



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

**Caracterização da região MHM em aves: padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas**

**Bruna Cristina Jeronimo**

**Botucatu, SP**

**- 2016 -**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“Júlio de Mesquita Filho”**

**Instituto de Biociências de Botucatu**

**Caracterização da região MHM em aves: padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas**

**Mestranda: Bruna Cristina Jeronimo**

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Adriane Pinto Wasko**

**Co-orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Claudia Aparecida Rainho**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para a obtenção do título de Mestre.**

**Botucatu, SP**

**- 2016 –**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Jerônimo, Bruna Cristina.

Caracterização da região MHM em aves : padrões  
diferenciais de metilação em machos e fêmeas / Bruna  
Cristina Jerônimo. - Botucatu, 2016

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de  
Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Claudia Aparecida Rainho

Capes: 20204000

1. Ave domestica - Sexagem. 2. Metilação de DNA.  
3. Genética molecular. 4. Cromossomos. 5. Reação em cadeia  
da polimerase.

Palavras-chave: Aves; MHM; Metilação; Sexagem molecular.

“Se você encontrar um caminho sem obstáculos, ele provavelmente não te levará a lugar algum.”

Frank Clark

## **Dedicatória**

À minha avó, que mesmo não estando mais fisicamente entre nós, está presente em todos os momentos. Obrigada pelo amor que tinha por mim, por me ensinar a ser forte e a correr atrás dos meus sonhos. Vó, este trabalho também é seu!

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à minha família, especialmente minha mãe, meu maior presente. Pai, Carol, Tia Cris, Brú, Jú e Fer, obrigada por me acompanharem em todas as minhas conquistas, sempre me incentivando a perseguir meus objetivos. Sou muito grata por fazer parte desta família.

Ao meu afilhado, Pedro, que mesmo sem falar uma única palavra consegue me acalmar e renovar minhas esperanças. Obrigada por trazer leveza e alegria à minha vida, gordinho.

À minha orientadora Adriane, um exemplo de pessoa e profissional. Agradeço pelos ensinamentos, pela paciência, por me encorajar a enfrentar todos os desafios. Não tenho palavras para agradecer tudo que fez por mim e por este trabalho. Serei eternamente grata.

À minha co-orientadora, Profa. Dra. Claudia Rainho, por toda a contribuição que trouxe a este trabalho, pelos ensinamentos e pelas muitas horas de trabalho no laboratório.

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Genética, por toda colaboração ao longo do meu mestrado.

Aos atuais e ex-integrantes do Laboratório de Genética Animal: Val, Talita, Bianca e Flávia, pelo aprendizado, pelo estímulo e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Genômica Integrativa: Érica, Diego, Aduino, Natália, Bruno, Taka e Rafael, agradeço imensamente por tudo que me ensinaram nestes dois anos e também pelos momentos de descontração.

À Talita, a irmã que a pós-graduação me trouxe, pelas experiências compartilhadas, por aguentar minha crises, por sempre me incentivar a acreditar em mim, enfim, por estar sempre disposta a me ajudar em tudo.

Ao meu amigo, Diego, pelas conversas, bom senso, pelo suporte emocional e profissional.

Ao Prof. Dr. Carlos Roberto Teixeira e a todos os veterinários do CEMPAS (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens), por toda ajuda na coleta das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao Acácio, proprietário do sítio Bela Vista, ao PC, proprietário da Chácara Estância Lambari, e a Maria, moradora da Chácara Santa Inês, por terem doado seu tempo e por permitirem a coleta de amostras biológicas de seus animais.

Ao João Henrique Maia por toda a ajuda com as análises computacionais.

Ao Zé do Departamento de Morfologia e ao Robson do Biotério Central da UNESP pela ajuda nas coletas de amostras biológicas.

Ao Prof. Dr. Cesar Martins por ceder a infra-estrutura de seu laboratório para a realização de diversas análises presentes neste trabalho.

À Prof Dra. Daisy Salvadori e aos amigos do laboratório Omics, por tudo que me ensinaram no período do meu treinamento técnico e também pela parceria durante o mestrado.

À minha amiga Juliana Padovani, por todos os conselhos, palavras de incentivo e pelos muitos géis de poliacrilamida.

Aos pesquisadores Prof. Dr. Jaes Joseph Roper e Dr. Felipe Shibuya da Universidade Federal do Paraná e à Profa. Dra. Cristina Miyaki do Laboratório de Genética e Evolução Molecular de Aves (LGEMA) da Universidade de São Paulo, pelas amostras cedidas.

Ao CNPq pelo suporte financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Considero-me uma pessoa de sorte, pois estou sempre rodeada de pessoas maravilhosas. Desta maneira, agradeço imensamente a todos que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho; não seria possível realizá-lo sozinha.

## RESUMO

Em contraste ao padrão de cromossomos sexuais de mamíferos (XX/XY), as aves apresentam um sistema de determinação sexual em que os machos representam o sexo homogamético (ZZ) e as fêmeas constituem o sexo heterogamético (ZW). Adicionalmente, embora mamíferos apresentem um mecanismo de compensação de dose, a inativação completa de um dos cromossomos Z não é observada em machos de aves e, portanto, estes possuem um maior nível de expressão de vários genes presentes nesse cromossomo. Apesar disso, um mecanismo ainda não completamente esclarecido de compensação de dose parcial em aves resulta em expressão equivalente entre os sexos para alguns genes do cromossomo Z. A região MHM (*Male Hypermethylated*), localizada no cromossomo Z de Galliformes, está associada a um padrão de hipermetilação em machos e hipometilação em fêmeas, levando à síntese de um RNA não-codificante longo (lncRNA) somente em fêmeas. A presença deste lncRNA é associada ao aumento da expressão de genes próximos à região MHM em fêmeas, o que parece resultar em uma compensação de dose local entre os sexos. Dado que, até o momento, segmentos MHM foram somente identificados em Galliformes e Anseriformes, o presente estudo visou isolar e caracterizar esta região em Galliformes (galinha doméstica, codorna europeia, peru) e também em Struthioniformes (avestruz), Strigiformes (coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-da-igreja, coruja-buraqueira), Piciformes (tucanuçu), Psittaciformes (arara-azul-grande) e Apodiformes (beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura, beija-flor-preto). Indivíduos adultos e embriões com seis dias de desenvolvimento foram sexados com base em caracteres morfológicos e moleculares - por meio de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) para amplificação de uma região intrônica dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, seguida de eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida, análise SSCP e análise automatizada de fragmentos de DNA. Métodos de sexagem molecular mostraram-se adequados para identificação de machos e fêmeas de galinha doméstica, codorna europeia, peru, tucanuçu, arara-azul-grande, coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-buraqueira, beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura e beija-flor-preto. Entretanto, as técnicas moleculares utilizadas não permitiram identificar diferenças entre machos e fêmeas de avestruz. Análises *in silico* da região MHM de galinha doméstica mostraram que esta se encontra localizada no braço curto do cromossomo Z, sendo constituída por 260Kb (chrZ:27,000,000-27,260,000) e alto conteúdo de CG. Esta região é delimitada por duas LINES (*Long Interspersed Nuclear Elements*) e possui múltiplos elementos repetitivos da classe LTR (*Long Terminal Repeat*), especialmente os pertencentes à família EVRL (*Endogenous Retrovirus*), denominados GGLTR5A. Com base em sua composição genômica, a região MHM de galinha doméstica foi subdividida em sub-regiões - denominadas de 1



(chrZ:27,176,712-27,260,282), 2 (chrZ:27,132,044-27,174,901), 3a (chrZ:27,094,512-27,132,043), 4 (chrZ:27,036,950-27,094,511) e 3b (chrZ:27,000,000-27,036,949) - que apresentam-se compostas por três unidades de repetições diferentes (denominadas de *repeats 1, 2* e *3*) flanqueadas por LTRs específicas. PCR multiplex em amostras de galinha doméstica levou à amplificação de dois fragmentos de DNA de aproximadamente 240 e 750 pares de bases, sendo o fragmento maior correspondente à *repeat 1* da região MHM. Assim como observado para galinha doméstica, também foram gerados, via PCR, dois fragmentos de DNA de diferentes tamanhos associados à região MHM para as outras espécies de aves estudadas. Um maior nível de identidade (80-97%) foi observado entre a região MHM de galinha doméstica e as sequências nucleotídicas obtidas de codorna européia, peru e avestruz, o que demonstra que a presença de segmentos MHM não se restringe ao genoma de Galliformes e Anseriformes. Ensaios de digestão enzimática em DNA genômico de galinha doméstica, codorna européia e peru, por meio do uso de endonucleases de restrição sensíveis à metilação e dependentes de metilação (*MspI*, *HpaII* e *McrBC*), seguidos de amplificação de um fragmento de DNA associado à sub-região 1 MHM, evidenciaram padrões diferenciais de metilação dessa região entre os sexos, sendo hipometilada em fêmeas e hipermetilada em machos. Tais padrões diferenciais mostram-se potencialmente adequados para aplicação em testes de sexagem molecular em espécies de aves.

*Palavras-chave:* aves, MHM, metilação, sexagem molecular.

## ABSTRACT

In contrast to the sexual chromosomes pattern found in mammals (XX/XY), birds present a sex determination system in which males represent the homogametic sex (ZZ) and females correspond to the heterogametic sex (ZW). Furthermore, although mammals present a dosage compensation mechanism, the complete inactivation of one Z chromosome is not observed in male birds and, therefore, they have a higher expression level of several genes that are found in this chromosome. Despite this, a mechanism of partial dosage compensation that was not clearly explained so far for birds results on an equivalent expression between sexes for some of the genes found at the Z chromosome. The MHM region (*Male Hypermethylated*), localized at the Z chromosome of Galliformes, is associated to a hypermethylation pattern in males and hypomethylation in females, which leads to the synthesis of a long non-coding RNA (lncRNA) only in females. The presence of this lncRNA is associated with a higher expression of genes that are located near to the MHM region in females, which seems to result in a local dosage compensation between sexes. As MHM segments were so far identified only in Galliformes and Anseriformes, the present study aimed to isolate and characterize this region on Galliformes (chicken, European quail, turkey) and also on Struthioniformes (ostrich), Strigiformes (striped owl, tropical screech-owl, barn owl, burrowing owl), Piciformes (toco toucan), Psittaciformes (hyacinth macaw), and Apodiformes (versicolored emerald, swallow-tailed hummingbird, black jacobin). Adult individuals and six-day embryos were sexed based on morphological and molecular characters - throughout PCR (*Polymerase Chain Reaction*) to amplify an intronic region of the *CHDI-Z* e *CHDI-W* genes, followed by agarose and polyacrylamide electrophoresis, SSCP analysis and automated fragment DNA analysis. Molecular sexing methodologies were useful for the identification of males and females of chicken, European quail, turkey, toco toucan, hyacinth macaw, striped owl, tropical screech-owl, burrowing owl, versicolored emerald, swallow-tailed hummingbird, and black jacobin. However, the applied techniques were not effective to identify differences between male and female ostriches. *In silico* analyses of the chicken MHM region showed that it is localized at the short arm of the Z chromosome and is constituted by 260Kb (chrZ:27,000,000-27,260,000) and a high CG content. This region is delimited by two LINES (*Long Interspersed Nuclear Elements*) and presents multiple repetitive elements of the LTR (*Long Terminal Repeat*) class, especially those of the EVRL (*Endogenous Retrovirus*) family, denominated GGLTR5A. Based on its genomic composition, the MHM region was subdivided into sub regions – denominated as 1 (chrZ:27,176,712-27,260,282), 2 (chrZ:27,132,044-27,174,901), 3a (chrZ:27,094,512-27,132,043), 4 (chrZ:27,036,950-27,094,511), and 3b (chrZ:27,000,000-27,036,949) - that are

composed by three different repeat units (denominated as *repeats 1, 2 e 3*) flanked by specific LTRs. Multiplex PCR on chicken samples resulted in the amplification of two different size DNA fragments of around 240 and 750 base pairs, and the larger fragment corresponds to the *repeat 1* of the MHM region. As observed for chicken, two different DNA fragments associated to the MHM region were also generated, by PCR, for the other studied species. A higher identity index (80-97%) was recognized between the chicken MHM region and the obtained nucleotide sequences of European quail, turkey and ostrich, which evidences that the presence of MHM segments is not restricted to the Galliformes and Anseriformes genomes. Enzymatic digestion assays in genomic DNA samples of chicken, European quail and turkey, through the use of methylation sensitive and methylation dependent restriction endonucleases (*MspI*, *HpaII* e *McrBC*), followed by the amplification of a DNA fragment associated to the sub region 1 MHM, showed differential methylation patterns between sexes - hypomethylated in females and hypermethylated in males. These differential patterns are potentially applicable for molecular sexing tests in bird species.

*Key words:* birds, MHM, methylation, molecular sexing.

## SUMÁRIO

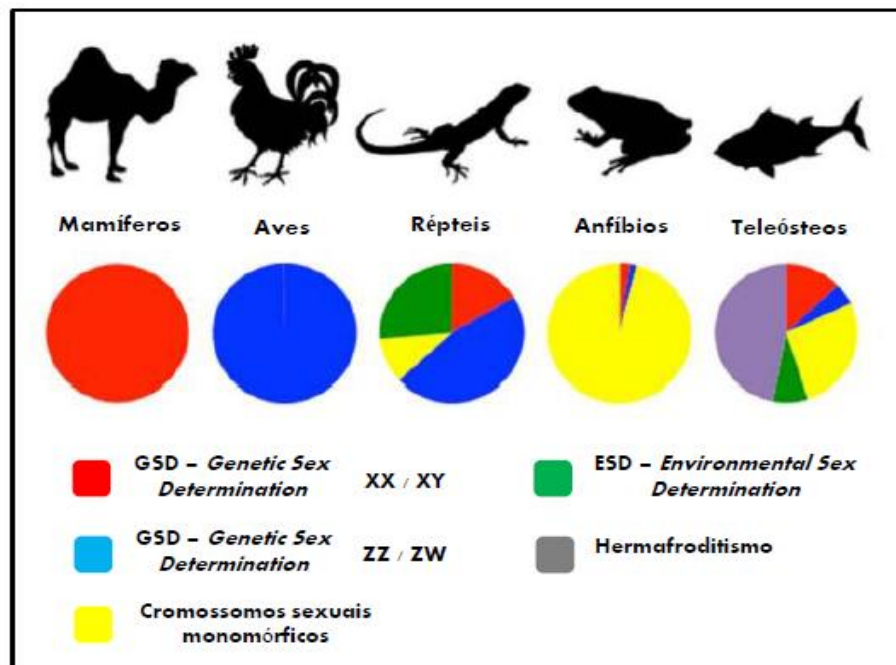
1. Introdução.....	1
1.1. Determinação e diferenciação sexual em aves.....	1
1.2. Identificação de machos e fêmeas de aves sem dimorfismo sexual aparente.....	4
1.3. Fatores epigenéticos associados à região MHM ( <i>Male Hypermethylated</i> ).....	6
2. Objetivos.....	10
2.1. Objetivo Geral.....	10
2.2. Objetivos Específicos.....	10
3. Materiais e Métodos.....	11
3.1. Materiais.....	11
3.1.1. Espécies estudadas.....	11
3.1.2. Amostras biológicas.....	14
3.2. Métodos.....	15
3.2.1. Extração de DNA.....	15
3.2.2. Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA.....	16
3.2.3. Identificação do sexo das aves.....	16
3.2.3.1. Caracteres morfológicos externos.....	16
3.2.3.2. Sexagem molecular por PCR ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> ).....	17
3.2.3.3. Análise automatizada de fragmentos de DNA.....	19
3.2.4. PCR para amplificação da região MHM ( <i>Male Hypermethylated</i> ).....	20
3.2.5. Sequenciamento nucleotídico.....	20
3.2.6. Análise das sequências nucleotídicas.....	20
3.2.7. Análise <i>in silico</i> da sequência e organização genômica da região MHM.....	21
3.2.8. Análise da metilação da região MHM por MSRE-PCR ( <i>Methylation Sensitive Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction</i> ) e MDRE-PCR ( <i>Methylation Dependent Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction</i> ).....	22

4. Resultados e Discussão.....	25
4.1. Amostragem biológica.....	25
4.2. Sexagem das aves.....	26
4.3. Caracterização <i>in silico</i> da região MHM de galinha doméstica.....	37
4.4. Identificação e caracterização da região MHM em outras espécies de aves.....	49
5. Conclusões.....	60
6. Referências Bibliográficas.....	61
APÊNDICE I .....	73
APÊNDICE II.....	76

## 1. Introdução

### 1.1. Determinação e diferenciação sexual em aves

A caracterização de genes envolvidos na determinação e diferenciação sexual representa uma área de estudo extremamente vasta, já que uma das características dos mecanismos de determinação do sexo é sua falta de conservação entre diferentes grupos taxonômicos. A determinação e diferenciação sexual em eucariotos envolvem diferentes mecanismos e tanto fatores genéticos como ambientais podem fazer parte destes processos. Entre os vertebrados, a determinação do sexo tem sido atribuída a um ou mais genes (*Genetic Sex Determination - GSD*), que podem estar localizados em cromossomos autossômicos, sexuais ou em ambos, e/ou a fatores externos (*Environmental Sex Determination - ESD*), como a temperatura ambiental e pH (e.g. Manolakou *et al.*, 2006; Bachtrog *et al.*, 2014) (Figura 1). A diferenciação entre machos e fêmeas refere-se não somente ao processo pelo qual gônadas indiferenciadas transformam-se em ovários ou testículos como também ao desenvolvimento dos genitais e ao estabelecimento de diferenças cerebrais sexo-específicas (Valenzuela & Lance, 2004; Penman & Piferrer, 2008).



**Figura 1:** Diversidade de mecanismos de determinação sexual em vertebrados (adaptado de Bachtrog *et al.*, 2014).

Embora tanto mamíferos quanto aves exibam determinação sexual genética baseada em cromossomos heteromórficos e com extensas regiões não recombinantes (Charlesworth & Mank, 2010; Gable & Zarkower, 2012; Smith & Sinclair, 2014), as aves apresentam um sistema de cromossomos sexuais, geralmente claramente distinguidos, em que os machos são homogaméticos (ZZ) e as fêmeas são heterogaméticas (ZW), em contraste ao padrão de cromossomos sexuais de mamíferos - XX para fêmeas e XY para machos. Dados de mapeamento genético comparativo demonstram que os cromossomos sexuais destes dois grupos de vertebrados evoluíram independentemente a partir de diferentes cromossomos autossômicos (Graves & Shetty, 2001).

As diferentes espécies de aves geralmente possuem um grande número de cromossomos ( $2n > 70$  na maioria das espécies), compreendendo pares de macrocromossomos e diversos microcromossomos (Griffin *et al.*, 2008). Os cromossomos sexuais classificam-se como macrocromossomos, embora o tamanho relativo do Z e do W varie grandemente entre as espécies (Takagi & Sasali, 1974). Em galinhas, o cromossomo Z, considerado o sexto maior do genoma e eucromático, possui um tamanho de aproximadamente 82.36Mb, tendo cerca de 1.140 genes identificados, enquanto o cromossomo W, menor e altamente heterocromático, apresenta somente 1,25Mb e poucos genes caracterizados (International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2011; NCBI Genome, 2015). Assim como em *Gallus gallus* (galinha doméstica), o cariótipo da maioria das espécies de aves inclui um cromossomo W consideravelmente menor que o cromossomo Z (Bloom, 1974; Rutkowska *et al.*, 2012), rico em arranjos de amplicons (Backstrom *et al.*, 2005) e repetições satélites (Saitoh *et al.*, 1991; Itoh & Mizuno, 2002). Por outro lado, esta diferença entre os cromossomos Z e W não se mostra tão evidente em outras aves, como as Ratitas - *Struthio camelus* (avestruz) apresenta os cromossomos W e Z praticamente do mesmo tamanho, diferindo apenas pela posição do centrômero (Solari, 1994). Os cromossomos sexuais de *Rhea americana* (ema), também muito similares em tamanho, distinguem-se apenas devido a uma pequena deleção no cromossomo Z (Nishida-Umehara *et al.*, 1999). Tais diferenças podem ter grandes implicações na organização, evolução e função dos cromossomos sexuais de vertebrados (Oliver & Parisi, 2004; Vallender & Lahn, 2004; Graves, 2006; Ellegren & Parsch, 2007).

Embora atualmente já se tenha conhecimento dos fatores associados à determinação sexual em mamíferos, este mecanismo permanece um enigma no grupo das aves. Tanto em mamíferos como em aves, a diferença no número de cópias dos cromossomos X ou Z resulta em uma maior dose de genes em um determinado sexo (Melamed & Arnold, 2007). No sistema sexual XX/XY de mamíferos, em que ocorre compensação de dose, um dos cromossomos X é inativado com o objetivo de igualar a quantidade de expressão gênica nos dois sexos (Straub & Becker, 2007;

Mank *et al.*, 2011). Entretanto, em aves, parece não ocorrer inativação completa de um dos cromossomos Z em machos. Em galinha doméstica, a expressão média de genes presentes no cromossomo Z é cerca de 30-40% maior em machos do que em fêmeas, mesmo antes da diferenciação gonadal (Itoh *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Morey & Avner, 2011). Apesar disso, um mecanismo ainda não completamente esclarecido de compensação de dose local resulta em expressão equivalente entre os sexos para alguns genes presentes no cromossomo Z (Smith, 2007; McQueen & Clinton, 2009; Itoh *et al.*, 2010).

Os papéis dos cromossomos sexuais Z e W na determinação e diferenciação sexual são ainda, em grande parte, desconhecidos e nenhum gene homólogo ao gene *SRY* (*Sex-determining region on the Y chromosome*) presente no cromossomo Y de mamíferos terianos (marsupiais e placentários) foi identificado em aves (Teranish *et al.*, 2001). Enquanto algumas evidências apontam para uma associação entre o cromossomo Z e mecanismos de compensação de dose de alguns genes (*Z Dosage Model*), outros dados apontam para a presença de genes associados ao desenvolvimento sexual feminino no cromossomo W (*W Domination Model*), assim como o gene *SRY* de mamíferos desencadeia a diferenciação dos testículos. Por outro lado, também existe a possibilidade da presença de uma dose única de um determinado gene no cromossomo Z ser importante para desencadear o desenvolvimento de fêmeas (Gubbay *et al.*, 1990; Sinclair *et al.*, 1990; Smith, 2007).

A teoria referente à dosagem de Z é fundamentada pela ação do gene *DMRT1* (*Doublesex and Mab-3-Related Transcription Factor 1*). Este gene, conservado entre os vertebrados, é fortemente expresso nas gônadas masculinas durante o período embrionário. Em aves, encontra-se presente no cromossomo Z e não apresenta nenhum gene ortólogo no cromossomo W (Raymond *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 2000; Shan *et al.*, 2000). Quando presente em dose dupla no genoma, favorece o desenvolvimento de gônadas masculinas (Zhao *et al.*, 2010). Smith *et al.* (2009), ao utilizarem um RNA de interferência (RNAi) para nocautear o gene *DMRT1* em embriões de galinha, verificaram uma redução da expressão da proteína *DMRT1*, o que levou à feminilização das gônadas em embriões geneticamente masculinos (ZZ).

Apesar destes dados, não se sabe ainda qual o exato mecanismo de determinação sexual das aves. Há, ainda, a possibilidade de que um ou mais genes ainda não identificados, ligados ao cromossomo W, possam ter um papel antagônico ao do gene *DMRT1* e ser o responsável pela determinação sexual em fêmeas (Teranish *et al.*, 2001). Estudos em galinhas triplóides ZZW evidenciam que tais animais se desenvolvem como intersexos, contendo tecidos ovariano e testicular, embora apresentem fenótipo externo feminino (Bonaminio & Fechheimer, 1993; Lin



*et al.*, 1995; Smith & Sinclair, 2004; Küpper *et al.*, 2012). Além disso, abordagens de *RNA-sequencing*, para análise do perfil de transcriptomas, revelaram que, pelo menos, 26 genes são transcricionalmente ativos no cromossomo W de galinha (Ayers *et al.*, 2013) e análises de sequências curtas identificaram ao menos 60 sequências específicas do cromossomo W (Chen *et al.*, 2012). Tais dados evidenciam que, até o momento, não é possível descartar um possível papel do cromossomo W na determinação sexual das aves.

O processo de diferenciação sexual em vertebrados pode também envolver, além de genes associados aos cromossomos sexuais, genes presentes nos cromossomos autossômicos. Diversos trabalhos envolvendo expressão gênica, silenciamento gênico, análises de promotores, hibridização *in situ* em tecidos e embriões, entre outros, têm discutido aspectos evolutivos e funcionais de diversos genes autossômicos candidatos (Morrish & Sinclair, 2002; Manolakou *et al.*, 2006; Ijiri *et al.*, 2008; Graves & Peichel, 2010). Adicionalmente, fatores epigenéticos podem também estar associados a mecanismos regulatórios de determinação sexual e de compensação de dose (Park & Kuroda, 2001; Smith & Sinclair, 2004; Nguyen & Disteché, 2006; Angelopoulou *et al.*, 2008; Yang *et al.*, 2010; Piferrer, 2013). A ampliação de tais análises poderá permitir uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na determinação e diferenciação sexual de aves.

## **1.2. Identificação de machos e fêmeas de aves sem dimorfismo sexual aparente**

A identificação do sexo de aves é importante em diversos estudos, sejam estes evolutivos, comportamentais ou conservacionistas (Griffiths & Tiwari, 1995; Double & Olsen, 1997; Komdeur *et al.*, 1997; Lens *et al.*, 1998). Espécies que apresentam dimorfismo sexual externo podem ter o sexo identificado por meio de comparação do peso e comprimento da cauda (Martin *et al.*, 2000), do padrão da plumagem (Baker *et al.*, 1999) ou mesmo do comportamento específico de machos e fêmeas (Jodice *et al.*, 2000). Por outro lado, aproximadamente 50% das aves não apresentam dimorfismo sexual aparente, mesmo em indivíduos adultos (Jensen *et al.*, 2003) e, nestes casos, a identificação de machos e fêmeas pode ser realizada por meio de análises de esteróides fecais, investigações cariotípicas ou métodos cirúrgicos. Entretanto, tais metodologias apresentam diversas desvantagens e podem levar a resultados insatisfatórios. Utilizada na análise de esteróides fecais, a razão entre estrógeno e testosterona não é totalmente fidedigna e, portanto, pode gerar resultados dúbios (Miyaki *et al.*, 1998). A análise de cromossomos em metáfase para distinção dos sexos, além de ser trabalhosa, pois depende geralmente de cultura celular, demandar grande tempo e nem sempre gerar resultados consistentes, não é adequada para espécies cujos

cromossomos sexuais sejam idênticos em tamanho e morfologia (Miyaki *et al.*, 1998; Griffiths & Phil, 2000). O exame de laparoscopia, embora possa ser utilizado em qualquer espécie de ave, é invasivo e envolve riscos cirúrgicos, incluindo a ruptura do saco aéreo e até a morte do animal. Além disso, este necessita de administração de anestésico, cuja determinação da relação entre a dose e o peso da ave nem sempre é adequada (Griffiths & Phil, 2000; Grando, 2002).

Como alternativa a tais metodologias de identificação de machos e fêmeas, a sexagem por meio de métodos moleculares, envolvendo a amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tem sido utilizada em diferentes espécies de aves (Griffiths & Tiwari, 1995; Miyaki *et al.*, 1998; Bertault *et al.*, 1999; Jarvi & Banko, 2000; Hornfeldt *et al.*, 2000; Duan & Fuerst, 2001; Ewen *et al.*, 2001; Russello & Amato, 2001; Wink *et al.*, 2002; Jensen *et al.*, 2003). Gerando resultados altamente confiáveis, este procedimento pode ser realizado com amostras de DNA em quantidades limitadas, o que permite a aplicação de metodologias não destrutivas e até mesmo não invasivas para obtenção de amostras biológicas, fato extremamente importante para evitar ou minimizar o estresse induzido pelo manuseamento dos animais e possíveis riscos a sua saúde (Jensen *et al.*, 2003).

Atualmente, um dos marcadores moleculares amplamente utilizados para sexagem de aves refere-se ao gene *CHD1* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) - o gene *CHD1-Z* é encontrado no cromossomo Z, ocorrendo, portanto, em ambos os sexos, enquanto o gene *CHD1-W* localiza-se no cromossomo W, presente somente nas fêmeas (Griffiths *et al.*, 1998). Embora não existam evidências de recombinação entre estes dois genes e nenhuma cópia autossômica tenha sido identificada, estes não estão diretamente relacionados com a determinação do sexo e com os processos de diferenciação de machos e fêmeas (Kahn *et al.*, 1998). A família de proteínas CHD é caracterizada pela presença de domínios cromo (*chromatin organization modifier*) que conseguem modular a expressão de genes por meio de modificações na estrutura da cromatina que resultam em alterações no acesso do aparato transcricional ao DNA molde (Strokes & Perry, 1995).

Na maioria das espécies de aves, o tamanho do gene *CHD1* é um pouco maior no cromossomo W do que no cromossomo Z, devido à presença de bases adicionais em uma região de íntron (Griffiths *et al.*, 1998). Assim, diferentes conjuntos de oligonucleotídeos foram desenvolvidos para serem utilizados em PCR para amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em um grande número de espécies de aves (Griffiths *et al.*, 1996; Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson & Ellegren, 1999). O conjunto de oligonucleotídeos mais comumente utilizado refere-se aos *primers* denominados P2 e P8 que se anelam a regiões conservadas de éxons dos

genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* e amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os dois genes, resultando na identificação de um único fragmento de DNA em machos (genótipo homozigoto) e de dois fragmentos distintos em fêmeas (genótipo heterozigoto) (Griffiths *et al.*, 1998).

Apesar do alto grau de confiabilidade da sexagem molecular por meio da amplificação de íntrons dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, falsos resultados podem ser obtidos devido a artefatos técnicos, dado que o produto de PCR do alelo W geralmente é maior do que o do alelo Z, o que pode acarretar em amplificação preferencial do fragmento de DNA de menor tamanho. Tal fato pode fazer com que fêmeas sejam erroneamente identificadas como machos (Robertson & Gemmell, 2006). Além disso, para algumas espécies de aves, como as das famílias Struthionidae e Rheidae (aves ratitas como avestruz e ema) não é possível realizar a identificação do sexo por meio deste protocolo de PCR que utiliza os *primers* P2 e P8, devido à pequena diferença de tamanho da variação intrônica *CHD1-Z* e *CHD1-W* (Ellegren, 1996; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Dawson *et al.*, 2001; Sacchi *et al.*, 2004; Huynen *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Embora o delineamento de novos conjuntos de *primers* (Ito *et al.*, 2003), a separação dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (Kahn *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 1999) e a aplicação de enzimas de restrição (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002) tenham sido realizadas visando a sexagem molecular das espécies destas famílias, ainda não foi possível a obtenção de resultados satisfatórios.

Uma metodologia alternativa de sexagem molecular, baseada em padrões diferenciais de metilação de uma região denominada MHM (*Male Hypermethylated*) foi aplicada em exemplares de galinha doméstica, evidenciando padrões sexo-específicos facilmente observáveis em gel de agarose (Caetano & Ramos, 2008). A caracterização desta região em outras aves poderá levar à padronização de novos testes de sexagem molecular, especialmente em espécies para as quais a metodologia mais tradicional, que utiliza *primers* em PCR para amplificação de íntrons dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, não é adequada.

### **1.3. Fatores epigenéticos associados à região MHM (*Male Hypermethylated*)**

Definida como o estudo de alterações herdadas mitótica e/ou meioticamente que não podem ser explicadas por mudanças na sequência do DNA (Russo *et al.*, 1996), a epigenética envolve mecanismos que regulam a expressão gênica, como metilação do DNA, modificações pós-traducionais em histonas e presença de RNAs não-codificantes (ncRNAs) tais como miRNAs (micro RNAs), snoRNAs (*small nucleolar RNAs*) e lncRNAs (*long non-coding RNAs*). Tais

mecanismos, que podem ser reversíveis (James & Renard, 2010), permitem que os organismos integrem informações genômicas e ambientais para modificar a atividade de seus genes para geração de fenótipos específicos (Brock & Fisher, 2005; Bird, 2007; Jirtle & Skinner, 2007; Turner, 2009).

Segundo Berger *et al.* (2009), existem três categorias de sinais que operam, sequencialmente, para o estabelecimento das modificações epigenéticas. A primeira categoria refere-se a um iniciador (denominado *epigenator*) recebido do ambiente celular, como sinais diferenciais, metabólitos ou variações de temperatura. A segunda categoria, chamada de iniciador epigenético, corresponde a um sinal de resposta na célula que estabelece um contexto na cromatina em um local específico, em resposta ao *epigenator*. Exemplos de iniciadores epigenéticos incluem proteínas de ligação ao DNA e RNAs não codificantes como o Xist (*X-inactive specific transcript*) que atua no silenciamento do cromossomo X de mamíferos (Heard, 2004; Chow *et al.*, 2005). O terceiro tipo de sinal (*epigenetic maintainer*) tem como função a manutenção do estado epigenético, ou seja, a perpetuação dos padrões epigenéticos na cromatina. Exemplos de mantenedores epigenéticos incluem metilação do DNA (em que um grupo metil CH<sub>3</sub> é adicionado no carbono 5 de uma deoxicitidina próxima a uma guanidina, ou seja, um dinucleotídeo CpG), modificações de histonas e variantes de histonas (Herman *et al.*, 2004; Berger *et al.*, 2009).

Um mecanismo epigenético, referente a diferenças de metilação em fêmeas e machos, associado a ilhas CpG, foi recentemente descrito em Galliformes. Este mecanismo inclui uma região repetitiva no braço curto do cromossomo Z, próxima ao gene *DMRT1* e composta por repetições de uma sequência de 2,2Kb, aparece hipometilada e transcrita somente no único cromossomo Z das fêmeas gerando, assim, um RNA não codificante longo (lncRNA). Por outro lado, foi sugerido que esta região é altamente metilada e reprimida em ambos cromossomos Z de machos e, assim, transcricionalmente silenciada. Devido a esta característica, esta região foi denominada de MHM (*Male Hypermethylated*) (Teranishi *et al.*, 2001). Em galinha doméstica, foi demonstrado que o *status* MHM estabelece-se durante o desenvolvimento inicial, logo após a fertilização, dependendo da ausência ou presença do cromossomo W (Teranishi *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2010) e que a presença de transcritos MHM está diretamente associada à diferenciação sexual gonadal (Roeszler *et al.*, 2012).

A região MHM parece representar um sítio específico de compensação gênica (Melamed & Arnold, 2007). Em galinhas, embora a maioria dos genes presentes nos cromossomos Z tenha maior grau de expressão em machos do que em fêmeas, alguns genes, como os localizados próximo ao loco MHM, mostram um grau local de compensação de dose entre os sexos (Melamed

& Arnold, 2007; Ellegren & Parsch, 2007; Itoh *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2008; Mank & Ellegren, 2009; Zhang *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2010). Em fêmeas, o lncRNA gerado a partir do MHM se acumula no núcleo, próximo ao sítio de transcrição deste loco (Teranishi *et al.*, 2001), onde também ocorrem elevados níveis de acetilação da histona 4 do resíduo 16 de lisina (H4K16Ac) (Bisoni *et al.*, 2005), levando a um aumento da expressão de genes que se localizam próximos a esta região (Melamed & Arnold, 2007). Tanto a presença de RNAs não codificantes como a acetilação têm sido associadas a mecanismos epigenéticos envolvidos em outros sistemas de compensação de dose (Bone *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2005). Além disso, Itoh *et al.* (2011) demonstraram a ocorrência de uma grande diferença na configuração da cromatina no loco MHM, sendo descompactada nas fêmeas e condensada nos machos.

Por outro lado, dado que o loco *DMRT1* encontra-se adjacente ao loco MHM, tem sido sugerido que o lncRNA codificado pela região MHM poderia se acumular neste local e agir como repressor da expressão do gene *DMRT1* em embriões de fêmeas de galinhas e, portanto, ter também um papel no processo de determinação sexual (Teranishi *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010). Segundo Caetano *et al.* (2014), MHM é expresso (*upregulated*) e *DMRT1* é desligado (*downregulated*) em fêmeas de galinhas no mesmo estágio de desenvolvimento e a expressão de MHM nas fêmeas pode ter uma ação semelhante ao ncRNA Xist de mamíferos. Produzidos por um gene presente no cromossomo X, os transcritos Xist acumulados agem como um mecanismo de compensação de dose por intermédio da inativação deste cromossomo associada à modificação de histonas e metilação do DNA (Heard, 2004; Chow *et al.*, 2005).

Embora ainda não se saiba exatamente se o loco MHM atua na determinação e/ou diferenciação sexual de aves, um estudo recente, utilizando análise de expressão mediada por retrovírus, investigou o papel potencial desta região no desenvolvimento embrionário de galinhas. Os resultados obtidos confirmaram que este é apenas expresso em diversos órgãos das fêmeas, principalmente nas gônadas. A não expressão de MHM resultou na hipertrofia dos tecidos onde deveria ser expresso (Roeszler *et al.*, 2012). Interessantemente, análises em frangos triplóides sugeriram que a hipermetilação do MHM em machos não é simplesmente determinada pelo número de cromossomos Z por genoma, mas parece ser influenciada pela ausência ou presença do cromossomo W, embora sua função seja ainda desconhecida (Teranish *et al.*, 2001).

Até recentemente, acreditava-se que a região MHM estivesse presente exclusivamente no genoma de Galliformes, dado que esta havia sido somente identificada em galinha doméstica (Teranishi *et al.*, 2001; Melamed & Arnold, 2007; Mank & Ellegren, 2009; Itoh *et al.* 2010), peru (Teranishi *et al.*, 2001, Itoh *et al.* 2010) e pavão (Teranishi *et al.*, 2001). Sequências de DNA

similares à MHM mostraram-se ausentes no passeriforme *Taeniopygia guttata* (mandarim) (Itoh *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), segunda espécie de ave a ter seu genoma completo sequenciado. Estas também não foram identificadas nos Passeriformes *Ficedula albicollis* (papa-mosca) (Uebbing *et al.*, 2013) e *Corvus corone* (gralha preta) (Wolf & Bryk, 2011), nos Struthioniformes *Dromaius novaehollandiae* (emu) e *Struthio camelus* (avestruz) (Wang *et al.*, 2014) e no Charadriiformes *Charadrius alexandrinus* (rolinha-da-praia) (Moghadam *et al.*, 2013). Entretanto, Wright *et al.* (2015) identificaram a presença da região MHM não somente em outros Galliformes (*Numida meleagris* - galinha d'angola, *Pavo cristatus* - pavão e *Phasianus colchicus* - faisão) como também em espécies da ordem Anseriformes (*Anas platyrhynchos* - pato-real e *Anser cygnoides* - ganso africano), ambas pertencentes à superordem Galloanserae.

Novas análises em espécies diversas de aves permitirão melhor inferir se a ocorrência de sequências MHM é mais ampla ou restrita a algumas ordens neste grupo de vertebrados. Além disso, será possível gerar informações adicionais acerca dos potenciais mecanismos de compensação de dose associados a esta região do genoma e confirmar se esta região configura-se como um mecanismo complexo de regulação epigenética, em que metilação, modificação de histonas e ncRNAs agem em conjunto na regulação gênica.

## **2. Objetivos**

### **2.1. Objetivo Geral**

O presente estudo teve como objetivo geral caracterizar a região MHM (*Male Hypermethylated*) em diferentes espécies de aves, com especial ênfase em Galliformes, visando gerar dados para melhor compreensão acerca de sua distribuição taxonômica e estrutura genômica.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- (1) Identificar a presença/ausência da região MHM em espécies de aves de diferentes ordens (Galliformes, Struthioniformes, Apodiformes, Psittaciformes, Piciformes e Strigiformes);
- (2) Caracterizar a região MHM quanto à sua sequência nucleotídica, organização genômica e padrões de metilação;
- (3) Avaliar a eficiência de diferentes metodologias de sexagem molecular em diversas espécies de aves e o potencial do uso de padrões diferenciais de metilação da região MHM para identificação de machos e fêmeas.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1. Materiais






##### 3.1.1. Espécies estudadas






Foram analisados 71 exemplares de aves pertencentes à ordem Galliformes, família Phasianidae - 42 exemplares de *Gallus gallus* (galinha doméstica), 23 exemplares de *Coturnix coturnix* (codorna européia) e 6 exemplares de *Meleagris gallopavo* (peru) (Tabela 1 e Apêndice I), com o objetivo de caracterizar a organização genômica da região MHM e verificar a ocorrência de padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas.




Adicionalmente, visando verificar a presença/ausência desta região em aves não Galliformes, também foram analisadas espécies de outras ordens, como Struthioniformes (3 exemplares de *Struthio camelus* - avestruz, Família Struthionidae), Strigiformes (3 exemplares de *Asio clamator* - coruja-orelhuda, 1 exemplar de *Megascops choliba* - corujinha-do-mato, e 1 exemplar de *Athene cunicularia* - coruja-buraqueira, pertencentes à Família Strigidae, e 1 exemplar de *Tyto furcata* - coruja-da-igreja, Família Tytonidae), Piciformes (4 exemplares de *Ramphastos toco* - tucanuçu, Família Rhamphastidae), Psittaciformes (4 exemplares de *Anodorhynchus hyacinthinus* - arara-azul-grande, Família Psittacidae) e Apodiformes (4 exemplares de *Amazilia versicolor* - beija-flor-da-banda-branca, 2 exemplares de *Eupetomena macroura* - beija-flor-tesoura e 2 exemplares de *Florisuga fusca* - beija-flor-preto, Família Trochilidae) (Tabela 1 e Apêndice I).



**Tabela 1.** Espécies utilizadas como material de estudo no presente trabalho. (Imagens obtidas do *website* The Internet IBC Bird Collection - <http://ibc.lynxeds.com>)

<b>Ordem</b>	<b>Família</b>	<b>Espécie e n°. de exemplares estudados</b>	<b>Nome Comum</b>	<b>Foto</b>
<b>Galliformes</b>	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> (42)	galinha doméstica	
<b>Galliformes</b>	Phasianidae	<i>Coturnix coturnix</i> (23)	codorna européia	
<b>Galliformes</b>	Phasianidae	<i>Meleagris gallopavo</i> (6)	peru	
<b>Struthioniformes</b>	Struthionidae	<i>Struthio camelus</i> (3)	avestruz	
<b>Strigiformes</b>	Strigidae	<i>Asio clamator</i> (3)	coruja-orelhuda	

<b>Strigiformes</b>	Strigidae	<i>Megascops choliba</i> (1)	corujinha-domato	
<b>Strigiformes</b>	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i> (1)	coruja-buraqueira	
<b>Strigiformes</b>	Tytonidae	<i>Tyto furcata</i> (1)	coruja-da-igreja	
<b>Piciformes</b>	Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i> (4)	tucanuçu	
<b>Psittaciformes</b>	Psittacidae	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (4)	arara-azul-grande	

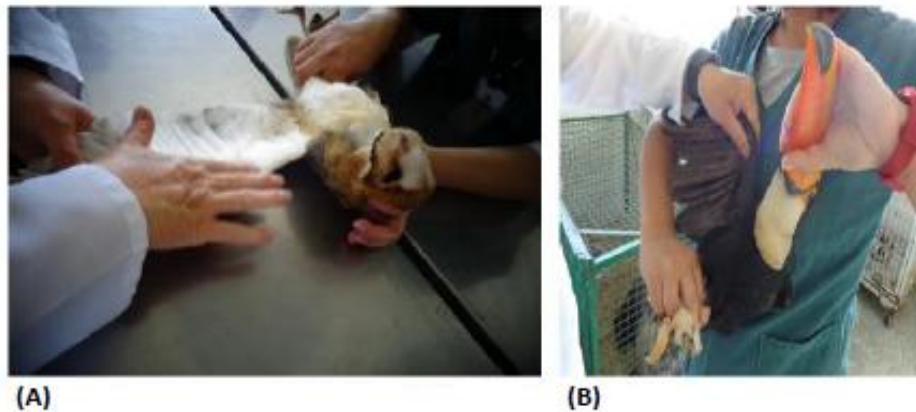
Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilia versicolor</i> (4)	beija-flor-da banda-branca	
Apodiformes	Trochilidae	<i>Eupetomena macroura</i> (2)	beija-flor- tesoura	
Apodiformes	Trochilidae	<i>Florisuga fusca</i> (2)	beija-flor- preto	

### 3.1.2. Amostras biológicas

As amostras biológicas das espécies pertencentes às ordens Strigiformes, Piciformes e Apodiformes foram obtidas do Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP) que recebe, por intermédio da Polícia Ambiental ou da própria população, animais geralmente associados ao tráfico ilegal ou a posses irregulares. Amostras de arara-azul-grande, provenientes da região de Carajás-PA, foram obtidas por intermédio de coletas do projeto de pesquisa “Conservação das araras-azuis (*Anodorhynchus hyacinthinus*) no mosaico de Carajás” realizado por meio de convênio entre UNESP-Fundibio (Fundação do Instituto de Biociências) e empresa Vale S.A. As amostras de galinha doméstica foram provenientes do Biotério Central e do Laboratório de Biologia e Toxicologia da Reprodução e do Desenvolvimento do Departamento de Morfologia, ambos localizados no Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu, SP). As amostras de codorna européia foram provenientes do Biotério do Departamento de Fisiologia do Instituto de

Biociências da UNESP (Botucatu, SP) e de criadores particulares. Amostras de peru e avestruz foram também obtidas de criadores particulares. As amostras da ordem Apodiformes foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Jaes Joseph Roper da Universidade Federal do Paraná.

Foram utilizadas amostras de penas e sangue de exemplares adultos, dado que a coleta desses materiais representa uma metodologia não destrutiva e implica em riscos reduzidos aos animais. Após contenção das aves, foram retiradas penas em crescimento (Figura 2) e/ou 0,2-0,5mL de sangue da veia braquial da asa, com seringa descartável. Adicionalmente, também foram utilizados embriões de galinha doméstica e codorna européia com 6 dias de desenvolvimento. Todo material coletado (penas, sangue e embriões) foi armazenado em tubos contendo etanol absoluto e mantido a  $-20^{\circ}\text{C}$  até seu processamento.



**Figura 2:** Coleta de penas de aves utilizadas no presente estudo, realizada no CEMPAS. (A) *Tyto furcata* (coruja-da-igreja) e (B) *Ramphastos toco* (tucanuçu).

## 3.2. Métodos

### 3.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA total seguiu o protocolo baseado na utilização de fenol-clorofórmio, como descrito por Bruford *et al.* (1998) com algumas modificações. Em um tubo de 1,5mL contendo o material biológico coletado, foram acrescentados 300 $\mu\text{L}$  de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30 $\mu\text{L}$  de Tris HCl 1M pH 7,5, 8 $\mu\text{L}$  de SDS 25% e 20 $\mu\text{L}$  de proteinase K (20mg/mL). O material foi incubado a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 horas ou a  $55^{\circ}\text{C}$  por 4 horas em banho-maria. Após a incubação, foram acrescentados aproximadamente 360 $\mu\text{L}$  de fenol : clorofórmio : álcool isoamílico (na proporção de 25:24:1). O material foi rapidamente misturado em *vortex* e

posteriormente centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm. A fase superior do material foi retirada com o auxílio de uma micropipeta e transferida para um novo tubo de 1,5mL. A esse novo tubo, foram adicionados aproximadamente 500µL de etanol absoluto e este foi invertido para precipitação do DNA. Posteriormente, o tubo foi centrifugado por 30 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi descartado, com auxílio de uma micropipeta. O precipitado obtido foi lavado com 500µL de etanol a 70%, centrifugado por 10 minutos a 12.000 rpm e mantido à temperatura ambiente até secar totalmente. O material obtido foi ressuspensão em água ultra pura estéril e armazenado em freezer a -20°C.

### **3.2.2. Análise da qualidade e quantidade das amostras de DNA**

A integridade e a quantidade das amostras de DNA obtidas foram analisadas em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µL/10mL) e visualizado em transiluminador, sob luz ultravioleta. Os géis obtidos foram fotografados com o uso do sistema de foto documentação Stratagene EagleSight (Stratagene). As amostras de DNA também foram avaliadas em espectrofotômetro (Nano Drop ND-1000 Spectrophotometer - Thermo Fisher Scientific) para quantificação do DNA e verificação de possíveis contaminações por proteínas e/ou solventes orgânicos como álcool/fenol/clorofórmio, por meio da análise das razões de absorvância da luz na faixa de 260/280nm e 230/260nm, respectivamente.

### **3.2.3. Identificação do sexo das aves**

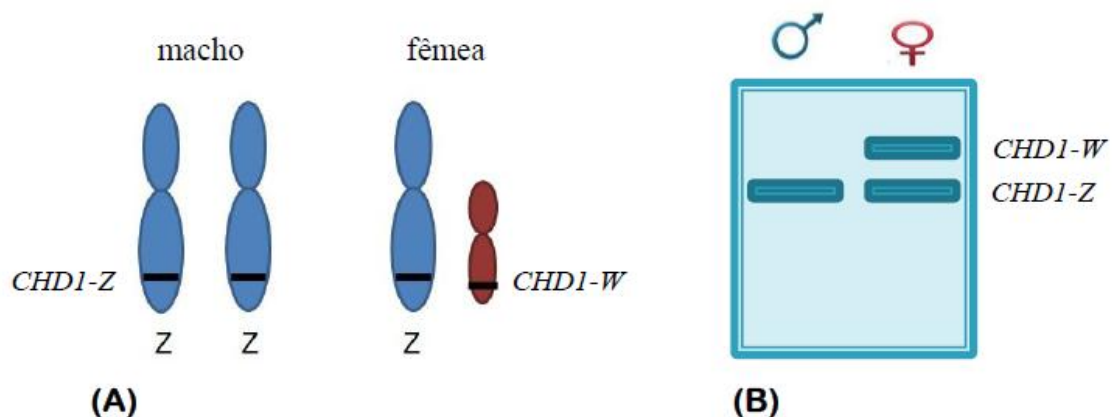
#### **3.2.3.1. Caracteres morfológicos externos**

Machos e fêmeas adultos e sexualmente maduros das espécies em estudo que apresentavam dimorfismo sexual aparente e inequívoco foram identificados por caracteres morfológicos externos - galinha doméstica (machos: crista e barbela de maior tamanho, esporões pontiagudos, penas da cauda mais compridas), codorna européia (machos: coloração relativamente uniforme das penas peitorais e presença de glândula cloacal; fêmeas: penas peitorais ligeiramente brancas com pintas pretas), peru (machos: maior tamanho, apêndice carnoso sob o bico, penas com zonas de iridescência vermelha, violeta, verde, cobreada, bronze e dourada; fêmeas: penas em tons de castanho e cinza) e avestruz (machos: tamanho e peso maiores, plumagem preta e ponta das asas brancas; fêmeas: plumagem de tonalidade cinza) (Eaton, 1992; Etches, 1996; Kinizetova, 1996; Deeming & Bubier, 1999).

### 3.2.3.2. Sexagem molecular por PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A identificação molecular do sexo de animais adultos foi realizada tanto para as espécies que apresentam dimorfismo sexual aparente consistente como para aquelas que não apresentam diferenças morfológicas ou que possuam diferenças muito discretas entre os sexos. Os embriões de galinha doméstica e codorna européia utilizados no presente estudo também foram molecularmente sexados via PCR.

As reações de amplificação foram realizadas utilizando os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'), descritos por Griffiths *et al.* (1998), que amplificam uma região do gene *CHD1-W* e do gene *CHD1-Z* em grande parte das espécies de aves. Diferenças de tamanho entre uma região intrônica específica desses genes resultam na amplificação esperada de dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos nas fêmeas e apenas um fragmento em machos (Griffiths *et al.*, 1998; Miyaki *et al.*, 1998) (Figura 3).



**Figura 3.** (A) Alelos do gene *CHD1* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) encontrados nos cromossomos Z e W de aves. (B) Padrão de bandas geradas pela amplificação dos fragmentos *CHD-Z* e *CHD-W* utilizando os primers P2 e P8 em PCR e visualizadas por meio de eletroforese em gel.

A amplificação de fragmentos de DNA foi realizada em um volume final de 10 $\mu$ L, sendo 6,1 $\mu$ L de água ultra pura estéril, 1,0 $\mu$ L de tampão (10x), 0,4 $\mu$ L de dNTPs (2mM), 0,4 $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,1 $\mu$ L de *Taq* DNA polimerase (5U/ $\mu$ L), 0,5 $\mu$ L do *primer* P2 (10 $\mu$ m), 0,5 $\mu$ L do *primer* P8 (10 $\mu$ m) e 1 $\mu$ L de DNA (100ng). As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por

30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 5 minutos.

As amostras de DNA foram amplificadas em réplicas (duas reações independentes) e foram utilizados um controle positivo (DNA de uma fêmea previamente analisada cujo resultado de sexagem molecular havia sido corroborado com análises morfológicas) e um controle negativo (reação de amplificação contendo todos os componentes da PCR exceto amostra de DNA, para monitorar qualquer possível contaminação).

Embora tenha sido utilizado um único par de oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de segmentos de DNA correspondentes aos genes *CHDI-Z* e *CHDI-W*, várias abordagens de eletroforese foram utilizadas para identificar as possíveis variações genéticas entre esses cromossomos. Tais abordagens referiram-se à visualização dos produtos de PCR após eletroforese em géis com diferentes resoluções, como em gel de agarose 2% (que permite uma resolução de fragmentos que apresentem 0,1 Kb de diferença), em gel de poliacrilamida 9% (que permite a distinção de fragmentos que apresentem diferenças de tamanho de cerca de 40 pares de bases) e por meio de análise SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*) (capaz de detectar diferenças de até um nucleotídeo que podem refletir em mudanças na conformação da fita simples de DNA) (Calladine *et al.*, 1991; Glavac & Dean, 1993; Walker & Rapley, 1999; Brown, 2002; Westermeier, 2005; Morinha *et al.*, 2011; Lee & Bahaman, 2010).

#### ● Eletroforese em gel de agarose

Os produtos de amplificação obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2%, corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µL/10mL) imerso em tampão TAE 1X (Tris-Ácido acético-EDTA). A corrida foi realizada a 80V, 300A, por 4 horas. Os tamanhos moleculares dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com um marcador de tamanho molecular conhecido. Os géis obtidos foram visualizados em transiluminador, sob luz ultravioleta, e fotografados com o uso do sistema de foto documentação Stratagene EagleSight (Stratagene).

#### ● Eletroforese em gel de poliacrilamida

Os produtos de amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida 9% corado com nitrato de Prata. Os géis foram elaborados com acrilamida/bisacrilamida 29:1, tampão tris-ácido bórico - EDTA, TBE 1x, 0,01% de TEMED e 0,1% de persulfato de amônio. A corrida foi realizada a 120V, por 1 hora e 30 minutos. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com um marcador de tamanho molecular conhecido. Os géis obtidos foram fotografados com o uso de câmera digital.

- **SSCP (*Single-Strand Conformation Polymorphism*)**

A análise SSCP foi realizada utilizando 8µL do produto de PCR obtido misturados com 8µL de tampão desnaturante (EDTA 10mM pH8,0; azul de bromofenol 0,025% e formamida 98%). Previamente à eletroforese, as amostras foram desnaturadas por 10 minutos a 95°C e imediatamente colocadas em gelo. Em seguida, as fitas desnaturadas foram carregadas em gel de poliacrilamida 9%, conforme descrito no item anterior. A corrida foi realizada a 120V, por aproximadamente 16 horas. Os tamanhos dos fragmentos amplificados foram estimados por meio de comparação com um marcador de tamanho molecular conhecido a partir de produtos de PCR não desnaturados obtidos de cada amostra pareada. Os géis obtidos foram fotografados com o uso de câmera digital.

### 3.2.3.3. Análise automatizada de fragmentos de DNA

A identificação do sexo dos animais em estudo foi também realizada pela definição do tamanho aproximado dos fragmentos gerados em PCR utilizando os *primers* P2 e P8, seguindo a técnica descrita por Schuelke (2000) que consiste em gerar produtos de PCR com *primers* marcados com fluorescência e sua posterior análise por eletroforese capilar. Foram utilizadas amostras de alguns exemplares previamente sexados por meio das demais metodologias empregadas, preferencialmente um macho e uma fêmea de cada uma das espécies estudadas (Apêndice I).

As reações de amplificação dos fragmentos de DNA foram realizadas em um volume final de 10µL, sendo 6,0µL de água ultra pura estéril, 1,0µL de tampão (10x), 1,0µL de dNTPs (2mM), 0,2µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,1µL do *primer* P2 + cauda M13 (CACGACGTTGTAAAACGACTCTGCATCGCTAAATCCTTT) (10µM), 0,3µL do *primer* P8 (10µM), 0,2µL da cauda M13 + fluorescência FAM (Applied Biosystem) e 1µL de DNA (100ng). As reações de amplificação foram realizadas pela desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 40 ciclos a 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 10 minutos.

Em seguida, 0,2µL do marcador molecular GeneScan™ - 500 Rox™ Standard (Applied Biosystem) (2fmol), uma alíquota de 1,0µL de cada amostra amplificada e 1,0µL de água ultra pura estéril foram misturados a Hi-Di™ Formamida (Applied Biosystems) para completar 10µL de solução. Os produtos diluídos foram fracionados após eletroforese capilar em sequenciador automático ABIPrism 3500 (Applied Biosystems). Os picos gerados nos eletroferogramas foram analisados com auxílio do programa computacional GeneMarker v.2.6.3 (Softgenetics).



### 3.2.4. PCR para amplificação da região MHM (*Male Hypermethylated*)

Foram utilizados dois conjuntos de *primers*, descritos por Caetano & Ramos (2008) com base na sequência nucleotídica de *Gallus gallus* (acesso GenBank AB046699), para amplificação de segmentos de DNA associados à região MHM (*Male Hypermethylated*). Segundo os autores, um par de *primers* (MHMs *Forward* - 5'-GCCAAACGCTGACAACCTCT-3' e MHMa *Reverse* - 5'-ATGTAGGTAGGTGGGAGGGA-3') amplifica um segmento de 242 pares de bases, mapeado fora de uma ilha CpG, enquanto o outro conjunto de *primers* (MHMs *Forward* - 5'-GCCAAACGCTGACAACCTCT-3' e MHM2a *Reverse* - 5'-TCAAACGCTACGATGGAAAT-3) amplifica um segmento de 756 pares de bases que inclui uma ilha CpG. Um controle negativo (reação de amplificação contendo todos os componentes da PCR exceto amostra de DNA) foi sempre utilizado para monitorar qualquer possível contaminação.

As amostras de DNA foram amplificadas em um volume final de 12,5µL contendo 1,25 µL de tampão 10x, 0,4µL de MgCl<sub>2</sub> (25mM), 0,4µL de dNTPs (2mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,5µL de cada *primer* (MHM2a e MHMs) (10µM), 1µL de DNA total em uma concentração de 100ng e 9,35µL de água ultra pura estéril. As reações de amplificação foram realizadas sob as seguintes condições: 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidos de 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 62°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, e por uma extensão final a 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µL/10mL) e visualizado em transiluminador, sob luz ultravioleta, e comparados a um marcador de tamanho molecular conhecido. Os géis obtidos foram fotografados com o uso do sistema de foto documentação Stratagene EagleSight (Stratagene).

### 3.2.5. Sequenciamento nucleotídico

Os produtos de PCR de maior tamanho, obtidos com o conjunto de *primers* MHMs e MHM2a, foram purificados com a enzima Exosap IT (Affymetrix) e posteriormente sequenciados em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems), utilizando o *kit Big Dye Terminator Cycle Sequencing v.3* (Applied Biosystems).

Cada reação de sequenciamento constou de 1,2µL de solução *Big Dye*, 1µL do *primer forward* ou *reverse* (10µM) e 5µL do produto de PCR (10 ng/µL). As reações foram colocadas em termociclador nas seguintes condições: desnaturação inicial a 96°C por 1 minuto, seguida de 25 ciclos a 96°C por 10 segundos, 50°C por 30 segundos e 60°C por 4 minutos, mais um passo adicional de extensão a 72°C por 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 4µL de água ultra

pura estéril e 16µL de etanol 95%. A solução foi misturada em agitador de tubos e mantida por 15 minutos à temperatura ambiente (~25°C). A amostra foi centrifugada por 30 minutos a 12.000 rpm e o sobrenadante foi retirado com auxílio de uma micropipeta. O precipitado obtido foi lavado com 200µL de etanol 70% e a solução foi misturada em um agitador de tubos e novamente centrifugada por 7 minutos a 12.000 rpm para nova retirada do sobrenadante, com auxílio de uma micropipeta. A amostra obtida foi seca a 90°C durante 2 minutos e os fragmentos de DNA obtidos foram posteriormente dissolvido em 1,6µL de formamida : dextran azul 25mM EDTA (5:1), ressuspenso e desnaturado por 2 minutos a 90°C em banho seco. 1,6µL de cada amostra foram carregadas no seqüenciador automático.

### **3.2.6. Análise das sequências nucleotídicas**

A visualização dos eletroferogramas das sequências nucleotídicas obtidas foi realizada por meio do programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd., 2007). As sequências individuais geradas foram posteriormente editadas e alinhadas com os programas computacionais Geneious 4.8.5 (Drummond, 2009) e Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw>). As sequências consenso foram determinadas manualmente. Para comparar as sequências obtidas com outras sequências depositadas no GenBank, incluindo sequências de *Gallus gallus* (access AB046699) (Teranish *et al.*, 2001), e confirmar a identidade das sequências geradas, foi utilizado o algoritmo BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) (Altschul *et al.* 1990), por meio do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), o qual relaciona sequências por meio de similaridade entre bases nitrogenadas. Futuramente, as sequências obtidas no presente trabalho serão também depositadas no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>).

### **3.2.7. Análise *in silico* da sequência e organização genômica da região MHM**

A sequência de bases nitrogenadas das repetições concatenadas associadas à região MHM - de aproximadamente 2,2Kb descrita por Teranishi *et al.* (2001) (Genbank *acession number* AB046699.1 e AB046698.1) e de aproximadamente 1,8Kb identificada como “*short MHM-related sequence*” (sMHM) por Itoh *et al.* (2011) - foram alinhadas na montagem do cromossomo Z (*Assembly* Chicken Nov 2011-CGSC *Gallus\_gallus-4.0/galGal4*) disponível no UCSC Genome Browser (UC Santa Cruz Genomics Institute, University of California Santa Cruz, <http://genome.ucsc.edu>). A ferramenta BLAT Search Genome, que localiza sequências de, pelo menos, 95% de identidade em 25 bases ou mais de comprimento e que gera índices baseados em

genomas completos, foi utilizada para delimitar a posição em nucleotídeos das repetições MHM no cromossomo Z e verificar a sobreposição de outras características na respectiva sequência genômica, incluindo a presença de elementos repetitivos interdispersos.

O programa computacional RepeatMasker Open-3.0 (<http://www.repeatmasker.org>, 1996-2010) foi utilizado para verificar o conteúdo de CG e a presença de ilhas CpG, segundo os critérios propostos por Gardiner-Garden & Frommer (1987), que definem como uma ilha CpG um fragmento de pelo menos 200 pares de bases, com conteúdo mínimo de CG de 50% e razão maior do que 0,6 entre os números de dinucleotídeos CpG observado e esperado com base no número de citosinas e guanina no segmento. Para a caracterização de ilhas CpG também foi utilizado o programa Methyl Primer Express v.1 (Applied Biosystems) (<http://www.appliedbiosystems.com>), seguindo o critério proposto por Takai & Jones (2002) que define como uma ilha CpG um fragmento de pelo menos 500 pares de bases, com conteúdo mínimo de CG de 55% e razão maior do que 0,65 entre os números de dinucleotídeos CpG observado e esperado com base no número de citosinas e guaninas no segmento.

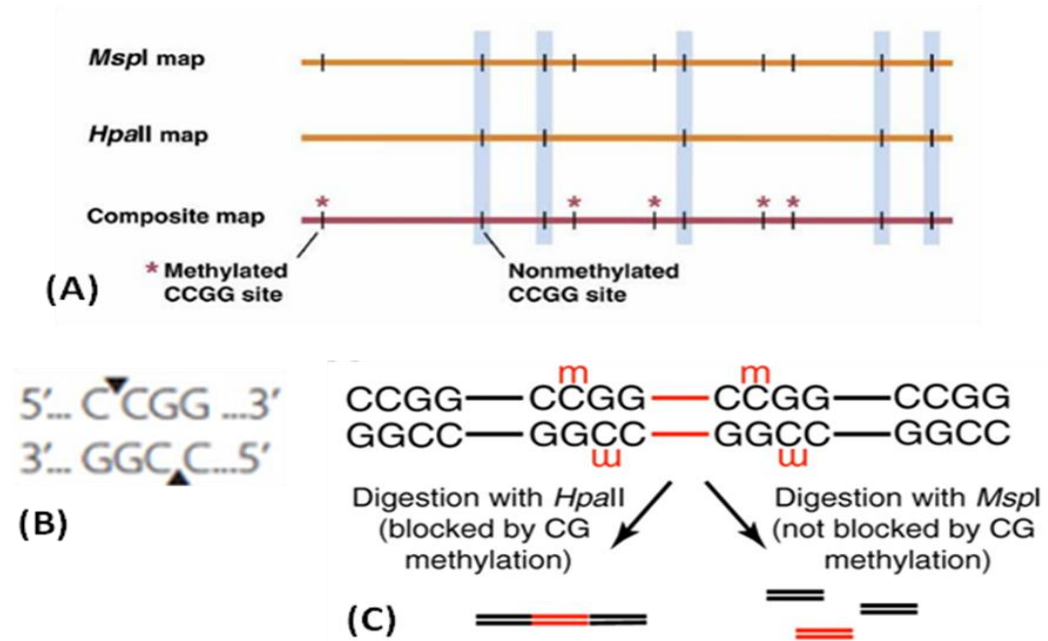
As diferenças detectadas na sequência de nucleotídeos das repetições *in tandem* e a distribuição dos elementos repetitivos foram utilizadas como parâmetros para a divisão da região MHM em sub-regiões. Para cada sub-região, a identidade/similaridade da sequência de bases de cada repetição e dos elementos repetitivos flanqueados foi avaliada pelo alinhamento de sequências múltiplas, segundo a ordem ao longo da sub-região, utilizando-se o programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>).

A orientação e extensão relativas das sub-regiões e das repetições associadas à região MHM foram delimitadas com o uso da ferramenta bl2seq (*Align two sequences using BLAST*) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) usando-se como sequência *query* a região MHM (posição em nucleotídeos chrZ:27,000,000-27,260,000) e, como *subject*, a sequência nucleotídica de cada sub-região ou unidade de repetição.

### **3.2.8 Análise da metilação da região MHM por MSRE-PCR (*Methylation Sensitive Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction*) e MDRE-PCR (*Methylation Dependent Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction*)**

Amostras de DNA das espécies pertencentes à ordem Galliformes (galinha, codorna europeia e peru) foram utilizadas em ensaios de digestão enzimática para verificação dos padrões de metilação no loco *MHM*. As digestões enzimáticas foram realizadas com as enzimas *MspI* e *HpaII* (Invitrogen) cujos sítios de reconhecimento são CC<sup>m</sup>GG e CCGG, respectivamente. Embora sejam

enzimas isoesquizômeras - reconhecem a mesma sequência de DNA -, estas exibem diferentes sensibilidades a modificações de metilação no DNA, o que permite discriminar sequências metiladas e não-metiladas (Figura 4).



**Figura 4:** Características de sítios de corte e sensibilidade à metilação das enzimas de restrição *MspI* e *HpaII*. (A, C) Sítios de reconhecimento das mesmas sequências, embora *HpaII* corte somente regiões não metiladas e *MspI* corte regiões metiladas e não metiladas. (B) Sítio de corte das enzimas. (modificado de Zilberman & Henikoff, 2007).

Visando a obtenção de resultados mais robustos, foi também utilizada uma terceira enzima de restrição (*McrBC*) dependente de metilação que reconhece citosinas metiladas precedidas por uma purina (5'...Pu<sup>m</sup>C<sub>(N40-3000)</sub>Pu<sup>m</sup>C...3').

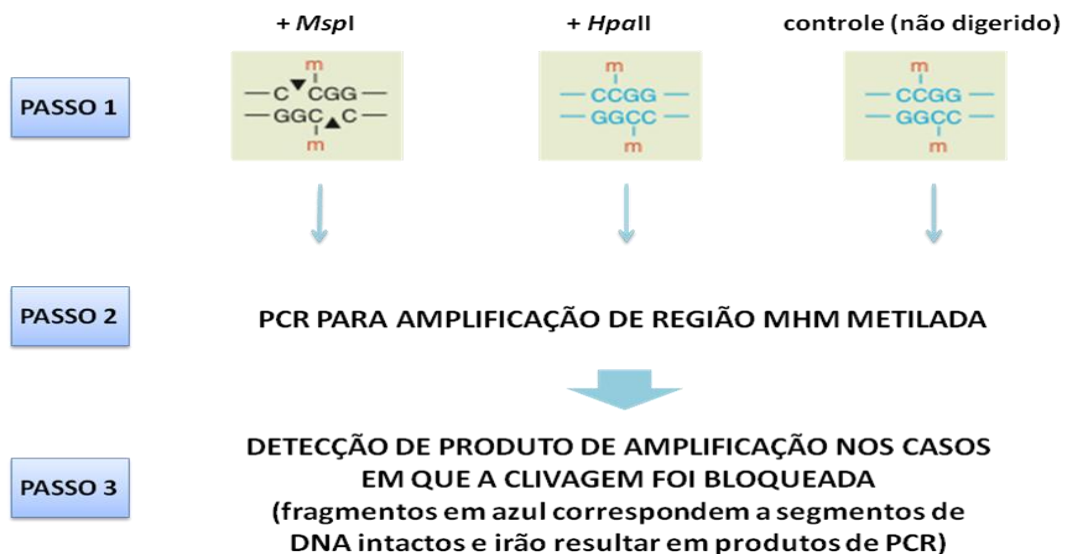
Alíquotas de 1µL de DNA total (cerca de 100ng) foram tratadas com 1U de cada enzima de restrição, separadamente, em 1µL de tampão 10x, 0,1 BSA e 6,9µL de água ultra pura estéril, durante 16 horas a 37°C.

Amostras digeridas com cada uma das enzimas e uma amostra controle (DNA não digerido) foram utilizadas em reações de amplificação únicas ou multiplex, com os *primers* MHMs, MHMa e MHMa2 descritos no item 3.2.4. As reações de amplificação foram realizadas em um volume total de 12,5µL contendo 1,25 µL de tampão de PCR 10x, 0,4µL de MgCl<sub>2</sub> (25µM), 0,4µL de dNTPs (2mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,5µL de cada *primer* (10µM), 1µL de DNA total em uma concentração de 100ng e 9,35µL de água ultra pura estéril. As condições da

PCR foram: 94°C por 1 minuto, 62°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto, seguidas de 35 ciclos a 94°C por 40 segundos, 62°C por 40 segundos e 72°C por 1 minuto, além de uma extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram analisados em gel de agarose 1% imerso em tampão TAE 1x (Tris-Ácido acético-EDTA), corado com *Gel Red* (Uniscience) (0,1µL/10mL) e visualizado em transiluminador, sob luz ultravioleta, e comparados a marcadores de peso molecular conhecido. Os géis obtidos foram fotografados com o uso do sistema de foto documentação Stratagene EagleSight (Stratagene).

A Figura 5 indica os resultados esperados para a abordagem de MSRE-PCR, baseando-se nos padrões diferenciais de metilação de dinucleotídeos CpG contidos em sítios de reconhecimento das enzimas de restrição *MspI* e *HpaII* flanqueados pelos *primers* específicos para a amplificação da região MHM de interesse.



**Figura 5:** Diagrama das principais etapas da análise MSRE-PCR (*Methylation Sensitive Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction*) mostrando os padrões/resultados esperados após os ensaios de digestão enzimática com as enzimas *MspI* e *HpaII*, posterior PCR e visualização dos resultados por eletroforese.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Amostragem biológica

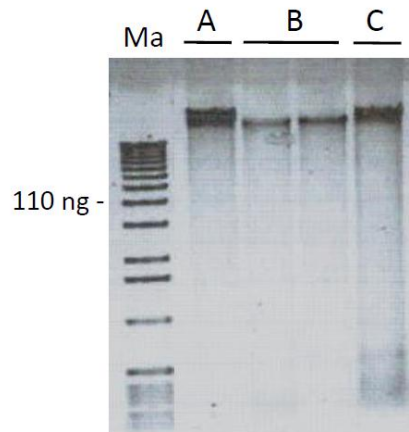
A sexagem molecular representa um dos testes mais comumente aplicados em aves, tanto silvestres como de cativeiro. Baseadas em análises de fragmentos de DNA, as diferentes metodologias atualmente disponíveis para identificação molecular de machos e fêmeas requerem a amostragem geralmente de sangue ou penas que se configuram como metodologias não destrutivas e que não alteram substancialmente o comportamento ou a sobrevivência dos animais (e.g. Harvey *et al.*, 2006). Adicionalmente, as hemácias das aves são nucleadas, o que faz com que estas representem uma rica fonte de DNA nuclear (Claver & Quaglia, 2009). Penas em crescimento também constituem um material adequado para isolamento de DNA, já que estas contêm tecido rico em divisões celulares na região da polpa dérmica (Segelbacher *et al.*, 2002; Pough *et al.*, 2005).

No presente trabalho, amostras de DNA foram obtidas de penas e/ou sangue de exemplares adultos de galinha doméstica, codorna européia, peru, avestruz, coruja-orelhuda, corujinha-domato, coruja-da-igreja, coruja-buraqueira, tucanuçu, arara-azul-grande, beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura e beija-flor-preto, com concentrações médias de 100ng/μl. Apesar de grande parte das amostras de DNA ter sido isolada de penas, muitas vezes de pequeno tamanho, estas apresentaram valores geralmente entre 1,8 a 2,1 em comparações de absorvância a 260/280nm ao espectrofotômetro e, portanto, com qualidade excelente para uso em PCR. De forma similar, as amostras de DNA isoladas de tecido sanguíneo também apresentaram valores de 1,8 a 2,1 em comparações de absorvância a 260/280nm ao espectrofotômetro.

Embora se tenha priorizado o uso de amostragens biológicas não-destrutivas, especialmente adequadas para as espécies das ordens Strigiformes, Piciformes, Psittaciformes e Apodiformes, que se configuram como objetos de programas conservacionistas, amostragens destrutivas foram empregadas para as espécies não silvestres, com o objetivo de comparar padrões de metilação em diferentes estágios de desenvolvimento. Para tanto, foram utilizados embriões de galinha doméstica e codorna européia com 6 dias, fase em que a diferenciação gonadal inicia-se (Gilbert, 2003; Smith & Sinclair, 2004), o que permitiu a obtenção de amostras de DNA com concentrações de 250-850ng/μl.

Análises em gel de agarose 1% ratificaram as concentrações e a integridade das amostras de DNA isoladas, demonstrando que estas são adequadas para uso em PCR e digestões enzimáticas.

A Figura 6 evidencia resultados obtidos de penas em crescimento, sangue e embriões de codorna européia.



**Figura 6:** Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando amostras de DNA obtidas a partir de embrião (A), penas em crescimento (B) e sangue (C) de codorna européia. Ma, marcador de massa molecular; ng, nanogramas.

#### 4.2. Sexagem das aves

Em diversas áreas de pesquisa, como conservação biológica, genética, ecologia, evolução e comportamento, a identificação de machos e fêmeas é de extrema importância. Em aves, nem sempre é possível identificar o gênero somente pela observação de caracteres morfológicos ou comportamentais e a correta identificação do sexo pode ser difícil até mesmo em espécies que apresentam dimorfismo sexual, já que tais características muitas vezes são sutis ou aparecem somente após o período de maturidade sexual (Pough *et al.*, 2005). O uso de análises morfológicas ou morfométricas para identificação de machos e fêmeas é ainda mais complicado quando o tamanho corpóreo ou a coloração das penas varia entre regiões geográficas (Kahn *et al.*, 1998; Shepard *et al.*, 2004). A distinção de machos e fêmeas pode ser também realizada por meio de análises de esteróides fecais para quantificação de estrógeno e testosterona, investigações cariotípicas para visualização dos cromossomos sexuais ou laparoscopia para exame das gônadas. Entretanto, estas metodologias podem levar a resultados inconsistentes e até mesmo a riscos para os animais (Miyaki *et al.*, 1998; Griffiths & Phil, 2000; Grando, 2002). Em meados dos anos 90, técnicas moleculares de sexagem de aves começaram a ser aplicadas com o objetivo de superar estas limitações (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996).

A correta identificação do sexo dos animais mostrou-se essencial no presente trabalho, dado que este visou verificar a ocorrência de padrões diferenciais de metilação de uma região encontrada no cromossomo Z de machos e fêmeas, como já descrito para *Gallus gallus* (Teranishi *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2010). Desta forma, os exemplares adultos e os embriões utilizados neste estudo tiveram seu sexo identificado por meio da visualização de características morfológicas externas e sexagem molecular baseada na amplificação e visualização de fragmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em gel de agarose ou de poliacrilamida, análises de SSCP e análise automatizada de fragmentos por eletroforese capilar (Apêndice I). Como não existe uma técnica de análise de DNA que possa ser amplamente utilizada em aves para identificação de machos e fêmeas (Ito *et al.*, 2003; Dubiec & Zagalska-Neubauer, 2006; Morinha *et al.*, 2011), foram utilizadas diferentes abordagens moleculares para detecção da variação genética entre esses genes, o que permitiu definir as melhores metodologias para as diferentes espécies (Tabela 2). Somente não foi possível diferenciar, por meio das técnicas moleculares utilizadas no presente estudo, machos e fêmeas de avestruz.

A sexagem molecular realizada baseou-se na amplificação de uma região intrônica que, em diversas espécies de aves, difere em tamanho entre os genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, resultando na identificação de um único fragmento de DNA em machos e de dois fragmentos em fêmeas (Griffiths *et al.*, 1998). A Figura 7 indica a localização do gene *CHD-1* no cromossomo sexual Z e os sítios de anelamento dos *primers* P2 e P8 utilizados no presente trabalho. Estes oligonucleotídeos vêm sendo empregado com sucesso em diferentes espécies e têm resultado em padrões de bandas altamente específicas, sendo mais vantajosos que outros oligonucleotídeos também associados ao gene *CHD1* mas que não apresentam uma aplicação ampla em aves (Jensen *et al.*, 2003).

Dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos e um único fragmento de DNA puderam ser claramente identificados, em fêmeas e machos, respectivamente, de galinha doméstica, arara-azul-grande e tucanuçu (Tabela 2 e Figuras 8A e 10). Entretanto, para os demais Galliformes (codorna européia e peru) e também para avestruz e todos Strigiformes (espécies de corujas) e Apodiformes analisados (espécies de beija-flor), tais diferenças não puderam ser visualizadas ou não se mostraram muito consistentes em gel de agarose (Tabela 2, Apêndice I e Figuras 8A e 10). Este resultado provavelmente relaciona-se a diferenças de tamanho menos evidentes entre os íntrons dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, observadas em algumas espécies de aves (Morinha *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012), que não puderam ser identificadas em gel de agarose a uma concentração de 2% já que este não permite uma alta resolução de fragmentos com tamanhos muito próximos



(Calladine *et al.*, 1991; Westermeier, 2005; Lee & Bahaman, 2010). Geralmente, a diferença de tamanho entre os fragmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* amplificados com o conjunto de *primers* P2 e P8 varia de 10 a 80 pares de bases (Fridolfsson & Ellegren, 1999; Jensen *et al.*, 2003) e, assim, fragmentos mais similares em tamanho não conseguem ser resolvidos nesta condição.

Para as espécies e indivíduos para os quais não foi possível identificar diferenças de fragmentos de DNA entre machos e fêmeas em gel de agarose, foram também realizadas análises em gel de poliacrilamida (Tabela 2, Apêndice I, Figuras 8B, 9 e 10). Tanto produtos diretos de PCR como produtos desnaturados (análises SSCP) foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida neutro, já que este, por possuir uma matriz com poros menores, proporciona uma melhor definição de bandas com tamanhos muito próximos (Walker & Rapley, 1999) - concentrações de acrilamida de 9-10% permitem uma excelente resolução de fragmentos de 30 a 1.000 pares de bases (Calladine *et al.*, 1991; Brown, 2002). Além disso, a metodologia de SSCP é altamente sensível e capaz de detectar diferenças de até um nucleotídeo. Nesta, a desnaturação parcial de fragmentos de DNA amplificados via PCR faz com que estes migrem no gel de poliacrilamida como dois fragmentos de fita simples cujas estruturas secundárias dependem de sua sequência de bases e de seu tamanho (Glavac & Dean, 1993; Morinha *et al.*, 2011), o que torna a análise SSCP potencialmente apropriada para identificação de machos e fêmeas de espécies de aves que apresentem tamanhos muito similares entre os genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*.

As análises em gel de poliacrilamida utilizando produtos de PCR não desnaturados permitiram identificar, com segurança, o sexo de exemplares de galinha doméstica, codorna européia, peru, arara-azul-grande, tucanuçu, coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-da-igreja, beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura e beija-flor-preto (Tabela 2 e Apêndice I), por meio da visualização de dois fragmentos de DNA em fêmeas e um único fragmento de DNA em machos (Figuras 8B, 9 e 10). Os resultados obtidos por meio das análises SSCP mostraram que esta metodologia foi altamente eficaz para sexagem das espécies em estudo, com exceção de codorna européia, avestruz e beija-flor-da-banda-branca (Figuras 9 e 10). Dado que as duas amostras de beija-flor-preto referiam-se a duas fêmeas (Apêndice I), não foi possível verificar a aplicabilidade da técnica de SSCP para sexagem de exemplares desta espécie. Problemas metodológicos, como o uso de concentrações não favoráveis de acrilamida e bisacrilamida ou a presença de *primers* livres (Fijita & Silver, 1994), podem ter levado aos resultados observados em codorna européia e beija-flor-da-banda-branca já que exemplares dessas duas espécies puderam ser molecularmente sexados por meio da visualização de fragmentos de DNA não desnaturados associados aos genes

*CHD1-Z* e *CHD1-W* em gel de poliacrilamida (Figuras 8B e 10). Ademais, a técnica de SSCP foi aplicada com sucesso, por Morina *et al.* (2011), para sexagem molecular em duas espécies de codorna utilizando o mesmo conjunto de *primers* do presente estudo, o que indica que esta também se configura como alternativa viável para identificação de machos e fêmeas de *Coturnix coturnix*.

Análises SSCP mostram-se especialmente úteis para identificação do gênero em espécies de corujas dado que diversos trabalhos têm relatado resultados dúbios de sexagem por meio do uso de diferentes conjuntos de oligonucleotídeos, incluindo os *primers* P2 e P8 que amplificam íntrons dos genes *CHD1*, e posterior eletroforese em gel de agarose e poliacrilamida (Griffiths *et al.*, 1998; Lepert *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008).

A impossibilidade de identificação de machos e fêmeas de avestruz por meio do uso do conjunto de *primers* P2 e P8 em PCR e posterior análise dos resultados de amplificação por meio das diferentes técnicas empregadas (Figuras 8, 9 e 10) pode ser correlacionada à pequena diferença de tamanho entre os cromossomos Z e W das aves Ratitas (Ansari *et al.*, 1988; Solari, 1994; Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996; Nishida-Umehara *et al.*, 1999), o que se reflete em diferenças diminutas ou mesma na ausência de diferenças de tamanho dos íntrons dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* (Ellegren, 1996; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Dawson *et al.*, 2001; Sacchi *et al.*, 2004; Huynen *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Os resultados das análises SSCP também indicam a ausência de diferenças na sequência de bases dos segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* amplificados de machos e fêmeas de avestruz.

A genotipagem utilizando eletroforese capilar mostra-se uma estratégia alternativa para a discriminação de genótipos que apresentam diferenças muito reduzidas de tamanho, especialmente se estas variarem entre 2 a 44 pares de bases (Morinha *et al.*, 2011). Desta forma, a identificação de machos e fêmeas por meio de genotipagem automatizada foi aplicada em exemplares previamente sexados por meio das demais técnicas empregadas. Para tanto, foram utilizados um macho e uma fêmea de galinha doméstica, codorna européia, peru, tucanuçu, arara-azul-grande e beija-flor-da-banda-branca e todos exemplares de coruja-orelhuda, corujinha-do-mato e coruja-da-igreja. Além disso, amostras de DNA de todos os exemplares de avestruz, para as quais não havia sido possível a identificação do sexo por meio de técnicas moleculares, também foram utilizadas para geração de genótipos moleculares (Apêndice I).

Os resultados observados, por meio de eletroferogramas - em que se observam dois picos de tamanhos diferentes para fêmeas e apenas um para machos (Figura 11) - corroboraram os dados prévios de identificação do sexo em galinha doméstica, peru, codorna européia, tucanuçu, arara-

azul-grande e todos exemplares de coruja-orelhuda, corujinha-do-mato e coruja-da-igreja. A Figura 11 exemplifica a determinação dos genótipos de um macho e uma fêmea de coruja-orelhuda, associados aos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, mostrando a presença de dois fragmentos de DNA com 9 pares de bases de diferença.

Ao contrário do padrão esperado, as fêmeas de beija-flor-da-banda-branca analisadas no presente trabalho apresentaram apenas um pico no eletroesferograma de genotipagem, não sendo, portanto, possível a distinção entre machos e fêmeas pelo processo de genotipagem empregado. Lee *et al.* (2009) também identificaram um único pico em algumas amostras de fêmeas de *Amazilia versicolor*, o que pode estar relacionado a variações nucleotídicas individuais no local de ligação dos *primers* ou ao uso de amostras de DNA degradadas.

A metodologia de genotipagem automatizada também não gerou resultados adequados para identificação do sexo dos exemplares de avestruz, dado que não foi possível observar diferenças entre os picos dos eletroesferograma de machos e fêmeas, confirmando a ausência de diferenças no tamanho dos íntrons associados aos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em Struthioniformes (Fridolfsson & Ellegren, 1999; Sacchi *et al.*, 2004; Huynen *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

A despeito de algumas dificuldades na visualização dos resultados dos produtos amplificados por meio de PCR, o uso dos *primers* P2 e P8 para geração de fragmentos diferenciais em machos e fêmeas mostrou-se vantajoso para as espécies do presente estudo. Embora tais oligonucleotídeos possam gerar a amplificação preferencial do íntron de menor tamanho, geralmente associado ao gene *CHD1-Z*, e assim identificar erroneamente fêmeas como sendo machos, a comparação dos resultados de diferentes tipos de análise dos produtos de PCR permitiu identificar com precisão o sexo dos animais. As metodologias empregadas somente não permitiram identificar machos e fêmeas de avestruz.

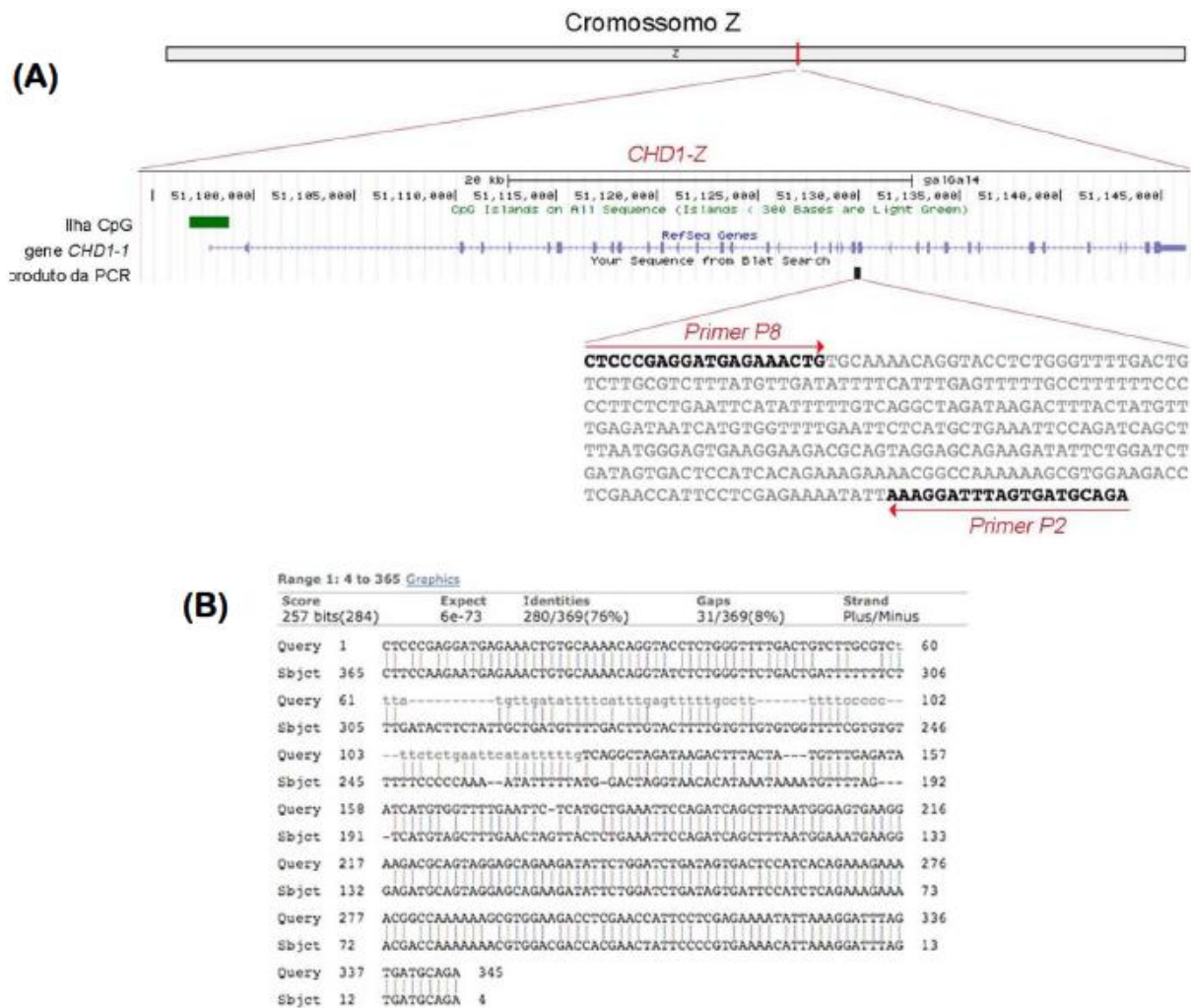
Não somente a separação dos produtos de PCR, gerados com o uso dos *primers* P2 e P8, em gel de poliacrilamida (Kahn *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 1999), como também o delineamento de outros conjuntos de oligonucleotídeos para amplificação dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* (Ito *et al.*, 2003) e a aplicação de enzimas de restrição (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002) não têm mostrado sucesso para a sexagem molecular das espécies de aves da ordem Struthioniformes. Uma técnica alternativa, baseada na amplificação de fragmentos de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) convertidos em marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), por meio de PCR multiplex, gerou resultados positivos para identificação de machos e fêmeas de avestruz (Mine, 2002; Hinckley *et al.*, 2005). Entretanto, esta metodologia é dispendiosa e gera múltiplos

fragmentos, o que dificulta a correta visualização de padrões sexo-específicos, especialmente se as condições de PCR não forem altamente padronizadas. Desta forma, a identificação e caracterização de outros segmentos de DNA que apresentem padrões sexo-específicos poderão subsidiar a identificação molecular de machos e fêmeas de Struthioniformes.

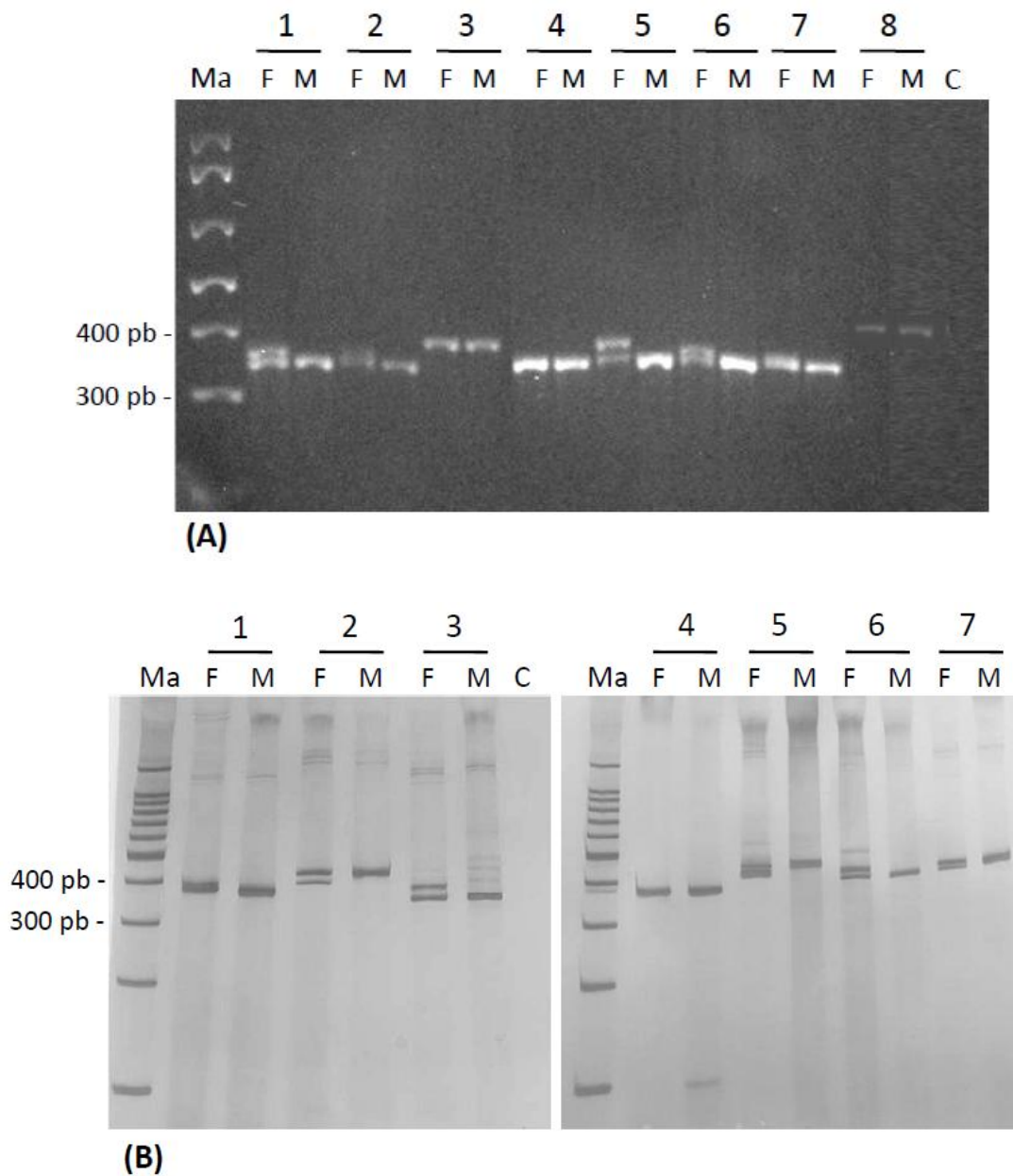
**Tabela 2:** Metodologias moleculares aplicáveis para identificação de machos e fêmeas das espécies estudadas. Sexagem baseada na visualização de características morfológicas externas (CME) e sexagem molecular baseada na amplificação e visualização de fragmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em gel de agarose (AGAR), gel de poliacrilamida (POL), análise SSCP (SSCP) e genotipagem automatizada (GA).

Ordem	Família	Espécie	Métodos de sexagem
Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> (galinha doméstica)	CME/AGAR/POL/SSCP/GA
		<i>Coturnix coturnix</i> (codorna européia)	CME/POL/GA
		<i>Meleagris gallopavo</i> (peru)	CME/POL/SSCP/GA
Struthioniformes	Struthionidae	<i>Struthio camelus</i> (avestruz)	CME
Strigiformes	Strigidae	<i>Asio clamator</i> (coruja-orelhuda)	POL/SSCP/GA
		<i>Megascops choliba</i> (corujinha-do-mato)	POL/SSCP/GA
		<i>Athene cunicularia</i> (coruja-buraqueira)	POL/SSCP/GA
	Tytonidae	<i>Tyto furcata</i> (coruja-da-igreja)	POL/SSCP/GA
Piciformes	Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i> (tucanuçu)	AGAR/POL/SSCP/GA
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (arara-azul-grande)	AGAR/POL/SSCP/GA
Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilia versicolor</i> (beija-flor-da-banda-branca)	POL
		<i>Eupetomena macroura</i> (beija-flor-tesoura)	POL/GA*/SSCP
		<i>Florisuga fusca</i> (beija-flor-preto)	POL

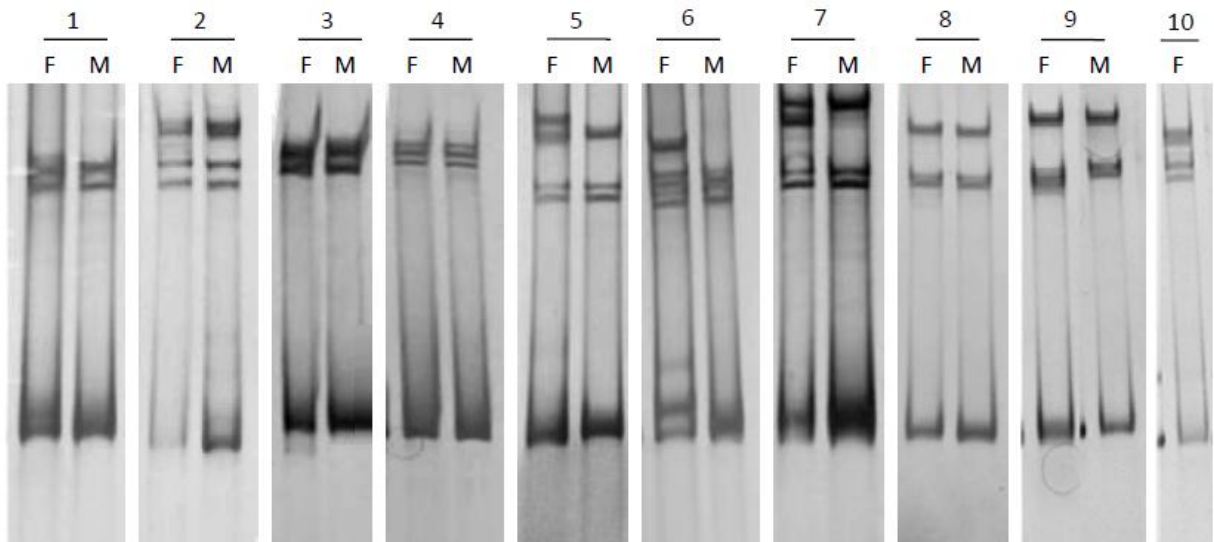
\*sexagem realizada pelo Prof. Dr. Jaes Joseph Roper (Universidade Federal do Paraná).



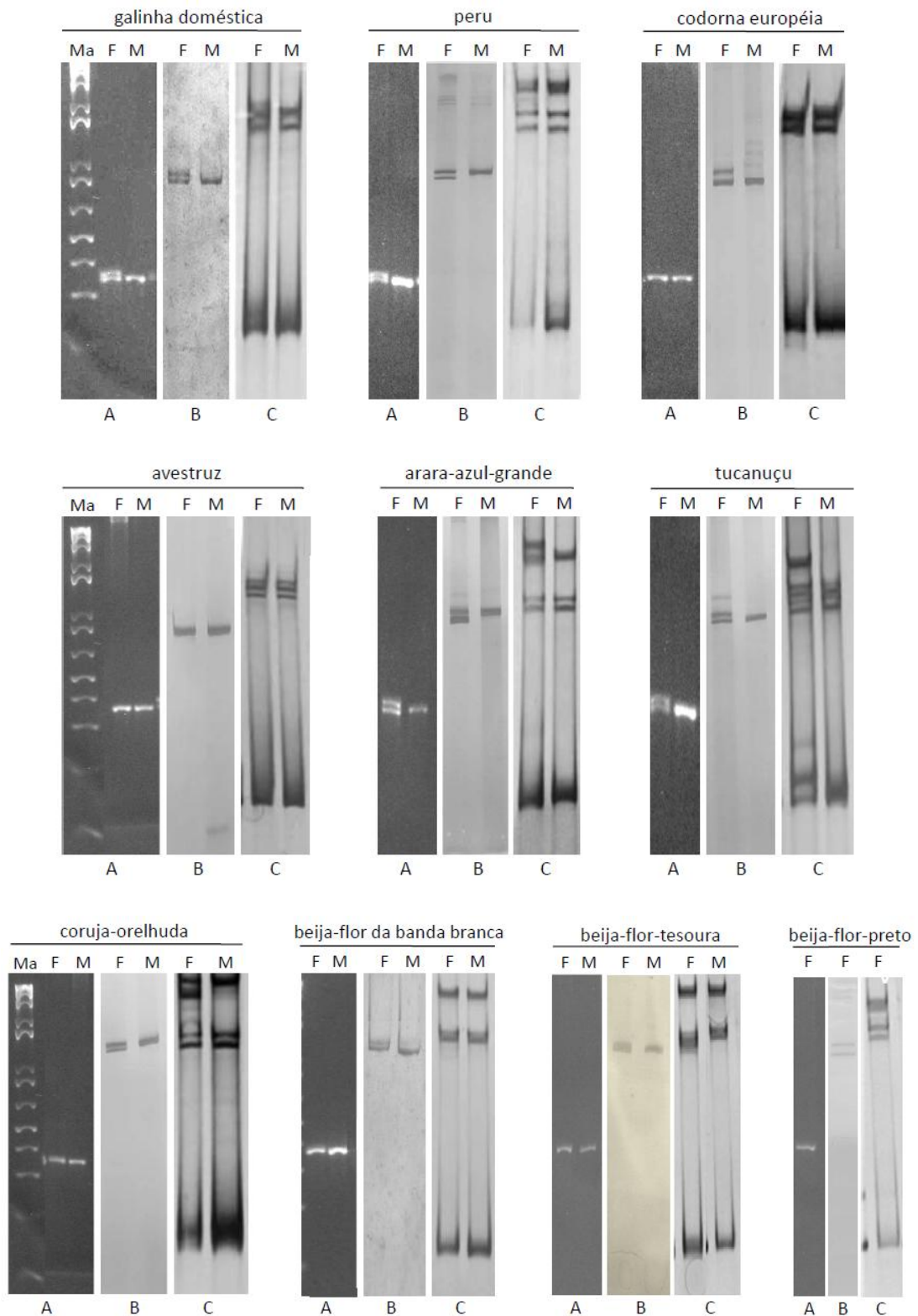
**Figura 7.** Representação esquemática dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*. **(A)** Localização do gene *CHD1-Z*, no braço longo do cromossomo Z de *Gallus gallus* (chrZ:51,097,769-51,146,189) constituído por 37 éxons distribuídos ao longo de 48.420 pares de bases e uma ilha CpG associada à sua região promotora. Os *primers* P2 e P8 geram um produto de PCR de 345 pares de bases e possuem sítios de anelamento nos éxons 23 e 24, respectivamente, que flanqueiam um íntron pequeno do gene *CHD-Z*. **(B)** Alinhamento da sequência do íntron do gene *CHD1-Z* no cromossomo W de *G. gallus* que prediz um produto correspondente a 362 pares de bases (*Align two sequences using BLAST*, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



**Figura 8.** Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em diferentes espécies de aves, visualizados em gel de agarose **(A)** e poliacrilamida **(B)**. 1 - galinha doméstica, 2 - peru, 3 - codorna européia, 4 - avestruz, 5 - arara-azul-grande, 6 - tucanuçu, 7 - coruja-orelhuda (padrão de fragmentos também observado para as demais espécies de corujas) e 8 - beija-flor-preto (padrão de fragmentos também observado para as demais espécies de beija-flores). Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; pb, pares de bases; F, fêmea; M, macho; C, controle negativo (ausência de amostra de DNA em PCR).

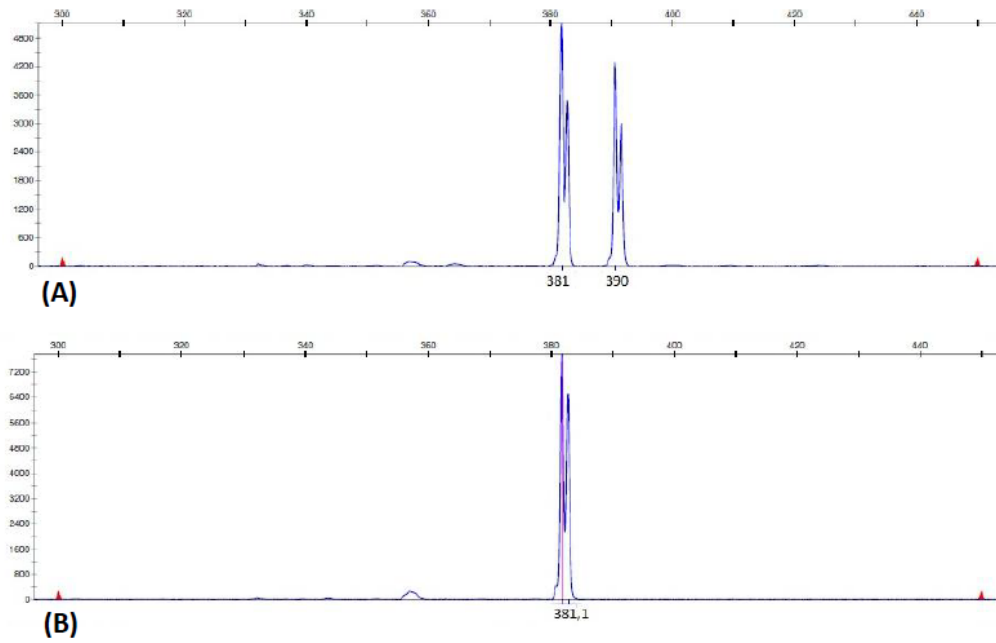


**Figura 9.** Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em diferentes espécies de aves, visualizados por meio de análise SSCP. 1 - galinha doméstica, 2 - peru, 3 - codorna européia, 4 - avestruz, 5 - arara-azul-grande, 6 - tucanuçu, 7 - coruja-orelhuda (padrão também observado para as demais espécies de corujas), 8 - beija-flor-da-banda-branca, 9 - beija-flor-tesoura e 10 - beija-flor-preto. F, fêmea; M, macho.



**Figura 10.** Comparação dos resultados de sexagem molecular relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em diferentes espécies de aves. (A) gel de agarose, (B) gel de poliacrilamida, (C) análise SSCP. Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; F, fêmea; M, macho. O padrão observado para coruja-orelhuda também foi observado para as demais espécies de corujas.





**Figura 11.** Eletroferogramas relativos à genotipagem automatizada de coruja-orelhuda evidenciando dois alelos de tamanhos diferentes associados aos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em fêmeas (A) e alelos de tamanhos iguais associados ao gene *CHD1-Z* em machos (B).

### 4.3. Caracterização *in silico* da região MHM de galinha doméstica

Grande parte do conhecimento sobre a determinação e diferenciação sexual das aves vem de estudos em *Gallus gallus*, cujo genoma completo está disponível no GenBank (Hillier *et al.*, 2004; Bisoni *et al.*, 2005). Seus cromossomos são organizados em 39 pares, sendo 28 pares de microcromossomos, 10 pares de macrocromossomos e 1 par de cromossomos sexuais. Nesta espécie, a diferenciação sexual ocorre entre o 6º e o 21º dia do período embrionário, quando as gônadas começam a se diferenciar em ovários ou testículos (Chue & Smith, 2011). Por outro lado, pouco se sabe sobre os mecanismos genéticos responsáveis pelo desencadeamento das diferenças entre machos e fêmeas.

Identificada até o momento somente em espécies das ordens Galliformes e Anseriformes (Teranishi *et al.*, 2001; Teranishi & Mizuno, 2004; Caetano & Ramos, 2008; Itoh *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2011; Caetano *et al.*, 2014; Wright *et al.*, 2015), ambas pertencentes à superordem Galloanserae, a região MHM pode estar associada a um mecanismo de diferenciação sexual gonadal (Roeszler *et al.*, 2012), representando um potencial sítio específico de compensação gênica nas aves (Melamed & Arnold, 2007). Segundo Teranishi *et al.*, 2001, esta região apresenta um padrão diferencial de metilação em fêmeas e machos de galinha doméstica. Em fêmeas, a região MHM apresenta-se hipometilada, sendo transcrita no cromossomo Z e gerando, assim, um lncRNA. Por outro lado, em machos, esta aparece hipermetilada e reprimida em ambos cromossomos Z, sendo assim transcricionalmente inativa.

Embora ainda não se saiba com certeza se o loco MHM atua na diferenciação sexual de aves, foi sugerido que este possui um papel regulatório sobre o gene *DMRT1*, dado que ambos localizam-se próximos um do outro, no braço curto do cromossomo Z. O lncRNA produzido pelo MHM poderia se acumular neste local e agir como repressor da expressão do gene *DMRT1* em embriões de fêmeas de galinhas, uma vez que este gene está relacionado com a formação dos testículos (Teranishi *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2010).

Visando contribuir com estudos acerca da função, evolução e organização da região MHM, no presente estudo este segmento de DNA de galinha doméstica foi analisado por meio de simulação computacional para construção de um modelo de sua estrutura genômica. O alinhamento das sequências repetidas previamente descritas como associadas à região MHM de galinha doméstica por Teranishi *et al.* (2001) e por Itoh *et al.* (2011) revelou múltiplos *hits* no segmento de 260Kb localizado no braço curto do cromossomo Z (posição em nucleotídeos chrZ:27,000,000-27,260,000). Este segmento genômico é caracterizado por um alto conteúdo de CG, delimitado por duas LINES (*Long Interspersed Nuclear Elements*) que apresentam conteúdo de CG menor em

relação às sequências adjacentes. Entre essas LINES, há uma região intermediária também apresentando menor conteúdo de CG. De forma geral, a região MHM de galinha doméstica apresenta múltiplos elementos repetitivos da classe LTR (*Long Terminal Repeat*), especialmente os pertencentes à família EVRL (*Endogenous Retrovirus*), denominados GGLTR5A. Baseado na posição e distribuição desses elementos e na composição da sequência repetitiva entre LTRs consecutivas, no presente trabalho, a região MHM foi subdividida em sub-regiões, numeradas do centrômero para o telômero do cromossomo Z: sub-região 1 (chrZ:27,176,712-27,260,282), sub-região 2 (chrZ:27,132,044-27,174,901), sub-região 3a (chrZ:27,094,512-27,132,043), sub-região 4 (chrZ:27,036,950-27,094,511) e sub-região 3b (chrZ:27,000,000-27,036,949) (Figura 12 e Apêndice II).

Considerando-se que a região MHM caracteriza-se por repetições concatenadas, buscou-se avaliar a identidade das LTRs correspondentes a cada sub-região, bem como os segmentos de DNA localizados entre LTRs. Essa análise diferenciou as LTRs e as sequências entre LTRs de acordo com as sub-regiões MHM propostas, conforme demonstrado na Figura 13. Além da presença de fragmentos distintos derivados da LTR GGLTR5A, as sub-regiões mostraram sequências repetitivas entre LTRs características, que foram identificadas como *repeat 1* para a sub-região 1, *repeat 2* para as sub-regiões 2 e 4 e *repeat 3* para as sub-regiões 3a e 3b (Figura 13A, B, C). Em adição, foram também identificadas duas duplicações segmentares - a primeira duplicação com aproximadamente 32,200 pares de bases mostrando orientação invertida e contida nas sub-regiões 3a (chrZ:27,002,428-27,034,648) e 3b (chrZ:27,094,799-27,127,331) e a segunda duplicação com cerca de 12,970 pares de bases e contida na sub-região 2. Esta segunda duplicação foi identificada como segmentos 2a (chrZ:27,132,044-27,145,016) e 2b (chrZ:27,151,845-27,164,811) (Figura 13D).

Análises de identidade de sequência revelaram que a *repeat 1*, característica da sub-região 1 proximal, relaciona-se com a sequência original MHM descrita por Teranishi *et al.* (2001) (Figura 14A). Em relação à sequência de 2,276 pares de bases descrita inicialmente por estes autores (AB046699.1 e AB046698.1), a *repeat 1* se sobrepõe por 1,860 pares de bases, sendo flanqueada por duas LTRs GGLTR5A de aproximadamente 350 pares de bases (Figura 14B). A *repeat 2*, das sub-regiões mediais 2 e 4, corresponde à sequência MHM originalmente identificada por Itoh *et al.* (2011) e denominada de sMHM (Figura 14C). Em relação à sequência de 1,860 pares de bases descrita por estes autores, a *repeat 2* se sobrepõe a esta em cerca de 1,260 pares de bases, sendo flanqueada parcialmente por duas LTRs GGLTR5A que variam em tamanho entre 493 a 613 pares

de bases (Figura 14D). A descrição detalhada da distribuição dos diferentes fragmentos das LTRs GGLTR5A e das *repeats* flanqueadas pelas mesmas encontra-se no Apêndice II.

O conjunto de oligonucleotídeos utilizado em PCR no presente estudo para amplificação da região MHM e para detecção do padrão de metilação desta região no genoma de *Gallus gallus*, amplifica dois fragmentos compostos por aproximadamente 240 e 750 pares de bases em galinha doméstica (Caetano & Ramos, 2008). O fragmento de maior tamanho mostrou-se associado à sequência descrita por Teranishi *et al.* (2001) e que se sobrepõe à *repeat 1* (Figura 15) que apresenta alto conteúdo de CG (cada unidade de repetição apresenta uma razão CpG observada/GpG esperada igual a 0,65% e %CG igual a 59,8%) e uma ilha CpG de 1,354 pares de bases que contém o amplicon (Figura 15 A e B). O alinhamento deste amplicon com a sequência de 83,571 pares de bases correspondente à sub-região 1 confirmou a presença de 32 cópias desta repetição (Figura 15 C) que potencialmente foram amplificadas simultaneamente pela PCR.

No presente trabalho, a região MHM foi amplificada com sucesso, por PCR multiplex, em *Gallus gallus* - foi possível evidenciar, em gel de agarose, dois fragmentos de cerca de 240 e 750 pares de bases tanto para machos quanto para fêmeas (Figura 16). Os resultados obtidos mostraram-se similares aos observados por Caetano & Ramos (2008). Três produtos de amplificação, referentes ao fragmento de maior tamanho gerado e, portanto, correspondentes à *repeat 1* da região MHM, foram encaminhados para sequenciamento. As sequências nucleotídicas individuais foram utilizadas para gerar uma sequência consenso que foi posteriormente comparada com demais sequências depositadas no GenBank. Um alto índice de identidade ( $\geq 98\%$ ) pôde ser identificado com a sequência referência de *Gallus gallus* (*access* AB046699) descrita por Teranishi *et al.* (2001) como correspondente à região MHM (Figura 17).

Um dos métodos empregados em análises de metilação refere-se à digestão de DNA com enzimas de restrição sensíveis à metilação (Zilberman & Henikoff, 2007). Em 2008, Caetano & Ramos realizaram um ensaio de digestão enzimática para evidenciar os padrões diferenciais de metilação da região MHM observados em fêmeas e machos de galinha doméstica. Amostras de DNA tratadas com a enzima *HpaII*, sensível à metilação de sítios CCGG, e posteriormente submetidas à PCR com *primers* específicos para amplificação concomitante de dois segmentos da região MHM - um de maior tamanho e que, segundo estes autores, inclui uma ilha CpG e outro de menor tamanho e mapeado fora da ilha CpG - evidenciaram, em gel de agarose, resultados distintos entre os sexos. Fêmeas apresentaram um único fragmento de cerca de 240 pares de bases e machos evidenciaram dois fragmentos, de aproximadamente 240 e 750 pares de bases. De acordo com Caetano & Ramos (2008), o fragmento menor, amplificado com os *primers* MHMs e

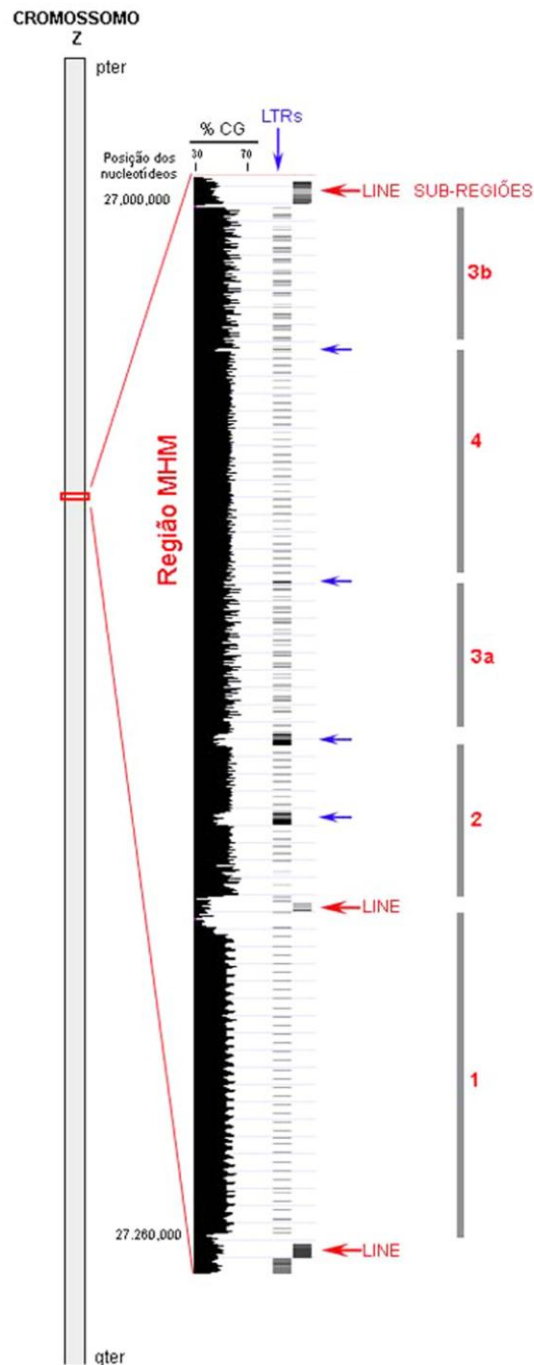
MHMa, é localizado fora de uma ilha CpG e o fragmento maior, gerado com os *primers* MHMs e MHM2a, inclui uma região CpG. Entretanto, o ensaio de digestão enzimática proposto por estes autores baseou-se em informações do genoma parcial de *Gallus gallus* (acesso AB046699). Dados mais recentes, referentes ao genoma completo de galinha doméstica disponibilizados em 2011 no GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), evidenciam que ambos fragmentos de DNA encontram-se em uma ilha CpG, segundo os critérios de Takai & Jones (2002) (Figura 15B). Neste contexto, a detecção dos produtos de amplificação com o uso dos pares de *primers* MHMs/MHMs e MHMs/MHM2a após a clivagem do DNA genômico com a endonuclease de restrição sensível à metilação indica que os sítios CCGG flanqueados por estes *primers* estão metilados.

Segundo Li *et al.* (2002), a combinação de duas ou mais enzimas em ensaios de digestão enzimática, cujos sítios de clivagem sejam localizados dentro e fora de ilhas CpG, garante uma avaliação mais ampla de fragmentos com diferentes padrões de metilação. Desta forma, no presente trabalho, o ensaio de digestão enzimática para verificação de padrões diferenciais em machos e fêmeas de galinha doméstica utilizou três enzimas de restrição - *MspI* (que corta tanto sequências CCGG metiladas quanto não metiladas, como controle da reação de digestão para se eliminar possíveis artefatos decorrentes de digestão parcial), *HpaII* (que cliva somente sequências CCGG não metiladas) e *McrBC* (que é uma endonuclease dependente de metilação das citosinas CpG em seu sítio de reconhecimento e, portanto, cliva somente sequências metiladas). As amostras digeridas foram posteriormente submetidas à amplificação utilizando os conjuntos de *primers* MHMs e MHMa e MHMs e MHM2a.

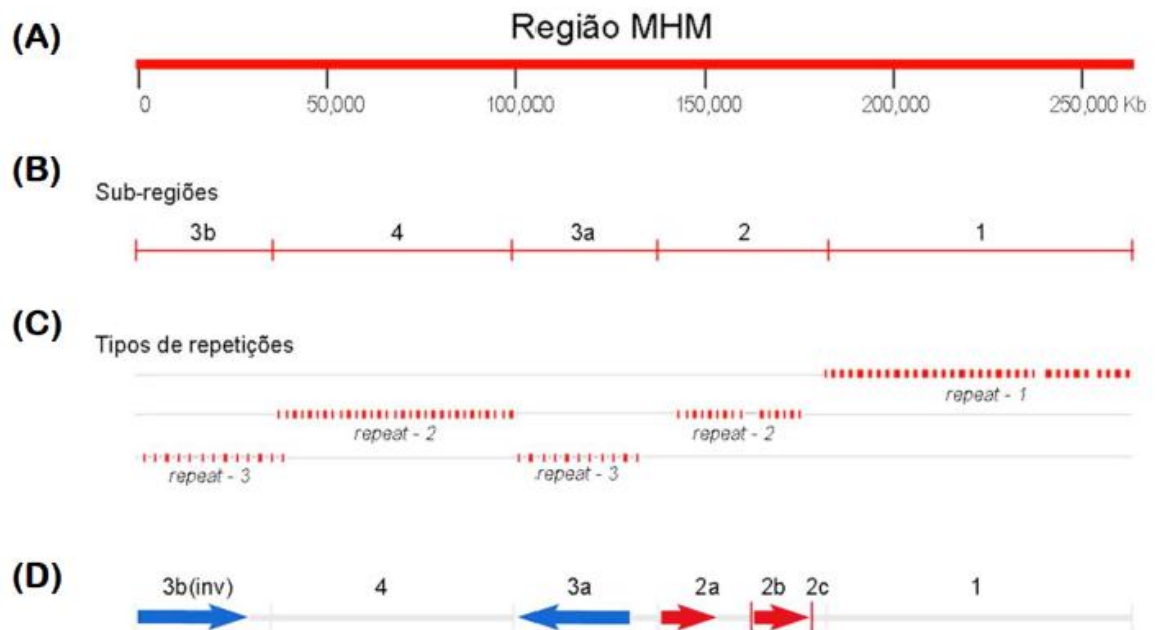
Conforme esperado, as enzimas *HpaII* e *MspI* levaram aos resultados preditos - a aplicação da enzima *HpaII* permitiu a identificação de um fragmento de DNA de aproximadamente 750 pares de bases somente em machos de galinha doméstica, enquanto amostras submetidas à clivagem pela enzima *MspI* não resultaram em produtos de PCR associados ao fragmento de maior tamanho em machos e fêmeas (Figura 18). Tais resultados, observados para indivíduos adultos e para embriões, confirmam os padrões diferenciais de metilação da região MHM descritos para esta espécie, sendo não metilado em fêmeas e metilado em machos (Teranishi *et al.*, 2001; Caetano & Ramos, 2008; Itoh *et al.*, 2010). Amostras de DNA de fêmeas também evidenciaram os resultados previstos após tratamento com a enzima *McrBC*, ou seja, um fragmento de cerca de 750 pares de bases pôde ser visualizado. Entretanto, diferentemente do esperado, os ensaios com *McrBC* evidenciaram uma clivagem apenas parcial nas amostras de DNA de machos (Figura 18), o que sugere que nem todas as cópias das repetições da sub-região 1 (*repeat 1*) encontram-se densamente metiladas.

Adicionalmente, foram detectados resultados não previstos após os ensaios de digestão enzimática realizados: baseado na existência de quatro sítios CCGG flanqueados pelos oligonucleotídeos MHMs e MHMa (Figura 15), que geram o amplicon de menor tamanho após amplificação pela PCR, seria esperado encontrar um mesmo padrão entre machos e fêmeas para este conjunto de *primers* quando comparado aos resultados previstos para o conjunto de *primers* MHMs e MHM2a que geram o amplicon de maior tamanho. Neste caso, a aplicação da enzima *HpaII* confirmaria a metilação destes sítios na região alvo em machos e sua ausência em fêmeas. No entanto, o amplicon menor foi detectado indistintamente em ambos os sexos após digestão com a enzima *MspI*, o que indica problemas técnicos decorrentes de digestão parcial do DNA genômico (Figura 18).

A estrutura da sub-região 1, o alto grau de identidade da sequência nucleotídica entre as diferentes cópias das repetições *in tandem* (*repeat 1*) e a especificidade dos *primers* utilizados no presente estudo explicam tais resultados obtidos e as dificuldades de padronização da análise de metilação do DNA baseada no uso de enzimas de restrição. A Figura 15C demonstra que o conjunto de *primers* MHMs, MHMa e MHM2a potencialmente amplifica simultaneamente cada uma das 32 cópias da *repeat 1*, característica da sub-região 1 MHM em cada cromossomo Z presente nas amostras. Portanto, análises de metilação do DNA baseadas em ensaios de digestão enzimática da região MHM devem considerar esta multiplicidade de sítios de reconhecimento de corte das endonucleases de restrição e as dificuldades inerentes a este loco. Abordagens alternativas para a análise dos padrões de metilação do DNA da região MHM, como as baseadas na modificação do DNA por bissulfato de sódio, poderão produzir resultados de interpretação menos complexa e mais relevante e, assim, ser aplicados em estudos que visem a identificação de novos marcadores moleculares associados à distinção entre machos e fêmeas de aves.

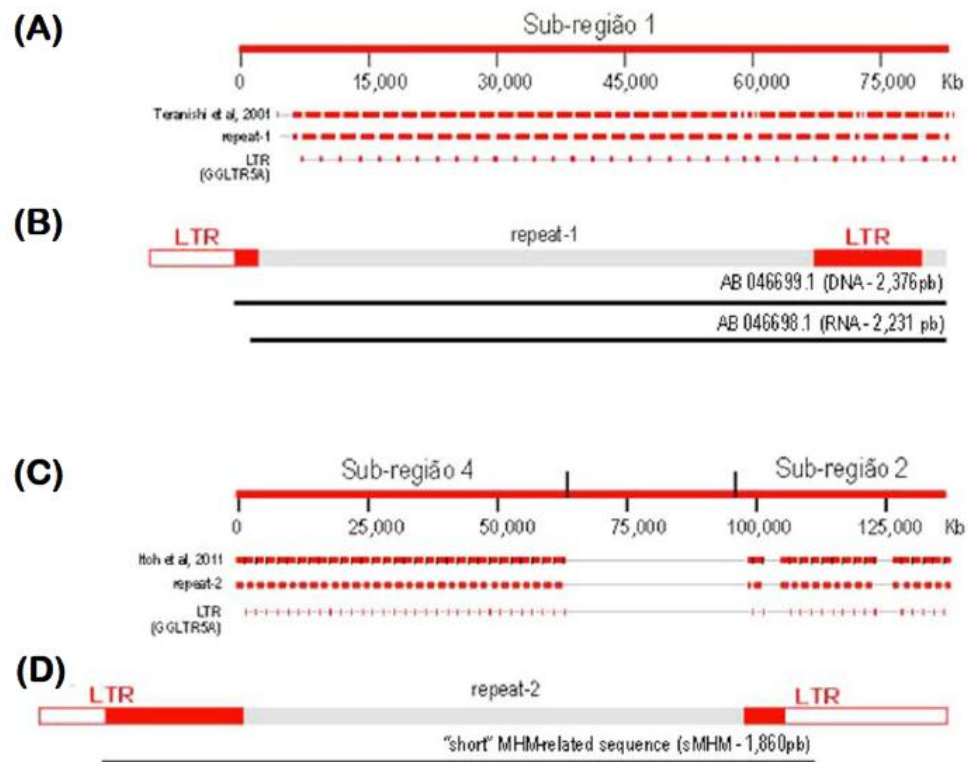


**Figura 12:** Estrutura da região MHM de galinha doméstica, localizada no braço curto do cromossomo Z, composta por 260Kb de extensão e com alto conteúdo de CG. Observam-se três LINES (setas vermelhas) que demonstram menor conteúdo de CG. Elementos repetitivos da classe LTR ao longo dessa região também se caracterizam pelo menor conteúdo de CG (setas azuis). As posições dos elementos repetitivos foram utilizadas como marca para delimitar sub-regiões numeradas do centrômero para o telômero (sub-regiões 1, 2, 3a, 4 e 3b). (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>, assembly Chicken Nov. 2011 – CGSC Gallus\_gallus-4.0/galGal4).



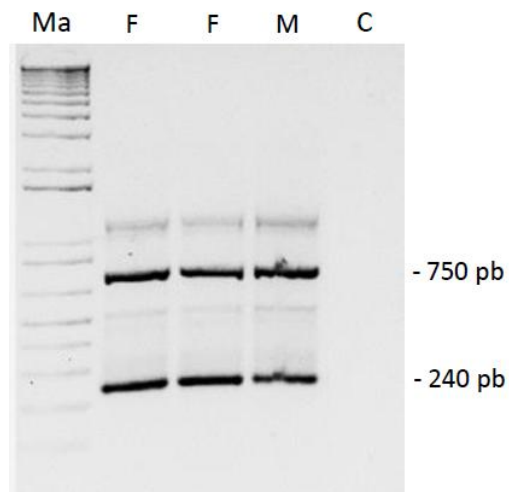
**Figura 13:** Organização da região MHM de galinha doméstica, composta por 260Kb de extensão (A), sendo dividida em sub-regiões de acordo com sua composição nucleotídica e conteúdo CG (B) e contendo três tipos de repetições concatenadas (*repeats* 1, 2 e 3) não sobrepostas e flanqueadas por LTRs específicas (não mostrado). As sub-regiões 3a e 3b (setas azuis) e 2a e 2b (setas vermelhas) apresentam duplicações segmentares (D). (*Align two sequences using BLAST*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). inv, inversão.





**Figura 14:** Distribuição das *repeats* entre as LTRs flangeadoras específicas da sub-região 1 e das sub-regiões 2 e 4, comparadas com as sequências das repetições MHM de galinha doméstica descritas por Teranishi *et al.* (2001) (A) e por Itoh *et al.* (2011) (C). A repetição de 2,237pb (Teranishi *et al.*, 2001; AB046699.1 e AB046698.1) se sobrepõe à *repeat 1*, parcialmente se sobrepõe à LTR na extremidade 5' e mostra-se idêntica em sequência à LTR contida na porção 3' (B). A repetição sMHM de 1,860pb (Itoh *et al.*, 2011) se sobrepõe parcialmente às LTRs em ambas extremidades 5' e 3' (D). (*Align two sequences using BLAST*, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).



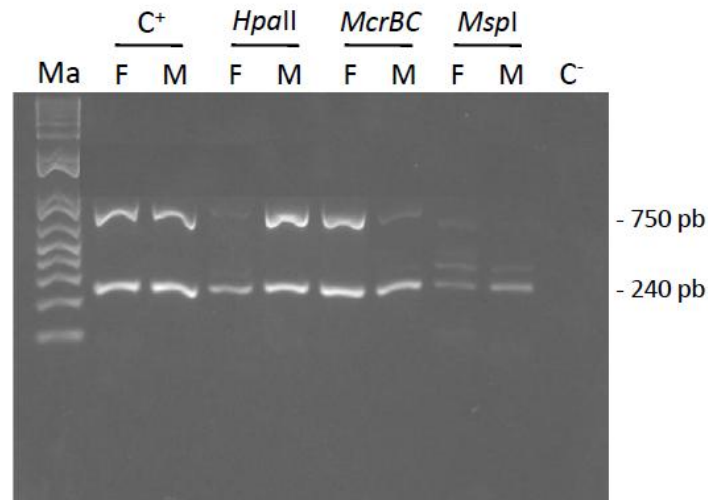


**Figura 16:** Resultados de PCR multiplex em amostras de DNA de galinha doméstica evidenciando, em gel de agarose 1%, dois fragmentos associados à região MHM. Os fragmentos de menor e de maior tamanho foram gerados pelos conjuntos de *primers* MHMs/MHMa e MHMs/MHM2a, respectivamente. Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; pb, pares de bases; F, fêmea; M, macho; C, controle negativo (ausência de amostra de DNA em PCR).

Gallus gallus DNA, male hypermethylated (MHM) region on the Z chromosome  
 Sequence ID: [dbj|AB046699.1](#) Length: 2376 Number of Matches: 1

Range 1: 606 to 1308		<a href="#">GenBank</a>	<a href="#">Graphics</a>	▼ Next Match ▲ Pri
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1199 bits(649)	0.0	688/705(98%)	11/705(1%)	Plus/Minus
Query 2	TCAAACGCTACGATGGAAATGAGTGGAGCCCTCTGGCGGGACTGCCCTTGGTTGTCTGT			61
Sbjct 1308	TCAAACGCTACGATGGAAATGAGTGGAGCCCTCTGGCGGG-ACTGCCCTTGGTTGTCTGT			1250
Query 62	GCCTTTCCACAAGGCAAGAGGCGGCACCTTAAAGGGCGAGGCATTTCCCATCAGATCCT			121
Sbjct 1249	GCCTTTCCACAAGGCAAGAGGCGGCACCTTAAAGGGCGAGGCATTTCCCATCAGATCCT			1190
Query 122	TATGCGGGAGGTGCGAGTGAGTTGCTGTTGCCAACCGAGAAGTGGAGCCGGCGGAGCTG-			180
Sbjct 1189	TATGCGGGAGGTGCGAGTGAGTTGCTGTTGCCAACCGAGAAGTGGAGCCGGCGGAGCTGG			1130
Query 181	TTAGCT-GGGACCAAAGCGCCCGTA-GTACCG-CTGGTCT-CCAGAAACCCCCGTGTC-A			235
Sbjct 1129	TTAGCTCGGGACCAAAGCGCCCGTAAGTACCGCCTGGTCTCCAGAAACCCCCGTGTCCA			1070
Query 236	GACACGAGGCAGCCCCAGCGCCAGCACCGGGACGCCCTTGGCCGGTGC GACTGCGCAGG			295
Sbjct 1069	GACACGAGGAAGCCCCAGCGCCAGCACCGGGACGCCCTTGGCCGGTGC GACTGCGCAGG			1010
Query 296	AATGGATCTGTTTTGTTCATGTGAGCACTTCCCGGAGCAAGGGGAATGGGCACGCAGTCAG			355
Sbjct 1009	AATGGATCTGTTTTGTTCATGTGAGCACTTCCCGGAGCAAGGGGAATGGGCACGCAGTCAG			950
Query 356	AGGGAGGCCTGGGAATATGAAGGAGCTAAAGAAAAAGCCAGGGAGCCAAGCCCTAAGCAG			415
Sbjct 949	AGGGAGGCCTGGGAATATGAAGGAGCTAAAGAAAAAGCCAGGGAGCCAAGCCCTAAGCAG			890
Query 416	TAGAAAACCACGTGGCGTACGGAGTGGCATGAAATGGCGGCTCCTCAGAGTGGAACGCAG			475
Sbjct 889	TAGAAAACCACGTGGCGTACGGAGTGGCATGAAATGGCGGCTCCTCAGAGTGGAACGCAG			830
Query 476	GCTCCAACAAAATGGCGCCTCCCTATGTAGGTAGGTGGGAGGGAGTCCGGTTATGGCCC			535
Sbjct 829	GCTCCAACAAAATGGCGCCTCCCTATGTAGGTAGGTGGGAGGGAGTCCGGTTATGGCCC			770
Query 536	CACCTACTTCCGGGCAAYAGCCAATCGGCAGCAGGT-CCGGTCC--TTCACCCGCAGCAC			592
Sbjct 769	CACCTATTTCCGGGCAATAGC-AATCGGCAGCAGGTTCCGGTCTTTTTACCTGCAGCAC			711
Query 593	TTTTCCCATCCCGGCACACATTCCGCATTCTGTGCAGCCTTGCCAGCTGGTGAGCGGGCA			652
Sbjct 710	TTTTCCCATCCCGGCACGCATTCCGCATTCTGTGCAGCCTTGCCAGCTGGTGAGCGGGCA			651
Query 653	GAGCGGCAGGCCAGAGGTGCGGGTCTGTGGAGCAGCTGCAGCCAC 697			
Sbjct 650	GAGCGGCAGGCCAGAGGTGCGGGTCTGTGGAGCAGCTGCAGCCAC 606			

**Figura 17:** Resultados de correlações BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que evidenciam similaridades em sequências de base nitrogenadas, evidenciando alto índice de identidade entre a sequência obtida de galinha doméstica no presente trabalho e a sequência referência de *Gallus gallus* (*access* AB046699), referente à região MHM descrita por Teranish *et al.* (2001).



**Figura 18:** Resultados das análises de metilação do DNA da sub-região 1 do loco MHM em galinha doméstica, pelas estratégias de MSRE e MDRE seguidas de PCR multiplex, visualizados em gel de agarose 1%. A detecção do amplicon maior em machos após digestão com *HpaII* confirma a presença de metilação nas *repeats 1* da região MHM. Apesar da ausência do amplicon maior após digestão com *MspI* em machos e fêmeas, a presença do amplicon menor é sugestiva de artefatos técnicos devido à digestão parcial da região alvo. A detecção do amplicon maior em machos após digestão com *McrBC*, dependente de metilação sugere que nem todas as cópias das *repeats 1* encontram-se densamente metiladas em indivíduos deste sexo. Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; pb, pares de bases; F, fêmea; M, macho; C<sup>+</sup>, controle positivo (amostras de DNA não digeridas) C<sup>-</sup>, controle negativo (ausência de amostra de DNA em PCR).

### 4.3. Identificação e caracterização da região MHM em outras espécies de aves

Até recentemente, sequências MHM haviam sido somente identificadas em galinha doméstica e peru, espécies da ordem Galliformes (Teranishi *et al.*, 2001; Melamed & Arnold, 2007; Mank & Ellegren, 2009; Itoh *et al.*, 2011). Em 2015, um estudo realizado por Wright *et al.*, baseado em RNAseq (*RNA sequencing*) com o objetivo de revelar a ocorrência de moléculas de RNA e sua quantidade no genoma em um determinado período do desenvolvimento, evidenciou a presença da região MHM em outros Galliformes - *Numida meleagris* (galinha d'angola), *Pavo cristatus* (pavão) e *Phasianus colchicus* (faisão) - e também em espécies da ordem Anseriformes - *Anas platyrhynchos* (pato-real) e *Anser cygnoides* (ganso africano). Por outro lado, sequências MHM mostraram-se ausentes no passeriforme *Taeniopygia guttata* (mandarim) (Itoh *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014) e nos Struthioniformes *Dromaius novaehollandiae* (emu) e *Struthio camelus* (avestruz) (Wang *et al.*, 2014). Resultados preliminares de transcriptomas também sugerem a ausência de MHM nos Passeriformes *Corvus corone* (gralha preta) (Wolf & Bryk, 2011) e *Ficedula albicollis* (papa-mosca) (Uebbing *et al.*, 2013) e no Charadriiformes *Charadrius alexandrinus* (rolinha-da-praia) (Moghadam *et al.*, 2013), o que levou à proposição de que esta região genômica encontrava-se restrita a somente algumas ordens (Wright *et al.*, 2015).

Visando ampliar estes dados e verificar a presença de segmentos de DNA associados à região MHM em outras espécies de aves, dois *primers* específicos desenhados para galinha doméstica e utilizados em PCR multiplex (Caetano & Ramos, 2008) foram testados, no presente trabalho, em outras espécies de Galliformes (codorna européia e peru) e também em avestruz (Struthioniformes), coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-da-igreja (Strigiformes), tucanuçu (Piciformes), arara-azul-grande (Psittaciformes), beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura e beija-flor-preto (Apodiformes). Entretanto, a utilização destes *primers* em reações de amplificação multiplex não permitiu a obtenção de resultados de qualidade, dado que várias bandas inespecíficas foram geradas. Tal fato pode estar relacionado à dificuldade de correta padronização das temperaturas de anelamento de múltiplos *primers* em reações de amplificação aplicadas para espécies de famílias tão diversas.

O uso dos dois conjuntos de *primers* separadamente em PCR permitiu gerar produtos de amplificação mais precisos, visualizados em gel de agarose, para codorna européia, peru, avestruz, tucanuçu, arara-azul-grande, coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-da-igreja, coruja-buraqueira e beija-flor-da-banda-branca. Fêmeas e machos de cada uma destas espécies apresentaram dois fragmentos de tamanhos distintos, como já observado para galinha doméstica (Caetano & Ramos, 2008; presente trabalho) (Figuras 16 e 19).

Os dois fragmentos de DNA identificados em codorna e peru - com cerca de 240 e 750 pares de bases - mostraram tamanhos correspondentes aos visualizados para galinha doméstica (Caetano & Ramos, 2008; presente trabalho), o que pode refletir o maior grau de relação filogenética entre estas espécies, pertencentes à ordem Galliformes. Adicionalmente, os resultados de PCR gerados para avestruz (Figura 19), pertencente à ordem Struthioniformes, também se mostraram similares aos obtidos para galinha doméstica (Figuras 16 e 19). Tucanuçu, coruja-orelhuda, corujinha-domato, coruja-da-igreja, coruja-buraqueira, beija-flor-da-banda-grande e arara-azul-grande apresentaram diferenças evidentes em relação ao tamanho dos fragmentos menor e maior, quando comparados com estes mesmos segmentos isolados de galinha-doméstica (Figura 19), refletindo uma maior distância filogenética entre estas espécies.

Sequências nucleotídicas dos fragmentos de maior tamanho gerados para codorna européia, peru, avestruz e beija-flor-da-banda-branca foram comparadas com demais sequências depositadas no *GenBank*. Altos índices de identidade (80-97%) puderam ser observados entre as sequências obtidas de codorna européia, peru e avestruz e a sequência referência de *Gallus gallus* (access AB046699) descrita por Teranish *et al.* (2001) como correspondente à região MHM (Figuras 20, 21 e 22). Entretanto, o fragmento de DNA isolado de beija-flor-da-banda-branca não apresentou similaridade significativa com a sequência referência de galinha doméstica. Entre as espécies estudadas, o beija-flor-da-banda-branca apresentou a maior discrepância de tamanho em relação ao fragmento amplificado com o conjunto de *primers* MHMs e MHM2a - enquanto que em galinha doméstica foi gerado um segmento composto por cerca de 750 pares de bases (Caetano & Ramos, 2008; presente trabalho) (Figura 16), em exemplares de beija-flor-da-banda-branca foi amplificado um fragmento de cerca de 1.600 pares de bases (Figura 19). Análises futuras de similaridade nucleotídica poderão comprovar se os fragmentos de DNA amplificados para as demais espécies de beija-flor correspondem a segmentos da região MHM que podem ter divergido substancialmente das sequências identificadas em galinha doméstica e demais Galliformes.

Os resultados obtidos suportam a recente hipótese de que a região MHM possui uma ocorrência mais ampla em aves do que inicialmente pressuposto. Tal fato é especialmente corroborado pelos resultados obtidos para avestruz, cujas sequências nucleotídicas apresentaram alta identidade com a região MHM descrita para galinha doméstica. Desta forma, infere-se que a região MHM encontra-se presente também em Struthioniformes. Além disso, os resultados de PCR sugerem a ocorrência desta região também, embora de forma não tão conservada, em espécies de Strigiformes, Piciformes, Psittaciformes e Apodiformes. Assim, é possível que os pressupostos mecanismos de compensação de dose local ou de determinação

sexual/desenvolvimento gonadal anteriormente hipotetizados para Galliformes (Teranishi *et al.*, 2001; Heard, 2004; Chow *et al.*, 2005; Melamed & Arnold, 2007; Yang *et al.*, 2010) tenham evoluído em grupos diversos de aves. A ausência da região MHM em alguns grupos de aves, como já hipotetizado para Passeriformes (Itoh *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014) pode indicar que padrões regulatórios desta região foram secundariamente perdidos.

Informações prévias da literatura e os resultados do presente trabalho, acerca da presença/ausência da região MHM em diferentes espécies, podem ser correlacionados à história evolutiva das aves. Todas as espécies de aves atualmente existentes são inseridas no grupo Neornithes que, de acordo com dados morfológicos e moleculares, compreende dois clados - Paleognathae e Neognathae. Entre os Neognathae são incluídos Galloanserae (Galliformes e Anseriformes) e Neoaves (que compreende cerca de 95% das demais espécies) (e.g. Braun & Kimball, 2002; Cracraft *et al.*, 2004; bird.tree.org, 2015) (Figura 23).

Paleognathae representa a linhagem mais basal das aves modernas e diversos dados, especialmente baseados em marcadores moleculares, indicam uma origem monofilética (Cracraft *et al.*, 2004). Dentre os Paleognathae, Struthioniformes configuram-se como mais primitivos (Chatterjee, 2015) e a presença de repetições MHM em avestruz pode indicar que este segmento de DNA representa uma característica basal em aves. A superordem Galloanserae, que inclui Galliformes e Anseriformes, também forma um clado monofilético que teve origem cerca de 90 milhões de anos atrás (Van & Hedges, 2001). A presença da região MHM nestas duas ordens pode ser explicada pela alta sintenia (co-localização física de locos genéticos) do cromossomo sexual Z em espécies de Galloanserae (Skinner *et al.*, 2009). Adicionalmente, dados de hibridização cromossômica em avestruz, emu, ema e casuar utilizando sondas cromossômicas derivadas do cromossomo Z de *Gallus gallus* evidenciaram a ortologia cariotípica dos cromossomos sexuais, em nível molecular, entre Paleognathae e Galloanserae (Nishida-Umehara *et al.*, 2007).

Por outro lado, a filogenia das Neoaves permanece ainda extremamente controversa, especialmente porque estudos baseados em caracteres morfológicos e em marcadores moleculares têm apresentado dados discrepantes de relações entre as espécies (e.g. Wang *et al.*, 2002). Dentro deste clado, a real posição filogenética dos Passeriformes é ainda mais altamente discutível e alguns autores têm sugerido que tais espécies deveriam compor um grupo a parte (Cracraft, 2001; Ericson *et al.*, 2006; Livezey & Zusi, 2007; Brown *et al.* 2008, Hackett *et al.*, 2008). Novas análises em outras famílias e espécies de aves poderão melhor delinear a distribuição da região MHM entre as Neoaves.

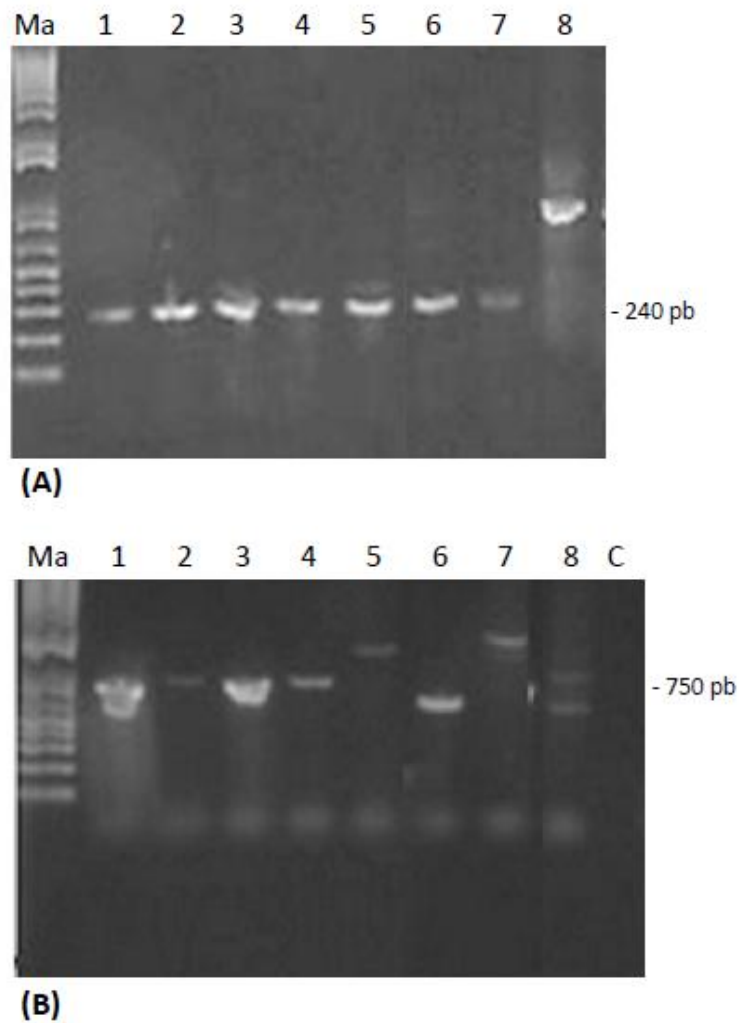


Ensaio de digestão enzimática foram realizados em amostras de DNA de codorna européia (adultos e embriões) e peru, ambos pertencentes à ordem Galliformes, visando verificar se estas espécies também apresentam os mesmos padrões de metilação da região MHM observados para galinha doméstica. Amostras de DNA destas espécies foram digeridas com *MspI*, *HpaII* e *McrBC* e posteriormente submetidas à amplificação utilizando o conjunto de *primers* MHMs e MHM2a que amplifica, em galinha doméstica, um segmento de aproximadamente 750 pares de bases (Caetano & Ramos, 2008). Digestões com as enzimas *HpaII* e *MspI* apresentaram resultados similares aos obtidos para galinha doméstica (Figura 18) - um único fragmento de DNA, de cerca de 750 pares de bases, foi observado, em gel de agarose, somente em machos de codorna e peru após aplicação da enzima *HpaII* e nenhum fragmento foi observado em amostras de machos e fêmeas destas duas espécies após clivagem com a enzima *MspI* (Figura 24). Conforme esperado, amostras de fêmeas de peru digeridas com a enzima *McrBC* evidenciaram uma única banda (Figura 24). Estes resultados confirmam os padrões diferenciais de metilação da região MHM também em codorna européia e peru, anteriormente já descritos para galinha doméstica, sendo não metilada em fêmeas e metilada em machos (Teranishi *et al.*, 2001; Caetano & Ramos, 2008; Itoh *et al.*, 2010). As amostras de fêmeas de codorna, submetidas à clivagem por *McrBC* que reconhece somente sequências não metiladas não apresentaram o padrão esperado. Embora não se possa descartar a possibilidade de ocorrência de problemas nos procedimentos de digestão, diferenças espécie-específicas nos sítios de reconhecimento da enzima podem ter levado aos resultados observados em codorna.

Até o momento, a sexagem molecular de aves tem sido essencialmente realizada via PCR com a utilização dos *primers* denominados P2 e P8 que amplificam uma região de íntron que difere em tamanho entre os genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* de diversas aves (Griffiths *et al.*, 1996; Ellegren & Parsch, 2007; Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson & Ellegren, 1999). Entretanto, tal metodologia não tem se mostrado adequada em algumas espécies, especialmente as das famílias Struthionidae e Rheidae devido à pequena diferença de tamanho da região alvo intrônica nos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* das aves ratitas como avestruz e ema (Ellegren, 1996; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Dawson *et al.*, 2001; Sacchi *et al.*, 2004; Huynen *et al.*, 2006; Reddy *et al.*, 2007; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Embora outras metodologias tenham sido testadas em espécies de Struthioniformes visando a inequívoca identificação de machos e fêmeas - como o uso de outros conjuntos de *primers* (Ito *et al.*, 2003; Chen *et al.*, 2012), a separação dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (Kahn *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 1999) e a aplicação de enzimas de restrição (Bermudez-Humaran *et al.*,

2002) - ainda não foi possível a obtenção de resultados satisfatórios. No presente estudo, os resultados dos ensaios de digestão enzimática na região MHM de exemplares de peru permitiram também a identificação de fragmentos diferenciais entre machos e fêmeas. Desta forma, a possível identificação de tais padrões diferenciais em machos e fêmeas nas espécies para as quais já foi identificada a presença de segmentos de DNA correspondentes à região MHM, como em avestruz, poderá ampliar a aplicação deste teste de sexagem molecular.



**Figura 19:** Resultados de PCR em amostras de DNA de diferentes espécies de aves evidenciando, em gel de agarose 1%, um fragmento de menor tamanho gerado com o conjunto de *primers* MHMs/MHMa (A) e um fragmento de maior tamanho gerado pelo conjunto de *primers* MHMs/MHM2a (B) associados à região MHM. Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; pb, pares de bases. 1 - galinha doméstica; 2 - codorna européia, 3 - peru. 4 - avestruz; 5 - tucanuçu; 6 - coruja-orelhuda (padrão também observado para as demais espécies de corujas); 7 - beija-flor-da-banda-branca; 8 - arara-azul-grande; C, controle negativo (ausência de amostra de DNA em PCR).

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
442 bits(239)	9e-128	499/622(80%)	28/622(4%)	Plus/Minus
Query 596	TGACGCTGCTG-T--GGCTGCAGCTGCTCCACAGACCCGCACCTCTGGCCTGCCGCTCTG			652
Sbjct 610	TGACGCTGCTGNTACGGCTGCAGCTCCTCCGCAGACCTGCACCTCTGGCCAGCCGCTCTG			551
Query 653	CCCGCTCACCAGCTGGCAAGGCTGCACAGAATGCGGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGT			712
Sbjct 550	TATGGGCACCAGCT-TTTA----GCACTGCAT--GGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGT			498
Query 713	GC---TGCAG-GTGAAAAGAACCAGAACTGCTGCCGATTG-CTATTGCCCGGAAATAGG			767
Sbjct 497	GCCGCGGCAGAAAGGAGAAAGGACAAGGACCCGCTTCCAATTGGCTACCCACCCGGAAGTGGG			438
Query 768	TGGGGCCATAAACCAGAACTCCCTCCCACCTACCTACATAGGGAGGGCGCCATTTTGTGGA			827
Sbjct 437	TGTGGCCAGAACCCAGAACTCCCTCCCACCTACCTACATAGGGAGGGCGCCATTTTGTGTA			378
Query 828	GCCTGCGTTCCACTCTGAGGAGCCGCCATTTTCATGCCACT-CCGTACG--CCACGTGGTT			884
Sbjct 377	CTCCACATTCCTACTCTCAGGAGCCGCCATTTTCATGTTACTTCCGTACCTCCCACGTGGTT			318
Query 885	TTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTTTTTCTTTAGCTCCTTCATATTTCCAGGCC			944
Sbjct 317	TTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTTCTTCTTTAACTCTTTCATACTCTCACGCC			258
Query 945	TCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCTTTGCTCCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGAT			1004
Sbjct 257	TCCCTCTGAATACGTGCCCAATTCCTTTGGTGCAGAGAAGCGCTCACAGGA-AAAACACAT			199
Query 1005	CCATTCTGCGCAGTGCACCCGGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCCCTC			1064
Sbjct 198	CCACTCCTACACAAGCTCACCGGGCAAAGGCGTCCCGGTGCTAGCGCTGCAGGCTGCGTTC			139
Query 1065	GTGTCTGGACACGGGGGTTTCTGGGAGACCAGGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCGA			1124
Sbjct 138	-TCT-T--ACACAGGGGTTTCTGG-AGACCAT-CTCTAC-TACCTGCACCTTGGTCCC-A			87
Query 1125	GCTAACCAGCTCCGCCGGCTCCACTTCTCGGTTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCC			1184
Sbjct 86	GCTAA-CAGTTCTGCCCGCTCCGCTTCTCATTTGGTTGTTGCAACCCACTCATCCCTTAC			28
Query 1185	GCATAAGGATCTGATGGGAAAT	1206		
Sbjct 27	ACATAAGCATCTGATGGGAAAT	6		

**Figura 20:** Resultados de correlações BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que evidenciam similaridades em sequências de base nitrogenadas. A correlação nucleotídica mostra alto índice de identidade entre as sequência nucleotídica obtida de codorna européia e a sequência referência de *Gallus gallus* (*access* AB046699), referente à região MHM descrita por Teranish *et al.* (2001).

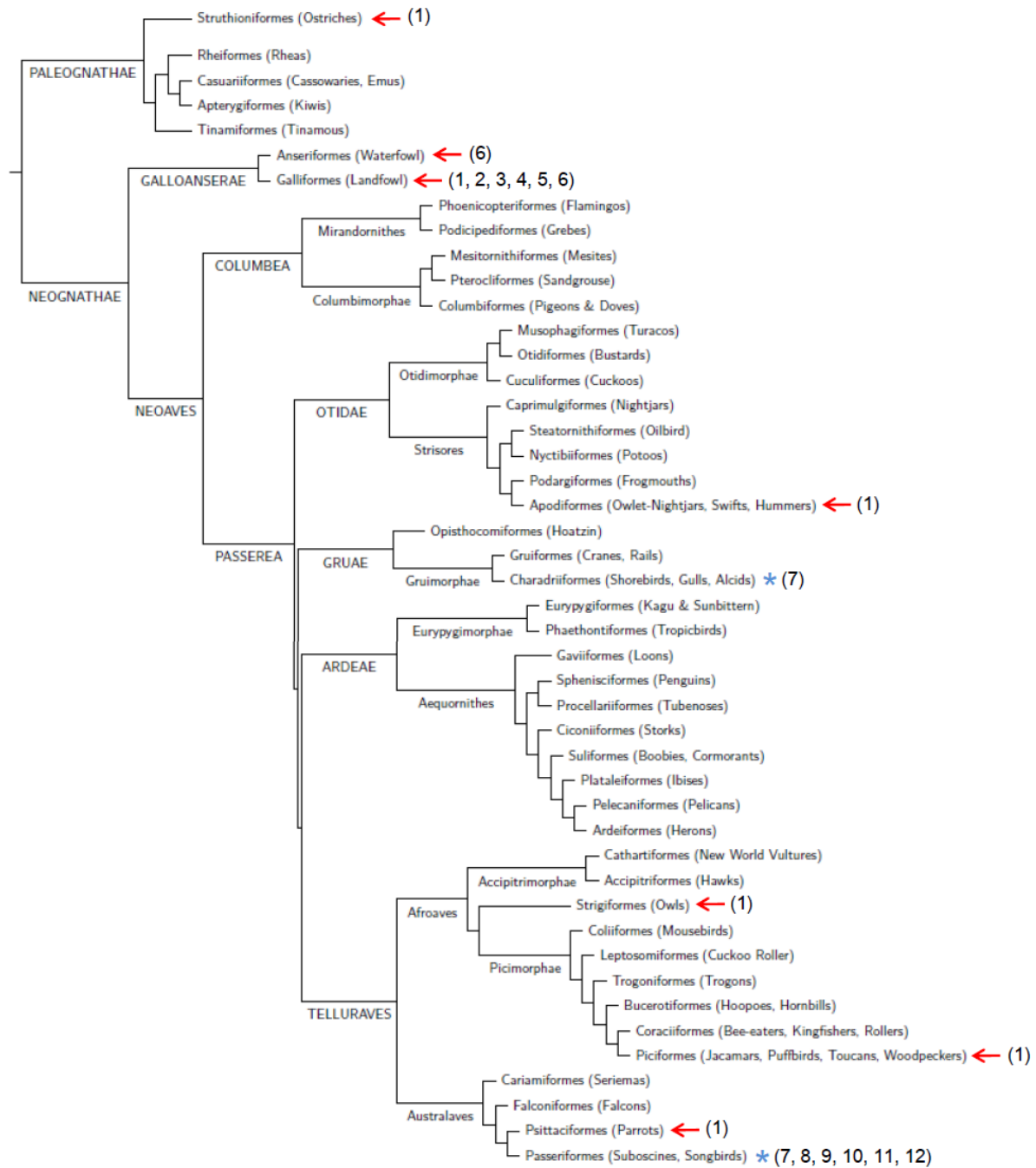
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
571 bits(309)	1e-166	488/580(84%)	16/580(2%)	Plus/Plus
Query 685	GCGGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGTGCTGCAGGTGAAAAGAACC			744
Sbjct 26	GCGGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAANTGCCGAGGTGAA--GGA-CTGTATCTGCTGCC			82
Query 745	GATT-GCTATTGCCCGGAAATAGGTGGGGCCATAACCGGAACTCCCTCCCACCTACCTAC			803
Sbjct 83	AATTGGCTAGAGCCCGGAAGTAGGTGGGGCCAGAACC			142
Query 804	ATAGGGAGGCGCCATTTTGTGGAGCCTGCGTTCCTACTCTGAGGAGCCGCCATTTTCATGC			863
Sbjct 143	ATAGGGAGGCGCCATTTTGTGTAAGTCCGCATTCCACCCTGAGGAGCCGCCATTTTCATGC			202
Query 864	CACTCCGTACGCCACGTGGTTTTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTTTTTT-CTTT			922
Sbjct 203	TACTCCGTACCCACGTGGTTTTGTACTGCTTAGGGCTCGGCTCCCTGGCTTTTTTNCCTT			262
Query 923	AGCTCCTTCATATCCCAGGCCCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCTTTGCTCCGGGAA			982
Sbjct 263	AACTCTTTGTAATCACAGGCCCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCTTTGGTCCGGGAA			322
Query 983	GTGCTCACATGACAAAA-CAGATCCATT-CCTGCGCAGTCGCACCGGGCAAAGGC-GT-C			1038
Sbjct 323	GCGCTCACAGGAAAAAACTCATCCATTNCCTACACAATCGCACCGGGCAAACACNGTNC			382
Query 1039	CCGGTGCTGGCGCTGGGGCTTCCCTCGTGTCTGGACACGGGGTTTCTGGGAGACCAGGC			1098
Sbjct 383	CCGGTGCTGGCGCTGGTGGCTGTCTCGTGTCT-GACGCCGGGGTTTCTGG-ANANCNGN-			439
Query 1099	GGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCAGCTAACCAGCTCCGCCGGCTCCACTTCTCGGTTG			1158
Sbjct 440	GG-AC-TACGGGCACTTTGATCCC-AGCTTGCAA-CTCCGCCAGCTCCACTTCTCACTTG			495
Query 1159	GCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAAGGATCTGATGGGAAATGCCTCGCCCTTT			1218
Sbjct 496	GCAACAGCGANNCGCTCGCGCTCCCGCATAAAGAACTGATGGGAANCCNNNNCCCTTT			555
Query 1219	AAGTGCGCCGCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAAC		1258	
Sbjct 556	AAGTGCAGCCTCTAGCCGTATGGTAAGACACAGATAAC		595	

**Figura 21:** Resultados de correlações BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que evidenciam similaridades em sequências de base nitrogenadas. A correlação nucleotídica mostra alto índice de identidade entre as sequência nucleotídica obtida de peru e a sequência referência de *Gallus gallus* (access AB046699), referente à região MHM descrita por Teranish *et al.* (2001).

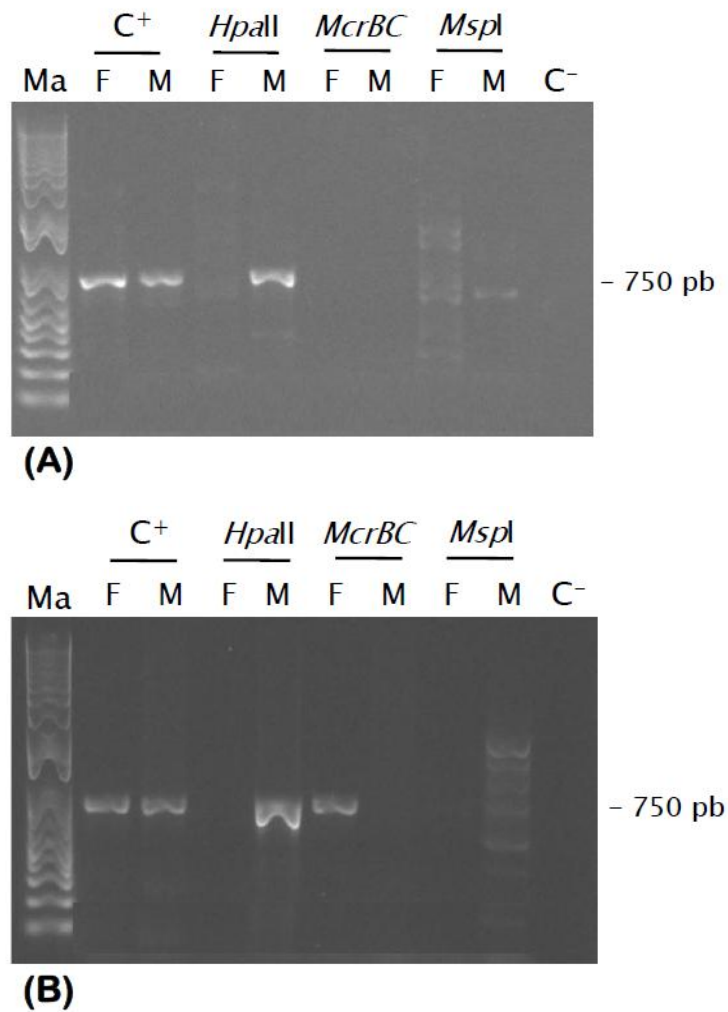
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1125 bits(609)	0.0	651/669(97%)	13/669(1%)	Plus/Minus
Query 618		GCTCCACAGA-CCCGCACCTCTGGCCTGCCGCTCTGCCCGCTCACCAGCTGGCAAGGCTG		676
Sbjct 660		GCTCCACAGACCCCGCACCTCTGGCCTGCCGCTCTGCCCGCTCACCAGCTGGCAAGGCTG		601
Query 677		CACAGAATGCGGAATGCGTGCCGGGATGGGAAAAGTGCTGCAGGTGAAAAGAACCAGAAC		736
Sbjct 600		CACAGAATGCGGAATGYGTGCCGGGATGGGAAAAGTGCTGCAGGTGAAAAGAACCAGAAC		544
Query 737		CTGCTGCCGATTG-CTATTGCCCGGAAATAGGTGGGGCCATAAACCAGAACTCCCTCCAC		795
Sbjct 543		CTGCTGCCGATTGGCTATTGCCCGGAAAGTAGGTGGGGCCATAAACCAGAACTCCCTCCAC		484
Query 796		CTACCTACATAGGGAGGCGCCATTTTGTGGAGCCTGCGTTCACCTCTGAGGAGCCGCCA		855
Sbjct 483		CTACCTACATAGGGAGGCGCCATTTTGTGGAGCCTGCGTTCACCTCTGAGGAGCCGCCA		424
Query 856		TTTCATGCCACTCCGTACGCCACGTGGTTTTTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTT		915
Sbjct 423		TTTCATGCCACTCCGTACGCCACGTGGTTTTTCTACTGCTTAGGGCTTGGCTCCCTGGCTT		364
Query 916		TTTCTTTAGCTCCTTCATATTTCCAGGCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCCTTGCT		975
Sbjct 363		TTTCTTTAGCTCCTTCATATTTCCAGGCTCCCTCTGACTGCGTGCCCAATTCCCTTGCT		304
Query 976		CCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCGCACCGGGCAAAGGC		1035
Sbjct 303		CCGGGAAGTGCTCACATGACAAAACAGATCCATTCTGCGCAGTCGCACCGGGCAAAGGC		244
Query 1036		GTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTTCTCGTGTCTGGACACGGGGGTTTCTGGGAGACCA		1095
Sbjct 243		GTCCCGGTGCTGGCGCTGGGGGCTGCTCGTGTCTG-ACACGGGGGTTTCTGG-AGACCA		186
Query 1096		GGCGGTACTTACGGGCGCTTTGGTCCCAGCTAACAGCTCCGCCGGCTCCACTTCTCGG		1155
Sbjct 185		G-CGGTAC-TACGGGCGCTTTGGTCCC-AGCTAA-CAGCTCCGCCGGCTCCACTTCTCGG		130
Query 1156		TTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAAGGATCTGATGGGAAATGCCT-CGCC		1214
Sbjct 129		TTGGCAACAGCAACTCACTCGCACCTCCCGCATAAAGGATCTGATGGGAAATGCCTTCCGC		70
Query 1215		CTTTAAGTGCGCCGCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAACCAAGGGCAGTCCC-GC		1273
Sbjct 69		CTTTAAGTGCGCCGCTCTTGCCTTGTGGAAAGGCACAGACAACCAAGGGCAGTCCCCGC		10
Query 1274		CAGAGGGCT 1282		
Sbjct 9		CAGAGGGCT 1		

**Figura 22:** Resultados de correlações BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) que evidenciam similaridades em seqüências de base nitrogenadas. A correlação nucleotídica mostra alto índice de identidade entre as seqüência nucleotídica obtida de avestruz e a seqüência referência de *Gallus gallus* (*access* AB046699), referente à região MHM descrita por Teranish *et al.* (2001).

## NEORNITHES: 46 Orders



**Figura 23:** Árvore filogenética de Neornithes (retirado de <http://jboyd.net/Taxo/List1.html> - dados baseados em Javies *et al.*, 2014). As setas indicam ordens que incluem espécies para as quais a região MHM já foi identificada. Asteriscos indicam ausência da região MHM. (1 - presente trabalho; 2 - Teranishi *et al.*, 2001; 3 - Melamed & Arnold, 2007; 4 - Mank & Ellegren, 2009; 5 - Itoh *et al.*, 2010; 6 - Wright *et al.*, 2015; 7 - Moghadam *et al.*, 2013; 8 - Itoh *et al.*, 2007; 9 - Warren *et al.*, 2010; 10 - Wang *et al.*, 2014; 11 - Uebing *et al.*, 2013; 12 - Wolf & Bryk, 2011).



**Figura 24:** Resultados de digestão enzimática de amostras de DNA de codorna européia (A) e peru (B) e posterior PCR para amplificação de um segmento de DNA de cerca de 750 pb, associado à região MHM e que inclui uma ilha CpG, visualizado em gel de agarose 1%. Ma, marcador de tamanho molecular conhecido; pb, pares de bases; F, fêmea; M, macho; C<sup>+</sup>, controle positivo (amostras de DNA não digeridas) C<sup>-</sup>, controle negativo (ausência de amostra de DNA em PCR).



## 5. Conclusões

Os resultados obtidos no presente trabalho permitiram concluir que:

(1) A região MHM encontra-se presente nos genomas de galinha doméstica, codorna européia, peru e avestruz. Tucanuçu, arara-azul-grande, coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-da-igreja, coruja-buraqueira e beija-flor-da-banda-branca potencialmente apresentam sequências correspondentes à região MHM.

(2) A região MHM de galinha doméstica possui uma organização genômica peculiar, estruturada ao longo de 260Kb no braço curto do cromossomo Z e composta por três unidades de repetições diferentes flanqueadas por LTRs específicas. As diferentes repetições e as LTRs associadas apresentam alto conteúdo de CG e parâmetros característicos de ilhas CpG.

(3) A porção central da repetição MHM, relacionada à sub-região 1, apresenta padrão de metilação diferencial entre os sexos, sendo hipometilada em fêmeas e hipermetilada em machos de galinha doméstica, codorna européia e peru.

(4) Métodos de sexagem molecular baseados na amplificação de fragmentos dos genes *CHDI-Z* e *CHDI-W* mostraram-se adequados para identificação de machos e fêmeas de galinha doméstica, codorna européia, peru, tucanuçu, arara-azul-grande, coruja-orelhuda, corujinha-do-mato, coruja-buraqueira, beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura e beija-flor-preto. Tais métodos não permitiram identificar quaisquer diferenças entre machos e fêmeas de avestruz.

(5) Ensaios de digestão enzimática seguidos de amplificação via PCR mostram-se potencialmente adequados para identificação de machos e fêmeas de espécies de aves que apresentem padrões de metilação diferenciais da região MHM entre os sexos.

## 6. Referências Bibliográficas

- Altschul SF *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology** **215**: 403-410, 1990. Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
- Angelopoulou R, Lavranos G, Manolakou P. Regulatory RNAs and chromatin modification in dosage compensation: a continuous path from flies to humans? **Reproductive Biology and Endocrinology** **6**: 1-12, 2008.
- Ansari H, Takagi N, Sasaki M. Morphological differentiation of sex chromosomes in three species of ratite birds. **Cytogenetics and Cell Genetics** **47**: 185-188, 1988.
- Arnold AP, Itoh Y, Melamed E. A bird eye view of sex chromosome dosage compensation. **Annual Review of Genomics and Genetics** **9**: 109-127, 2008.
- Ayers KL *et al.* RNA sequencing reveals sexually dimorphic gene expression before gonadal differentiation in chicken and allows comprehensive annotation of the W-chromosome. **Genome Biology** **14**: R26, 2013.
- Bachtrog D *et al.* Sex determination: Why so many ways of doing it? **PLoS Biology** **12**: 1-13, 2014.
- Backstrom N *et al.* Gene conversion drives the evolution of *HINTW*, an ampliconic gene on the female-specific avian W chromosome. **Molecular Biology and Evolution** **22**: 1992-1999, 2005.
- Baker AJ, Piersma T, Greenslade AD. Molecular vs. phenotypic sexing in red knots. **The Condor** **101**: 887-893, 1999.
- Berger SL *et al.* An operational definition of epigenetics. **Genes and Development** **23**: 781-783, 2009.
- Bermudez-Humaran LG *et al.* Loss of restriction site *DdeI*, used for avian molecular sexing in *Oreophasis derbianus*. **Reproduction of Domestic Animals** **37**: 321-323, 2002.
- Bertault *et al.* Sex determination in greater flamingo chicks through DNA analysis. **Waterbirds** **22**: 282-284, 1999.
- Bird A. Perceptions of epigenetics. **Nature** **447**: 396-398, 2007.
- Bisoni L *et al.* Female-specific hyperacetylation of histone H4 in the chicken Z chromosome. **Chromosome Research** **13**: 205-214, 2005.

- Bloom SE. Chromosome abnormalities in chicken (*Gallus domesticus*) embryos: types, frequencies and phenotypic effects. **Chromosoma** **37**: 309-326, 1972.
- Bonaminio GA, Fechheimer NS. The gonadal histology of triploid chicken (*Gallus domesticus*) embryos. **Genetics, Selection and Evolution** **25**: 201-210, 1993.
- Bone JR *et al.* Histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. **Genes and Development** **8**: 96-104, 1994.
- Braun EL, Kimball RT. Examining basal avian divergences with mitochondrial sequences: model complexity, taxon sampling, and sequence length. **Systematic Biology** **51**: 614-625, 2002.
- Brock HW, Fisher CL. Maintenance of gene expression patterns. **Developmental Dynamics** **232**: 633-655, 2005.
- Brown JW *et al.* Strong mitochondrial DNA support for a Cretaceous origin of modern avian lineages. **BMC Biology** **6**: 6, 2008.
- Brown TA. **Genomes**. 2nd edition. Oxford: Wiley-Liss, 2002.
- Bruford MW *et al.* Single locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoazel, AR (ed.). **Molecular Genetics Analysis of Populations. A Practical Approach**. 2nd edition. Oxford University Press, New York, p. 225-269, 1998.
- Caetano LC, Ramos ES. MHM assay: molecular sexing based on the sex-specific methylation pattern of the MHM region in chickens. **Conservation Genetics** **9**: 985-987, 2008.
- Caetano LC *et al.* Differential expression of the MHM region and of sex-determining-related genes during gonadal development in chicken embryos. **Genetics and Molecular Research** **13**: 838-849, 2014.
- Calladine CR *et al.* A study of electrophoretic mobility of DNA in agarose and polyacrylamide gels. **Journal of Molecular Biology** **221**: 981-1005, 1991.
- Chang HW *et al.* High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based real-time PCR combined with melting curve analysis. **BMC Biotechnology** **8**: 1-12, 2008.
- Charlesworth D, Mank JE. The birds and the bees and the flowers and the trees: lessons from genetic mapping of sex determination in plants and animals. **Genetics** **186**: 9-31, 2010.

- Chatterjee S. **The rise of birds: 225 million years of evolution**. 2nd edition. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 2015.
- Chen N *et al.* Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing. **BMC Genomics 13**: 183, 2012.
- Chow CM *et al.* Variant histone H3.3 marks promoters of transcriptionally active genes during mammalian cell division. **EMBO Reports 6**: 354-360, 2005.
- Chue J, Smith CA. Sex determination and sexual differentiation in the avian model. **FEBS Journal 278**: 1027-1034, 2011.
- Claver JA, Quaglia AIE. Comparative morphology, development, and function of blood cells in non mammalian vertebrates. **Journal of Exotic Pet Medicine 18**: 87-97, 2009.
- Cortes O, Barroso A, Dunner S. Avian sexing: an optimized protocol using polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism. **Journal of Veterinary Diagnostic and Investigation 11**: 297-299, 1999.
- Cracraft J. Avian evolution, Gondwana biogeography and the Cretaceous-Tertiary mass extinction event. **Proceedings of Biology Sciences 268**: 459-469, 2001.
- Cracraft J *et al.* Phylogenetic relationships among modern birds (Neornithes): toward an avian tree of life. In: Cracraft J, Donoghue MJ (eds.) **Assembling the tree of life**. Oxford University Press, New York, pp. 468-489, 2004.
- Dawson *et al.* A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. **Molecular Ecology Notes 1**: 201-204, 2001.
- Deeming DC, Bubier NE. Behaviour in natural and captive environments. In: Deeming DC (ed.). **The ostrich: Biology, production and health**. CABI Publish, Cambridge, 1999.
- Double MC, Olsen P. Simplified PCR-based sexing assists conservation of an endangered owl, the Norfolk Island Boobook *Ninox novaeseelandiae undulata*. **Bird Conservation International, 7**: 283-286, 1997.
- Drummond AJ. **Genetics 4.8.5**, 2009. Disponível em: ([www.geneious.com](http://www.geneious.com)).
- Duan W, Fuerst PA. Isolation of a sex-linked DNA sequence in cranes. **Journal of Heredity 92**: 392-397, 2001.

- Dubiec A, Zagalska-Neubauer M. Molecular techniques for sex identification in birds. **Biological Letters**, **43**: 3-12, 2006.
- Eaton S. Wild Turkey (*Meleagris gallopavo*). In: **The Birds of North America**, Vol. 22A. Poole P, Stettenheim F, Gill F (eds.). The Academy of Natural Sciences, The American Ornithologists' Union, Washington, p. 1-28, 1992.
- Ellegren H. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. **Proceedings of the Royal Society of London B - Biological Sciences** **263**: 1635-1341, 1996.
- Ellegren H, Parsch J. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. **Nature Review Genetics** **8**: 689-698, 2007.
- Ericson PGP *et al.* Diversification of Neoaves: integration of molecular sequence data and fossils. **Biology Letters** **2**: 543-547, 2006.
- Etches RJ. **Reproduction in Poultry**. CAB International. Oxford, UK, 1996.
- Ewen *et al.* Primary sex ratio bias in an endangered cooperatively breeding bird, the black-eared miner, and its implications for conservation. **Biology Conservation** **101**: 137-145, 2001.
- Fujita K, Silver J. Single-strand conformational polymorphism. **Genome Research** **4**: 137-140, 1994.
- Fridolfsson A, Ellegren H. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology** **30**: 116-121, 1999.
- Gable T, Zarkower D. Sex determination. **Current Biology** **22**: 8257-8262, 2012.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology** **20**: 261-821, 1987.
- Gardiner-Garden M, Frommer M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology** **196**: 261-282, 1987.
- Gilbert SF. **Developmental Biology**. 7th edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 2003.
- Glavac D, Dean M. Optimization of the single-strand conformation polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. **Human Mutations** **2**: 404-414, 1993.

- Grando AP. **Utilização de tomografia por ressonância magnética nuclear para sexagem de aves silvestres sem dimorfismo sexual.** 107f. Dissertação (Mestrado em Bioengenharia) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, SP, 2002.
- Graves JAM. Sex chromosome specialization and degeneration in mammals. **Cell** **124**: 901-14, 2006.
- Graves JAM, Shetty S. Sex from W to Z: Evolution of vertebrate sex chromosomes and sex determining genes. **Journal of Experimental Zoology** **290**: 449-462, 2001.
- Graves JAM, Peichel CL. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or limited options? **Genome Biology** **11**: 205, 2010.
- Griffin DK *et al.* Whole genome comparative studies between chicken and turkey and their implications for avian genome evolution. **BMC Genomics** **9**: 168, 2008.
- Griffiths R *et al.* A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology** **7**: 1071-1075, 1998.
- Griffiths R, Daan S, Dijkstra C. Sex identification in birds using two CHD genes. **Proceedings of the Royal Society of London B** **263**: 1251-1256, 1996.
- Griffiths R, Tiwari B. Sex of the last wild Spixi's macaw. **Nature** **375**: 454, 1995.
- Griffiths R, Phil D. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine** **9**: 14-26, 2000.
- Gubbay J *et al.* A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a novel family of embryonically expressed genes. **Nature** **346**: 245-250, 1990.
- Hackett SJ *et al.* A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. **Science** **320**: 1763-1768, 2008.
- Harvey MG *et al.* A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. **Journal of Field Ornithology** **2**: 136-140, 2006.
- Heard E. Recent advances in X-chromosome inactivation. **Current Opinion on Cell Biology** **16**: 247-255, 2004.
- Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cellular and Molecular Life Sciences** **61**: 2571-2587, 2004.
- Hillier LW *et al.* Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature** **432**: 695-716, 2004.

- Hinckley JD *et al.* Identification and development of sex specific DNA markers in the ostrich using Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Poultry Science** **4**: 663-669, 2005.
- Hornfeldt *et al.* Sex ratio and fledging success of supplementary-fed Tengmalm's owl broods. **Molecular Ecology** **9**: 187-192, 2000.
- Huynen L, Miles J, Lambert D. Unusual electrophoretic mobility of a DNA fragment of the universal 'non-ratite' sexing marker CHD allows sexing of New Zealand's endangered kiwi ratite *Apteryx* spp. **IBIS** **148**: 167-168, 2006.
- Ijiri S *et al.* Sexual dimorphic expression of genes in gonads during early differentiation of a teleost fish, the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. **Biology and Reproduction** **78**: 333-341, 2008.
- International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature** **432**: 695-716, 2004.
- Ito H *et al.* Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. **Zoological Science** **20**: 339-344, 2003.
- Itoh Y, Mizuno S. Molecular and cytological characterization of *SspI*-family repetitive sequence on the chicken W chromosome. **Chromosome Research** **10**: 499-511, 2002.
- Itoh Y *et al.* Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. **Journal of Biology** **6**: 2, 2007.
- Itoh Y *et al.* Sex bias and dosage compensation in the zebra finch versus chicken genomes: general and specialized patterns among birds. **Genome Research** **20**: 512-518, 2010.
- Itoh Y, Kampf K, Arnold AP. Possible differences in the two Z chromosomes in male chicken and evolution of MHM sequences in Galliformes. **Chromosoma** **120**: 587-598, 2011.
- James H, Renard JP. Epigénétique et construction du phénotype, un enjeu pour les productions animales? (Epigenetics and construction of the phenotype: a challenge for animal production). **INRA Production Animal** **23**: 23-42, 2010.
- Jarvi S, Banko P. Application of a PCR based approach to identify sex in Hawaiian honeycreepers (Drepanidinae). **Pacific Conservation Biology** **6**: 14-17, 2000.
- Javies *et al.* Whole-genome analyses resolve early branches in the tree of life of modern birds. **Science** **346**: 1320-1331, 2014

- Jensen *et al.* Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels, and feathers. **Zoo Biology** **22**: 561-571, 2003.
- Jirtle RL, Skinner MK. Environmental epigenomics and disease susceptibility. **Nature Reviews Genetics** **8**: 253-262, 2007.
- Jodice *et al.* Sexing adult black-legged kittiwakes by DNA, behavior, and morphology. **Waterbirds** **23**: 405-415, 2000.
- Jurka J. Repbase Update: a database and an electronic journal of repetitive elements. **Trends in Genetics** **16**: 418-420, 2000.
- Kahn NW, St. John J, Quinn TW. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. **Auk** **115**: 1074-1078, 1998.
- Kinizetova H. Growth and carcass traits of Japanese quail. **Zivocisna Vyroba** **41**: 225-233, 1996.
- Komdeur *et al.* Extreme adaptive modification in sex ratio of the Seychelles warbler's eggs. **Nature** **385**: 522-525, 1997.
- Küpper C *et al.* Triploid plover female provides support for a role of the W chromosome in avian sex determination. **Biology Letters** **8**: 787-789, 2012.
- Lee SV, Bahaman AR. Modified gel preparation for distinct DNA fragment analysis in agarose gel electrophoresis. **Tropical Biomedicine** **27**: 351-354, 2010.
- Lens *et al.* Highly skewed sex ratios in the critically endangered Taita thrush as revealed by CHD genes. **Biodiversity and Conservation** **7**: 869-873, 1998.
- Lepert *et al.* Sex identification in four owl species from Idaho: DNA and morphometrics. **Journal of Raptor Research** **40**: 291-294, 2006.
- Li J *et al.* *NotI* subtraction and *NotI*-specific microarrays to detect copy number and methylation change in whole genomes. **Proceedings of the Natural Academy of Science USA** **99**: 10724-10729, 2002.
- Lin M *et al.* Development of the gonads in the triploid (ZZW and ZZZ) fowl, *Gallus domesticus*, and comparison with normal diploid males (ZZ) and females (ZW). **Reproduction Fertility Development** **7**: 1185-1197, 1995.



- Livezey BC, Zusi RL. Higher-order phylogeny of modern birds (Theropoda, Aves: Neornithes) based on comparative anatomy. Analysis and discussion. **Zoological Journal of the Linnean Society** **149**: 1-95, 2007.
- Mank JE, Hosken DJ, Wedell N. Some inconvenient truths about sex chromosome dosage compensation and the potential role of sexual conflict. **Evolution** **65**: 2133-2144, 2011.
- Mank JE, Ellegren H. Sex-linkage of sexually antagonistic genes is predicted by female, but not male-effect in birds. **Evolution** **63**: 1464-1472, 2009.
- Manolakou P, Lavranos G, Angelopoulou R. Molecular patterns of sex determination in the animal kingdom: a comparative study of the biology of reproduction. **Reproductive Biology and Endocrinology** **4**: 59, 2006.
- Martin *et al.* An approach to sexing young great bustards *Otis tarda* using discriminant analysis and molecular techniques. **Bird Study** **47**: 147-153, 2000.
- McQueen HA, Clinton M. Avian sex chromosomes: dosage compensation matters. **Chromosome Research** **17**: 687-97, 2009.
- Melamed E, Arnold AP. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. **Genome Biology** **8**: 202, 2007.
- Mine OM. Application of a sex identification technique in juvenile ostriches and its potential application in Botswana. **South African Journal of Animal Science** **32**: 160-163, 2002.
- Miyaki CY *et al.* Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies. **Zoo Biology** **17**: 415-423, 1998.
- Moghadam HK *et al.* The plover neurotranscriptome assembly: transcriptomic analysis in an ecological model species without a reference genome. **Molecular Ecology Resources** **13**: 696-705, 2013.
- Morey C, Avner P. The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. **Plos Genetics** **7**: 1-11, 2011.
- Morinha F *et al.* Molecular sexing and analysis of *CHDI-Z* and *CHDI-W* sequence variations in wild common quail (*Coturnix c. coturnix*) and domesticated Japanese quail (*Coturnix c. japonica*). **Journal of Genetics** **90**: 39-43, 2011.
- Morrish BC, Sinclair AH. Vertebrate sex determination: many means to an end. **Reproduction** **124**: 447-57, 2002.

Nanda I *et al.* Conserved synteny between the chicken Z sex chromosome and human chromosome 9 includes the male regulatory gene *DMRT1*: a comparative (re)view on avian sex determination. **Cytogenetics and Cell Genetics** **89**: 67-78, 2000.

NCBI Genome, 2015. Disponível em ([www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/genome/assembly/grc)).

Nguyen DK, Disteche CM. Dosage compensation of the active X chromosome in mammals. **Nature Genetics** **38**: 47-53, 2006.

Nishida-Umehara C *et al.* Differentiation of Z and W chromosomes revealed by replication banding and FISH mapping of sex-chromosome-linked DNA markers in the cassowary (Aves, Ratitae). **Chromosome Research** **7**: 635-640, 1999.

Nishida-Umehara C *et al.* The molecular basis of chromosome orthologies and sex chromosomal differentiation in palaeognathous birds. **Chromosome Research** **15**: 721-734, 2007.

Oliver B, Parisi M. Battle of the Xs. **BioEssays** **26**: 543-548, 2004.

Park Y, Kuroda MI. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. **Science** **293**: 1083-1085, 2001.

Penman DJ, Piferrer F. Fish gonadogenesis. Part I: genetic and environmental mechanisms of sex determination. **Review on Fish Sciences** **16**: 16-34, 2008.

Piferrer F. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. **Developmental Dynamics** **242**: 360-370, 2013.

Pough FH, Janis CM, Heiser JB. **Vertebrate Life**. 7th edition. Pearson Prentice Hall, New Jersey, 2005.

Raymond CS *et al.* Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. **Developmental Biology** **215**: 208-220, 1999.

Reddy A, Prakash V, Shivaji S. A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (white-backed and long-billed vultures) - Implications for captive breeding programmes. **Current Science** **92**: 659-662, 2007.

Robertson BC, Gemmill NJ. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology? **Conservation Genetics** **7**: 267-271, 2006.

Roeszler KN, Sinclair AH, Smith CA. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis. **Developmental Biology** **366**: 317-326, 2012.

- Russello MA, Amato G. Application of a noninvasive, PCR-based test for sex identification in an endangered parrot, *Amazona guildingii*. **Zoo Biology** **20**: 41-45, 2001.
- Russo VEA, Martienssen RA, Riggs AD. **Epigenetic mechanisms of gene regulation**. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Woodbury, 1996.
- Rutkowska J, Lagisz M, Nakagawa S. The long and the short of avian W chromosomes: no evidence for gradual W shortening. **Biology Letters** **8**: 636-638, 2012.
- Sacchi P *et al.* A non-invasive test for sex identification in short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). **Molecular and Cellular Probes** **18**: 193-196, 2004.
- Saitoh Y *et al.* Occupancy of the majority of DNA in the chicken W chromosome by bent-repetitive sequences. **Chromosoma** **101**: 32-40, 1991.
- Schuelke M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature America Inc** **18**: 233-234, 2000.
- Segelbacher G. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. **Molecular Ecology Notes** **2**: 367-369, 2002.
- Shan Z *et al.* Sex-specific expression of an evolutionarily conserved male regulatory gene, *DMRT1*, in birds. **Cytogenetics and Cell Genetics** **89**: 252-257, 2000.
- Shepard JM, Cattersall CP, Hughes JM. Discrimination of sex in the White-bellied Sea-Eagle, *Haliaeetus leucogaster*, using genetic and morphometric techniques. **Emu** **104**: 83-87, 2004.
- Sinclair AH *et al.* A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. **Nature** **346**: 240-244, 1990.
- Skinner *et al.* Comparative genomics in chicken and Pekin duck using FISH mapping and microarray analysis. **BMC Genomics** **10**: 357, 2009.
- Smit AFA, Hubley R, Green P. **RepeatMasker Open-3.0**, 2010. Disponível em: (<http://www.repeatmasker.org.1996-2010>).
- Smith CA *et al.* Conservation of a sex-determining gene. **Nature** **402**: 601-602, 1999.
- Smith CA. Sex determination in birds: Hints from the W sex chromosome? **Sex Developmental** **1**: 279-85, 2007.
- Smith CA, Sinclair AH. Sex determination: insights from the chicken. **Bioessays** **26**: 120-132, 2004.

- Smith CA *et al.* The avian Z-linked gene *DMRT1* is required for male sex determination in the chicken. **Nature** **461**: 267-271, 2009.
- Smith ER *et al.* A human protein complex homologous to the *Drosophila* MSI complex is responsible for the majority of histone H4 acetylation at lysine 16. **Molecular and Cell Biology** **25**: 9175-9188, 2005.
- Solari AJ. **Sex chromosomes and sex determination in vertebrates**. CRC Press, Boca Raton, 1994.
- Straub T, Becker PB. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. **Nature Reviews Genetics** **8**: 47-57, 2007.
- Strokes DG, Perry RP. DNA-binding and chromatin localization properties of *CHDI*. **Molecular and Cell Biology** **15**: 2745-2753, 1995.
- Takagi N, Sasaki M. A phylogenetic study of bird karyotypes. **Chromosoma** **46**: 91-120, 1974.
- Takai D, Jones PA. Comprehensive analysis of CpG islands in human chromosomes 21 and 22. **Proceeding of the Natural Academy of Sciences USA** **99**: 3740-3745, 2002.
- Technelysium Pty Ltd. **Chromas lite version 2.01**, 2007. Disponível em: ([http://www.technelysium.com.au/chromas\\_lite.html](http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html)).
- Teranishi M *et al.* Transcripts of the MHM region on the chicken Z chromosome accumulate as non-coding RNA in the nucleus of female cells adjacent to the *DMRT1* locus. **Chromosome Research** **9**: 147-165, 2001.
- Teranishi M, Mizuno S. The Male Hypermethylation (MHM) Region on the chicken Z chromosome: female-specific transcription and its biological implication. **Chromosomes Today** **14**: 45-53, 2004.
- Turner BM. Epigenetic responses to environmental change and their evolutionary implications. **Philos Transactions of the Royal Society of Lond B Biological Sciences** **364**: 3403-3418, 2009.
- Uebbing S *et al.* Transcriptome sequencing reveals the character of incomplete dosage compensation across multiple tissues in flycatchers. **Genome Biology and Evolution** **5**: 1555-1566, 2013.
- Valenzuela N, Lance VA. Evolution and maintenance of temperature dependent sex determination. In: **Vertebrates**. Smithsonian Books, Washington, p. 131-147, 2004.

- Vallender EJ, Lahn BT. How mammalian sex chromosomes acquired their peculiar gene content. **BioEssays** **26**: 159-69, 2004.
- Van TM & Hedges SB. Calibration of avian molecular clocks. **Molecular Biology and Evolution** **18**: 206-213, 2001.
- Walker MR, Rapley R. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999.
- Wang B *et al.* Whole genome sequencing of the Black grouse (*Tetrao tetrix*): reference guided assembly suggests faster-Z and MHC evolution. **BMC Genomics** **15**: 180, 2014.
- Wang LC *et al.* Sex identification of owls (Family Strigidae) using oligonucleotide microarrays. **Journal of Heredity** **99**: 187-192, 2008.
- Warren WC *et al.* The genome of a songbird. **Nature** **464**: 757-762, 2010.
- Westermeier R. **Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations**. 4th edition. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co, Weinheim, 2005.
- Wink *et al.* The use of PCR to sex Old World vultures (Aves: Accipitridae). **Molecular Ecology** **7**: 779-782, 1998.
- Wolf JBH, Bryk J. General lack of global dosage compensation in ZZ/ZW systems? Broadening the perspective with RNA-seq. **BMC Genomics** **12**: 91, 2011.
- Wright AE *et al.* Conservation of regional variation in sex-specific sex chromosome regulation. **Genetics** **201**: 587-98, 2015.
- Yang X *et al.* Exogenous cMHM regulates the expression of *DMRT1* and ER alpha in avian testes. **Molecular Biology and Reproduction** **37**: 1841-1847, 2010.
- Zhang SO *et al.* Sex-dimorphic gene expression and ineffective dosage compensation of Z-linked genes in gastrulating chicken embryos. **BMC Genomics** **11**: 11-13, 2010.
- Zhao D, McBride D, Nandi S *et al.* Somatic sex identity is cell autonomous in the chicken. **Nature** **464**: 237-242, 2010.
- Zilberman D, Henikoff A. Genome-wide analysis of DNA methylation patterns. **Development** **134**: 3959-3965, 2007.

## APÊNDICE I

**Dados de identificação do sexo dos exemplares estudados.** Sexagem baseada na visualização de características morfológicas externas (CME), sexagem molecular baseada na amplificação e visualização de fragmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* em gel de agarose (AGAR), gel de poliacrilamida (POL), análise SSCP (SSCP) e genotipagem automatizada (GA).

Amostra	Ordem	Família	Espécie	Sexo	Métodos de sexagem
21G*	Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> (galinha doméstica)	F	AGAR
22G*				M	AGAR
23G*				M	AGAR
24G*				M	AGAR
25G*				M	AGAR
26G*				M	AGAR
27G*				F	AGAR
28G*				M	AGAR/GA
29G*				M	AGAR
30G*				F	AGAR/SSCP
31G*				M	AGAR
32G*				M	AGAR
33G*				M	AGAR
34G*				F	AGAR
35G*				M	AGAR
36G*				F	AGAR/GA/SSCP
37G*				F	AGAR
38G*				M	AGAR
39G*				F	AGAR
40G*				F	AGAR
41G*				M	AGAR
42G*				M	AGAR
45				F	CME/AGAR
46				F	CME/AGAR
47				F	CME/AGAR
48				F	CME/AGAR
49				F	CME/AGAR
50				M	CME/AGAR/SSCP
51				M	CME/AGAR
52				M	CME/AGAR
53				M	CME/AGAR/SSCP
115				F	CME/POL
42G*				M	AGAR
45				F	CME/AGAR
46				F	CME/AGAR
47				F	CME/AGAR
48				F	CME/AGAR
49				F	CME/AGAR
50				M	CME/AGAR
51				M	CME/AGAR
52				M	CME/AGAR
53				M	CME/AGAR

115	Galliformes	Phasianidae	<i>Coturnix coturnix</i> (codorna européia)	F	CME/POL			
116				F	CME/POL			
117				M	CME/POL/GA			
118				M	CME/POL			
119				M	CME/POL			
120				F	CME/POL			
121				F	CME/POL/GA/SSCP			
122*				M	CME/POL/SSCP			
123*				M	POL			
124*				M	POL			
125*				F	POL			
126*				M	POL			
127*				M	POL			
128*				M	POL			
129*				M	POL			
130*				F	POL			
131*				M	POL			
132*				M	POL			
133*				M	POL			
134*				M	POL			
135*				F	POL			
136*				M	POL			
137*				M	POL			
P1				Struthioniformes	Struthionidae	<i>Meleagris gallopavo</i> (peru)	M	POL
P2							M	POL
P3							F	CME/POL/GA/SSCP
P4							F	CME/POL
P5							M	CME/POL
P6	M	CME/POL/GA/SSCP						
Alejandro	Struthioniformes	Struthionidae	<i>Struthio camelus</i> (avestruz)				M	CME/GA/SSCP
Cassandra				F	CME/GA/SSCP			
Marrie				F	CME			
1	Strigiformes	Strigidae	<i>Asio clamator</i> (coruja-orelhuda)	F	POL/GA/SSCP			
2				M	POL/GA/SSCP			
3				F	POL/GA			
7		Strigidae	<i>Megascops choliba</i> (corujinha-do-mato)	F	POL/GA			
13				<i>Athene cunicularia</i> (coruja-buraqueira)	F	POL/GA		
8		Tytonidae	<i>Tyto furcata</i> (coruja-da-igreja)	F	POL/GA			
80	Piciformes	Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i> (tucanuçu)	M	AGAR/SSCP			
81				F	AGAR/GA/SSCP			
82				M	AGAR/GA			
83				M	AGAR			
LGA1	Psittaciformes	Psittacidae	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (arara-azul-grande)	M	AGAR/SSCP			
LGA2				F	AGAR/GA			
LGA3				F	AGAR/GA/SSCP			
LGA4				F	AGAR			

B1	Apodiformes	Trochilidae	<i>Amazilia versicolor</i> (beija-flor-da-banda-branca)	M	POL	
B2				F	POL	
B3				M	POL/SSCP	
B4				F	POL/SSCP	
B12					F	POL**/SSCP
B13					M	POL**/SSCP
B14					F	POL/SSCP
B15					F	POL/SSCP

\*embriões

\*\*sexagem realizada pelo Prof. Dr. Jaes Joseph Roper (Universidade Federal do Paraná)