

JULIANA NOBRE VIEIRA

**SEXAGEM MOLECULAR EM AVES VIA PCR –
AVALIAÇÃO DE TRÊS TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO DE DNA**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Zootecnia. Área: Genética e Melhoramento Animal

Orientadora: Denise Aparecida Andrade de Oliveira.

Co-orientador: Eduardo Geraldo Alves Coelho

BELO HORIZONTE
UFMG – ESCOLA DE VETERINÁRIA
2009

Dissertação defendida e aprovada em 19 de fevereiro de 2009, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa. Denise Aparecida Andrade de Oliveira
Orientadora

Dra. Cláudia Salviano Teixeira

Profa. Ângela Maria Quintão Lana

*Dedico à minha mãe e
em especial ao meu pai
por sempre ser meu companheiro
e pelos eternos ensinamentos.*

*Afinal, “entre nós dois não cabe
mais nenhum segredo além do que já combinamos”.*
(Ana Carolina/Dudu Falcão/Gean Luca Grignani/Massima Luca)

AGRADECIMENTOS

À professora Denise Aparecida Andrade de Oliveira por me aceitar como sua aluna e por acreditar em mim.

Ao Eduardo e Cláudia pelos ensinamentos e por terem sido meus consultores de dúvidas.

Aos colegas de morcegagem do Laboratório de Genética: Ângelo, Arno, Bruna, Cláudia, Daniel, Daniela, Danilo, Henrique, LÍlian e Ronaldo pelo companheirismo, ajudas e boas risadas.

Ao Adson, pois se não fosse sua boa vontade e suas “incríveis” máquinas fotográficas estaria até hoje tentando melhorar os géis.

Aos criatórios de aves e ao IBAMA que colaboraram com as amostras para a realização deste trabalho.

À minha mãe por ter vibrado comigo desde o momento da minha classificação no mestrado, quando ganhei a bolsa e quando consegui padronizar a PCR (mesmo sem entender nadinha de nada).

Às minhas irmãs por me aturarem e por fingirem que entendiam meus géis e minhas longas e exaustivas “mesmas” explicações.

Aos meus cachorros sobrinhos, Guma e João, e à minha filhota, Gilda.

À minha dindinha, Mônica, por tanto me aconselhar.

Às minhas amigas, Dani, Érika e Kika pelas discussões de biologia molecular.

À minha querida amiga, Rê, por estar tão presente em minha vida, mesmo estando tão distante, mas ao mesmo tempo tão perto de mim. E também, é claro, pelas traduções para o inglês. *Thank you!!!*

Ao Roberto Santiago, Samambaia, Pena Branca, Gira Mundo, Treme-terra, Carioca, DaMata e Caveira pelos conselhos e companheirismo espiritual.

A CAPES - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - pela bolsa de estudo oferecida.

SUMÁRIO

	RESUMO	8
1.	INTRODUÇÃO	10
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1.	Evolução dos Cromossomos Sexuais	10
2.2.	Cromossomos Sexuais Z e W	11
2.3.	Dimorfismo sexual	12
2.4.	Importância da Sexagem	12
2.5.	Biologia Molecular.....	14
2.5.1.	Reação em Cadeia da Polimerase- PCR	14
2.6.	Tipos de Criatórios	15
2.6.1.	Criatório Comercial.....	16
2.6.2.	Criatório Conservacionista	17
2.6.3.	Criatório Expositivo	17
3	MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1.	Coleta e Composição das Amostras	18
3.2.	Extração e Armazenamento do DNA	18
3.3.	<i>Primers</i>	19
3.4.	Amplificação pela PCR, eletroforese e análise do gel	19
3.5.	Análise Estatística	20
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
4.1.	Extrações de DNA	20
4.2.	Caracterização	22
4.3.	Estudo de Associação	26
5	CONCLUSÕES	26
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Comparação das técnicas de determinação do sexo das aves. FONTE: Grando (2002) - modificada	14
Tabela 02	Tempo de extração, número de reagentes e tempo de conservação do DNA das três técnicas de extração de DNA, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.	21
Tabela 03	Método de sexagem utilizando par de <i>primers</i> alelo-específico P ₂ /P ₈ em 15 diferentes espécies de aves e amostras (sangue e/ou pena), em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.	22
Tabela 04	Diferentes tamanhos de pb dos cromossomos sexuais (Z e W) das espécies, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.	24
Tabela 05	Tabela de contingência de Segregação Genética para os sexos 1:1, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Filogenia dos vertebrados que ilustra os métodos da determinação de sexo. “Fêmea” e “macho” têm a GSD com fêmeas e machos heterogaméticos respectivamente. O TSD representa a determinação de sexo temperatura-dependente. FONTE: Modi & Crews (2005).	11
Figura 02	Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular <i>pGEM</i> [®] . Canaletas: 2/F e 3/M - Estrelinha, 4/F e 5/M - Pintassilgo, 6/F e 7/M - Catatau. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Catatau.	24
Figura 03	Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular <i>pGEM</i> [®] . Canaletas: 2/F e 3/M - Tucano, 4/F e 5/M - Papagaio, 6/F e 7/M - Maritaca. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Papagaio.	24
Figura 04	Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular <i>pGEM</i> [®] . Canaletas: 2/F e 3/M - Canário-belga, 4/F e 5/M - Pássaro-preto, 6/F e 7/M - Sabiá. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos das fêmeas de Pássaro-preto e Sabiá.	25
Figura 05	Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular <i>pGEM</i> [®] . Canaletas: 2/F e 3/M - Azulão, 4/F e 5/M - Bicudo, 6/F e 7/M - Trinca-ferro-verdadeiro. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Bicudo.	25
Figura 06	Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular <i>pGEM</i> [®] . Canaletas: 2/F e 3/M - Canário-da-terra, 4/F e 5/M - Galo-da-campina, 6/F e 7/M - Tico-tico.	25

RESUMO

O Brasil reúne uma das maiores riquezas em avifauna do mundo. Estima-se que pelo menos metade das aves não possuam dimorfismo sexual que, quando existe, é geralmente sutil, e pode ocorrer somente no período de maturidade sexual. Por estes motivos faz-se necessária a determinação do sexo das aves. Este estudo avaliou além do tempo de conservação do DNA após extração, o método de análise molecular para a identificação do sexo das aves utilizando três diferentes técnicas de extração de DNA, de penas e de sangue. Foi empregado o par de *primers* alelo-específico, P₂/P₈, para o gene CHD, localizado nos cromossomos sexuais (**Z** e **W**) das aves, pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se o método de extensão do *introns* do gene CHD (helicase-dependente de cromo). O resultado eletroforético demonstrou dois alelos para as fêmeas, sendo, portanto, heterogaméticas (ZW), enquanto nos machos, somente um, homogaméticos (ZZ). Os resultados obtidos demonstraram que há variação entre os tamanhos dos pares de base (pb) entre as espécies: de 246 a 396 pb para o alelo Z e de 254 a 412 pb para o W. As três técnicas de extração de DNA foram eficazes a todas as 15 espécies analisadas. Porém a metodologia do DNA extraído do sangue colhido em papel filtro obteve melhor resultado quando se comparou a questão do tempo de extração e conservação do DNA. Os resultados revelaram a presença de 71 machos (49,31%) e 73 fêmeas (50,69%), totalizando 144 aves. Esta situação propõe desvios meramente casuais ($p > 0,05$). A variável estudada, dicotômica, está na relação 1:1 dentro de um universo amostral. Estes dados mostram que esta técnica é segura e eficaz para a determinação sexual das aves.

Palavras-chave: determinação sexual em aves, PCR, cromossomos sexuais Z e W, extração e tempo de conservação do DNA.

ABSTRACT

Brazil has one of the wealthiest avifauna in the world. It is estimated that a half of the birds don't have sexual dimorphism, that when occur, is generally subtle and could only be present in sexual maturity. All this reasons illustrate why the avian sex identification is important. This study evaluated not only the time of conservation of the DNA after extraction, but also the bird sex identification molecular analysis method using three different techniques of DNA extraction from feathers and blood. It was utilized the allele-specific primer pair P₂/P₈, within the CHD gene, located in the bird sexual chromosomes (Z e W), by means of the polymerase chain reaction (PCR) technique. The introns extension method of gene CHD (chromium-helicase-dependent) was chosen. The eletrophoretic result demonstrated two alleles for the females, being, therefore, heterogametics (ZW), while in the males, just one, homogametics (ZZ). Results demonstrated that there is variation between the sizes of the stand pairs (bp) between species: 246 to 396 pb for allele Z and 412 to 254 pb for the W. The three techniques of DNA extraction were efficient to all the 15 species analyzed. However the methodology using DNA extracted from the blood harvested in filter paper got better results taking into consideration the extraction time and conservation of the DNA, as well as the final cost of the technique. The results disclosed the presence of 71 males (49.31%) and 73 females (50.69%), totalizing 144 birds. This situation proposes casual deviations, Test χ^2 ($p > 0.05$). The studied variable was presented as dicotomic form part of an sampling universe. These data show that this technique is efficient and safe for the bird sexual determination.

Keywords: *sex determination in birds, PCR, sexual chromosomes Z and W, DNA extraction and time of conservation.*

1. INTRODUÇÃO

O Brasil reúne uma das maiores riquezas em avifauna do mundo com mais de 1796 espécies, das quais mais de 10% são endêmicas, o que torna o país um dos mais importantes em relação a investimentos em conservação.

A fauna silvestre vem sendo constantemente ameaçada de extinção, sendo as aves um dos grupos mais atingidos. Várias são as causas desta perda de espécies, mas certamente um dos fatores mais importantes é a destruição dos habitats, que leva ao isolamento de populações cada vez menores, aumentando as chances de desaparecimento. Por outro lado, o país também sofre forte pressão do tráfico de animais silvestres. Por estes motivos, nos últimos anos, vem crescendo consideravelmente a criação de animais silvestres no Brasil, com a finalidade de se evitar o desaparecimento destas espécies ameaçadas.

Para o sucesso reprodutivo e produtivo é fundamental que seja determinado o sexo das aves. Portanto, a sexagem em aves monomórficas é necessária para o sucesso reprodutivo de espécies silvestres mantidas em cativeiro, tanto no sentido conservacionista quanto no criacionista e é uma ferramenta valiosa para os estudos

comportamentais e populacionais em espécies sem dimorfismo sexual aparente.

Estima-se que pelo menos metade das aves existentes no mundo não possuam dimorfismo sexual que, quando existe, é geralmente sutil, e pode ocorrer somente no período de maturidade sexual. O dimorfismo sexual é um caso especial no qual machos e fêmeas de uma mesma espécie diferem em caracteres sexuais secundários, como tamanho ou coloração.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o método de análise molecular para a identificação do sexo das aves, com três diferentes técnicas de extração de DNA, utilizando como amostras penas e sangue, empregando-se *primers* específicos para o gene CHD (*chromo-helicase-DNA-binding*, helicase dependente de cromosoma), localizado nos cromossomos sexuais (Z e W) das aves, pela técnica da reação em cadeia da polimerase, PCR. Outro aspecto importante foi o tempo de conservação do DNA após extraído.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Evolução dos Cromossomos Sexuais

Os vertebrados têm os indivíduos separados sexualmente, sendo o sexo determinado por diferentes maneiras (Ezaz *et al.*, 2006).

Frequentemente, os dois sexos diferem entre si em aspectos básicos relacionados com a ecologia e com a morfologia (Sheldon, 1999; Ellegren & Sheldon, 1997). Por exemplo, em muitas espécies de aves e mamíferos, os machos são maiores que as fêmeas, um sexo é mais dispersivo (machos nas aves são poligâmicos) e, assim, a seleção sexual age mais fortemente neste sexo. Estas diferenças ecológicas mostram que os fatores ambientais podem causar diferenças da seleção entre os sexos (Sheldon, 1999).

Muitas espécies de peixes e répteis, dentre elas quelônios, lagartos e crocodilianos) utilizam o ambiente para determinar o sexo por meio da temperatura (ESD/STD) (Uller *et al.*, 2007; Ezaz *et al.*, 2006). Como exemplos têm-se a temperatura de incubação dos ovos do jacaré-do-Pantanal, que quando o ninho é incubado em temperatura baixa (<31,5 °C), produzem fêmeas e em temperatura alta (>31,5 °C) produzem principalmente machos (Campos, 2005). Há também as espécies de tartarugas marinhas,

que quanto mais quente a temperatura da areia, mais fêmeas eclodem (Piccinini, 2007).

A transição entre ESD e GSD pode ocorrer rapidamente durante o estágio de incubação, sendo que tanto os fatores genéticos quanto o ambiente influenciam na determinação de sexo (Uller *et al.* 2007).

Entre as espécies que usam a genética como determinante do sexo, onde os machos são heterogaméticos (XY), sendo heterozigotos no *locus* codificante do sexo e fêmeas homogaméticas (XX), estão todos os mamíferos. Há também espécies em que todas as fêmeas são heterogaméticas (ZW) e os machos homogaméticos (ZZ), dentre estas estão todas as aves e serpentes. Algumas espécies de peixes, de anfíbios, de quelônios e de lagartos podem apresentar fêmeas e machos hetero e homogaméticos, dependendo do sistema sexual XY e/ou ZW (Ezaz *et al.*, 2006; Modi & Crews, 2005; Griffiths *et al.*, 1998), Figura 01.

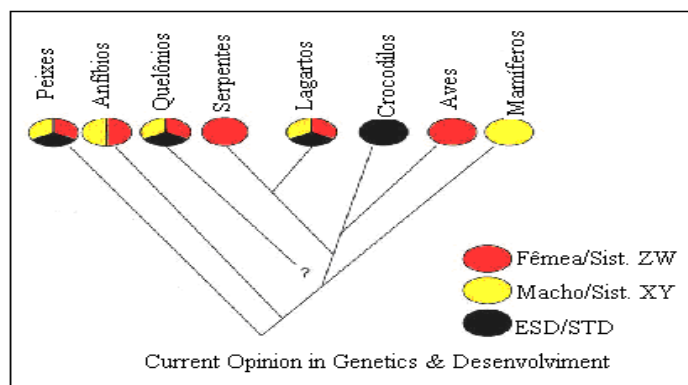


Figura 01: Filogenia dos vertebrados que ilustra os métodos da determinação de sexo. “Fêmea” e “macho” têm a GSD com fêmeas e machos heterogaméticos respectivamente. O STD representa a determinação de sexo temperatura-dependente. **FONTE:** Modi & Crews (2005).

As espécies com cromossomos sexuais heteromórficos têm níveis iguais da expressão do gene entre os sexos quando um sexo tem somente uma cópia, ZW ou XY, e o outro sexo tem duas cópias de um cromossomo em particular, ZZ ou XX (Modi & Crews, 2005). Os cromossomos sexuais W e Y são alelos dominantes ao sexo masculino em relação aos Z e X, respectivamente (Schartl, 2004).

Aves e mamíferos apresentam cromossomos sexuais na base de sua filogenia, onde as espécies apresentam cromossomos sexuais bem diferenciados (Artoni *et al.*, 2000). A hipótese da evolução do cromossomo sexual de vertebrado é que o sistema XY de mamífero pode ter sido originado diretamente do sistema ZW do ancestral réptil, melhor que um estado intermediário ou transitório da determinação de sexo pelo ambiente. Portanto, um importante e relevante estudo de cromossomos sexuais de vertebrados é o sistema XY de mamíferos e os sistemas ZW de aves e serpentes (Modi & Crews, 2005; Ezaz *et al.*, 2006). Estes sistemas mostram a similaridade superficial dos cromossomos X e Z, afinal, eles são grandes e carregam muitos genes entretanto, parecem não influenciar na determinação de sexo, visto que os cromossomos Y e W são menores, altamente heterocromáticos e têm poucos genes ativos (Ezaz *et al.*, 2006;

Charlesworth & Charlesworth, 2005; Duan & Fuerst, 2001; Ellegren, 2000).

2.2. Cromossomos Sexuais Z e W

A maioria dos animais e muitas plantas apresentam dimorfismo sexual. Na maioria destes casos, o sexo é determinado por cromossomos sexuais. Nestes organismos, existem duas categorias de cromossomos, os sexuais e os autossomos.

A maioria dos cromossomos em um genoma é de autossomos. Os cromossomos sexuais estão em menor número, apenas um par (Suzuki *et al.*, 2002). Os pares de cromossomos autossômicos constam de cópias materna e paterna, sendo morfológicamente semelhantes. Porém, os cromossomos sexuais são bem distintos entre si (Ohno, 1967 citado por Griffiths, 2000).

Em aves o sexo é determinado por cromossomos sexuais Z e W (Suzuki *et al.*, 2002). Os genes, CHD-Z e CHD-W (*chromo-helicase-DNA-binding*, helicase dependente de cromo), estão localizados nos cromossomos sexuais de todas as aves. O gene CHD-W localiza-se no cromossomo W, somente nas fêmeas e o gene CHD-Z é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo em ambos os sexos (Griffiths *et al.*, 1998). Ambos os cromossomos apresentam seus

tamanhos variados na maioria das espécies (Ezaz *et al.*, 2006; Fridolfsson & Ellegren, 2000). Somente em ratitas (avestruz, ema, emu) os cromossomos sexuais Z e W são morfologicamente similares aos autossomais, mostrando pequena diferença no tamanho ou na cópia paterna. A sexagem molecular nestas aves é feita utilizando outro par de *primers* (Ansari *et al.*, 1988 & Tagaki *et al.*, 1972 citados por Griffiths *et al.*, 1998).

2.3. Dimorfismo sexual

As diferenças existentes entre machos e fêmeas se classificam como características primárias e secundárias. As secundárias referem-se a diferenças provocadas pela ação dos hormônios sexuais e, portanto, estão sujeitas a uma considerável variação, dependendo da natureza do meio endócrino que interfere nos caracteres citados. Já as primárias se consideram habitualmente integradas pelas diferenças anatômicas sobre todos os órgãos reprodutivos. Porém, em ambos os sexos das aves a genitália externa consiste da cloaca que é a porção final do intestino e do trato geniturinário, não sendo possível a determinação do sexo (Griffiths, 2000; Pough, 1999). As aves podem vir a ter dimorfismo sexual somente quando atingem a maturidade sexual (Pough, 1999; Ellegren & Sheldon, 1997; Hutt, 1958). O dimorfismo sexual representa diferenças

morfológicas, as quais são utilizadas durante a corte no período reprodutivo entre machos e fêmeas (Pough, 1999).

2.4. Importância da Sexagem

A regulamentação de criadouros pelo IBAMA trouxe nova visão do conceito de reprodução e manutenção de aves silvestres (Allgayer & Cziulik, 2007), sendo de extrema importância a sexagem de aves. A determinação do sexo em aves monomórficas é fundamental para o sucesso reprodutivo de espécies silvestres mantidas em cativeiro (Raso & Werther, 2004), é uma ferramenta valiosa para os estudos comportamentais e populacionais em espécies sem dimorfismo sexual aparente, assim como em criatórios de comercialização de produção (Faria *et al.*, 2007).

Existem vários métodos de sexagem, cada qual com suas vantagens e limitações; em alguns casos, a identificação sexual não é efetiva utilizando-se determinada técnica, tendo-se que repetir várias vezes a análise ou recorrer a outro tipo de exame até o êxito total (Grando, 2002). Os métodos cirúrgicos, laparoscopia e a TRMN (tomografia por ressonância magnética nuclear), podem causar sérios problemas como no caso da administração do anestésico: relação da dose e peso das aves, uma vez que podem pesar

de alguns gramas a muitos quilos; tempo de absorção do sedativo, e ainda, o ponto da incisão pode causar ruptura do saco aéreo, podendo levar as aves ao óbito (Richner,

1989 citado por Griffiths, 2000; Grando, 2002), Tabela 01.

Tabela 01: Comparação das técnicas de determinação do sexo das aves

	Laparoscopia	TRMN	Análise de DNA	Cariotipagem
Valor médio do exame/ave	R\$ 25 - 50,00	R\$ 100,00	R\$ 11- 50,00	R\$ 150,00
Invasiva	sim	não	não	não
Stress	alto	alto	mínimo	mínimo
Porte da ave	grande	todos	todos	todos
Idade	adulta	adulta	qualquer	qualquer
Tempo necessário para obtenção do resultado	poucos minutos	poucos minutos	9 dias	20 dias

FONTE: Grando (2002) - modificada

As técnicas utilizadas nos processos laboratoriais, citogenética e análise de DNA, são as mais modernas que existem. O processo de sexagem via DNA é uma alternativa segura quando comparado à sexagem cirúrgica. Tem sido utilizado desde o seu desenvolvimento com precisão superior a 99% e por ser uma técnica simples, de baixo custo, segura, além de causar stress mínimo à ave. Podendo ser realizado em aves de qualquer idade, facilitando a formação de pares na criação assistida e em programas de reintrodução, além da venda comercial e legal de animais sexados (Griffiths, 2000; Ferreira & Grattapaglia, 1998; <http://www.mackenzie.com.br/universidade/exatas/ejbio/sexagem.html>). A grande vantagem da sexagem é a redução de custos nas eventuais reposições de casais que os

fornecedores precisam fazer se eventualmente algum erro for cometido nas determinações de sexo pelos métodos tradicionais.

2.5. Biologia Molecular

Nos últimos anos, o uso do material genético passou do nível citológico para o molecular (Griffiths, 2000). As tecnologias de análise molecular da variabilidade do DNA permitem determinar pontos de referência nos cromossomos, tecnicamente denominados “marcadores moleculares” (Borba, 2002).

2.5.1. Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

A técnica de PCR é extremamente sensível, ou seja, a falta ou excesso de algum componente da reação pode diminuir a fidelidade do teste. A padronização das

condições de amplificação é imprescindível para se obter resultados satisfatórios da técnica, uma vez que há variação entre diferentes ambientes (de laboratório para laboratório), da temperatura ambiente, do tipo de armazenamento e variações de perfis térmicos que se diferem entre os aparelhos termocicladores (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Os resultados obtidos são iguais, porém é necessário padronizar a técnica de acordo com cada laboratório.

Ensaio de sexagem molecular em aves são geralmente baseados no gene CHD, localizado no cromossomo W, único para fêmeas. Seu homólogo, CHD-Z, é encontrado no cromossomo Z e ocorre em ambos os sexos (ZW em fêmeas e ZZ em machos). A identificação do gênero baseada na PCR emprega um único *set* de *primers* P₂/P₈ (CHD-universal) que amplifica fragmentos homólogos de ambos os genes e incorpora *introns* que geralmente variam de tamanho entre as espécies (Ramos *et al.*, 2009; Chang *ET AL.*, 2008; Anciães & Nassif Del Lama, 2002; Griffiths, 2000; Fridolfsson & Ellegren, 2000; Griffiths *et al.*, 1998; 1996). O método para identificar o sexo em aves baseado neste para de *primers* foi descrito por Griffiths *et al.* (1996; 1998).

2.6. Tipos de Criatórios

A crescente degradação do meio ambiente vem causando redução e fragmentação de inúmeros ecossistemas. Como consequência direta destes fatos, muitas espécies animais e vegetais caminham para a extinção (Almeida, 2003).

O Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2007), através das portarias 117 e 118 de 15 de outubro de 1997, que normatizam a criação de espécies nativas e comercialização de animais vivos, abatidos, partes e produtos da fauna nativa, propiciou que, nos últimos anos, houvesse um incremento na criação legal desses animais. Estas portarias visam colaborar com a conservação da fauna brasileira e combater o comércio clandestino de animais silvestres, pois acredita-se que o comércio ilegal deverá reduzir-se progressivamente à medida que exista a possibilidade de aquisição de animais de maneira lícita e confiável, com documentação correta, saúde, origem controlada e adaptado ao cativeiro (Allgayer & Cziulik, 2007). Esta medida foi um grande passo rumo à regulamentação do mercado ilegal de animais silvestres. Marcando uma mudança radical na política do IBAMA que agora apóia e estimula a criação comercial de animais silvestres, sendo considerada, por muitos, a medida

mais eficiente para a redução do tráfico ilegal de animais. Há também a Resolução Conama nº 394, 06 de novembro de 2007, onde o IBAMA disponibiliza para consulta pública a lista das espécies da fauna silvestre nativa que serão permitidas para a criação e comercialização (IBAMA, 2007). Uma vez que, observou-se que estimular a produção legal em cativeiro visando suprir a demanda no mercado, reduz o impacto nas populações silvestres na natureza, muitas vezes ameaçadas de extinção (<http://www.animalworld.com.br/aves/ver.php?id=198>).

Ao pensar em criação assistida de aves, a primeira pergunta para a qual se deve encontrar uma resposta é: qual o objetivo do manejo em cativeiro? Criacionista (criação da avifauna), exposição (visitação pública – parques e zoológicos), educação ambiental, conservacionista ou pesquisa? (Allgayer & Cziulik, 2007). Todos os tipos de criatórios devem ser credenciados ao IBAMA (IBAMA, 2007).

2.6.1. Criatório Comercial

O espaço físico para a criação deve ter ventilação, tamanho de gaiolas e luminosidade adequados a cada espécie. O conhecimento nutricional também é essencial, pois é um fator que determina o sucesso do manejo em cativeiro,

possibilitando a sanidade e a reprodução das aves (Allgayer & Cziulik, 2007).

A formação de casais compatíveis não é uma tarefa fácil, podendo-se tentar com o isolamento de casais em gaiolas e com a observação do comportamento dos possíveis casais. As aves só se reproduzirão se o manejo atender às suas necessidades etológicas básicas (Allgayer & Cziulik, 2007).

Em criatórios que possuem poucos casais denominados matrizes há necessidade de se tomar o cuidado com a formação de futuros pares, pois a endogamia pode provocar a diminuição da heterozigose e conseqüentemente, aumento da homozigose que pode ocorrer tanto para genes dominantes quanto para os recessivos, sendo necessário que haja a seleção se estes são preferidos em relação aos heterozigotos. Ao reduzir a heterozigose favorece-se a ocorrência de genes recessivos indesejáveis ou de efeitos deletérios. A perda da variabilidade genética em populações pequenas tende a ocorrer aleatoriamente, causando mudanças nas frequências alélicas e genotípicas, fixando alguns alelos e eliminando outros, processo este denominado deriva genética. A maioria desses genes está relacionada com a baixa fertilidade e os níveis de reprodução,

aumento da mortalidade, aumento de doenças devido à diminuição da resistência e do vigor híbrido e do valor genético adaptativo (Pereira, 2004; Falconer, 1970). Portanto, a manutenção das características genéticas é de suma importância.

2.6.2. Criatório Conservacionista

Em um contexto conservacionista e de leis nacionais e internacionais, a decisão máxima sobre a disposição de animais confiscados do tráfico de animais silvestres deve atingir três pontos: 1) maximizar o valor conservacionista dos animais sem qualquer prejuízo a sua saúde, comportamento e características genéticas, ao *status* de conservação de populações das espécies selvagens ou de cativeiro ou à biota nativa; 2) não incentivar o comércio ilegal ou irregular e 3) fornecer solução clara para o problema, mesmo que esta envolva a manutenção de animais em cativeiro, a sua reintrodução à natureza ou mesmo o emprego da eutanásia (caso a ave tenha excedência populacional em cativeiro). Um dos grandes problemas da triagem de animais apreendidos e provenientes de cativeiro é a dificuldade de se destinar indivíduos diante de um quadro caótico de superpopulação nas instituições que os recebem. Outro problema frequente é o alto custo de manutenção de cativeiros e gastos com funcionários, alimentação e

medicamentos e, por outro lado, há a carência de recursos para o combate ao tráfico e para bons programas de conservação (Efe *et al.*, 2006).

2.6.3. Criatório Expositivo

Para trabalhar com exposições de aves para a visitação pública (parques e zoológicos) faz-se necessário determinar qual a maneira de tornar um setor de aves atraente ao público. Dentre as opções, podem ser estruturados recintos representativos dos diferentes ecossistemas para as espécies nativas ou exóticas, em um ambiente que seja agradável tanto para as aves quanto para o público visitante. Placas informativas são, muitas vezes, despercebidas, mas é fundamental sua presença, explicando o trabalho ou o objetivo (Allgayer & Cziulik, 2007).

Outros objetivos de parques e zoológicos é o compromisso de cumprir funções básicas como pesquisa, educação ambiental, conservação de espécies ameaçadas de extinção, educação e lazer (IBAMA, 2007; <http://www.zoologico.sp.gov.br/ensinopesquisa/cursoprofessores2006.htm>, acesso em 21/fev./2008).

Sendo assim, faz-se necessária a sexagem de aves em todo e qualquer criatório a fim de se identificar facilmente os indivíduos em um

recinto, para a não ocorrência de formação de casais ao acaso que não apresentam dimorfismo sexual ou baseados nas características comportamentais, podendo causar, no caso de fêmeas, postura de ovos inférteis e, conseqüentemente, o não crescimento da população (Grando, 2002).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Coleta e Composição das Amostras

Para o presente estudo, foram colhidas amostras, de maneira aleatória, de sangue e de penas de criatórios comerciais - Criatório JC e Criatório Lua de Mel, do criatório conservacionista - ZooAmbiental e do CETAS (Centro de Triagem de Animais Silvestres) do IBAMA todos localizados no estado de Minas Gerais.

Foram coletadas 10 amostras de cada espécie estudada (*Calliphlox amethystina* – Estrelinha; *Passerina brissonii* – Azulão; *Saltator similis* – Trinca-ferro-verdadeiro; *Oryzoborus maximiliani* – Bicudo; *Sicalis flaveola* – Canário-da-terra; *Zonotrichia capensis* – Tico-tico; *Carduelis magellanicus* – Pintassilgo; *Leninus canária* – Canário-belga; *Gnorimopsar chopi* – Pássaro-preto; *Campylorhynchus turdinus* – Catatau; *Turdus* sp. – Sabiá; *Ramphastos toco* – Tucano; *Amazona aestiva* – Papagaio-verdadeiro e *Aratinga* sp. – Periquito-Maritaca). Com exceção de uma

espécie (*Poroaria dominicana* – Galo da campina) da qual amostras foram colhidas de apenas quatro indivíduos.

As amostras foram obtidas por meio do corte da unha obtendo-se o sangue que foi coletado em papel filtro (Marca *Whatman*, 55mm) e armazenado individualmente em envelope a temperatura ambiente. Também foram coletadas penas que ainda continham ou não sangue no bulbo, novas ou velhas que foram armazenadas em envelope ou em um tubo contendo álcool absoluto ou 70% sendo conservado em refrigerador a 4 °C.

Todas as amostras foram armazenadas individualmente e devidamente identificadas.

As coletas foram realizadas em aves de todas as idades (entre um mês de vida à idade senil), por todo o ano, no período da manhã até, no máximo, às 15 horas. Desta forma não houve mudança nas condições de temperatura do ambiente dos criatórios, não influenciando no bem estar dos animais.

3.2. Extração e armazenamento do DNA

Foram feitas extrações de DNA utilizando-se três diferentes técnicas, uma através do sangue pelo método fenol/clorofórmio com digestão pela enzima proteinase K (Sambrook *et al.*, 1989), outra utilizando o

bulbo de pena pelo método de extração alcalina simples rápida (Rudbek & Dissing, 1998) e uma terceira pela tecnologia (modificada) de cartões FTA da *Whatman* (www.biomerica-inc.com), aqui denominada PFE, por ter sido utilizado papel filtro estéril (Marca *Whatman*, 55mm) e não os cartões FTA.

Cada amostra extraída pelos dois primeiros métodos foi armazenada em microtubo e aliqüotada em geladeira, 4 °C, enquanto que pelo terceiro, as amostras foram armazenadas em microtubos em temperatura ambiente.

Todos os testes foram realizados no Laboratório de Genética do Departamento de Zootecnia da Escola de Veterinária da UFMG.

3.3. *Primers*

Foi utilizado um par de *primers* alelo-específicos, P₂ e P₈, por amplificarem especificamente os alelos relacionados com os cromossomos sexuais e por serem universais. O *primer* P₂ amplifica o gene CHD-W enquanto o P₈ o CHD-Z (Griffiths *et al.*, 1996; 1998).

3.4. **Amplificação pela PCR, eletroforese e análise do gel**

Houve a necessidade de adaptar a amplificação descrita por Griffiths *et al.* (1998) às condições do Laboratório de Genética da Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais. As modificações feitas em relação ao protocolo original foram em relação à concentração de cada dNTP (de 200 µM para 100 µM de cada um dos dNTPs), da U/amostra da enzima *GoTaq*® DNApolimerase/Promega (de 0,15 U para 1,0 U/amostra) e a temperatura padrão de anelamento (de 48 °C para 49 °C).

Para realizar a sexagem foi preciso conhecer estes marcadores na espécie a ser sexada, ou seja, definir o padrão de macho e fêmea para cada espécie (Miyaki *et al.*, 1998). A PCR foi realizada com o estudo do material genético de um casal que já possuía filhotes ou cujos sexos já tinham sido determinados.

O mix para PCR foi preparado em câmara de fluxo laminar a fim de se evitar qualquer tipo de contaminação com DNA exógeno.

O sistema e o programa de amplificação da PCR foram realizados conforme protocolos modificados de Griffiths *et al.* (1998). A reação de PCR para amplificação foi realizada no termociclador do Modelo *MJ*

Research, PTC-100TM, contendo um volume final de 10 µl, sendo: 8,0 µl do mix de reação, sendo este: tampão 5X *Green GoTaqTM* (Promega), 100 µM de cada um dos dNTPs (Promega), 5 µM de cada um dos *primers* P₂ e P₈ e 1,0 U de *GoTaq®* DNA polimerase (Promega). Os outros 2,0 µl foram de DNA extraído ou pelo método do fenol-clorofórmio e/ou pela técnica alcalina simples rápida ou, ainda, 0,5 mm de papel filtro estéril quando a extração foi feita pelo método de PFE.

As amostras amplificadas foram submetidas à corrida eletroforética em gel de poliacrilamida (PAGE) 10%, a 200 V e 25 mA, por cerca de quatro horas. Foi utilizado, no gel, como padrão de peso molecular o marcador o *pGEM®* (Promega), com um volume de 2 µl. Esta corrida teve como finalidade a comparação dos tamanhos de pb (pares de base) das espécies estudadas. Para a visualização dos alelos, usou-se o método de coloração com Nitrato de Prata.

Após a coloração, os géis foram analisados com auxílio de transiluminador de luz branca e fotografados em câmera digital Canon (modelo: EOF 40D).

3.5. Análise Estatística

Foi realizada estatística descritiva para descrição das respostas avaliadas. Para o estudo da relação machos e fêmeas foi feito o estudo de dispersão de frequência (Sampaio, 2007).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Extrações de DNA

As penas utilizadas para a extração de DNA podem ser novas ou velhas, contendo ou não sangue no bulbo das mesmas. Os resultados obtidos das três diferentes extrações foram satisfatórios, não apresentando alteração após corrida eletroforética. Porém, de acordo com criadores, a amostra de sangue pelo corte da unha das aves é mais prática e rápida, além de causar menos *stress* ao animal quando se compara à coleta de penas. A coleta de penas só é feita quando os animais ainda não haviam completado um mês de vida.

As três técnicas de extração foram eficazes, porém foi observado que após um mês da extração de DNA do bulbo de pena, o mesmo degrada totalmente, quando armazenado sob refrigeração, a 4 °C. Enquanto que a extração do sangue, pelo método de Sambrook *et al.* (1989) é mais resistente. No período de três a oito meses após a extração não foi observada diferença nos resultados obtidos. Coelho (2001)

relatou que o DNA não degrada em um período de três a nove meses, porém armazenado a -20 °C.

Utilizando a técnica de PFE, o DNA não degradou em um período mínimo de 12 meses, sendo este resultado semelhante ao descrito no site www.biomerica-inc.com. As modificações realizadas foram a utilização de um papel filtro estéril (Marca *Whatman*, 55mm), que não continha solução que lisa as membranas citoplasmáticas, desnaturando proteínas, como ocorre com os cartões FTA (FTA *micro card*). O reagente para extração de DNA foi o SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*). Este método foi escolhido por ser mais simples e de baixo custo em relação aos demais, não deixando a desejar em nenhum resultado obtido.

O tempo de conservação do DNA é de grande valia ao banco de dados do laboratório, uma vez que estes materiais serão os controles para a determinação do sexo das diferentes espécies de aves. Como

também para a realização de contra-prova quando assim for necessário.

Há uma diferença de tempo de extração que varia de 40 minutos a três dias para que se possa realizar a PCR (Tabela 02). Como não houve diferença na amplificação dos alelos, a melhor opção de amostras de sangue, seria a técnica do PFE (Marca *Whatman*, 55mm), pois é rápida. Apesar de extração de penas ser mais breve em relação à técnica de PFE, os criadores preferem coletar sangue da unha a penas das aves.

Outro aspecto relevante que se deve levar em consideração, além do tempo de extração do DNA, é a quantidade de reagentes que são gastos, aumentando, assim o custo da técnica. Gasta-se apenas um reagente para a extração do PFE, dois para a extração de penas e oito para a técnica do fenol/clorofórmio, sendo que um destes reagentes é a enzima proteinase K que possui maior custo (Tabela 02).

Tabela 02: Tempo de extração, número de reagentes gastos e tempo de conservação do DNA das três técnicas de extração de DNA, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.

Técnica de extração	Tempo da extração (hora)	Nº de reagentes	Tempo conservação DNA (mês)
P	0,66	02	01
S _{PFE}	2	01	12 (mínimo)
S _S	48 a 72	08*	03 a 08

P: pena/extração alcalina simples rápida (Rudbek & Dissing, 1998); S_{PFE}: sangue/extração modificada de cartões FTA (www.biomerica-inc.com), utilizando papel filtro estéril e SDS; S_S: sangue/extração fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989); * um dos reagentes é a enzima proteinase K que tem alto custo.

4.2. Caracterização

Segundo Griffiths *et al.* (1996; 1998) o par de *primers* é bem específico pois possuem alta proporção de citosina e guanidina (C e G), permitindo, assim, a detecção precisa

dos alelos sexuais, Tabela 03. Outro item que a Tabela 03 demonstra é a eficácia dos três diferentes métodos de extração de DNA de sangue ou de pena.

Tabela 03: Método de sexagem utilizando par de *primers* alelo-específico P₂ /P₈ em 15 diferentes espécies de aves e amostras (sangue e/ou pena), em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.

Ordem	Família	Espécie	Nome Popular	F	M	Total	Extração
Caprimulgiphorme	Trochilidae	<i>Calliphlox amethystina</i>	Estrelinha	2	8	10	S _{PFE}
Passeriphorme	Cardinalidae	<i>Passerina brissonii</i>	Azulão	5	5	10	S _S /P
		<i>Saltator similis</i>	Trinca-ferro-verdadeiro	5	5	10	S _S /S _{PFE}
		<i>Oryzoborus maximiliani</i>	Bicudo	7	3	10	S _{PFE} /P
	Emberizidae	<i>Sicalis flaveola</i>	Canário-da-terra	4	6	10	S _{PFE}
		<i>Paroaria dominicana</i>	Galo da campina	3	1	4	S _{PFE}
		<i>Zonotrichia capensis</i>	Tico-tico	7	3	10	S _{PFE}
		<i>Carduelis magellanicus</i>	Pintassilgo	6	4	10	S _S /S _{PFE}
	Frigillidae	<i>Leninus canaria</i>	Canário-belga	5	5	10	S _{PFE}
		Icteridae	<i>Gnorimopsar chopi</i>	Pássaro-preto	4	6	10
	Piciphorme	Troglodytidae	<i>Campylorhynchus turdinus</i>	Catatau	4	6	10
Turdidae			<i>Turdus sp.</i>	Sabiá	5	5	10
Ramphastidae		<i>Ramphastos toco</i>	Tucano	8	2	10	S _S /S _{PFE} /P
Psittaciphorme	Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	4	6	10	S _S /S _{PFE} /P
		<i>Aratinga sp.</i>	Periquito/Maritaca	4	6	10	S _S /S _{PFE} /P
Total				73	71	144	---

F/Fêmea; M/Macho; S_S: sangue/extração com fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989); S_{PFE}: sangue/extração modificada de cartões FTA (www.bioamerica-inc.com), utilizando papel filtro estéril e SDS; P: pena/extração alcalina rápida (Rudbek & Dissing, 1998).

Diferentemente do que foi concluído por Griffiths *et al.* (1998), a temperatura de anelamento não variou entre as espécies, pois a mesma foi de 49 °C para todas as estudadas.

Anciães & Del Lama (2002), Griffiths *et al.* (1996; 1998) e Miyaki *et al.* (1998) testaram dois métodos moleculares de identificação sexual. Um pela extensão dos *introns* dos

genes CHD-Z e CHD-W, sendo este o método utilizado neste trabalho. Um segundo, onde os produtos de PCR dos genes sexuais são discriminados pelo uso de enzima de restrição. Porém, este método não foi feito no presente estudo por apresentar a mesma eficiência do primeiro. Consequentemente, o tempo de análise e o custo foram reduzidos.

Ramos *et al.* (2009), Chang *et al.* (2008), Faria *et al.* (2007), Sacchi *et al.* (2004), Ito *et al.* (2003), Anciães & Del Lama (2002), Cortés *et al.* (1999) e Miyaki *et al.* (1998), dentre outros autores, obtiveram resultados semelhantes e eficazes para a determinação do sexo em várias espécies de aves, utilizando a metodologia (modificada) de Griffiths *et al.* (1998). Dentre as espécies sexadas por estes autores estão: Águia (*Spilornis cheela hoya*, *Circus aeruginosus*), Fura-barreira (*Hylocryotus rectirostris*), Falconiformes (*Falco* sp., *Spizaetus nipalensis*, *Aquila chrysaetos*, *Accipiter gentilis*, dentre outros), Tangarazinho (*Ilicura militaris*), Psitacídeos (*Amazona* sp., *Aratinga* sp.), Tucano (*Ramphastos* sp.), Pavão (*Pavo* sp.), Cisne (*Cygnus olor*), Coruja-do-mato (*Strix aluco*) e Gaivota-da-asa-escura (*Larus fuscus*).

Entretanto, não foram encontrados relatos sobre sexagem molecular de algumas aves descritas neste trabalho, como Estrelinha (*Calliphlox amethystina*), Azulão (*Passerina brissonii*), Trinca-ferro-verdadeiro (*Saltator*

similis), Bicudo (*Oryzoborus maximiliani*), Canário-da-terra (*Sicalis flaveola*), Galo-da-campina (*Paroaria dominicana*), Tico-tico (*Zonotrichia capensis*), Pintassilgo (*Carduelis magellanicus*), Canário-belga (*Leninus canaria*), Pássaro-preto (*Gnorimopsar chopi*), Catatau (*Campylorhynchus turdinus*) e Sabiá (*Turdus* sp.).

Como é demonstrado na Tabela 04 e nas Figuras 02 a 06, há diferença no tamanho dos pares de base (pb) entre as espécies. A Tabela 04 mostra os valores aproximados dos diferentes tamanhos de pb demonstrando a relação espécie-específica dos cromossomos sexuais das aves estudadas.

Tabela 04: Diferentes tamanhos de pb dos cromossomos sexuais (Z e W) das espécies, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.

Espécie	pb - Z*	pb - W*
Estrelinha	246	254
Pintassilgo	354	396
Catatau	396	390
Tucano	373	396
Papagaio	396	412
Maritaca	396	412
Azulão	378	396
Trinca-ferro-verdadeiro	392	412
Bicudo	385	390
Canário-da-terra	362	385
Galo-da-campina	373	385
Tico-tico	373	396
Canário belga	344	390
Pássaro-preto	385	390
Sabiá	390	404
* Valores aproximados		246-396 254-412

A interpretação das amostras amplificadas foi feita de acordo com o genótipo de fêmeas que são heterogaméticas, apresentando dois alelos no gel e machos que são homogaméticos, apresentando apenas um alelo, Figuras 02 a 06.

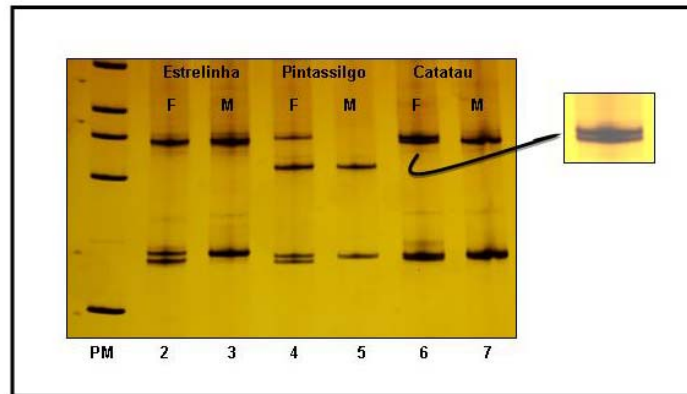


Figura 02: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular pGEM®. Canaletas: 2/F e 3/M - Estrelinha, 4/F e 5/M - Pintassilgo, 6/F e 7/M - Catatau. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Catatau.

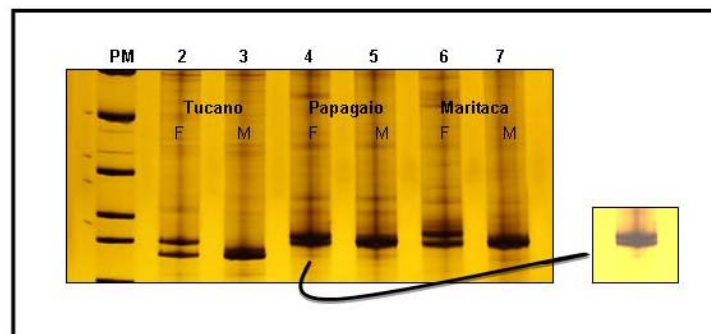


Figura 03: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular pGEM®. Canaletas: 2/F e 3/M - Tucano, 4/F e 5/M - Papagaio, 6/F e 7/M - Maritaca. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Papagaio.

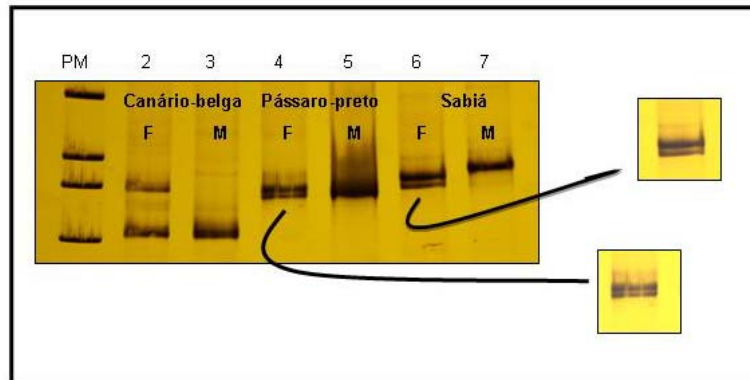


Figura 04: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular *pGEM*®. Canaletas: 2/F e 3/M - Canário-belga, 4/F e 5/M - Pássaro-preto, 6/F e 7/M - Sabiá. Nos detalhes, melhor visualização dos dois alelos das fêmeas de Pássaro-preto e Sabiá.

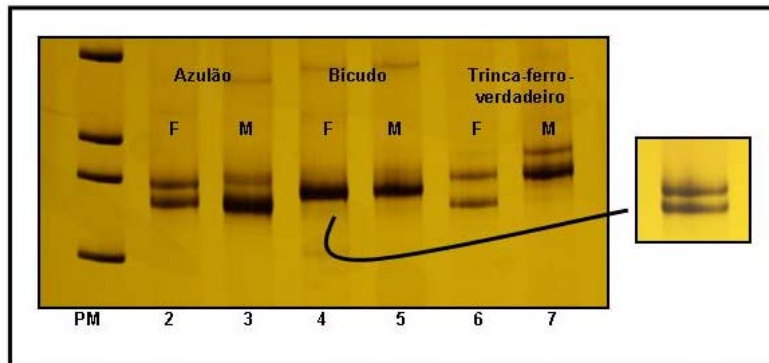


Figura 05: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular *pGEM*®. Canaletas: 2/F e 3/M - Azulão, 4/F e 5/M - Bicudo, 6/F e 7/M - Trinca-ferro-verdadeiro. No detalhe, melhor visualização dos dois alelos da fêmea de Bicudo.

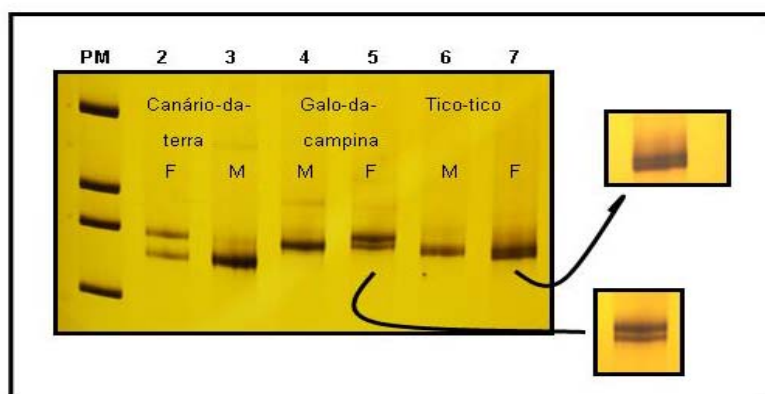


Figura 06: Gel de poliacrilamida 10%, corado com nitrato de prata, em ensaio realizado na EV/UFMG em 2008. PM: padrão de Peso Molecular *pGEM*®. Canaletas: 2/F e 3/M - Canário-da-terra, 4/F e 5/M - Galo-da-campina, 6/F e 7/M - Tico-tico. Nos detalhes, melhor visualização dos dois alelos das fêmeas de Galo-da-campina e Tico-tico.

4.3. Estudo de associação

Foi feito estudo de dispersão de frequência utilizando o Teste de Qui-quadrado (χ^2) para avaliação da proporção de machos e fêmeas no universo amostral (Sampaio, 2007). Foram testadas 144 aves, sendo esperados

72 indivíduos de cada sexo, o que ocorreu, pois foram observados 73 fêmeas (50,69%) e 71 machos (49,31%). Portanto, esta situação propõe desvios meramente casuais, Tabela 05.

Tabela 05: Tabela de contingência de Segregação Genética para os sexos 1:1, em ensaio realizado na EV/UFMG, em 2007 e 2008.

Sexo	fo/fr(%)
M	71 (49,31)
F	73 (50,69)
Total	144 (100)

M - macho; **F** - fêmea; **fo e fr:** frequência absoluta e relativa, respectivamente. **Teste χ^2 ($p>0,05$)**

Estes resultados confirmam o que também pode estar ocorrendo com a população de todos os criatórios comerciais e conservacionistas, assim como na natureza em si.

5. CONCLUSÕES

A determinação do sexo das aves pelo método da PCR empregando *primers* do gene CHD mostrou-se acurada, segura e de baixo custo para as 15 espécies analisadas.

Tanto o sangue como a pena são amostras viáveis para a extração de DNA, podendo a pena ser nova ou velha, com o bulbo vascularizado ou não.

O DNA extraído da pena degrada em um período de cerca de um mês após a extração, enquanto que o extraído do sangue dura em média de oito meses, ambos mantidos a 4 °C.

O DNA extraído do sangue colhido em papel filtro estéril dura em média 12 meses, sendo, portanto, a maneira mais eficaz para se determinar molecularmente o sexo das aves.

6. REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

ALMEIDA, M. A. Influências dos sistemas artificial e natural de incubação e criação de emas (*Rhea americana*) nos índices produtivos de criadouros do estado de São Paulo. [Influences of artificial and natural incubation and breeding management

systems on the productive traits of São Paulo state greater rhea (*Rhea americana*) breeders.] 2003. 75f. Dissertação (Mestrado em Reprodução Animal) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

ALLGAYER, M.C & CZIULIK, M.. Reprodução de psitacídeos em cativeiro [*Captive psittacines breeding*]. **Rev. Bras. Reprod. Anim.**, Belo Horizonte, v.31, n.3, p.344-350, jul./set.2007. Disponível em www.cbpa.org.br

ANCIÃES, M. & NASSIF DEL LAMA, S. Sex identification in pin-tailed manakins (*Ilicura militaris*: Pipridae) using the polymerase chain reaction and its application to behavioral studies. **Ornitologia Neotropical**, 13: 159-165, 2002.

ANSARI, H., TAKAGI, N., SASAKI, M. Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. **Cytogenetical Cell Genetics**, 47, 185-188, 1988.

ARTONI, R.F.; VICARI, M.R.; BERTOLLO, L.A.C. Citogenética de peixes neotropicais: método, resultados e perspectivas. **Biological and Health Sciences**, 6 (1): 43-60, 2000.

BORBA, V.S. Marcadores moleculares: Classificação e Aplicações, 2002, extraído <http://www.ufv.br/dbg/trab2002/GMOL/GMOL005.htm>, em 24/agosto/2006.

CAMPOS, Z. Temperatura pode definir sexo dos jacarés. 04/08/2005. Site: http://www.ecoinforme.com.br/main_noticia.asp?id_noticia=525&id_tipo_noticia=25&id_secao=88, acessado em 21/04/2008.

CHANG, H.W; CHOU, T. C.; GU, D. L. *et al.* An improved PCR method for gender identification of eagles **Mol. And Cel. Probes.**, v.22, p.184-188, 2008.

CHARLESWORTH, D. & CHARLESWORTH, B. Sex chromosomes: Evolution of the weird and wonderful. **Current Biology**, vol.15, n.4, 129-131, 2005.

COELHO, E.G.A. Análise quali-quantitativa de técnicas para extração de DNA de sangue, sêmen e pêlos. 2001. 37p., Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Veterinária.

CORTÉS, O., BARROSO, A. & DUNNER, S. Avian sexing: na optimized protocol using polymerase chain reaction-single-

- strand conformation polymorphism. **J. Vet. Diagn. Invest.**, 11:297-299 (1999).
- DUAN, W. and FUERST P. A. Isolation of a Sex-Linked DNA Sequence in Cranes. **The American Genetic Association** 92:392–397, 2001.
- EFE, M. A., MARTINS-FERREIRA, C., OLMOS, F. *et al.* Diretrizes da Sociedade Brasileira de Ornitologia para destinação de aves silvestres provenientes do tráfico e cativeiro. **Ver. Bras. Ornitologia**, 14 (1), 67-72, Março, 2006.
- ELLEGREN, H. Evolution of the avian Sex chromosomes and their role in Sex determination. **Tree**: vol. 15, nº 5, May, 2000.
- ELLEGREN, H. & SHELDON, B.C. New tools for Sex identification and the study of Sex allocation in birds. **Trends Ecol. Evol.**: v. 12, nº 7, July, 1997.
- EZAZ *et al.* Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems – Review. Research School of Biological Sciences, The Australian National University, Canberra, ACT 2601, Australia. **Current Biology** 16, R736–R743, September 5, 2006.
- FALCONER, D. S. Introducción a la genética cuantitativa. Mexico: Compañía Editorial Continental, 1970. 430p.
- FARIA, L. P., CARRARA, L. A. & RODRIGUES, M. Sexual size dimorphism in henna-capped foliage-gleaner *Hylocryptus rectirostris* (Wied) (Aves, Furnariidae). **Rev. Bras. Zoologia**, v.24, n.1, Curitiba, mar.2007.
- FERREIRA, M.E. & GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Genética. 3 ed. Brasília: **EMBRAPA-CENARGEM**, 1998, pp.220.
- FRIDOLFSSON, A.K & ELLEGREN, H. Molecular evolution of the avian *CDHI* genes on the Z and W Sex chromosomes. **Genetics** 155: 1903-1912 (August, 2000).
- GRANDO, A.P. *Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual*. 2002. 107f., Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) – Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, São Carlos.
- GRIFFITHS, R.; DAAN, S.; DUKSTRA, C. Sex identification in birds using two genes. **Proc. R. Soc. Lond. Ser. B.** 263: 1251-1256 (1996).

- GRIFFITHS, R., DOUBLE, M. C., ORR, K. *et al.* A DNA test to sex most birds – Short communication. Blackwell Science Ltd, **Molecular Ecology**, 7,1071-1075 (1998).
- GRIFFITHS, R. Sex Identification in Birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, vol 9, nº1 (January), 2000: pp. 14-26.
- HUTT, F.B. Genética Avícola. Salvat Editores, S.A.. Barcelona-Madrid-Buenos-Aires-México-Caracas-Bogotá-Rio de Janeiro. 1ªed., 1958, 652p.
- ITO, H., SUDO-YAMAJI, A., ABE, M. *et al.* Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. **Zoological Science**, 20: 339-344 (2003).
- MIYAKI *et al.* Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. **Zoo. Biology**, 17:415-423 (1998).
- MODI, W.S. & CREWS, D. Sex chromosomes and sex determination in reptiles. **Genomes and Evolution**. 15:660-665, 2005.
- OHNO, S. Sex chromosomes and Sex linked genes. Berlin, Germany, Springer Verlag, 1967.
- PEREIRA, J.C.C. Melhoramento genético aplicado à produção animal: aplicação da Biotecnologia Reprodutiva no Melhoramento Animal. 4.ed. Belo Horizonte: FEPMVZ Editora, 2004, p.195-221.
- PICCININI. A reprodução de tartarugas já está comprometida. Um Nordeste mais quente II. 05/06/2007. Site: <http://www.jc.uol.com.br/jornal/noticias/ler.php?codigo=23457&canal=303&dt=&indice=1>, acessado em 21/04/2008.
- POUGH, J.F.HARVEY. A vida dos vertebrados. 2ed., São Paulo: Atheneu Editora, 798p., 1999.
- RAMOS, P. S.; BASTOS, E.; MANNAN, R. W. *et al.* Polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism applied to sex identification of *Accipiter cooperii*. **Mol. and Cel. Probes.**, doi:101016/jmcp.2008.12.02; 2009, p.1-4.
- RASO, T.F. & WERTHER, K. Sexagem cirúrgica em aves silvestres. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.56, n.2, p.187-192, 2004.
- RICHNER, A.C. A technique for performing laparotomy on small birds. **Condor**, 73: 376-379, 1989 citado por GRIFFITHS, 2000.

- RUDBEK, L, DISSING, J. Rapid simple alkaline extraction of human genomic DNA from whole blood, buccal epithelial cells, semen and forensic stains for PCR. **Biotechniques**, **25**:588-592, 1998.
- SACCHI, P., SOGLIA, D., MAIONE, S. *et al.* A non invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). **Mol. And Cel. Probes**, v.18(1), p.193-196, june 2004.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: CSHL Press, 1989.
- SAMPAIO, I.B.M. Estatística aplicada à experimentação animal. 3ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2007, 264p.
- SCHARTL, M. Sex chromosome evolution in non-mammalian vertebrates. **Genomes and Evolution**. 14:634-641, 2004.
- SHELDON, B.C. Sex allocation: At the female's whim. **Curret Biology**, 9, n.13:R487-R489, 1999.
- SUZUKI, D.T., GRIFFITHS, A. J.F., MILLER, J. H. *et al.* Introdução à Genética. 7ed., Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2002, 633p.
- TAGAKI, N., ITOH, M., SASAKI, M. Chromosome studies in four species of ratitae (Aves). **Chromosoma**, 36, 281-291, 1972.
- ULLER, T., PEN, I., WAPSTRA E. *et al.* The evolution of sex ratios and sex-determining systems. **TRENDS in Ecology and Evolution Elsevier Ltd.** Vol.22, No.6, 2007.
- Sites:**
<http://www.animalworld.com.br/aves/ver.php?id=198>, acesso em 15/11/2007. Machado P.A.R.. Criação Comercial de Pássaros. **Revista TTA**, Ano 2 n°08.
<http://www.biomerica-inc.com>, acessado em dezembro de 2007.
<http://www.mackenzie.com.br/universidade/exatas/ejbio/sexagem.html>, acesso em julho de 2007.
 IBAMA – www.ibama.gov.br, acesso em agosto de 2007.
<http://www.zoologico.sp.gov.br/ensinopesquisa/cursoprofessores2006.htm>, acesso em 21/fev./2008