

## COMPARAÇÃO ENTRE DIFERENTES PROCESSOS DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO PROVENIENTE DE PENAS DE AVE TAXIDERMIZADA

Quênia Yoko de Paula Matsui<sup>1</sup>, Davi Bernes Pereira<sup>2</sup>, Francisco Ângelo F. Moral<sup>3</sup> e Josane Mittmann<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Graduanda do curso de Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP. quenia\_yoko@hotmail.com

<sup>2</sup>Mestrando em Ciências Biológicas da Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) - IP&D/UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP. davipereira\_bio@hotmail.com

<sup>3</sup>Prof. Ms. Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA) - Depto. Ensino de Biologia, Campus Goiânia - Setor Oeste, Rua 10 - Goiânia - GO. fafmoral@uol.com.br

<sup>4</sup>Profa.Dra. Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP) - Laboratório de Parasitologia e Biotecnologia - IP&D/UNIVAP. Av. Shishima Hifumi, 2911, São José dos Campos/SP. mittmann@univap.br

**Resumo** - A identificação sexual de aves é muito importante, principalmente para estudos de conservação e manejo ambiental. Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes processos de extração de DNA genômico de penas de ave taxidermizada, determinando qual método se adapta melhor para amplificação do gene CHD através da técnica de PCR e dentre os procedimentos para obtenção de material genético, o método mais viável foi o desenvolvido por Malagó, *et al* (2002), por ser uma análise simples, rápida e por dispensar a etapa fenol/clorofórmio, mesmo para bulbos de penas armazenados em espécies taxidermizadas.

**Palavras-chave:** Sexagem, penas, extração de DNA, gene CHD.

**Área do Conhecimento:** Ciências Biológicas - Genética

### Introdução

A identificação sexual de aves é muito importante, principalmente para estudos de conservação e manejo ambiental (RUDNICK *et al*, 2005). Em muitas espécies de aves, a distinção entre machos e fêmeas se torna extremamente difícil baseando-se somente na sua morfologia externa, especialmente em aves jovens, (MALAGÓ JR. *et al*, 2002) já que possuem órgãos genitais internos. Dentre os métodos disponíveis para sexagem de aves, a maioria apresenta caráter invasivo, como a laparotomia ou pesquisa de hormônios através da retirada do sangue da ave (TURCI *et al.*, 2004). Ambos os procedimentos apresentam riscos para o animal. Ultra-sonografias e tomografias também são utilizadas, porém, há necessidade da utilização de fármacos sedativos (GRANDO, 2002). Todas essas abordagens, além de consumirem muito tempo, impõem estresse sobre os espécimes examinados, devendo ser evitadas de acordo com os termos da legislação de proteção animal, especialmente em aves ameaçadas de extinção. (HARZ *et al.*, 2008).

Nos últimos anos, análises genéticas de amostras coletadas de modo não invasivo tornaram-se um método muito utilizado para

obtenção de informações presentes no DNA, como amostras de cabelo e saliva, ou em casos de aves, a partir de penas (RUDNICK *et al*, 2005).

Os cromossomos sexuais em aves estão localizados no gene CHD - Chromo-helicase-DNA bindind. Diferente dos mamíferos em aves as fêmeas são sexo heterogamético apresentando alelo heterozigótico (CHD-ZW) e os machos são o sexo homoganético apresentando alelo homozigótico (CHD-ZZ). A identificação do sexo por técnicas moleculares é normalmente realizada pela a amplificação através da Reação em Cadeia da Polimerase do gene CHD com par de primers denominados P2 (5' - TCTGCATCGCTAAATCCTTT - 3') e P8 (5' - CTCCCAAGGATGAGRAAYTG - 3') desenvolvidos por GRIFFITHS *et al.* (1998). Para obtenção do material genético é necessário o uso de métodos rápidos, fáceis, seguros e de baixo custo para extração do DNA desses animais (MALAGÓ JR. *et al*, 2002). A utilização de penas ao invés de sangue para a obtenção de DNA genômico minimiza o estresse da ave e questões relacionadas à preservação da integridade do animal. Além de ser um método rápido e fácil para obtenção de DNA de boa qualidade (BELLO, FRANCINO, SÁNCHEZ, 2001; MALAGÓ JR. *et al*, 2002) e pode ser utilizado para estabelecer perfil

genético confiável, seguro e útil para estudos importantes de filogenia (LEETON, CHRISTIDIS, WESTERMAN, 1993) ou de conservação, permitindo a análise genética de espécimes ameaçados de extinção sem a necessidade de captura (RUDNICK *et al*, 2005).

Além das pesquisas de conservação e manejo, com o advento da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) é possível realizar análises genéticas em espécimes que fazem parte de coleções de museu, fornecendo um estudo amplo sobre a filogenia abrangendo desde a confirmação de uma espécie como a investigação das relações entre famílias e ordens taxonômicas (BANTOCK, PRYS-JONES, LEE, 2008). A utilização de espécimes taxidermizados para análises genéticas nos permite analisar espécies já extintas e traçar sua relação com espécies hoje existentes, além de permitir a coleta de material para estudos de uma espécie de difícil captura (BANTOCK, PRYS-JONES, LEE, 2008; LEETON, CHRISTIDIS, WESTERMAN, 1993).

Este trabalho teve como objetivo comparar diferentes processos de extração de DNA genômico de penas de ave taxidermizada, determinando qual método se adapta melhor para amplificação do gene CHD através da técnica de PCR.

## Metodologia

Foram retiradas seis penas da porção caudal de Sábida-do-campo (*Mimus saturninus*), taxidermizada em agosto de 2007 e guardada em temperatura ambiente até então, segundo autorização do comitê de ética nº processo A039/CEP/2006. Cortes de 0,5 cm da porção terminal da haste foram realizados, para obtenção da maior concentração de DNA presente no bulbo da pena. Os cortes foram lavados uma vez com álcool 70% e em seguida mergulhados em água destilada. As porções cortadas foram colocadas em microtubos de 1,5 mL e tratadas com três soluções de lise diferentes, em duplicata, descritas na literatura, como se seguem:

Tampão de lise A (20µL por microtubo): 0,2 M de NaOH e aquecimento das amostras a 75°C em banho-maria por 20 minutos. Após esse período foi adicionado 180µL de uma solução de Tris-HCl 0,04M, pH 7,5 (MALAGÓ JR. *et al.*, 2002).

Tampão de lise B (500µL por microtubo): 50 mM Tris-HCl pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, 2% SDS e 175 µg/mL de proteinase K. As amostras foram incubadas por 4 horas a 56°C e após este período, agitadas vigorosamente e centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido

para outro tubo de 1,5 mL e o DNA foi purificado com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). O DNA final foi ressuspenso em TE/RNase (70 µg/mL) (BELLO, FRANCINO, SÁNCHEZ, 2001).

Tampão de lise C (500 µL por microtubo): 50mM Tris-HCl pH 8, 10mM de EDTA pH 8, 100mM NaCl, 40 mM DTT, 10% SDS e 100µg/mL de proteinase K. As amostras foram incubadas por 12 horas a 37°C sob agitação, centrifugadas a 12.000 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi submetido a purificação com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1). Foi utilizado TE/RNase (70 µg/mL) para eluir o DNA final, conforme protocolo modificado de Leeton, Christidis, Westerman (1993).

As amostras foram visualizadas em gel de agarose 0,8% para verificação da qualidade do DNA. Para a realização da PCR, foram utilizadas quantidades crescentes de DNA (2µL, 4µL, 6µL, 8µL e 10µL) de cada amostra com as seguintes concentrações da solução de reação: tampão (20 mM Tris - HCl, pH 8,4, 500 mM KCl - LGC); 3 mM de cloreto de magnésio (LGC); 0,2 mM de cada dNTP's (Invitrogen); 20 pmol de cada primer (P2/P8- IDT), 1 unidade de Taq DNA polimerase (LGC). Todas as amostras foram submetidas às seguintes condições de amplificação (Thermal Cycler/PXE 0.2- Thermo Eletro Corporation): etapa inicial de 5 minuto a 95°C, 36 ciclos de 95°C durante 1 minuto, 48°C durante 1 minuto, e 72°C durante 1 minuto, com etapa final de 48°C durante 2 minutos e 72°C durante 5 minutos. As amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a uma concentração de 3% (110V durante 15 minutos e 60V por 90 minutos). A visualização dos resultados foi feita pela exposição do gel à radiação ultra-violeta no transluminador (Transluminador UV 302 nm – T26M, BioAgency), os resultados foram registrados por fotodocumentador (Gel Logic 100 Imaging System, Kodak®).

Como controles positivos, foram utilizados 2µL de amostras de DNA extraídas de sangue coletadas de *Ara ararauna* cedidas por Cristina Myiaki (USP) e como controle negativo apenas água ultrapura autoclavada.

## Resultados

Dentre os procedimentos testados para obtenção de material genético, todos apresentaram rendimento baixo conforme demonstrado na figura 1, onde em gel de garose 0,8 % não foi possível visualizar DNA genômico. Apesar do rendimento baixo as amostras foram testadas para a amplificação do gene CHD pela técnica da PCR.

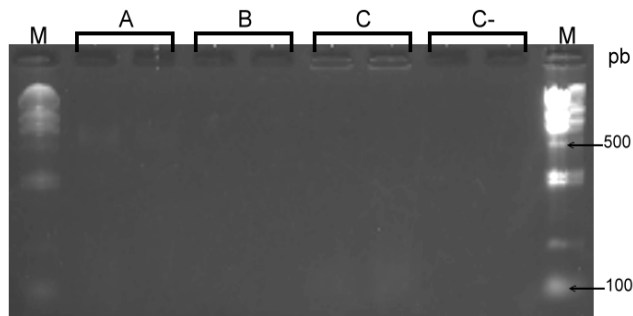


Fig.1- Extração de DNA extraído a partir de penas de *Mimus saturninus* a partir de diferentes metodologias. M: marcador 100pb. A, B, C: DNA, segundo cada protocolo de extração. C- controle negativo.

Os produtos resultantes da reação em cadeia da polimerase foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 3%, corados com brometo de etídio, para visualização dos produtos da amplificação. A amplificação do material genético do espécime da família Mimidae, foi possível apenas em amostras extraídas utilizando-se o tampão de lise A e utilizando 8 $\mu$ L da amostra. (fig.2), onde se observou amplificação de dois fragmentos o menor com cerca de 200 pb e o maior entre 300 e 400 pb. O padrão observado é característico de fêmeas, já que em aves este é o sexo heterogamético. Cabe ressaltar que o padrão genético observado foi diferente do observado para *Ara ararauna* (Psitacidae), utilizada como controle positivo, onde observa-se amplicons de tamanhos maiores entre 396 e 517 pb.

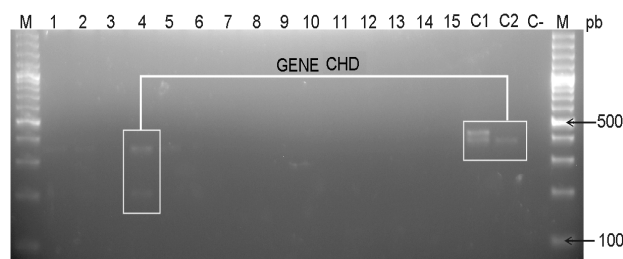


Fig.2- Amplificação do material genético em PCR. M: marcador 100pb. A: 1 a 5, B: 6 a 10 e C: 11 a 15, sendo 1,6,11: 2 $\mu$ l; 2,7,12: 4 $\mu$ l; 3,8,13: 6 $\mu$ l; 4,9,14: 8 $\mu$ l e 5,10,15: 10 $\mu$ l. C1-Fêmea controle e C2 macho controle de *Ara ararauna*. C- controle negativo.

## Discussão

Bello, Francino e Sánchez (2001) descreveram um protocolo para extração de DNA de penas e obtiveram DNA em boa quantidade e qualidade, sendo facilmente observados em gel de agarose corado com brometo de etídeo, porém utilizaram penas retiradas em um período máximo de duas semanas, o que aumenta as chances de extrair material genético íntegro e de fácil detecção por eletroforese. A ave em questão foi taxidermizada

em 2007, que poderia ter influenciado na quantidade do DNA disponível, sendo sua concentração tão baixa que impossibilitou a visualização em gel de agarose. Bello, Francino e Sánchez (2001) afirmam ainda que, a quantidade e a integridade do DNA isolados, são dois parâmetros que são essenciais para o êxito da otimização de testes PCR e que a degradação de DNA genômico não é um fator agravante para a realização da técnica, dependendo da região e do tamanho do DNA a ser amplificado. Quando pequenas regiões (100-200 pb) são amplificadas, entretanto, essa metodologia geralmente produz amplificações inespecíficas.

O método desenvolvido por Leeton, Christidis e Westerman (1993), para a extração de DNA de ave taxidermizada há cem anos (*Geopsittacus occidentalis*) mostrou-se eficaz em estudos filogenéticos, utilizando primers para amplificação do gene citocromo b, presente no DNA mitocondrial, que apresenta maior resistência e estabilidade em relação ao DNA genômico em amostras mal preservadas, mantendo as informações genéticas de maneira eficaz. Por esse método, a extração não foi detectável em gel de agarose e também não foi possível a amplificação do material genético, onde supõe-se que a extração de DNA genômico de penas em mau estado de conservação e de longa procedência, utilizando fenol/clorofórmio, além de ser um processo demorado, mais complexo e caro, não produz resultados satisfatórios.

MALAGÓ JR. *et. al.*, (2002) teve sucesso ao usar um conjunto de primers P2 e P8 para sexar 100 indivíduos e obteve 100% de precisão ao confirmar o resultado por técnicas convencionais, como foi observado no presente estudo, além de ser empregado de maneira simples e rápida nas condições laboratoriais. Assim também visto em estudos realizados por Duan e Fuerst (2001) onde a utilização de um simples método utilizando NaOH em ebulição permitiu a extração de DNA a partir de uma pena em menos de uma hora.

Em geral, os resultados destacam que qualquer estudo utilizando PCR em métodos de sexagem, deve testar possíveis evasões alélicas ou polimorfismos no gene CHD-Z/W (Robertson & Gemell, 2006).

Nesta reação para amplificação de ambos os genes (CHD-Z e CHD-W) há uma diferença em relação as bandas do gênero Mimidae e Psitacidae, que se explica pelo polimorfismos entre diferentes gêneros de aves, nas regiões que flanqueiam a sequência alvo dos primers P2/P8 (BANTOCK, PRYS-JONES, LEE, 2008; GRIFFITHS, 2000).

## Conclusão

A metodologia utilizada por MALAGÓ JR. *et al.*, (2002) que utilizou a técnica de extração de DNA com NaOH foi a que melhor se adaptou às condições locais, por ser uma análise simples, rápida e por dispensar a etapa fenol/clorofórmio, mesmo para bulbos de penas armazenados em espécies taxidermizadas. Observamos também que essa metodologia permite obtenção de DNA de ave taxidermizada, sendo ferramenta útil para estudos de aves presentes em museus e coleções.

## Referências

- BANTOCK, T.M. PRYS-JONES, R.P., LEE, P.L.M. New and improved molecular sexing methods for museum bird specimens. *Molecular Ecology Resources*. N. 8, 2008. 519–528.
- BELLO, N. FRANCINO, O. SÁNCHEZ, A. Isolation of genomic DNA from feathers. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. Vol. 13, 2001. 162–164 (Brief communications).
- DUAN, W., FUERST, P.A. Isolation of a Sex - Linked DNA Sequence in Cranes. *The Journal of Heredity*. Vol. 92, n. 5. 2001. 392-397.
- GRANDO, A.P. Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual. Dissertação pela Universidade Federal de São Carlos. 2002
- GRIFFITHS, R *et al.* A DNA test to sex most birds. *Molecular Ecology*. N°7.1998. 1071-1075.
- GRIFFITHS, R. Sex Identification in Birds. *Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine*, vol. 9, n.1, 2000. 14-26
- HARZ, M. *et al.* Minimal invasive gender determination of birds by means of UV-resonance Raman Spectroscopy. *Analytical Chemistry*. N. 80, 2008. 1080-1086.
- LEETON, P. CHRISTIDIS, L. WESTERMAN, M. Feathers from Museum Bird Skins: A Good Source of DNA for Phylogenetic Studies. *The Condor*, Vol. 95, n. 2, 1993. 465-466.
- MALAGÓ JR, W., *et al.* Large scale Sex typing of ostriches using DNA extracted from feathers. *BMC Biotechnology*. vol. 2, 2002.
- ROBERTSON, B.C, GEMMELL, N.J. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology? *Conservation Genetics*, vol. 7, n.2, 2006. 267–271.
- RUDNICK, J. A. *et al.* Using naturally shed feathers for individual identification, genetic parentage analyses, and population monitoring in an endangered Eastern imperial eagle (*Aquila heliaca*) population from Kazakhstan. *Molecular ecology*. N.14, 2005. 2959–2967.
- TURCI, K.F.; MORAL, F. A. F.; NOBREGA, F.G. Sexagem de psitacídeos (Psittaciformes, Aves) e Ramphastídeos ( Piciformes, aves) do criadouro conservacionista Univap utilizando marcadores moleculares. Trabalho de graduação. 2004.