SEXAGEM FETAL EM EQUINOS UTILIZANDO O DNA LIVRE FETAL CIRCULANTE (ccffDNA)

LEON, Priscila Marques Moura de[1*]; CAMPOS, Vinicius Farias[1]; LUCAS, Caroline Gomes[2]; HAAS, Cristina Sangoi[1]; SEIXAS, Fabiana Kömmling[2]; COLLARES, Tiago[1]**

Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
[1] Laboratório de Embriologia Molecular e Transgênese, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
[2] Laboratório de Genômica Funcional, Biotecnologia/Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas
** primleon@gmail.com **collares.t@gmail.com*

1. INTRODUÇÃO

A predeterminação do sexo em espécies domésticas de interesse zootécnico tem substanciais aplicações comerciais e científicas (HAN et al., 2010). A determinação do sexo fetal em égua pode fornecer um serviço útil aos criadores, pois permite programar estratégias comerciais, tomar decisões de venda e valor da égua prenha (BUCCA, 2005). Além disso, alguns garanhões têm uma maior proporção de fêmeas de melhor qualidade versus machos, ou o oposto (BUCCA, 2005).

Tradicionalmente, a determinação do sexo fetal em éguas é realizada através de ultrassom por identificação tubérculo genital ou por identificação da genitália externa, aos 59-68 dias e 120-210 dias de gestação respectivamente. Entre os dias 70 e 120 da gestação a imagem de ultrassom para diagnóstico do sexo fetal é incerta devido ao posicionamento do feto no útero (BUCCA, 2005). Estas técnicas requerem considerável experiência e muitas horas de visualização ultrassonográfica do feto equino e ainda são limitadas ao posicionamento fetal (BUCCA, 2005).

Ensaios utilizando a reação em cadeia da polimerase (PCR) para sexagem molecular são muitas vezes úteis por fornecer resultados sensíveis, precisos, rápidos e confiáveis (HAN et al., 2010). A diferenciação sexual é determinada pela presença ou ausência do cromossomo Y e pela expressão do gene SRY (*sex determining region Y*). Na ausência destes fatores o desenvolvimento gonodal é feminino (HAN et al., 2010; PIPREK, 2010). A sexagem com base na PCR foi realizada em embriões equinos (PEIPPO et al., 1995; CHOI et al., 2010). A sexagem molecular em equinos foi descrita com os genes SRY e AMELX-AMELY (HASEGAW et al., 2000) e ZFX / ZFY (PEIPPO et al., 1995).

A presença de DNA fetal livre circulante (ccffDNA) no plasma materno tem sido descrita em mulheres (LO et al., 1997). Embora durante a gestação, as circulações materna e fetal são separadas pela membrana placentária, os mecanismos possíveis do ccffDNA incluem a lise das células resultantes de danos físicos e imunológicos e apoptose dos tecidos fetais, que poderiam transpor essa barreira (LO et al., 1997). O ccffDNA no plasma materno oferece uma fonte alternativa de material genético fetal para o diagnóstico pré-natal inclusive na determinação do sexo fetal (AKOLEKAR et al., 2010) .

O diagnóstico não invasivo para a determinação do sexo fetal a partir do exame do plasma materno seria uma ferramenta importante na criação de cavalos, além de oferecer a possibilidade de diagnóstico genético pré-natal.

Baseado nisso, este estudo teve como objetivo executar ensaios de PCR para detectar ccffDNA no plasma águas prenhas e determinar o sexo fetal através da identificação do gene SRY. Além de executar um estudo de validação através da re-amplificação do produto de PCR e PCR quantitativo em tempo real (qPCR).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Coleta e preparação das amostras

Para a coleta do DNA livre no plasma sanguíneo usamos 20 águas prenhas nos últimos três meses de gestação. Para o controle da sexagem molecular usamos duas águas não gestantes e duas águas virgens.

A preparação das amostras foi realizada de acordo com o método utilizado pelo Akolekar et al. (2010). O sangue venoso foi coletado em tubos de vacutainer (Becton Dickinson UK Limited, Oxfordshire, UK) contendo EDTA, e processado após a coleta através de centrifugações. O plasma obtido foi então dividido em alíquotas de 0,5mL e armazenado a -80°C até análise posterior.

2.2. Extração do ccffDNA

Foi utilizado Kit comercial para a extração de DNA das amostras de plasma de águas prenhas e controles. O protocolo foi realizado conforme instruções do fabricante.

2.3. Detecção e amplificação de seqüências do cromossomo Y

O par de *primers* foi desenhado utilizando software Vector NTI11 (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA), através das sequências do SRY de *Equus caballus* depositadas no GenBank (# AC215855.2). A região-alvo, o gene SRY foi amplificado pela técnica de PCR (PCR, re-amplificação-PCR e qPCR) originando um produto de 182 pares de base (pb). O gene da desidrogenase gliceraldeído-3-fosfato (GAPDH) foi utilizado como controle, GAPDH gene foi amplificado pelas mesmas técnicas de PCR descritas, originando um produto de 150 pb.

2.4. Padronização reação molecular sexagem

Para padronizar a sexagem molecular, DNA genômico de 10 fêmeas e 10 machos foram utilizados. As amostras de sangue foram coletadas para extração do DNA genômico de acordo com as instruções do fabricante do kit. Amostras de DNA equinos de fêmeas e machos foram utilizadas a fim de padronizar a reação de sexagem molecular previamente a sexagem por ccffDNA.

2.5. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para a reação de PCR 5ρmol de cada primer foi utilizado e 12 µL de GoTaq® qPCR Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI, EUA) e água livre de DNases e RNases para um volume total de reação de 25µL. Para cada amostra foram realizadas duas reações, uma com o primer para o gene SRY e outra com o GAPDH. Para a visualização do amplificado, 12µL do produto de PCR foi corrido em eletroforese, gel de agarose 1,5% e corados com GelRed™ (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA). As reações de PCR foram realizadas em triplicata para todas as amostras.

A re-amplificação do produto de PCR usando o mesmo par de *primers* foi realizada a fim de aumentar a quantidade do fragmento de DNA amplificado. Na segunda rodada PCR o produto do primeiro PCR foi utilizado como *template* para a segunda reação. As condições reações foram idênticas às descritas acima.

2.6. Reação em cadeia da polimerase quantitativo em tempo real (qPCR)

O ccffDNA foi usado como *template* para a reação de qPCR que foi realizada no Stratagene® Mx3005P™ Real-Time PCR System (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA), a reação utilizando Platinum® SYBR® Green qPCR Supermix UDG (Invitrogen). O volume final das reações foi de 25µL. As condições foram as mesmas descritas para PCR, além disso, foi realizada a curva de dissociação. As reações de qPCR foram realizadas em triplicatas para todas as amostras.

2.7. Controles da PCR

Um controle branco (NTC) foi incluído em cada corrida para todas as técnicas de PCR. O controle negativo foi composto por DNA genômico feminino, enquanto que para o controle positivo foi utilizado DNA masculino diluído a 2% em DNA feminino. O sexo fetal foi confirmado após o nascimento. Os produtos de PCR foram sequenciados para confirmação do amplificado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

Os *primers* projetados para os genes SRY e GAPDH amplificaram com sucesso fragmentos 182 e 150pb respectivamente. Estes produtos PCR foram confirmados por sequenciamento, mostrando 100% de cobertura para os genes SRY e GAPDH equinos. A padronização da sexagem molecular utilizando DNA genômico mostrou que o SRY foi amplificado exclusivamente em amostras do sexo masculino (10/10 DNA genômico masculino e 0/10 DNA genômico feminino).

O PCR/SRY mostrou eficiência de 85% (17/20) e sensibilidade de 72,7%, portanto foi capaz de identificar oito de 11 gestações do sexo masculino. Enquanto a especificidade foi de 100%, identificando como femininas nove gestações. Com a re-amplificação do PCR/SRY foi obtido 95% (19/20) de eficiência e 90,9% (10/11) de sensibilidade, enquanto os mesmos resultados foram observados para o qPCR/SRY. Obtivemos amplificação em todas as amostras para o GAPDH, demonstrando 100% de eficiência de extração ccffDNA.

Em mulheres, um estudo usando a sequência de SRY informou que a previsão correta de fetos do sexo masculino variou de 31 a 97%, e a especificidade variou de 93 a 100% (JOHNSON et al., 2004). Ainda, comparando o desempenho entre os genes SRY e DYS14 foi observado uma maior sensibilidade no DYS14 (80 vs 97,9%) (PICCHIASSI et al., 2008). Enquanto que no Nested-PCR para o gene da amelogenina foi relatado 50% de casos de falso-negativos (MAZZA et al., 2002).

Ausência de seqüências de cromossomo Y no plasma materno implica que o feto é feminino, mas isso também pode ser a consequência de níveis indetectáveis de cffDNA na presença de fetos do sexo masculino (PICCHIASSI et al., 2008). O uso de maiores volumes de plasma e técnicas moleculares mais sensíveis podem evitar essas falhas no teste. O qPCR elimina risco de contaminação, pois é um sistema de detecção fechado. Além disso, sua sensibilidade permite a detecção de baixo número de copias de DNA, o que pode ser extremamente útil nos estágios iniciais da gestação. Em mulheres, foi demonstrado que a previsão do sexo fetal a partir do ccffDNA no sangue materno pode ser alcançada com alta precisão nos primeiros três meses de gestação (AKOLEKAR et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

Este é o primeiro estudo que demonstra a presença de ccffDNA no plasma de éguas prenhas. Esta descoberta inicia uma abordagem para avaliações não invasivas da gestação, incluindo a identificação de gênero fetal e análise de doenças genéticas. Nossos esforços estão sendo para melhorar a sensibilidade do teste de sexagem e determinar o menor período de gestação em que é possível detectar a ccffDNA em concentrações satisfatórias para detecção molecular em equinos. Em conclusão, este estudo demonstra que é possível alcançar a determinação do sexo fetal em éguas utilizando ccffDNA.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKOLEKAR, R.; FARKAS, D.H.; VANAGTMAEL, A.L.; BOMBARD, A.T.; NICOLAIDES, K.H. Fetal sex determination using circulating cell-free fetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. **Prenat. Diagn.**, v.30, p.918-23, 2010.

BUCCA, S. Equine fetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v.64, p.568-71, 2005.

CHOI, Y.H.; GUSTAFSON-SEABURY, A.; VELEZ, I.C.; et al. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **Reproduction**, v.140, p.893-902, 2010.

HAN, S.H.; YANG, B.C.; KO, M.S.; OH, H.S.; LEE, S.S. Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. **J. Assist. Reprod. Genet.**, v.27, p.725-8, 2010.

HASEGAW, T.; SATO, F.; ISHIDA, N.; FUKUSHIMA, Y.; MUKOYAMA, H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. **J. Vet. Med. Sci.**, v.62, p.1109-10, 2000.

JOHNSON, K.L.; DUKES, K.A.; VIDAVER, J.; et al. Interlaboratory comparison of fetal male DNA detection from common maternal plasma samples by real-time PCR. **Clin. Chem.**, v.50, p.516-21, 2004.

LO, Y.M.; CORBETTA, N.; CHAMBERLAIN, P.F.; et al. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, v.350, p.485-7, 1997.

PIPREK, R.P. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. **Int. J. Dev. Biol.**, v.54, p.779-86, 2010.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.44, p.619-27, 1995.