mais tardia. Utilizando a técnica de PCR, em contrapartida, uma maior margem de segurança pode ser obtida por se tratar da análise do DNA fetal, o que motiva ainda mais os estudos para realização da sexagem fetal através desta ferramenta molecular de alta especificidade.

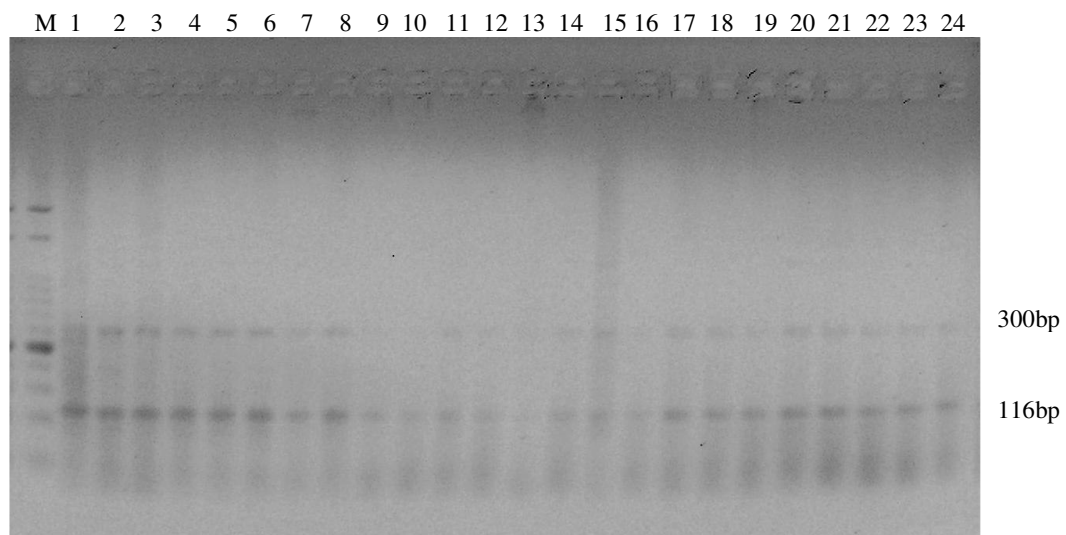


Figura 1 – Resultado da amplificação por PCR, apresentando bandas correspondentes ao AML-X (300pb) e SRY (116pb) em ovinos machos.

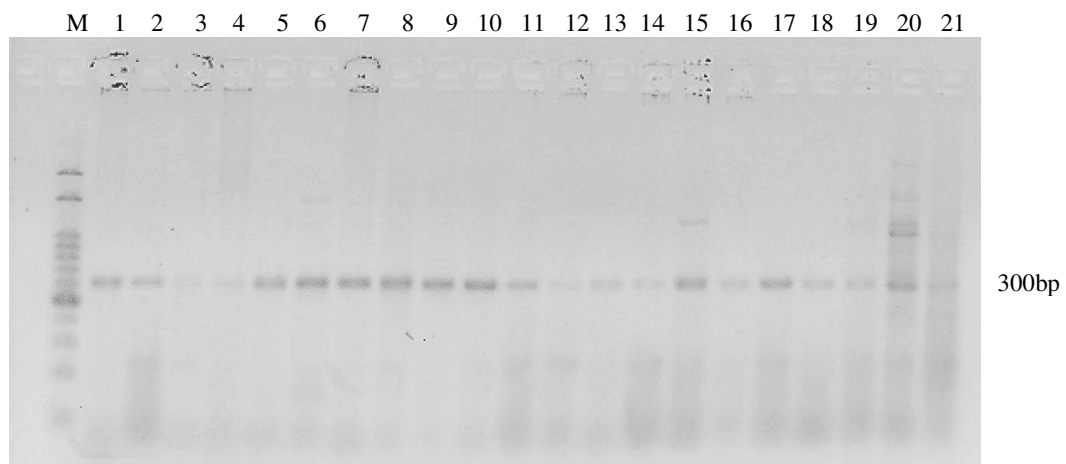


Figura 2 – Resultado da amplificação por PCR, apresentando a banda correspondente ao AML-X (300pb) em ovinos fêmeas.

O gene Aml-X serviu de parâmetro apresentando sua seqüência amplificada em todas as amostras como sugerido por Pfeiffer e Brenig (2005), o que representa um controle de qualidade para a reação de amplificação. Foi possível realizar a identificação do sexo utilizando uma seqüência do gene SRY em todas as amostras, confirmando o proposto por Luz et al. (2000).

Apesar da pequena quantidade de DNA presente no líquido amniótico, a reação em cadeia da polimerase é uma técnica bastante eficaz para reproduzir uma seqüência alvo desejada, como afirmaram Champe e Harvey (1997).

As amostras analisadas apresentaram variação entre a idade gestacional demonstrada na Tabela 1, porém não houve diferença entre os três grupos para a realização da sexagem fetal, já que em todas as amostras foi possível realizar extração de DNA e amplificação dos segmentos desejados.

Tabela 1. Número de fetos (n), Tamanho (cm), a Média (M) e o erro padrão da média (EPM) do CCC – paquímetro (cm) em relação à sexagem fetal (M- machos; F – fêmeas).

Grupos	n	Tamanho (cm)	Sexo morfológico		Sexo genético		% Acertos
		M \pm EPM	M	F	M	F	
I	8	7,16 \pm 0,59	6	2	6	2	100
II	25	16,03 \pm 0,90	14	11	14	11	100
III	12	34,25 \pm 1,77	4	8	4	8	100
Total	45		24	21	24	21	

CONCLUSÃO

A técnica de PCR, utilizando os marcadores SRY e Aml-X, permite realizar a identificação do sexo fetal à partir das células amnióticas de ovinos, com rapidez e confiabilidade, em estágios precoces da gestação.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.P.; ALVAREZ, R.H. Métodos de determinação do sexo de embriões bovinos. **Boletim da Indústria Animal**, v.60, n.2, p.185-196, 2003.

BÜRSTEL, D.; MEINECKE-TILLMANN, S.; MEINECKE, B.; 2001. Ultrasonographic determination of fetal sex in small ruminants. ANNUAL CONFERENCE OF THE EUROPEAN SOCIETY FOR DOMESTIC ANIMAL REPRODUCTION. 5, 2001, Vienna. **Anais...** Vienna: ESDAR Newsletter, v.6, p.53 - 54.

CASTRO, F.C.; CASTRO, M.J.B.V.; CABRAL, A.C.V.; FILHO, G.B.; VITOR, R.W.A.; LANA, A.M.A.; ANDRADE, G.M.Q. Comparação dos Métodos para Diagnóstico da Toxoplasmose Congênita. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.23, n.5, p. 277-282, 2001.

CHAMPE, P.C.; HARVEY, R.A. Bioquímica ilustrada. 2ª ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 1997. p. 446.

ENNIS, S.; GALLAGHER, T. F. A PCR-based sex determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetic**, v.25, p. 425-427, 1994.

FUCHS, F.; RIIS, P. Antenatal determination of foetal sex: in prevention of hereditary diseases. **Lancet**, v.276, p.180-182, 1960.

GARCIA, J. F.; AVELAR, G. A.; DIAS, F. E. F. Aplicação de tecnologias de análise genética no diagnóstico em Medicina Veterinária. In: CONGRESSO PERNAMBUCANO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 5, 2003. **Anais...**, 2003, Recife. p.100-103.

KADU, M.S.; KAIKINI, A.S. Prenatal development of caprinos foetus. **Indian Journal of Animal Science**, v. 57, n. 9, p. 962-969, 1987.

KAMIMURA, S.; N. NISHIYAMA, S. OOKUTSU, K. GOTO u. K. HAMANA Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis. **Theriogenology**, v.47, p.1563-1569, 1997.

LOPES, A.C.V.; PIMENTEL, K.; ALMEIDA, A.M.; MATOS, E.C.; TORALLES, M.B.P. Complicações materno-fetais da biópsia de viló corial: experiência de um centro especializado do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v.29, n.7, p.360-367, 2007.

LUZ, M. R. et al. Sexagem de embriões bovinos fecundados in vitro pela técnica de PCR multiplex. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 37, n. 6, 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-95962000000600006&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 25 Feb 2008. doi: 10.1590/S1413-95962000000600006

MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F; SAMBROOK, J. (Ed.) **Molecular cloning: a laboratory manual**. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 3 v.

MAKONDO, K.; AMIRIDIS, G.S. JEFFCOATE, I.A.; O'SHAUGHNESSY, P.J.; BOYD, J.S.; PATERSON, C.,; ROBERTSON, L. Use of polymerase chain reaction to sex the bovine fetus using cells recovered by ultrasound-guided fetal fluid aspiration. **Animal Reproduction Science**, v.49, p. 125-133, 1997.

MESSIAS, J. B. Estimativa do peso fetal caprino (*Capra hircus* L., 1758) através de medidas obtidas por ultra-sonografia e paquímetro. 2002. 37f. Dissertação (Mestrado em Ciência Veterinária) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife.

MUFTI, A.M.; WANI, G.M.; WANI, N.A.; BUCHOO, B.A.; KHAN, M.Z. Prenatal development of ovine fetus. **Small Ruminant Research**, v.38, p.87-89, 2000.

PFEIFFER, I.; BRENIG, B. X- and Y-chromosome specific variants of the amelogenin gene allow sex determination in sheep (*Ovis aries*) and European red deer (*Cervus elaphus*). **BMC Genetic**, v. 6, p. 16, 2005.

PHUA, A. C. Y.; ABDULLAH, R. B.; 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. **Journal of Reproduction and Development**, v. 49. n. 4, p. 307-311, 2003.

SANSEVERINO, M.T.V.; KESSLER, R.G.; BURIN, M.G.; STEIN, N.R.; HERMAN, R.F.; MATTE, U.; BARRIOS, P.M.M.; MAGALHAES, J.A. Diagnóstico pré-natal: avanços e perspectivas. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v.3, p.301-316, 2001.

SANTOS, M.H.B.; MORAES, E.P.B.X.; GUIDO, S.I.; BEZERRA, F.Q.G.; MELO, A.N.; LIMA, P.F.; OLIVEIRA, M.A.L. Sexagem fetal em ovelhas Santa Inês por ultra-sonografia. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.573-578, 2006.

SMITH, K.C.; McGLADDERY, A.J.; BINNS, M.M.; MUMFORD, J.A. Use of transabdominal ultrasound-guided amniocentesis for detection of equid herpesvirus 1-induced fetal infection in utero **American Journal of Veterinary Research**, v.58, p.997-1002, 1997.

STEELE, M.W.; BREG, W.R. Chromosome analysis of human amniotic-fluid cells. **Lancet** v.287, p.383-385, 1966.

SULLIVAN, K. M.; MANNUCCI, A.; KIMPTON, C. P.; GILL, P. A rapid and quantitative DNA sex test: fluorescence-based PCR analysis of X-Y homologous gene amelogenin. **Biotechniques**, v.15, p. 636-641, 1993.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nas condições em que foi realizado este estudo, os dados analisados permitem concluir que:

- a) O líquido amniótico é uma importante ferramenta a ser cada vez mais usado em diversas áreas, em especial na biologia molecular, por permitir estudos avançados sobre o feto antes do nascimento, como a identificação do sexo.

- b) A técnica de reação em cadeia da polimerase é eficiente e prática para realizar a sexagem fetal em ovinos a partir de baixas quantidades de DNA quando utilizados os primers SRY e AML-X.

- c) Apesar de invasiva, a técnica de amniocentece guiada por ultra-sonografia pode constituir uma via de acesso rápida e simples para punção do líquido amniótico, com fins de realizar a sexagem fetal na espécie ovina.