

Sexagem molecular em aves: abordagens genéticas e epigenéticas

Bruna Cristina Jeronimo

Botucatu/SP

2020



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Sexagem molecular em aves: abordagens genéticas e epigenéticas

Doutoranda: Bruna Cristina Jeronimo
Orientadora: Prof^a. Dra. Adriane Pinto Wasko
Coorientadora: Prof^a. Dra. Claudia Aparecida Rainho

Tese 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 Doutora.

Botucatu/SP

2020

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

Jeronimo, Bruna Cristina.

Sexagem molecular em aves : abordagens genéticas e epigenéticas / Bruna Cristina Jeronimo. - Botucatu, 2020

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Adriane Pinto Wasko

Coorientador: Claudia Aparecida Rainho

Capes: 20204000

1. Aves. 2. Análise para determinação do sexo. 3. Sexo - Determinação genética. 4. Epigenética.

Palavras-chave: Aves; CHD; MHM; Sexagem molecular; Spindlin.

“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e fora da alegria”

Paulo Freire

Dedicatória

À todos os cientistas brasileiros, que, apesar de todas as dificuldades persistem produzindo ciência de qualidade em um país onde a profissão é tão desvalorizada.

Agradecimentos

Primeiramente quero agradecer minha família, minha base. Muito obrigada por sempre apoiarem minhas escolhas, por me darem força em momentos difíceis e por acreditarem em mim. Amo vocês.

À minha orientadora, Adriane. Agradeço por caminhar junto comigo nestes 6 anos, entre mestrado e doutorado. Obrigada pela paciência, pela compreensão e pelos ensinamentos.

À minha coorientadora, Claudia. Obrigada por todo o ensinamento que me trouxe nestes anos que trabalhamos juntas.

Ao meu grande amigo, Aduino. Você não imagina a diferença que fez e faz na minha vida. Agradeço primeiramente pela sua amizade, pelos conselhos sempre sensatos e por me fazer rir em qualquer situação. Além da ajuda na vida pessoal, você ainda foi fundamental nesta parte final do meu doutorado. Este trabalho não seria o mesmo sem as suas contribuições. Obrigada!

Às amigas que a pós-graduação me trouxe: Camila, Jordana, Mari, Érica, Talita. Vocês foram fundamentais em todo esse processo. Seja na ajuda no laboratório, nas correções, congressos, nas muitas conversas e também nos momentos de descontração.

Aos membros do Laboratório de Genética Animal: Val, Marielly, Bianca, Bruna e Talita. Vou sentir muitas saudades do tempo que passamos juntas. Obrigada por deixarem os dias no laboratório mais leves.

Aos professores, funcionários e colegas do Dep. de Ciências Químicas e Biológicas por toda a colaboração ao longo destes anos.

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

Às agências de fomento, CNPq e Fapesp, pelo suporte financeiro, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho.

Resumo

Estima-se que aproximadamente 50% das espécies de aves não podem ter o sexo identificado por meio de características externas. A capacidade de identificar de maneira correta o sexo das aves é fundamental para o sucesso de estudos comportamentais, ecológicos, como também programas de reprodução em cativeiro com espécies ameaçadas de extinção. A identificação do gene *CHD1* (*Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1*) possibilitou inúmeros avanços na sexagem molecular de aves. Este gene está presente nos cromossomos sexuais Z e W, as fêmeas possuem duas cópias diferentes, *CHD1-Z* e *CHD1-W*, enquanto os machos possuem duas cópias iguais do gene *CHD1-Z*. Recentemente, foi descrito um novo marcador associado a um loco que também apresenta homólogos nos cromossomos Z e W do gene *Spindlin*. Adicionalmente alguns autores também sugerem explorar diferenças epigenéticas entre machos e fêmeas com o intuito de identificar o sexo dos mesmos. No presente trabalho foram testados marcadores que exploram diferenças de tamanhos entre alelos dos genes *CHD1* (P2/P8) e *Spindlin* (SPIN12/SPIN13), de genes específicos ao cromossomo W (*ASW* e *XhoI*) e também de um *locus* que apresenta diferenças de metilação de DNA entre machos e fêmeas de membros da superordem Galloanserae (MHM). Os marcadores relacionados ao cromossomo W não apresentaram resultados positivos, em contraposição os *primers* P2/P8 mostraram-se efetivos na sexagem molecular de indivíduos das ordens Piciformes e Psittaciformes, já amplificações com os marcadores SPIN12/SPIN13 apresentaram padrões sexo-específicos facilmente observáveis em géis de agarose em espécies das ordens Galliformes, Apodiformes e em exemplares de Corujinha-orelhuda. Nossos resultados demonstram que a escolha de um marcador molecular adequado para a identificação do sexo em aves está diretamente ligada a espécie em estudo e ao modo de visualização dos fragmentos gerados. Enquanto em algumas espécies os padrões sexo-específicos podem ser facilmente observáveis em agarose, outros dependem de métodos mais resolutivos, como poliacrilamida ou ainda, eletroforese capilar.

Palavras-chave: sexagem molecular, aves, *CHD*, *Spindlin*, *MHM*

Abstract

It is estimated that approximately 50% of bird species cannot have their sex identified by means of external characteristics. The ability to correctly identify the sex of birds is fundamental to the success of behavioral, ecological studies, as well as captive breeding programs with endangered species. The identification of the *CHD1* gene (Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1) has enabled numerous advances in the molecular sexing of birds. This gene is located on the sex chromosomes Z and W, females have two different copies, *CHD1-Z* and *CHD1-W*, while males have two equal copies of the *CHD1-Z* gene. Recently, a new genetic marker associated with a locus that also has homologues copies on the Z and W chromosomes of the *Spindlin* gene has been described. Additionally, some authors also suggest exploring epigenetic differences between males and females in order to identify the sex. In the present work, molecular markers that explore size differences between alleles of the *CHD1* (P2 / P8) and *Spindlin* (SPIN12 / SPIN13) genes, W-specific markers (*ASW* and *XhoI*) and also of a locus that presents epigenetic differences of DNA between males and females of members of the superorder Galloanserae (*MHM*) were tested. The molecular markers related to the W chromosome did not show positive results, in contrast, the P2 / P8 primers were effective in the molecular sexing of individuals of Piciform and Psittaciform orders, whereas amplifications with the SPIN12 / SPIN13 markers showed sex-specific patterns easily observed in agarose gels in species of the orders Galliformes, Apodiformes and Striped owl (*Asio clamator*). Our results demonstrate that the choice of a suitable molecular marker for the identification of sex in birds is directly linked to the species under study and to the method of visualization of the generated fragments. While in some species sex-specific patterns can be easily observed in agarose, others depend on more sensitive methods, such as polyacrylamide or capillary electrophoresis.

Key words: molecular sexing, birds, *CHD*, *Spindlin*, *MHM*

Sumário

1. Introdução	1
1.1. Processos de determinação sexual com ênfase no grupo das aves.....	1
1.2. Identificação de machos e fêmeas de aves sem dimorfismo sexual aparente	7
1.3. Fatores epigenéticos associados à região <i>MHM</i> (<i>Male Hypermethylated</i>)	10
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo Geral	14
2.2. Objetivos Específicos	14
3. Materiais e Métodos	14
3.1. Materiais	14
3.1.1. Espécies estudadas	14
3.2. Métodos	24
3.2.1. Extração de DNA	24
3.2.2. Análise da qualidade e quantificação das amostras de DNA.....	24
3.2.3. Identificação do sexo das aves.....	25
3.2.3.1. Análise de caracteres morfológicos externos.....	25
3.2.3.2. Sexagem molecular por PCR.....	25
3.2.3.3 Sexagem molecular por PCR quantitativa (qPCR).....	27
3.3 Análise dos padrões de metilação da região <i>MHM</i> por MSRE-PCR (<i>Methylation Sensitive Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction</i>) e MDRE-PCR (<i>Methylation Dependent Restriction Enzyme-Polymerase Chain Reaction</i>).....	29
3.4. Modificação de DNA por bissulfito de sódio.....	29
3.5. Análise dos padrões de metilação da região <i>MHM</i> por MS-PCR (<i>Methylation Sensitive PCR</i>).....	30
3.6. Sequenciamento nucleotídico.....	31
3.7. Análise das sequências nucleotídicas associadas à região <i>MHM</i>	32
3.8 Análises <i>in silico</i> da sequência e organização genômica da região <i>MHM</i> em galinha doméstica.....	32
3.9. Produção de material de divulgação científica.....	33

4. Resultados.....	34
4.1. Amostragem biológica	34
4.2. Sexagem molecular	34
4.3. Sexagem molecular por qPCR.....	43
4.4. Caracterização <i>in silico</i> da região <i>MHM</i> de galinha doméstica.....	44
4.5. Identificação da região <i>MHM</i> em outras espécies de aves.....	45
4.6. Potencial uso de padrões diferenciais de metilação da região <i>MHM</i> para sexagem molecular de aves.....	47
4.7. Análise dos padrões diferenciais de metilação da região <i>MHM</i> por MS-PCR (Methylation Sensitive PCR).....	48
4.8. Sequenciamento nucleotídico.....	50
4.9. Produção de material de divulgação científica com o tema Epigenética.....	51
5. Discussão.....	52
5.1. Sexagem molecular em aves.....	52
5.2. Potencial uso de padrões diferenciais de metilação da região <i>MHM</i> para sexagem molecular de aves.....	61
5.3. Estrutura genômica e presença da região <i>MHM</i> em aves fora do clado Galloanserae.....	63
5.4. Material de divulgação científica sobre Epigenética.....	67
6. Conclusão.....	68
7. Referências Bibliográficas	69

ANEXO (Cartilha)

1. Introdução

1.1. Processos de determinação sexual com ênfase no grupo das aves

Os mecanismos de diferenciação e determinação sexual são bastante variáveis entre os organismos, mesmo em espécies intimamente relacionadas. Sistemas bem conhecidos como os encontrados em mamíferos, nas moscas *Drosophila melanogaster* e no nematelminto *Caenorhabditis elegans*, podem levar à falsa impressão de que os mecanismos de determinação sexual são bem conservados e de que a presença de cromossomos sexuais é uma regra entre os eucariotos. Além disso, diferentes tipos celulares podem iniciar o processo de determinação sexual - em mamíferos, as células somáticas são parte fundamental neste processo, já nos peixes esta função pertence às células germinativas (Capel, 2017).

A determinação do sexo em diferentes grupos de animais pode seguir algum dos seguintes mecanismos:

- *Environmental Sex Determination* – ESD, neste tipo de determinação não existem diferenças genéticas consistentes entre os sexos e este é determinado após a fertilização, em resposta a algum fator ambiental, como temperatura e pH (Manolakou *et al.*, 2006; Bachtrog *et al.*, 2014). Este mecanismo é observado principalmente em répteis e peixes e o momento onde o sexo do animal é determinado é chamado de período termossensível (TSP).

- *Genetic Sex Determination* – GSD, neste caso um ou mais genes são responsáveis pela determinação do fenótipo sexual e estes podem estar localizados especificamente nos cromossomos sexuais ou dispersos nos autossomos ou em ambos os tipos cromossômicos. Esse mecanismo está presente em diversos grupos, incluindo invertebrados (insetos, nematelmintos), anfíbios, aves e mamíferos.

A determinação sexual configura-se como uma característica que evolui rapidamente em muitos grupos animais e, às vezes, até mesmo entre espécies estreitamente relacionadas ou populações da mesma espécie (Bull, 1983; Charlesworth, 1996; Ming & Renner, 2011). As moscas domésticas, por exemplo, normalmente têm cromossomos sexuais XY, mas em algumas populações podem existir alelos masculinizantes e feminilizantes dominantes em cromossomos autossomos que anulam a determinação do sexo pelos cromossomos X e Y (Dubendorfer *et al.*, 2002).

O processo de determinação e diferenciação sexual em aves é muito peculiar, porém envolve mecanismos semelhantes aos encontrados em peixes e mamíferos. O desenvolvimento do sistema urogenital de galinha doméstica (*Gallus gallus*) assemelha-se ao dos mamíferos, enquanto os efeitos dos hormônios sexuais são similares aos observados em peixes. Apesar das diferenças quanto à origem autossômica e heterogamética, os cromossomos sexuais de mamíferos e aves evoluíram de maneira similar, porém, independentemente (Graves 2016; Bellott et al. 2017). Nestes grupos, são encontrados dois tipos de cromossomos sexuais - X e Y em mamíferos e, Z e W em aves. Outra diferença diz respeito ao fato de que nas aves as fêmeas constituem o sexo heterogamético (ZW), ao contrário dos mamíferos, onde os machos possuem dois cromossomos sexuais distintos.

As teorias da evolução dos cromossomos sexuais heteromórficos sugerem que eles evoluíram a partir autossomos que adquiriram um locus de determinação sexual (Figura 1) e a região próxima a este locus então passa a sofrer mutações vantajosas para a determinação sexual divergindo de seu ancestral autossômico. Em alguns casos, a recombinação foi suprimida ao longo da maior parte do comprimento dos cromossomos sexuais, levando a uma perda de genes ativos nos elementos Y e W (Charlesworth *et al.*, 2005; Bachtrog *et al.*, 2011), resultando em grandes diferenças de tamanho, com um cromossomo grande e rico em conteúdo gênico (cromossomo X ou Z) e um cromossomo menor, com poucos genes (cromossomo Y ou W).

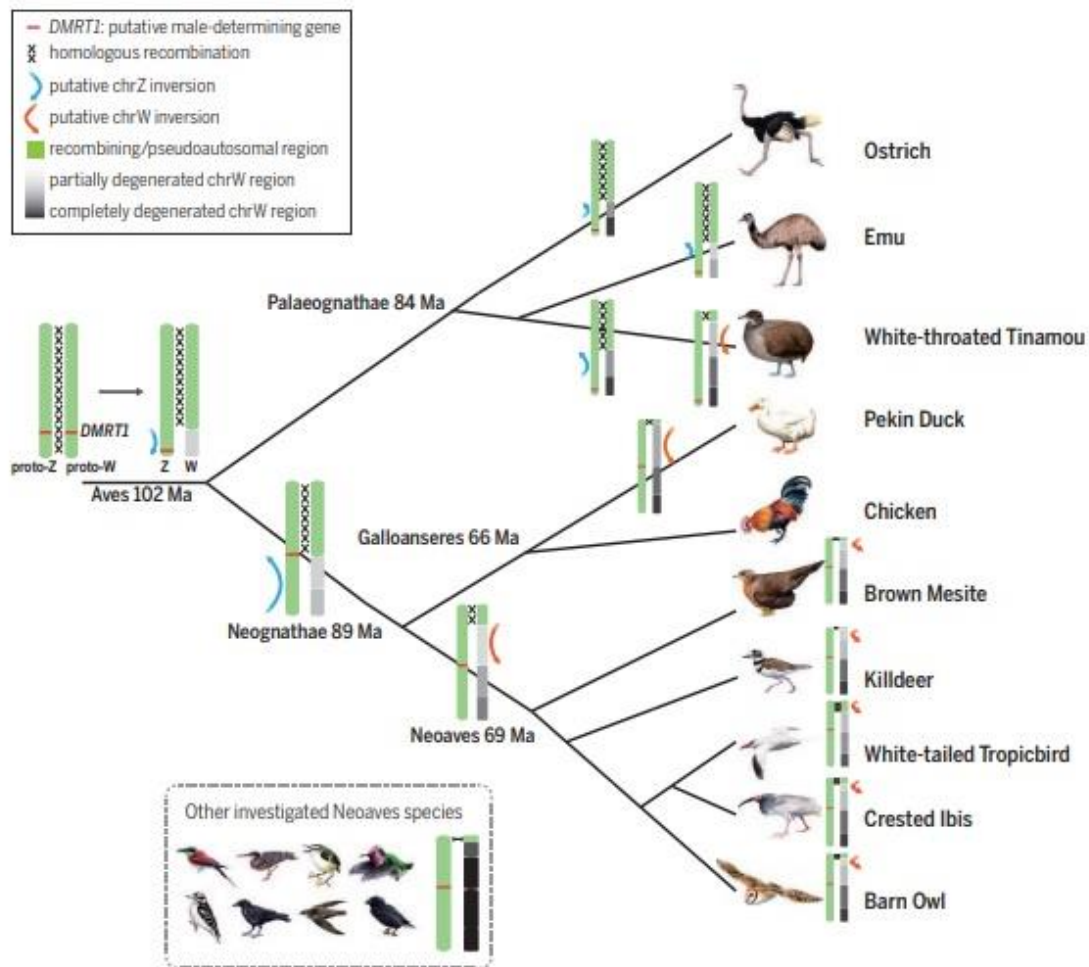


Figura 1. Etapas da evolução dos cromossomos sexuais em aves. (Adaptado de Zhou *et al.*, 2014).

No grupo das aves, o cromossomo Z é altamente conservado entre as espécies (Nanda *et al.*, 2000). Em contraposição, embora mostre-se altamente diferenciado do Z na maioria das espécies, o cromossomo W é quase idêntico em nível citológico entre as espécies, desde as consideradas mais basais, pertencentes ao grupo das Ratitas (avestruz, ema e emu), indicando que este pode ter sido o padrão ancestral do sistema de cromossomos sexuais em aves, a partir do qual os cromossomos Z e W das demais espécies deste grupo de vertebrados evoluíram (Graves, 2016).

Assim como o cromossomo X dos mamíferos, o cromossomo Z da galinha doméstica é rico em conteúdo gênico, possui um tamanho de aproximadamente 82.36Mb, tendo cerca de 1.140 genes identificados, enquanto o cromossomo W é menor e altamente

heterocromático (Nanda *et al.*, 2000; International Chicken Genome Sequencing Consortium, 2011).

Tanto em mamíferos como em aves, a diferença no número de cópias dos cromossomos X ou Z resultaria em uma maior expressão de determinados genes no sexo homogamético (Melamed & Arnold, 2007). Por este motivo, surgiram diversos mecanismos para compensar a diferença entre a dose gênica existente entre machos e fêmeas (Dementyeva & Zakian, 2010). Embora tenha sido assumido que a compensação de dose completa estaria sempre associada à evolução dos cromossomos sexuais (Ohno, 1967), há considerável variação no mecanismo e na abrangência da compensação de dose entre diferentes espécies. Em mamíferos, na mosca *Drosophila melanogaster* e no nematelminto *Caenorhabditis elegans*, a compensação de dose é realizada por meio de mecanismos regulatórios que inativam totalmente ou quase totalmente o cromossomo X (Straub & Becker, 2007; Meyer, 2010; Conrad & Akhtar, 2012). Porém, em muitos organismos, a inativação completa de um cromossomo é exceção - em mamíferos monotrematas, aves, répteis e peixes, a compensação de dose parece ser gene-específica e parcial (Graves, 2016).

A regulação de dosagem global emprega mecanismos que modificam grande parte dos genes do cromossomo; já a parcial atua em genes individuais (Disteché, 2016). Em mamíferos, ocorre a compensação de dose global - um dos cromossomos X das fêmeas é inativado por meio de eventos epigenéticos, fazendo com que a expressão dos genes presentes neste cromossomo seja igual nos dois sexos (Straub & Becker, 2007; Mank *et al.*, 2011). Por outro lado, análises de *microarray* associadas aos níveis de transcrição em machos e fêmeas de *Gallus gallus* demonstraram que a expressão dos genes do cromossomo Z é cerca de 30-40% maior em machos do que em fêmeas. Portanto, enquanto alguns genes são completamente compensados, outros não apresentam nenhum grau de compensação, e a maioria dos genes se encontra entre estes dois limites (Itoh *et al.*, 2007; Ellegren & Parsch, 2007).

As vias que controlam o desenvolvimento sexual foram bem caracterizadas a nível molecular em *D. melanogaster*, *C. elegans* e em mamíferos, grupos que possuem um gene que é o principal responsável pela determinação sexual. Os mecanismos responsáveis pela determinação sexual em aves ainda são desconhecidos (Bachtrog *et al.*, 2014) e, por este motivo, foram formuladas duas hipóteses para explicá-los. Segundo a hipótese conhecida como *Z Dosage Model*, existe uma associação entre o cromossomo Z e mecanismos de

compensação de dose de alguns genes, enquanto a hipótese *W Domination Model* sugere a presença de genes associados ao desenvolvimento sexual feminino no cromossomo W, assim como o gene *SRY* de mamíferos desencadeia a diferenciação dos testículos. Também foi proposto que fatores no cromossomo W possam neutralizar a expressão de genes presentes no cromossomo Z (Graves 2000).

Estudos mais recentes apontam a primeira hipótese como sendo a mais provável. Através da técnica de RNAseq, genes candidatos a serem sexo determinantes foram identificados em galinha doméstica, mas, embora tenham sido isolados 26 genes ligados ao cromossomo W, a grande maioria destes mostrou-se homóloga a suas cópias no cromossomo Z. Apenas os genes *HINTW* (*Histidine Triad Nucleotide Binding Protein W*), *FET1* (*Female Expressed Transcript 1*) e *FAF* (*Female Associated Factor*) mostraram-se promissores, uma vez que são específicos do cromossomo W e são transcritos durante toda a embriogênese. No entanto, ao analisar a expressão destes genes em animais que passaram por reversão sexual experimental, a hipótese de que *HINTW*, *FET1* ou *FAF* desempenhem papéis decisivos no desenvolvimento ovariano de aves foi descartada, uma vez que seus padrões de expressão não se alteraram durante o desenvolvimento testicular em fêmeas ZW (Hirst *et al.*, 2017).

Apesar das grandes diferenças no modo de determinação sexual entre os organismos, os genes da família doublesex-mab3 (*DM*) são expressos nas gônadas em desenvolvimento de quase todos os animais - vertebrados e invertebrados. O gene *DMRT1* (*Doublesex and Mab-3-Related Transcription Factor 1*) pertence a essa família gênica e, em mamíferos, o produto de *DMRT1* faz parte da via de formação dos testículos e são necessárias duas cópias para o desenvolvimento normal das gônadas masculinas, mesmo na presença do gene *SRY* (Hake & O'Connor, 2008). Em aves, o gene *DMRT1* encontra-se no cromossomo Z e não apresenta nenhum gene ortólogo no cromossomo W (Raymond *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1999; Nanda *et al.*, 2000). Quando presente em dose dupla, favorece o desenvolvimento de gônadas masculinas (Zhao *et al.*, 2010). A inibição da aromatase - uma das principais enzimas envolvidas na síntese de estrogênio e na indução do desenvolvimento ovariano em embriões ZW (Elbrecht & Smith, 1992; Vaillant *et al.*, 2001) - com o fármaco fadrozol também causa a masculinização de gônadas em embriões ZW de *G. gallus*, caracterizada por regulação positiva da expressão de *DMRT1* e organização do cordão seminífero (Smith *et al.*, 2003). 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).

Recentemente, o gene *HEMGN* (*Hemogen*) também foi identificado como atuante na diferenciação testicular de embriões de galinha. Este gene, localizado no cromossomo Z, codifica um fator de transcrição que é expresso em células hematopoiéticas (sangue) e é regulado positivamente nas gônadas masculinas. A expressão gonadal de *HEMGN* parece ocorrer após o início da expressão de *DMRT1* e sua superexpressão em gônadas embrionárias de fêmeas provoca aumento da expressão de *DMRT1* e masculinização das gônadas, sugerindo uma possível interação entre os dois genes (Nakata *et al.*, 2013; Lambeth *et al.*, 2014).

Apesar do importante papel do gene *DMRT1* na diferenciação sexual gonadal em aves, seu mecanismo exato de atuação ainda não é completamente compreendido. 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 serem os responsáveis pela determinação sexual em fêmeas (Teranish *et al.*, 2001). É importante ressaltar que apesar de ser altamente heterocromático, o cromossomo W é transcricionalmente ativo. Além disso, não existe registro de nenhuma espécie de ave que não possuísse o cromossomo W, o mesmo não sendo válido para mamíferos, uma vez que algumas espécies raras de roedores perderam totalmente o cromossomo Y. Estes dados sugerem que o cromossomo W provavelmente contém uma função integrante na determinação sexual ou em algum mecanismo de compensação de dose (Graves, 2008).

O processo de diferenciação sexual em aves parece ser mais complexo e dinâmico do que se imaginava. Segundo Smirnov e Trukhina (2019), o esquema moderno de determinação sexual em aves inclui um mecanismo epigenético responsável por desligar a cópia do gene *DMRT1* em fêmeas por meio de hipermetilação e da ação do lncRNA MHM (Hirst, Major, Smith, 2018; Caetano LC *et al.*, 2014). Como já demonstrado em algumas espécies, fatores epigenéticos também podem estar envolvidos em mecanismos de determinação sexual - *Dicentrarchus labrax* (robalo) apresenta determinação sexual dependente de temperatura e foi demonstrado que os machos possuem o dobro dos níveis de metilação das fêmeas no promotor da aromatase, enzima que converte andrógenos em estrógenos (Navarro- Martín, 2011).

Assim, a determinação sexual de aves parece ser mais complexa do que a observada em outros grupos e, apesar de diversos estudos focarem nas duas principais hipóteses (*Z dosage* e *W domination*), as duas não são excludentes e ambas podem ser necessárias.

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

Em oposição ao padrão encontrado em mamíferos, onde a maioria das espécies apresenta dimorfismo sexual aparente, aproximadamente 50% das espécies de aves não podem ter o sexo identificado por meio de características externas (Jensen *et al.*, 2003; Ong & Vellayan, 2008). Entre as espécies monomórficas, onde as diferenças morfológicas entre machos e fêmeas são muito sutis, a identificação sexual baseada no fenótipo se torna extremamente difícil ou até impossível, mesmo para ornitólogos experientes (Dubiec & Neubauer, 2006). A capacidade de identificar de maneira correta o sexo das aves é fundamental para o sucesso de diversos estudos, sejam eles comportamentais, ecológicos, evolutivos como também em programas de reprodução em cativeiro com espécies ameaçadas de extinção (Ghorpade *et al.* 2012; Morinha *et al.* 2012). Em estudos populacionais, a determinação do sexo dos indivíduos também é crucial, uma vez que a capacidade de dispersão, taxa de mortalidade e aquisição de território podem ser caracterizadas por padrões que são influenciados pelo sexo do indivíduo (Rodrigues *et al.*, 2019; Donald, 2007).

Por muito tempo, a identificação de machos e fêmeas de aves foi realizada principalmente por meio de observações comportamentais, investigações cariotípicas ou métodos cirúrgicos. Entretanto, tais metodologias apresentam diversas desvantagens e podem levar a resultados insatisfatórios. A identificação do sexo baseada na observação comportamental só pode ser realizada durante o período reprodutivo. A análise cariotípica é extremamente trabalhosa e não pode ser realizada em espécies cujos cromossomos sexuais sejam idênticos em tamanho e morfologia, como é o caso das ratitas (Miyaki *et al.*, 1998; Griffiths & Phil, 2000). A laparoscopia é invasiva, pois trata-se de um método cirúrgico, envolvendo riscos de contaminação e reações à anestesia, também sendo estressante para os animais (Griffiths & Phil, 2000; Grando, 2002).

A fim de superar estas limitações, em meados dos anos 90, técnicas moleculares baseadas na amplificação de segmentos de DNA via PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

começaram a ser implementadas na sexagem de diferentes espécies de aves (Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1996). A sexagem molecular necessita de uma pequena quantidade de DNA, que pode ser extraído a partir de sangue, penas, fezes ou saliva (Jensen *et al.* 2003; Brubaker *et al.* 2011), diminuindo assim o estresse causado pelo manuseamento dos animais.

A identificação do gene *Chromodomain Helicase DNA Binding Protein 1 (CHD1)* possibilitou inúmeros avanços na sexagem molecular de aves. Este gene, apesar de não estar diretamente envolvido em nenhum processo de determinação e diferenciação sexual, está presente nos cromossomos sexuais Z e W (Kahn *et al.*, 1998). As fêmeas possuem duas cópias diferentes deste gene, *CHD1-Z* e *CHD1-W*, enquanto os machos possuem duas cópias do gene *CHD1-Z*. Portanto, um padrão de produto de PCR bem-sucedida será diferente entre machos e fêmeas, com machos apresentando uma única banda correspondente aos dois alelos do cromossomos Z e fêmeas apresentando duas bandas de tamanhos distintos, referentes aos alelos dos cromossomos Z e W (Rodrigues *et al.*, 2019; Vucicevic *et al.*, 2013). Assim, foram desenvolvidos diferentes conjuntos de oligonucleotídeos para uso em PCR com o objetivo de explorar esta diferença de tamanho de fragmentos de DNA entre machos e fêmeas. Dentre tais oligos, destacam-se os *primers* 2550F/2718R e P2/P8, por não dependerem de digestões de restrição pós-PCR. Embora anelem-se em diferentes sítios, estes amplificam o mesmo íntron do gene *CHD1* (Griffiths *et al.*, 1996; Ellegren, 1996; Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Jensen *et al.*, 2003). Embora os *primers* 1237L/1272H também sejam utilizados na sexagem molecular de aves, estes tendem a gerar mais bandas inespecíficas devido à degeneração em sua região de anelamento, o que não acontece com os oligonucleotídeos P2 e P8 que se anelam a regiões altamente conservadas de éxons dos genes *CHD1* (Jensen *et al.*, 2003).

Apesar do alto grau de confiabilidade da sexagem molecular com o uso dos *primers* P2 e P8, estes possuem algumas limitações e podem gerar resultados inconsistentes. O problema mais frequente refere-se a fêmeas sendo erroneamente identificadas como machos (Dawson *et al.*, 2001). Como o tamanho do produto de PCR do alelo W é geralmente maior do que o do alelo Z, pode ocorrer amplificação preferencial do fragmento de DNA de menor tamanho, levando à incorreta identificação do sexo em fêmeas. O segundo erro mais comum ocorre quando o método escolhido para a visualização dos fragmentos gerados pela PCR não possui uma resolução adequada à

espécie em estudo. 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 120 pares de bases (Fridolfsson & Ellegren, 1999; Jensen *et al.*, 2003; Robertson & Gemmell, 2006) e, assim, fragmentos mais similares em tamanho não podem ser separados em gel de agarose, sendo necessária a utilização de uma metodologia mais resolutive, como eletroforese em gel de poliacrilamida, por exemplo.

Além disso, para algumas aves, como as das famílias Struthionidae e Rheidae (aves ratitas), não é possível realizar a identificação do sexo com o uso dos *primers* P2 e P8, uma vez que não foram observadas diferenças entre os íntrons dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* dessas espécies (Ellegren, 1996; Fridolfsson & Ellegren, 1999; Huynen *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008). Assim, diversas alternativas têm sido utilizadas visando a sexagem molecular das espécies destas famílias, como a aplicação de enzimas de restrição por meio da técnica RFLP (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Bermudez-Humaran *et al.*, 2002; Mine, 2002; Hinckley *et al.*, 2005) e, mais recentemente, a aplicação da técnica HRM (*High-resolution melting*) (Morinha *et al.*, 2015). Embora tenham gerado resultados satisfatórios, estas técnicas envolvem a necessidade do desenvolvimento de *primers* espécie-específicos, o que não é vantajoso em estudos que englobem um grande número de espécies de aves. Desta maneira, é necessário o desenvolvimento de marcadores moleculares não somente capazes de identificar o sexo das aves com segurança, mas que também possuam uma aplicação mais ampla, e não restrita a apenas algumas espécies.

Recentemente, foi descrito um novo marcador associados a um loco que apresenta homólogos nos cromossomos Z e W (região UTR (*untranslated region*) do gene *spindlin* das aves). Embora este marcador não tenha se mostrado eficiente para sexagem molecular de aves ratitas, foi possível identificar diferenças entre machos e fêmeas de espécies de 10 ordens diferentes (Dawson, 2016). Dado que este marcador apresenta sequências nucleotídicas altamente conservadas entre espécies pertencentes ao grupo Neognathae, é potencialmente aplicável em diversas famílias.

Uma alternativa interessante para a sexagem molecular em aves seria utilizar um marcador que amplificasse um gene específico do cromossomo W. Alguns genes ou sequências do cromossomo W são conhecidos e parecem ser amplamente conservados entre as espécies, como *CHD1W* (Ellegren, 1996), *ATP5A1W* (Nanda *et al.*, 2000), *EE0.6* (pseudogene; Ogawa *et al.*, 1997), *SPINW* (Itoh *et al.*, 2001) e *ASW / Wpkci / HINT1W*

(Hori *et al.*, 2000; O'Neill *et al.*, 2000). Entretanto, a maioria deles possui cópias altamente homólogas no cromossomo Z, como é o caso dos genes *CHD1-W* e *SPIN-W*.

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

Segundo Chen *et al* (2017), a epigenética pode ser definida como o “estudo dos mecanismos pelos quais a cromatina é alterada quimicamente (através de modificações de DNA e histonas) ou estruturalmente (via remodelação da cromatina)”. Ou seja, epigenética é o estudo das modificações no DNA e nas histonas que alteram a expressão gênica sem afetar a sequência de bases do DNA.

Os eventos epigenéticos possuem um papel proeminente durante o desenvolvimento dos mamíferos, sendo fundamentais para o desenvolvimento celular, regulação do ciclo celular e também na manutenção de genes *housekeeping* (Russo, 1996; Xing, 2007, Chen *et al.*, 2017). As principais modificações epigenéticas compreendem alterações químicas nas caudas N-terminais das histonas e nas citosinas do DNA, além da presença de RNAs não-codificantes (ncRNAs).

As histonas são proteínas que, junto com o DNA cromossomal, compõem os nucleossomos. Estas importantes proteínas possuem caudas que estão sujeitas a mais de 130 modificações pós-traducionais (PTMs), seja por meio do controle da acessibilidade ao DNA ou servindo de substrato de ligação a proteínas (Kouzarides, 2007). Estas modificações podem levar à ativação ou à repressão gênica, uma vez que sua ocorrência altera a conformação dos nucleossomos e a acessibilidade do DNA à RNA polimerase. As alterações mais estudadas são: acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. A metilação pode estar associada tanto a repressão gênica como a ativação, já as demais estão normalmente associadas a genes ativos. A fosforilação também apresenta um papel importante no processo de divisão celular. (Tan *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2012).

Apesar de grande parte do genoma humano ser transcrito, apenas uma pequena porção destes genes são traduzidos em proteínas (Djebali *et al.*, 2012). Por sua vez, uma importante fração dos transcritos possui função regulatória, os chamados RNAs não codificadores (ncRNAs). Os ncRNAs podem ser classificados de acordo com seu tamanho em: pequenos ncRNAs (pequenos RNAs de interferência (siRNAs), microRNAs (miRNAs), Piwi-interacting RNAs (piRNAs), RNAs de transferência, pequenos RNAs

nucleolares (snRNAs)) e ncRNAs longos (lncRNAs) (Chen *et al.*, 2017). Além disso, várias outras classes de ncRNAs vêm sendo caracterizadas à medida que a pesquisa nesse campo avança. Segundo Carthew (2009), essa regulação pode ocorrer em níveis indispensáveis à função do genoma, incluindo estrutura da cromatina, segregação cromossômica, transcrição, processamento e estabilidade de RNA e tradução.

A alteração epigenética mais bem caracterizada é a metilação do DNA, que ocorre por meio da adição de um grupo metil (CH₃) ao carbono 5 de citosinas em dinucleotídeos CpG. Estes dinucleotídeos podem estar dispersos no genoma ou agrupados nas chamadas ilhas CpG, que correspondem a regiões do genoma com um conteúdo elevado de dinucleotídeos CpG e normalmente associadas a regiões promotoras ou regulatórias. Alterações nos níveis de metilação destas regiões estão associadas com a regulação da expressão gênica (Piferrer, 2013). Hipermetilação de ilhas CpG de promotores gênicos promove silenciamento gênico, enquanto que hipermetilação dessas regiões está associada com ativação dos genes (Chen *et al.*, 2017). Em 2001, foi descrita uma região que sofre importantes modificações epigenéticas – metilação de DNA, presença de lncRNAs e acetilação de histonas. Trata-se de uma região repetitiva localizada no braço curto do cromossomo Z composta por repetições de uma sequência de 2,2Kb que aparece hipometilada e transcrita somente no único cromossomo Z das fêmeas. Por outro lado, 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 fêmeas de galinha doméstica, o loco MHM codifica um lncRNA específico que se acumula no sítio de transcrição, podendo desempenhar função regulatória nos genes adjacentes. Foi demonstrado também que o *status* MHM estabelece-se durante o desenvolvimento inicial, logo após a fertilização (Teranishi *et al.*, 2001).

A expressão do loco MHM e seu acúmulo próximo ao sítio de transcrição pode ser importante para o desenvolvimento das fêmeas, desempenhando um mecanismo regulatório similar ao RNA *Xist* dos mamíferos, sendo parte crucial do mecanismo de compensação de dose neste grupo de vertebrados (Caetano *et al.*, 2014). Apesar disso, em galinhas foi comprovado que apesar de não ocorrer compensação de dose global, alguns genes localizados próximos à região MHM apresentam um grau local de compensação de dose (Itoh *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2010; Itoh *et al.*, 2010). Além da presença de um lncRNA em fêmeas associado ao loco MHM, também foram observados

elevados níveis de acetilação da histona 4 no resíduo de lisina 16 (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 ncRNAs como a acetilação de histonas têm sido associadas a mecanismos epigenéticos envolvidos em outros sistemas de compensação de dose (Bone *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 2005). Em *D. melanogaster*, o único cromossomo X dos machos duplica a expressão da maioria de seus genes através dos mesmos mecanismos ((Marin *et al.*, 2000; Meller, 2000; Park & Kuroda, 2001).

A localização do gene *DMRT1* é citogeneticamente indistinguível do loco MHM no cromossomo Z e, segundo Caetano *et al.* (2014), *MHM* é expresso (*upregulated*) e *DMRT1* é desligado (*downregulated*) em fêmeas de galinhas no mesmo estágio de desenvolvimento. Estima-se que a hiperacetilação da cromatina no loco MHM se estenda por ao menos 460 kb e, por este motivo, tem sido sugerido que o lncRNA codificado pela região MHM poderia 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).

Um estudo utilizando análise de expressão mediada por retrovírus investigou o papel potencial da região MHM no desenvolvimento embrionário de galinhas. Os resultados obtidos demonstraram que alterações nos padrões da expressão normal dos transcritos MHM - expresso em fêmeas e silenciado em machos - podem causar distúrbios nos dois sexos. Os efeitos mais significativos foram o desenvolvimento anormal das gônadas, anomalias cerebrais e crescimento exacerbado de tecidos. A expressão de transcritos MHM em machos levou a uma diminuição da proteína *DMRT1* e embriões submetidos a uma alta dose destes transcritos apresentaram um aumento na taxa de mortalidade (Roeszler *et al.*, 2012).

Por outro lado, acetilação de histonas e descompactamento da cromatina são sinais característicos de atividade gênica e, portanto outros autores sugerem que, ao invés de reprimir a expressão do gene *DMRT1*, o loco MHM age aumentando a expressão de genes importantes para o desenvolvimento feminino (Itoh *et al.*, 2010). De fato, um estudo recente identificou a presença do gene *VLDL* (*Very-Low-Density-Lipoprotein Receptor*) na região MHM (Wright *et al.*, 2015). Trabalhos anteriores mostram que este gene codifica um receptor envolvido no transporte de lipoproteínas do plasma e desenvolvimento do folículo ovariano (Wang *et al.*, 2013; Hu *et al.*, 2014).

Estudos em galinhas triplóides ZZW também trouxeram evidências interessantes sobre o papel de mecanismos epigenéticos. Tais animais se desenvolvem como intersexos, contendo tecidos ovariano e testicular, embora apresentem fenótipo externo feminino (Lin *et al.*, 1995; Smith & Sinclair, 2004). Em relação ao status de metilação da região *MHM*, estudos em animais ZZW e ZZZ sugerem que a hipermetilação encontrada em machos não se deve ao número de cromossomos Z, mas parece ser influenciada pela ausência ou presença do cromossomo W. Apesar destas evidências, os possíveis mecanismos pelos quais o cromossomo W poderia influenciar este perfil de metilação permanecem desconhecidos (Teranish *et al.*, 2001).

Recentemente, um estudo identificou outra região no cromossomo Z de galinha doméstica com características idênticas à região *MHM* descrita por Teranish *et al.* (2001). Este novo locus, denominado região *MHM 2* (Sun *et al.*, 2019), também possui repetições em tandem, padrões diferenciais de metilação entre machos e fêmeas e codifica um lncRNA nos animais ZW. Porém, estudos realizados com alinhamentos entre as duas regiões não identificaram homologia entre elas, o que significa que as regiões evoluíram de forma independente. Outra diferença entre elas, é que, ao contrário da região descrita anteriormente, a nova região está localizada na parte mais “nova” do cromossomo Z, sendo compartilhada também com o supergrupo Neoaves, constituído pelas aves “modernas” e que não inclui os Paleognathae e Galloanserae.

Por quase 15 anos, acreditou-se que a região *MHM* estivesse restrita ao genoma de Galliformes, dado que esta havia sido somente identificada em galinha doméstica, codorna, peru e pavão (Teranishi *et al.*, 2001). 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.

Apesar de ter sido descoberta há quase duas décadas, muitas perguntas permanecem sem respostas em relação à distribuição, organização e função da região *MHM*. Estudos em um maior número de espécies poderão melhor caracterizar esse locus do ponto de vista de sua organização genômica e função como também investigar seu potencial uso em técnicas de sexagem molecular.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

Identificar um conjunto de marcadores moleculares que possa ser utilizado de maneira mais ampla para a sexagem das diferentes espécies de aves e caracterizar a região *MHM* (*Male Hypermethylated*) visando gerar dados para melhor compreensão acerca de sua distribuição taxonômica, estrutura genômica e padrões de metilação de DNA.

2.2. Objetivos Específicos

- (1) Identificar o melhor marcador para sexagem molecular de diferentes espécies de aves;
- (2) Identificar a presença/ausência da região *MHM* em espécies de aves pertencentes a diferentes táxons: Paleognathae (Struthioniformes) e Neognathae (Anseriformes, Galliformes, Columbiformes, Apodiformes, Pelecaniformes, Cathartiformes, Accipitriformes, Cuculiformes, Strigiformes, Piciformes, Falconiformes e Psittaciformes);
- (3) Caracterizar a região *MHM* quanto à sua sequência nucleotídica, organização genômica e padrões de metilação em galinha doméstica.

3. Material e Métodos

3.1. Material

3.1.1. Espécies estudadas

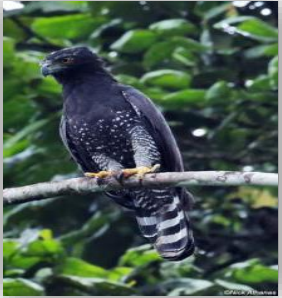
Foram analisados 124 exemplares de aves, de 26 espécies distintas, pertencentes à diferentes ordens como indicado na Tabela 1. Todos os procedimentos para coleta e manipulação de amostras biológicas destas espécies foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP (Protocolo no.956-CEUA).

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

Ordem	Família	Espécie e nº. de exemplares estudados	Nome comum	Foto
Tinamiformes	Tinamidae	<i>Rhynchotus rufescens</i> (10)	Perdiz	
Anseriformes	Anatidae	<i>Anas platyrhynchos</i> (6)	Pato	
Galliformes	Phasianidae	<i>Gallus gallus</i> (20)	Galinha doméstica	

Galliformes	Phasianidae	<i>Coturnix coturnix</i> (20)	Codorna européia	
Galliformes	Phasianidae	<i>Meleagris gallopavo</i> (4)	Peru	
Struthioniformes	Struthionidae	<i>Struthio camelus</i> (3)	Avestruz	
Pelecaniformes	Threskiornithidae	<i>Theristicus caudatus</i> (2)	Curicaca	

Cathartiformes	Cathartidae	<i>Coragyps atratus</i> (1)	Urubu-de-cabeça-preta	
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Circus cinereu</i> (1)	Gavião- cinza	
Accipitriformes	Accipitridae	<i>Rupornis magnirostris</i> (2)	Gavião- carijó	

Accipitriformes	Accipitridae	<i>Spizaetus tyrannus</i> (1)	Gavião-pegamaco	
Charadriiformes	Charadriidae	<i>Vanellus chilensis</i> (1)	Quero-quero	
Cuculiformes	Cuculidae	<i>Guira guira</i> (1)	Anu-branco	
Strigiformes	Strigidae	<i>Asio clamator</i> (3)	Coruja - orelhuda	

Strigiformes	Strigidae	<i>Megascops choliba</i> (1)	Corujinha- do-mato	
Strigiformes	Strigidae	<i>Athene cunicularia</i> (1)	Coruja- buraqueira	
Strigiformes	Tytonidae	<i>Tyto furcata</i> (1)	Coruja-da- igreja	

Nyctibiiformes	Nyctibiidae	<i>Nyctibius griseus</i> (1)	Urutau	
Apodiiformes	Trochilidae	<i>Amazilia versicolor</i> (4)	Beija-flor-de-banda-branca	
Apodiiformes	Trochilidae	<i>Eupetomena macroura</i> (2)	Beija-flor-tesoura	

Apodiformes	Trochilidae	<i>Florisuga fusca</i> (2)	Beija-flor-preto	
Piciformes	Ramphastidae	<i>Ramphastos toco</i> (4)	Tucanuçu	
Cariamiformes	Cariamidae	<i>Cariama cristata</i> (1)	Seriema	
Falconiformes	Falconidae	<i>Caracara plancus</i> (2)	Carcará	

				
Falconiformes	Falconidae	<i>Falco femoralis</i> (1)	Falcão-de-coleira	
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i> (10)	Arara-azul-grande	
Psittaciformes	Psittacidae	<i>Amazona aestiva</i> (10)	Papagaio-verdadeiro	

Psittaciformes	Psittacidae	<i>Pionus maximiliani</i> (10)	Maitaca	
-----------------------	-------------	-----------------------------------	---------	---

As amostras biológicas referentes as ordens Pelecaniformes, Cathartiformes, Accipitriformes, Cuculiformes, Strigiformes, Nyctibiiformes, Falconiformes, Piciformes, Cariamiformes e Psittaciformes foram obtidas no Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Silvestres (CEMPAS) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP (Botucatu, SP). As amostras de *Rhynchotus rufescens* (perdiz) foram gentilmente cedidas pela Dra. Fabiana Ferreira de Souza, docente da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP de Botucatu. 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 Biologia Estrutural e Funcional, ambos localizados no Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu, SP). As amostras de codorna européia foram provenientes do Biotério do Departamento de Biologia Estrutural e Funcional do Instituto de Biociências da UNESP (Botucatu, SP) e de criadores particulares. Amostras de peru, pato 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. Amostras de arara-azul-grande, provenientes da região de Carajás-PA, foram obtidas de coletas associadas ao 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.

Foram utilizadas amostras de penas e sangue de exemplares adultos. Após contenção das aves, foram retiradas penas em crescimento 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 europeia, com 6 dias de desenvolvimento, fase

em que a diferenciação gonadal inicia-se (Gilbert, 2003; Smith & Sinclair, 2004). Todo material coletado (penas, sangue e embriões) foi armazenado em tubos contendo etanol absoluto e mantido a -20°C até seu processamento.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA

A extração de DNA total foi realizada usando protocolo baseado na utilização de fenol-clorofórmio, segundo descrito por Bruford *et al.* (1992) com algumas modificações. Em um tubo de 1,5mL contendo uma alíquota do material biológico coletado, foram acrescentados 300 µL de TNE (50mM de Tris, 100mM de NaCl e 5mM de EDTA, pH 7,5), 30µL de Tris HCl 1M pH 7,5, 8µL de SDS 25% e 20µL de proteinase K (20mg/mL). O material foi incubado a 37°C durante 12 horas ou a 55°C por 4 horas em banho seco. Após a incubação, foram acrescentados aproximadamente 360µL 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. 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 ressuspenso em água ultrapura autoclavada e armazenado em freezer a -20°C.

3.2.2. Análise da qualidade e quantificação 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. 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 absorbância da luz na

faixa de 260/280nm e 230/260nm, respectivamente. Foram consideradas adequadas para utilização as amostras que apresentaram valores entre 1,8 a 2,1 em comparações de absorbância a 260/280nm ao espectrofotômetro.

3.2.3. Identificação do sexo das aves

3.2.3.1. Análise de caracteres morfológicos externos

Machos e fêmeas adultos e sexualmente maduros das espécies em estudo que apresentam dimorfismo sexual aparente foram identificados por caracteres morfológicos externos - galinha doméstica (machos: crista e barbela de maior tamanho, esporões pontiagudos, penas da cauda mais compridas), peru (machos: maior tamanho, apêndice carnosos sob o bico, penas com zonas de iridescência vermelha, violeta, verde, cobreada, bronze e dourada; fêmeas: penas em tons de castanho e cinza), avestruz (macho: plumagem preta e as pontas das asas são brancas; fêmea plumagem cinza (Eaton, 1992; Etches, 1996; Deeming & Bubier, 1999).

3.2.3.2. Sexagem molecular por PCR

A identificação molecular do sexo de animais adultos foi realizada tanto para as espécies que apresentam dimorfismo sexual como para aquelas que não apresentam diferenças morfológicas ou que possuam diferenças muito discretas entre os sexos.

- **Amplificação de segmentos dos genes *CHD1***

As reações de amplificação, utilizando os *primers* P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') e P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'), descritos por Griffiths *et al.* (1998), foram realizadas em um volume final de 10µL, sendo 6,1µL de água ultrapura estéril, 1,0µL de tampão (10x), 0,4µL de dNTPs (2mM), 0,4µL de MgCl₂ (25mM), 0,1µL de *Taq* DNA polimerase (5U/µL), 0,5µL de cada *primer* (10µM) e 1µL 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, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 5 minutos.

Para identificação de possíveis polimorfismos entre os genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, também foi utilizado o sistema de eletroforese capilar QIAxel Advanced (Qiagen) para visualização dos fragmentos gerados pela PCR em amostras de galinha doméstica.

- **Amplificação de segmentos dos genes *Spindlin***

As reações de amplificação, utilizando os *primers* SPIN12 (5'-GCAGAATACAGCATGGATGGAA-3') e SPIN13 (5'-AGGTGGGCATCACTAATTCGAG-3'), descritos por Kloet (2002), foram realizadas em um volume final de 12,5µL, sendo 6,5µL do kit Jumpstart™ RedTaq® Readymix (Sigma-Aldrich), 4,3µL de água ultrapura estéril, 0,5µL de cada *primer* (10µM) e 0,7µL de DNA (100ng). As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a 95°C por 30 segundos, 55°C por 20 segundos e 72°C por 80 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 10 minutos.

- **Amplificação de segmentos dos genes *ASW***

O conjunto de *primers* ASWF (5'- ATGGAGGTGCTTTTGTGG-3') e ASWR (5'- ACACGCTTAAACGGGATTG -3'), desenhado com o auxílio do programa Primer3plus, amplifica um fragmento de 221kb do gene ASW. As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 12,5µL, sendo 6,5µL do kit Jumpstart™ RedTaq® Readymix (Sigma-Aldrich), 4,3µL de água ultrapura estéril, 0,5µL de cada *primer* (10µM) e 0,7µL 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, 53°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 5 minutos.

- **Amplificação de segmentos da repetição *Xho1***

As reações de amplificação, utilizando os *primers* W02 (5'-CGTGAGAAAAGTGGTAGTTC-3') e W03 (5'- CCAAAAATACCACCTGTCTC-3'), descritos por Petite e Kegelmeyer (1995), foram realizadas em um volume final de 10µL, sendo 6,1µL de água ultrapura estéril, 1,0µL de tampão (10x), 0,4µL de dNTPs (2mM), 0,4µL de MgCl₂ (25mM), 0,1µL de Taq DNA polimerase (5U/µL), 0,5µL do *primer* P2 (10µM), 0,5µL do *primer* P8 (10µM) e 1µL de DNA (100ng). As reações de amplificação foram realizadas com desnaturação inicial a 94°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos a

94°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto. Um passo adicional de extensão a 72°C foi realizado por mais 10 minutos.

Em todas as reações de amplificação 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).

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), e visualizados em transiluminador, sob luz ultravioleta.

3.2.3.3 Sexagem molecular por PCR quantitativa (qPCR)

O valor de GDR (*gene dosage ratio*) foi obtido usando o método de quantificação relativa (ΔCt), onde o número relativo de cópias do gene é calculado como $2^{-\Delta Ct}$, sendo $\Delta Ct = Ct_{\text{target}} - Ct_{\text{reference}}$ (Bel *et al.* 2011). O gene de referência utilizado foi o gene autossômico de cópia simples GAPDH (Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase). Como alvo, utilizamos genes localizados no cromossomo Z *MHM* e *DMRT1*. O gene alvo e o de referência foram analisados simultaneamente em triplicatas. Para amplificação do gene *MHM*, foram utilizados os primers MHMs (Forward -5'-GCCAAACGCTGACAACTCT-3') e MHMa (5'- ATGTAGGTAGGTGGGAGGGA-3') desenvolvidos por Caetano & Ramos (2008). Os conjuntos para a amplificação dos genes *DMRT1* (Forward 5'AGCATTTTCATGGGTTCGTTC 3' e Reverse 5' TGTAATGGCAGCAAAGCAAG 3') e GAPDH (Forward 5'GGAAAGTCATCCCTGAGCTG 3' e Reverse 5' AACAGAGACATTGGGGGTTG 3') foram desenhados com o auxílio do programa Primer3Plus. A reação de qPCR foi realizada no StepOne Real-Time PCR Systems (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). A amplificação foi feita a 95 °C por 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

3.3. Amplificação da região *MHM* e prospecção de novos marcadores moleculares para sexagem

Amostras de DNA foram utilizadas em PCR utilizando 4 diferentes conjuntos de *primers*. Para a amplificação da sub-região 1, foi utilizado o conjunto descrito por Caetano & Ramos (2008). Tais *primers* foram desenhados com base nos dados levantados por Teranish *et al.* (2001) que primeiramente descreveram a região *MHM*. O conjunto de *primers* (*MHMs Forward* - 5'-GCCAAACGCTGACAACTCT-3' e *MHMa Reverse* - 5'-ATGTAGGTAGGTGGGAGGGA-3') amplifica um segmento de cerca de 240 pares de bases (Caetano & Ramos 2008). Um controle negativo (reação de amplificação contendo todos os componentes da PCR exceto amostra de DNA) foi sempre utilizado para monitorar qualquer possível contaminação.

Já a região descrita por Itoh *et al* (2011), foi dividida em 4 sub-regiões (2A, 2B, 2C e 4) e, a partir delas, foram geradas 2 sequências consenso que foram amplificadas com 2 conjuntos distintos – o conjunto 2AB4F (*Forward* 5'-TGTGCAACAGAACACCTCTT- 3') e 2AB4R (*Reverse* 5'-GACAGACCTGAGAAGACAATGG- 3') que amplifica um fragmento de 375 pb e o conjunto 2CF (*Forward* 5' - TGTGCAACAGAACACCTCTT - 3') e 2CR (*Reverse* 5'-GACAGACCTGAGAAGACAATGG - 3') que amplifica um fragmento de 619 pb.

Recentemente, foi identificada pela primeira vez uma região adjacente às inicialmente descritas para a região *MHM* (Jeronimo, 2016) e, portanto, também foi desenvolvido um conjunto de *primers* para verificação da presença/ausência, da composição nucleotídica e dos padrões de metilação deste segmento da região *MHM*. O conjunto 3F (*Forward* 5' – TGTGAAAGGCAGACTGAAAGA – 3') e (*Reverse* 5'-GCACCACAGCAGTTCAAATC- 3') amplifica um fragmento de 475 pb.

As amostras de DNA foram amplificadas em um volume final de 12,5µL contendo 1,25 µL tampão de PCR, 0,4µL de MgCl₂, 0,4µL dNTPs, 0,1µL de *Taq* DNA polimerase, 0,5µL de cada *primer* (*MHM2a* e *MHMs*), 1µL de DNA total em uma concentração de 100ng e 9,35µL de H₂O MilliQ autoclavada. 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 amplificação foram analisados em gel de poliacrilamida 6% 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.

3.4 Análise dos padrões de 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 de galinha doméstica foram utilizadas em ensaios de digestão enzimática para verificação dos padrões de metilação do loco *MHM*. As digestões enzimáticas foram realizadas com as enzimas *MspI* e *HpaII* (Invitrogen) cujos sítios de reconhecimento são CCmGG e CCGG, respectivamente. Embora sejam enzimas isoesquizômeras - reconhecem a mesma sequência de DNA, estas exibem diferentes sensibilidades a modificações de metilação no DNA. Visando a obtenção de resultados mais robustos, foi utilizada uma terceira enzima de restrição, a enzima *McrBC*, dependente de metilação que reconhece citosinas metiladas precedidas por uma purina (5'....PumC(N40-3000) PumC....3').

Alíquotas de 1µL de DNA total (cerca de 50ng) foram tratadas com 10U de cada enzima de restrição, separadamente, em 1µL de tampão 10x, 0,1µL de BSA e 6,9µL de água MilliQ 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 PCR para verificação dos perfis de metilação. Para tanto, foram utilizados os conjuntos de *primers* descritos no item 3.2.4.

3.4. Modificação de DNA por bissulfito de sódio

Ao tratar o DNA com bissulfito de sódio, as citosinas não-metiladas são convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem sem sofrer nenhuma alteração. O DNA tratado pode ser então utilizado em reações de PCR ou pode ser submetido ao sequenciamento nucleotídico para verificação de padrões de metilação (Hayatsu *et al.*, 2008).

A conversão por bissulfito seguiu os seguintes passos: Inicialmente, 2µL de DNA (30ng) foi adicionado a 2µL de hidróxido de sódio (3M) e 16µL de água pura estéril, o material foi incubado a 40°C por 15 minutos. Após este período, foi adicionado 208µL de bissulfito de sódio (2M)/ uréia (6,25M) e 12µL de hidroquinona (10mM). As amostras foram então colocadas em termociclador em ciclos de 55°C por 15 minutos e 95°C por 30 segundos. Os ciclos foram repetidos 20 vezes. Após este período, o DNA das amostras foi purificado seguindo as recomendações do kit PureLink Genomic DNA mini Kit Invitrogen®.

Após a purificação, foram adicionados 2µL de hidróxido de sódio (0,3M) ao DNA purificado (18µL) e esta reação foi incubada em temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram adicionados 75µL de acetato de amônio (5M, pH=7) e as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente, o DNA tratado foi precipitado com a adição de 350µL de etanol absoluto e 1µL de glicogênio. Este volume foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm e o sobrenadante foi desprezado. Em seguida, foram adicionados ao DNA 500µL de etanol 70% e o material foi centrifugado por 20 minutos a 14.000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado, o material obtido foi mantido à temperatura ambiente até secar totalmente. Após este período, o material foi ressuspensão em água ultrapura autoclavada e armazenado em freezer a -20°C.

3.5. Análise dos padrões de metilação da região *MHM* por MS-PCR (*Methylation Sensitive PCR*)

A técnica de MSP consiste em utilizar amostras de DNA convertidas por bissulfito em reações de PCR utilizando dois conjuntos de *primers* distintos – um capaz de amplificar amostras com DNA metilado e um para DNA não-metilado. De acordo com os resultados encontrados, é possível detectar diferenças nos padrões de metilação das amostras analisadas (Hayatsu *et al.*, 2008).

Para a verificação dos padrões diferenciais de metilação da região *MHM*, foram desenvolvidos conjuntos de *primers* baseados nas sequências descritas por Teranish *et al* (2001) e Jeronimo BC (2016). Os conjuntos 1MmF/ 1MmR e 2MmF/2MmR amplificam apenas amostras de DNA metilado e os conjuntos 1MuF/1MuR e 2MuF/2MuR são específicos para amostras de DNA não-metilado.

Os *primers* foram desenvolvidos com o auxílio do software MethPrimer e suas sequências encontram-se descritas abaixo.

Primers específicos para a região MHM 1:

DNA metilado → 1MmF (5' GTAGTCGTATCGGGTAAAGGC 3') e 1MmR (5' AAATACGAATAAATTACTATTACCAACCG 3')

DNA não-metilado → 1MUF (5' GTAGTTGTATTGGGTAAAGGTG 3') e 1MUR (5' AATACAAATAAATTACTATTACCAACCAAA 3').

Primers específicos para a região 2C:

DNA metilado → 2MmF (5' TAGTCGGTTTAAACGGGTCG 3') e 2MmR (5' CCTACATACCATCGACAAACC 3')

DNA não-metilado → 2MUF (5' AGTTGGTTTAAATGGGTTGG 3') e 2MUR (5' AAACACATTCCCTACATACCATCA 3')

3.6. Sequenciamento nucleotídico

Produtos de PCR associados à amplificação de segmentos da região *MHM* 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 ultrapura autoclavada 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 retirado com auxílio de uma micropipeta. O precipitado obtido foi lavado com cerca de 200µL de etanol 70% e a solução 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 o produto do

sequenciamento foi posteriormente dissolvido em 1,6µL de formamida:dextran azul 25mM EDTA (5:1), ressuspensão e desnaturado por 2 minutos a 90°C em banho seco. No gel de sequenciamento, foram carregados 1,6µL de cada amostra.

3.7. Análise das sequências nucleotídicas associadas à região MHM

As sequências nucleotídicas dos eletroferogramas foram analisadas, editadas e alinhadas com o programa computacional Geneious 4.8.5 (Drummond, 2009). Para comparação das sequências obtidas com outras sequências depositadas no GenBank, incluindo sequências de *Gallus gallus* (access AB046699) (Teranish *et al.*, 2001), e confirmação da identidade das sequências geradas, foi utilizado o algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1990), por meio do site National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

3.8. Análises *in silico* da sequência e organização genômica da região MHM em galinha doméstica

A visualização dos eletroferogramas e análise das sequências nucleotídicas obtidas foram feitas por meio do programa computacional Chromas Lite 2.01 (Technelysium Pty Ltd., 2007). As sequências individuais geradas foram posteriormente editadas e alinhadas com o programa Geneious 4.8.5 (Drummond, 2009) e as sequências consenso foram determinadas manualmente. As sequências nucleotídicas associadas à região MHM foram também submetidas a análises BLAT Search Genome (<https://genome.ucsc.edu>) que localiza sequências de, pelo menos, 95% de identidade em 25 bases ou mais de comprimento e que gera índices baseados em genomas completos.

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.

As sequências de bases nitrogenadas das repetições concatenadas associadas à região MHM de galinha doméstica 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 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 Circus - Circular Genome Data Visualization (<http://circos.ca/software>) foi utilizado para geração de um ideograma circular contendo informações acerca de relações entre segmentos de DNA e de posições específicas, tamanho e orientação de elementos genômicos associados à região MHM.

3.9. Produção de material de divulgação científica

Uma cartilha educativa com o tema “Epigenética” foi produzida, visando a divulgação e a compreensão facilitada dos principais fenômenos epigenéticos. Este material contém textos em uma linguagem apropriada à divulgação ou popularização científica (definida como o uso de processos e recursos técnicos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral) e ilustrações com o intuito de despertar a curiosidade para o tema abordado. Este material deverá ser disponibilizado à Rede Nacional Leopoldo de Meis de Educação e Ciência: Novos Talentos da Rede Pública - RNEC (<http://educacaoeciencia.org/>) e também na plataforma de compartilhamento de documentos e obras Scribd, de forma gratuita (www.scribd.com).

4. Resultados

4.1. Amostragem biológica

Foram coletadas amostras de 26 espécies pertencentes a 16 diferentes ordens, englobando praticamente metade de todas as ordens de aves encontradas no Brasil (Tabela 1). As amostras biológicas foram obtidas de forma não-destrutiva - sangue e/ou penas em crescimento - e mostraram-se adequadas para o uso em reações de PCR, gerando DNA com uma concentração entre 50 e 500 ng/ μ L e valores de absorbância entre 1,8 a 2,2 a 260/280nm em espectrofotômetro. Análises em gel de agarose 1% ratificaram as concentrações e a integridade das amostras de DNA isoladas (Figura 2).

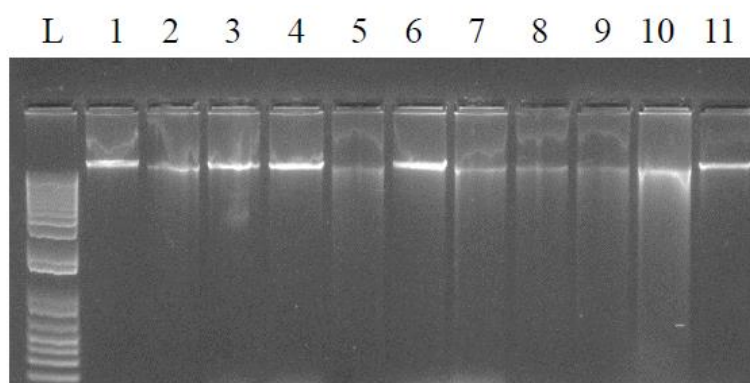


Figura 2. Resultado de eletroforese em gel de agarose 1% evidenciando amostras de DNA obtidas (1 a 11) a partir de sangue de exemplares de galinha doméstica (*Gallus gallus*). L, marcador de peso molecular 1Kb.

A amostragem destrutiva foi empregada apenas em espécies não silvestres - galinha doméstica e codorna europeia. Para tanto, foram utilizados embriões com 6 dias de desenvolvimento, o que permitiu a obtenção de amostras de DNA com concentrações de 250-1500ng/ μ L.

4.2. Sexagem molecular

Foi possível identificar machos e fêmeas de grande parte dos animais em estudo. Os exemplares adultos de galinha doméstica, perdiz, pato e avestruz tiveram o sexo identificado também por meio da visualização de caracteres externos.

- Amplificação do gene *CHD1*

Todos os animais do presente estudo foram sexados por meio da amplificação de fragmentos do gene *CHD1* gerados pelos *primers* P2 e P8 com posterior visualização em gel de agarose. O padrão esperado da amplificação é de dois fragmentos de DNA de tamanhos distintos para fêmeas e um único fragmento de DNA machos. Os padrões observados são evidenciados nas Figura 3 a 7.

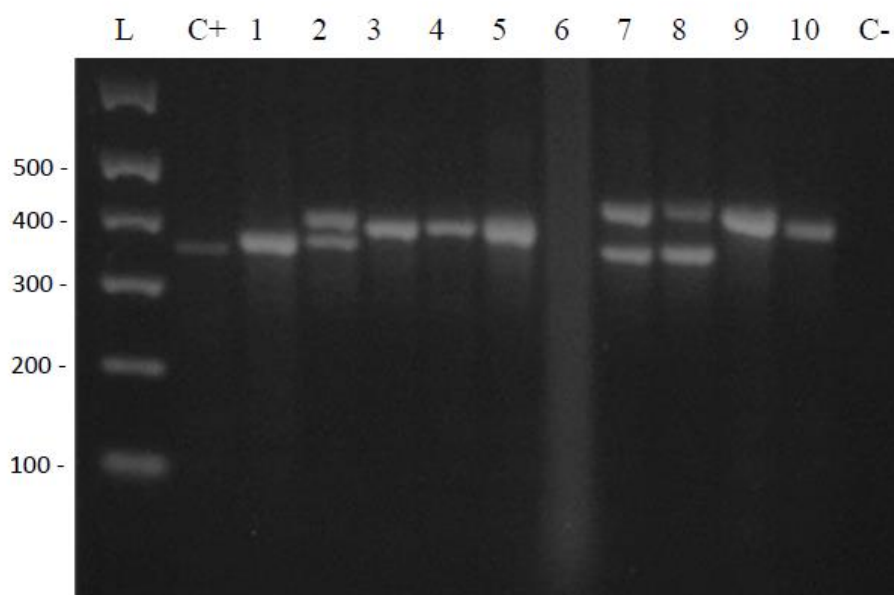


Figura 3. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, visualizados em gel de agarose 2%: C+, controle positivo (amostra de DNA previamente sexada), 1. Galinha doméstica (F), 2. Perdiz (M), 3. Perdiz (M), 4. Gavião-carijó (n/i), 5. Gavião-cinza (n/i), 6. Gavião-carijó (n/i), 7. Anu branco (n/i), 8. Carcará (F), 9. Carcará (F), 10. Falcão-de-coleira (n/i), 11. Urutau (n/i), C-, controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado. n/i, amostra cujo sexo não foi identificado previamente.

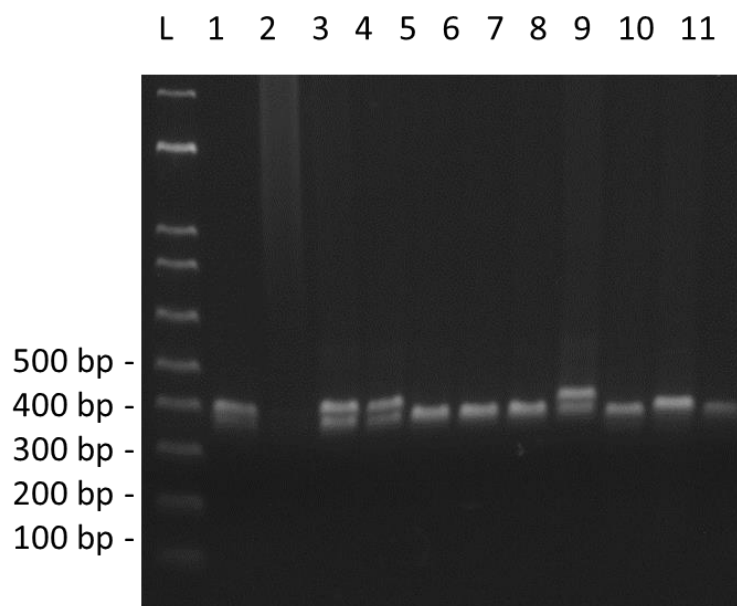


Figura 4. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, visualizados em gel de agarose 2%: 1 a 5. Perdiz (F), 6 e 7, Perdiz (M), 8 e 9. Pato doméstico (F). 10 e 11. Pato doméstico (M). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado.

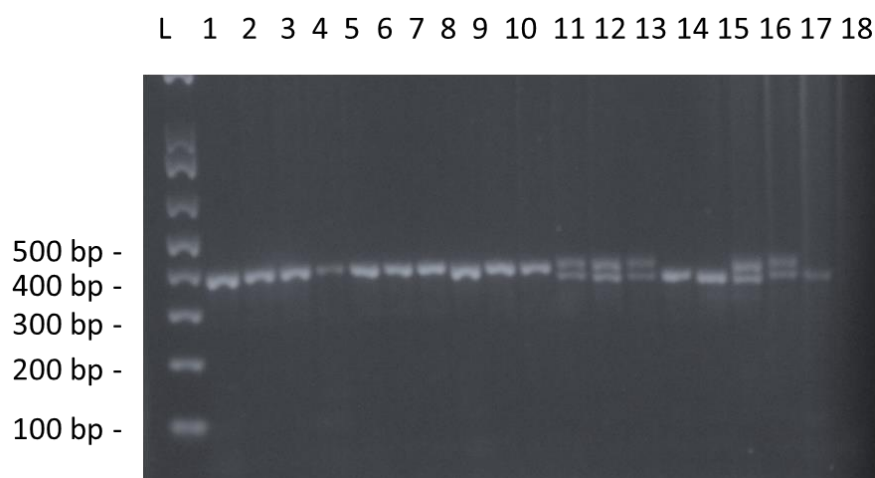


Figura 5. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, visualizados em gel de agarose 2%: 1 a 10. Codorna europeia (Poços 2,3,7 e 10. F e 1, 4,5,6,8 e 9. M), 11 a 14. Perdiz (F), 15 a 18. Perdiz (M). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado.

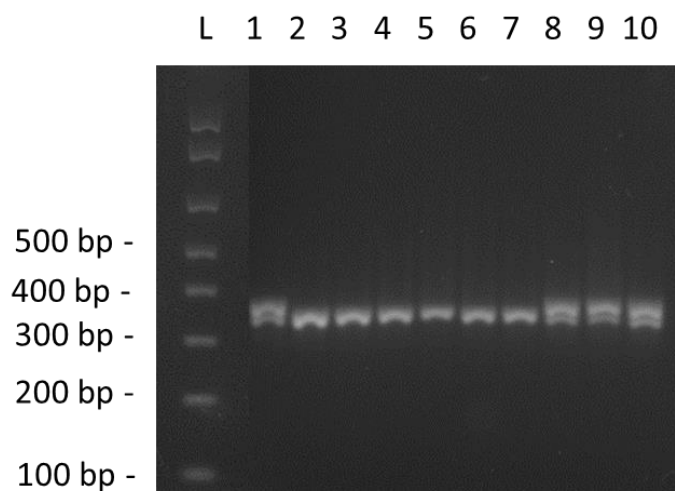


Figura 6. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, visualizados em gel de agarose 2%: 1. Maitaca (F), 2 e 3. Maitaca (M) 4 a 7. Papagaio-verdadeiro (M) e 8 a 10. Arara-azul (F). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado.

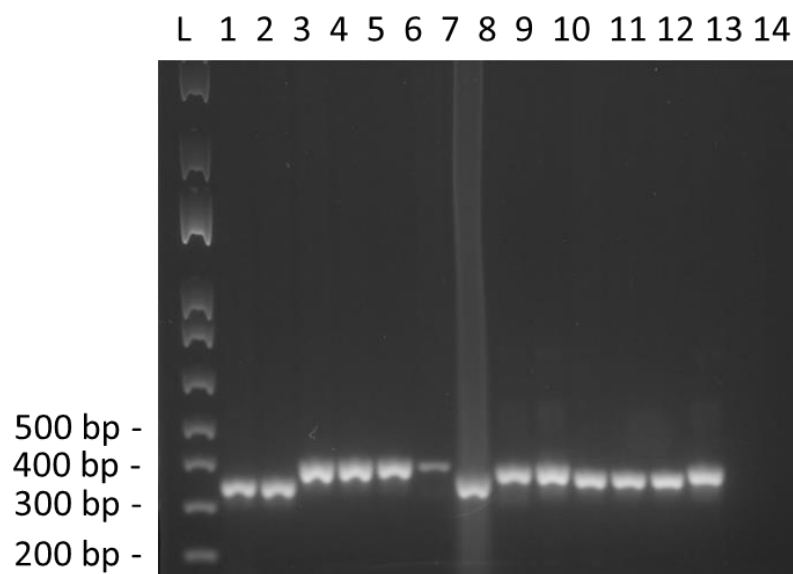


Figura 7. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, visualizados em gel de agarose 2%: 1. Galinha doméstica (F), 2. Galinha doméstica (M), 3 a 5. Curicaca (n/i), 6. Urubu (n/i), 7. Anu branco (n/i), 8. Gavião pega-macaco (n/i), 9. Gavião- carijó (n/i), 10 a 12. Seriema (n/i), 13. Quero-quero (n/i), 14. Galinha doméstica (F). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases).

Com o objetivo de verificar a ocorrência de possíveis polimorfismos referentes ao gene *CHD1* no organismo modelo do presente estudo, a galinha doméstica, foi realizada a visualização dos fragmentos amplificados pelos *primers* P2 e P8 por meio do sistema QIAxel. Este sistema apresenta uma alta sensibilidade e dispensa a utilização de gel de agarose, uma vez que é realizada uma eletroforese capilar automatizada. Foi possível verificar o padrão esperado na amplificação dos alelos *CHD1-Z* e *CHD1-W* - duas bandas distintas para fêmeas e uma banda para machos (Figura 8).

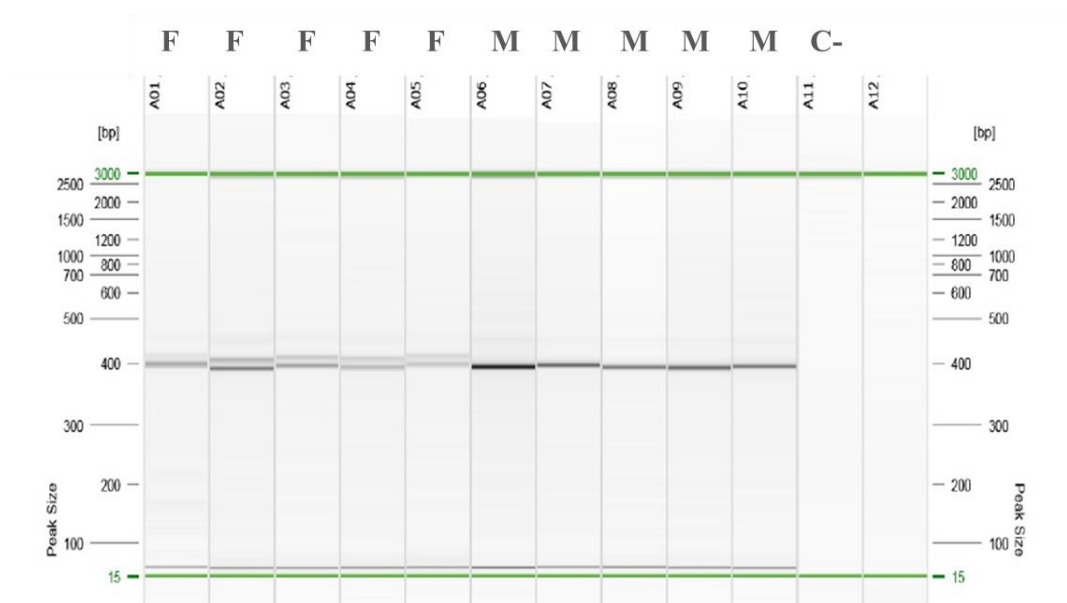


Figura 8. Resultados de sexagem molecular, associada à amplificação de segmentos dos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*, realizada em exemplares de galinha doméstica e visualizada através do *software* QIAxel. F, fêmeas, M, machos, C-, controle negativo (PCR sem amostra de DNA). Nas laterais da figura, encontram-se indicados os tamanhos de fragmentos de DNA padrão, em pares de bases.

- Amplificação do gene *Spindlin*

O gene *Spindlin* também foi utilizado para realização da sexagem dos animais do presente estudo. O conjunto de primer utilizado foi descrito por Koet (2002) e foi desenvolvido para o grupo dos Tinamiformes. Segundo o autor, embora o padrão esperado seja de um fragmento de 1,0kb para fêmeas e um fragmento de aproximadamente 1,0kb comum aos dois sexos, também foram observados fragmentos menores ou maiores em algumas espécies. Os padrões observados no presente trabalho são evidenciados nas Figura 9 a 11.

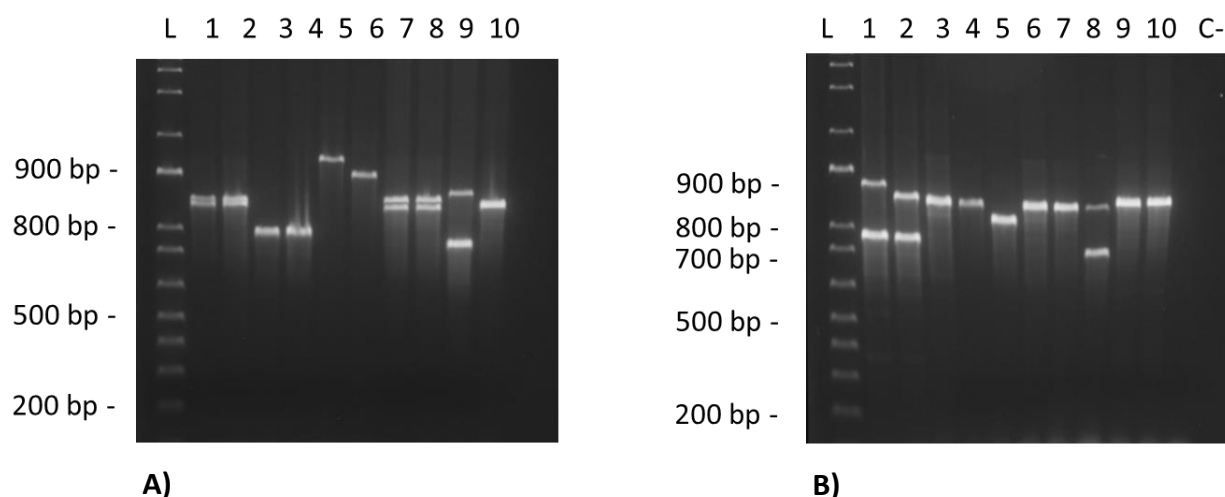


Figura 9. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene *Spindlin* visualizados em gel de agarose 2%: A) 1 e 2. Coruja orelhuda (F), 2. Beija-flor-tesoura (M), 3. Beija-flor-tesoura (F), 4. Tucanuçu (F), 5. Tucanuçu(M) 7 e 8. Carcará (F), 9. Perdiz (F), 10. Perdiz (M). B) 1 e 2. Perdiz (F), 3. Papagaio (F), 4. Papagaio (M), 5. Gavião-carijó (n/i), 6. Gavião-cinza (n/i), 7. Pato doméstico (M), 8. Pato doméstico (F), 9. Perdiz (F), 10. Periz (M). C, Controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado. N/i, amostra cujo sexo não foi identificado previamente.

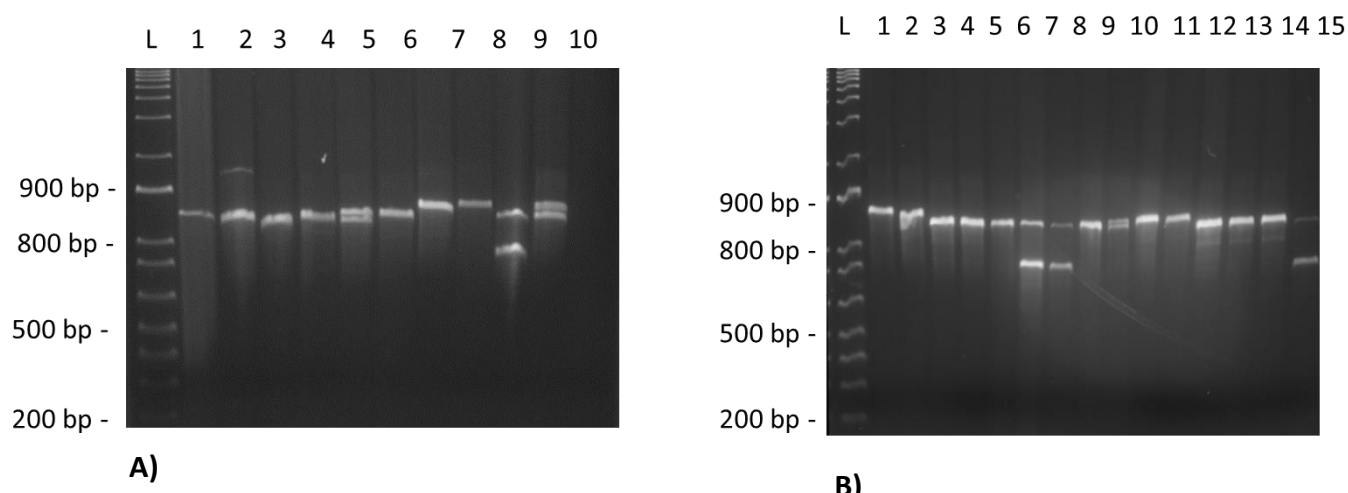


Figura 10. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene *Spindlin* visualizados em gel de agarose 2%: A) 1. Anu-branco (n/i), 2. Gavião-carijó (n/i), 3. Gavião pega-macaco (n/i), 4. Gavião-carijó (n/i), 5. Urubu (n/i), 6. Falcão-de-coleira (n/i), 7. Quero-quero (n/i), 8. Carcará (M), 9. Perdiz (F), 10. Perdiz (M). B) 1 e 2. Curicaca

(n/i), 3 e 4. Seriema (n/i), 5 e 6. Pato-doméstico (F), 7 e 8. Pato-doméstico (M), 9. Coruja-orelhuda (F), Coruja-orelhuda (M), 11. Coruja-de-igreja (F), 12. Avestruz (M), 13 e 14. Avestruz (F), 15. Peru (F). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado. N/i, amostra cujo sexo não foi identificado previamente.

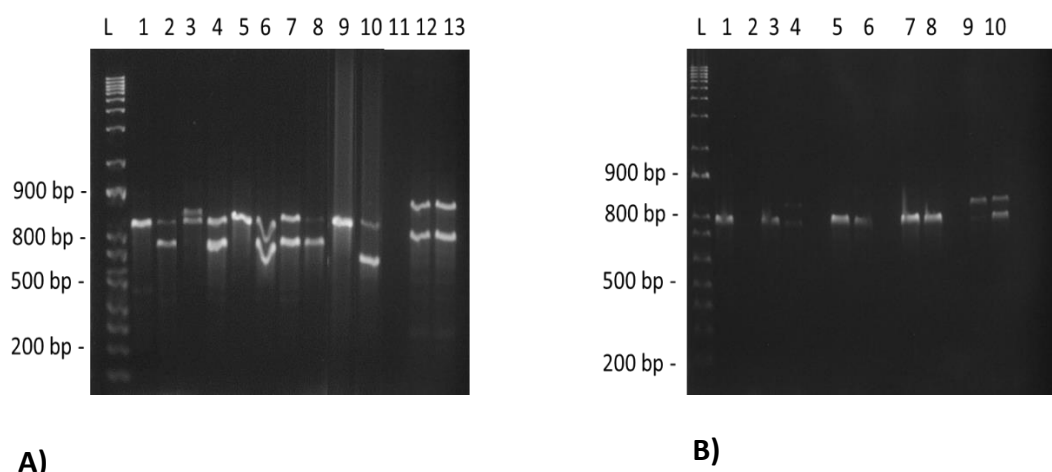


Figura 11. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene *Spindlin* visualizados em gel de agarose 2%: A) 1. Galinha doméstica (M), 2. Galinha doméstica (F), 3, 5 e 7. Codorna europeia (M), 4, 6 e 8 Codorna europeia (F) 9. Peru (M), 10. Peru (F). 11-, 12 e 13. Perdiz (F). B) 1 e 3. Beija-flor-da-banda-branca (M), 2 e 4. Beija-flor-da-banda-branca (F), 5 e 6. Beija-flor-de-orelha-violeta (M), 7. Beija-flor-tesoura (M), 8. Beija-flor-tesoura 9 e 10. Beija-flor-preto (F). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases). F, Fêmea previamente sexada. M, Macho previamente sexado.

- Amplificação do gene ASW

O gene ASW está localizado no cromossomo W, o que o torna um potencial marcador de sexagem. Para sua amplificação, foi desenhado um conjunto de *primers* baseado na sequência do gene em galinha doméstica. O conjunto apresentou resultados promissores apenas em peru, uma vez que foi observada amplificação em machos de algumas das espécies testadas. Os padrões observados são evidenciados nas Figura 12 e 13.

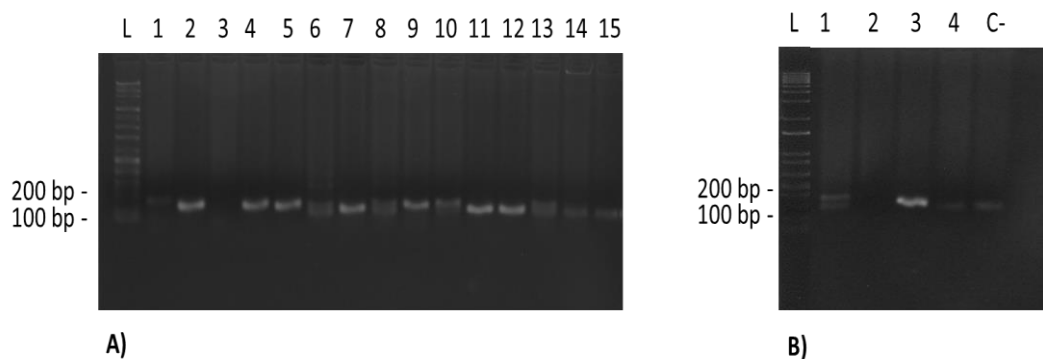


Figura 12. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene ASW visualizados em gel de agarose 2%: A) 1 a 6. Fêmeas de galinha doméstica, 7 a 10. Machos de galinha doméstica, 11 e 12. Fêmeas de peru, 14 e 15. Machos de peru. B) 1 e 2. Galinha doméstica 3 e 4. Peru. C-. Controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases).

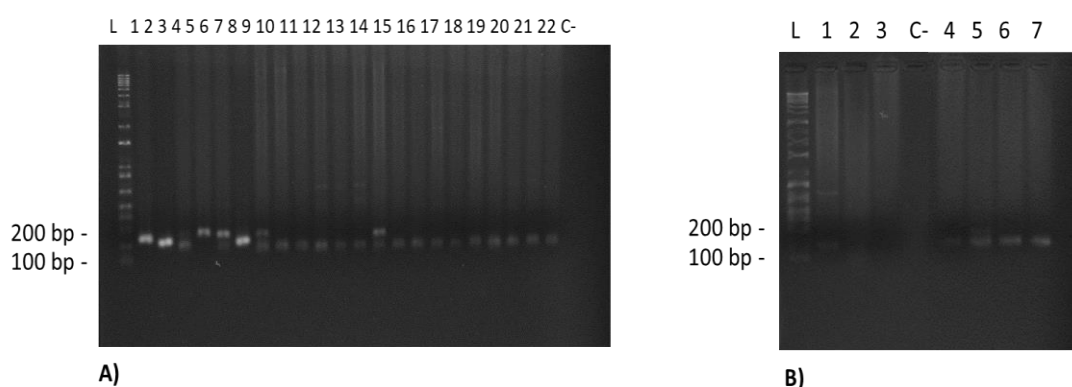


Figura 13. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene ASW visualizados em gel de agarose 2%: A) 1 a 6. Galinha doméstica, 8 e 9. Perdiz, 10 a 12. Coruja orelhuda, 13. Corujinha-do-mato, 14. Suindara, 15 e 16. Beija-flor-de-banda-branca, 17 a 20. Beija-flor tesoura, 21 e 22. Papagaio verdadeiro. B) 1 a 3. Avestruz, 4 e 5. Codorna europeia, 6 e 7. Pato doméstico. C-. Controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases).

- Amplificação da repetição *XhoI*

Para a amplificação da repetição *XhoI*, foram utilizados os *primers* descritos por Petite & Kegelmeyer (1995) que amplifica um fragmento de aproximadamente 276 pb. Assim como o gene ASW, esta repetição está presente apenas no cromossomo W de galinha doméstica, portanto é esperado que haja amplificação apenas em amostras de fêmeas. Não obtivemos êxito na padronização deste marcador, uma vez que foi observada

amplificação em machos de galinha doméstica. Não foi observada amplificação desta repetição em outras espécies do presente estudo. Os padrões observados são evidenciados na Figura 14.

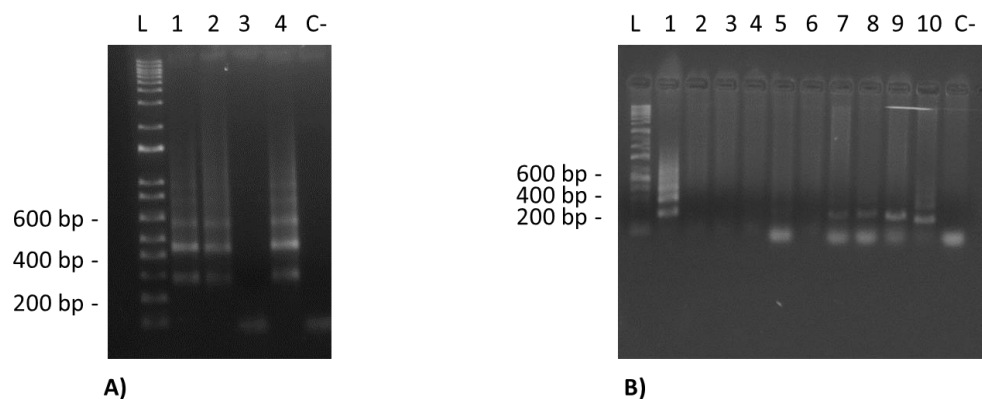
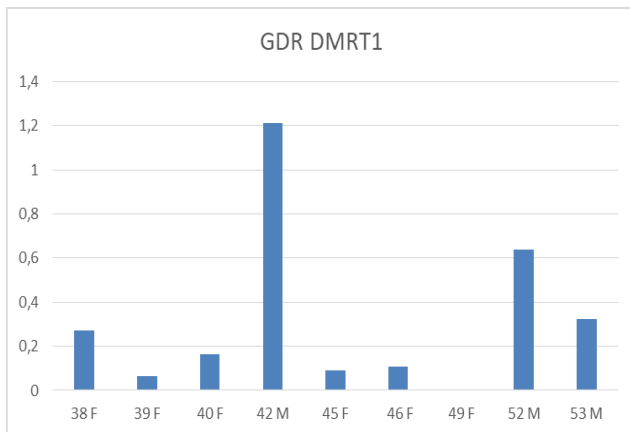


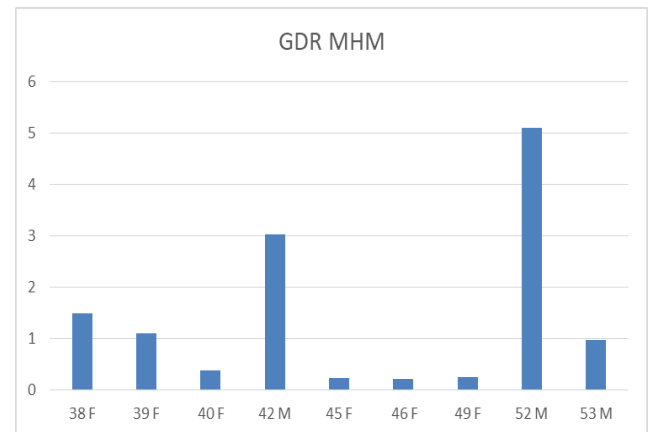
Figura 14. Produtos de PCR, relativos à amplificação de segmentos do gene *ASW* em galinha doméstica visualizados em gel de agarose 2%: A) 1 e 3. Machos, 2 e 4. Fêmeas. B) 1 a 5. Fêmeas e 6 a 10. Machos. C-. Controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases).

4.3. Sexagem molecular por qPCR

Para realizar a sexagem com base no número de cópias de segmentos de DNA, foi utilizado o gene autossômico de cópia simples *GAPDH* como referência para normalização das do número de cópias dos genes *DMRT1* e *MHM*, que estão localizados no cromossomo Z, portanto presentes em duas cópias em machos e uma cópia em fêmeas. Esta técnica foi utilizada em galinha doméstica e codorna europeia (Figuras 15 e 16), apresentando resultados positivos apenas em *G. gallus*. Não foi possível padronizar a reação de amplificação dos genes *DMRT1* e *MHM* para as demais espécies em estudo.

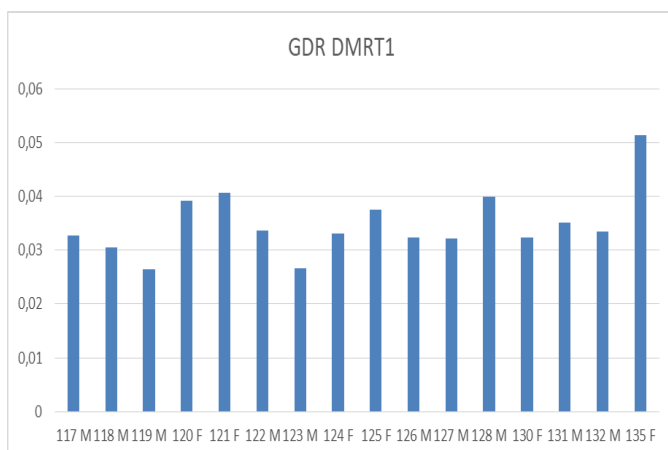


A.

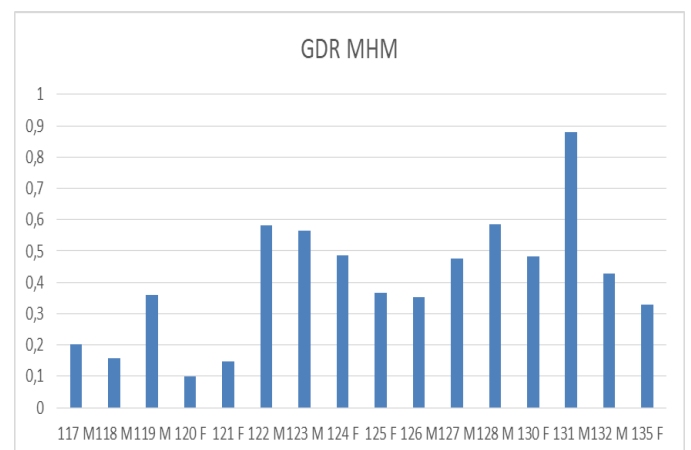


B.

Figura 15. Análise da técnica GDR em machos e fêmeas de galinha doméstica. A) Comparação do número de cópias do gene referência com o gene *DMRT1*. B) Comparação do número de cópias do gene referência com o gene *MHM*.



A)



B)

Figura 16. Análise da técnica GDR em machos e fêmeas de codorna europeia. (A) Comparação do número de cópias do gene referência com o gene *DMRT1*. B) Comparação do número de cópias do gene referência com o gene *MHM*.

4.4. Caracterização *in silico* da região *MHM* de galinha doméstica

A região *MHM* de galinha doméstica caracterizada representa um segmento de 72kb, consistindo de 35 repetições de cerca de 2.2 kb e com alto conteúdo de CG. Esta é delimitada por duas LINES (*Long Interspersed Nuclear Elements*) que apresentam menor conteúdo CG em relação sequências adjacentes. O loco *MHM* também apresenta múltiplos elementos repetitivos da classe LTR (*Long Terminal Repeat*), especialmente os pertencentes à família EVRL (*Endogenous Retrovirus*), denominados GGLTR5A. Esta região do loco *MHM* foi denominada de região *MHM* 1.

Foi possível descrever, pela primeira vez, uma região *MHM* expandida (denominada de e*MHM*) que foi dividida em sub-regiões designadas como: 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 17A). Estas sub-regiões caracterizam-se por três diferentes unidades de repetição (denominadas como *repeats* 1, 2 e 3), cada uma flanqueada por LTRs específicas. As sub-regiões 3A e 3B resultaram de duplicações segmentares invertidas. A primeira duplicação, com aproximadamente 32.200 pares de bases, possui uma orientação invertida e está inserida nas sub-regiões 3A e 3B. A segunda duplicação, identificada como segmento 2A, tem cerca de 12.970 pares de bases e encontra-se na sub-região 2 (Figura 17B). As sequências consenso das sub-regiões 1, 2 e 3 contêm ilhas CpG (tamanho do fragmento >200bp, conteúdo de CG >50%, e CpG obs/esp>0.6).

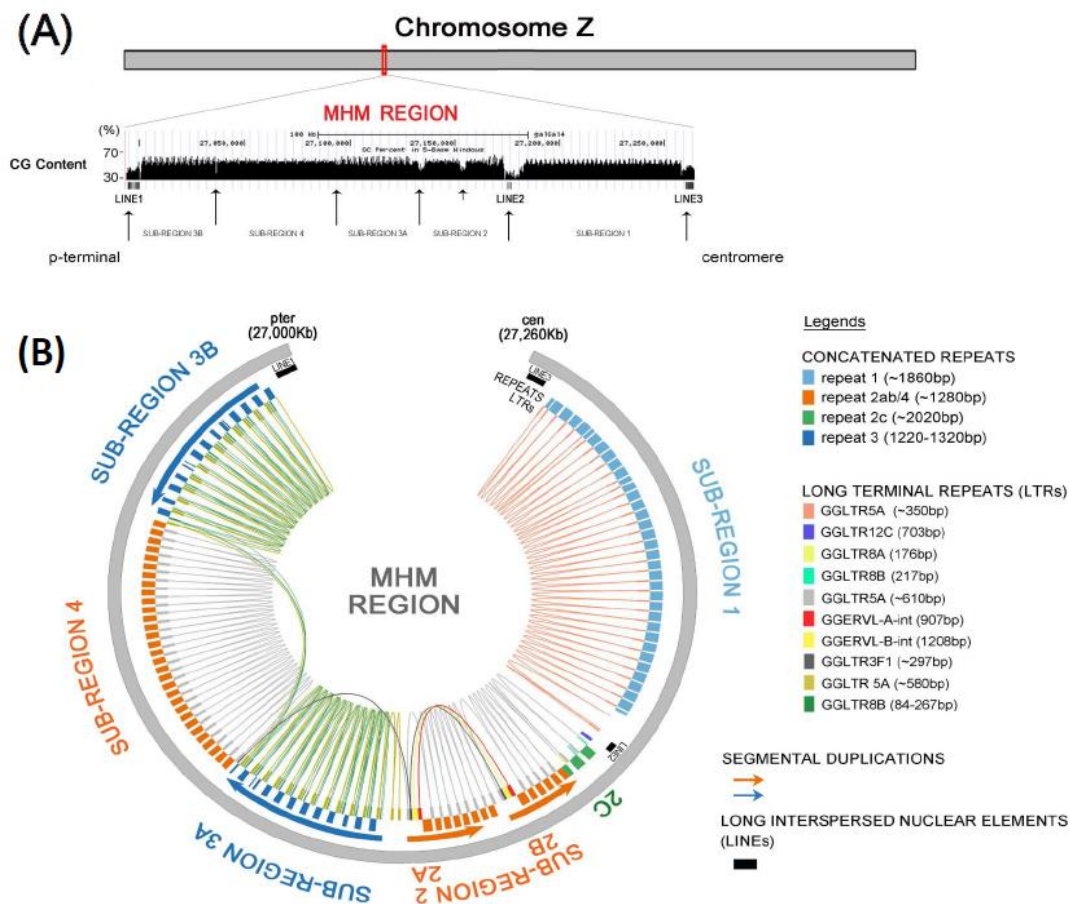


Figura 17. Detalhes da estrutura genômica da região *MHM* de galinha doméstica (*Gallus gallus*), localizada no braço curto do cromossomo Z e composta por 260 kb e alto conteúdo de CG. Três LINES e LTRs (setas) apresentam menores conteúdos de CG. A posição dos elementos repetitivos foram usadas como marcadores para delimitar sub-regiões que foram numeradas do centrômero para o telômero (sub-regiões 1, 2, 3A, 4 e 3B) (A). Repetições concatenadas (repeats 1, 2 e 3), LTRs, duplicações segmentares e LINES encontram-se diferenciadas por cores.

4.5. Identificação da região *MHM* em outras espécies de aves

Visando verificar a presença ou ausência da região *MHM* em outras espécies de aves, reações de amplificação foram realizadas com amostras de DNA das espécies em estudo. Dados prévios já haviam sido obtidos para codorna europeia, peru, avestruz e beija-flor-da-banda-branca. Comparações com sequências depositadas no GeneBank

evidenciaram um alto índice de identidade (80-97%) entre a região *MHM* de galinha doméstica descrita por Teranish *et al.* (2001) e as sequências nucleotídicas obtidas de codorna, peru e avestruz. Entretanto, os fragmentos de DNA amplificados de beija-flor-da-banda-branca não apresentaram similaridade significativa com a sequência referência de galinha doméstica (Jeronimo, 2016). Produtos de amplificação associados ao loco *MHM* também foram obtidos para exemplares de tucanuçu, maitaca, perdiz, gavião-carijó, carcará e urutau (Figura 18). Não foi possível padronizar a reação de amplificação para as demais espécies.

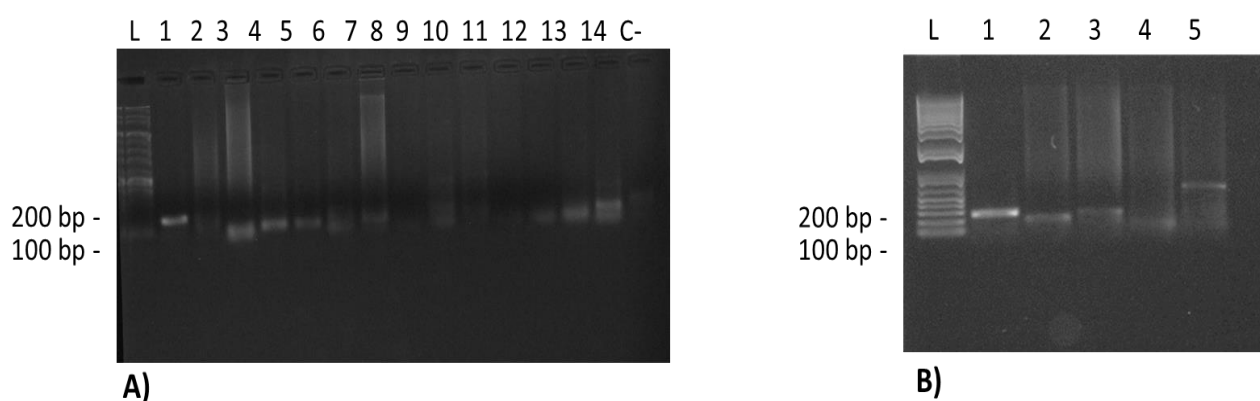


Figura 18. Resultados de PCR em amostras de DNA de diferentes espécies de aves evidenciando, em gel de agarose 1%, um fragmento de DNA gerado com o conjunto de *primers* MHMs/MHMa associados à região *MHM* (sub-região 1). A) 1. Galinha doméstica, 2 e 3. Tucanuçu, 4 e 5. Maitaca, 6 e 7. Pato doméstico, 8 a 10. Avestruz, 11 e 12. Beija-flor-da-banda-branca, 13 e 14. Coruja-orelhuda. B) 1. Galinha doméstica, 2. Perdiz, 3. Gavião-carijó, 4. Carcará, 5. Urutau. C-, Controle negativo (PCR sem amostra de DNA). L, marcador de peso molecular 1Kb (tamanho dos fragmentos indicados, à esquerda, em pares de bases).

4.6. Potencial uso de padrões diferenciais de metilação da região *MHM* para sexagem molecular de aves

Foram utilizadas três diferentes enzimas de restrição - *HpaII*, *MspI* e *McrBC* - em ensaios de digestão enzimática para verificação de padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas de galinha doméstica. As amostras digeridas foram posteriormente submetidas à amplificação utilizando os conjuntos de *primers* MHMs e MHMa, 2AB4F e 2AB4R, 2CF e 2CR e 3F e 3R (Figura 19).

Todos os conjuntos, exceto o 2AB4F e 2ABR, apresentaram o mesmo padrão diferencial de metilação entre machos e fêmeas. Os resultados encontrados com os *primers* 2AB4F e 2ABR foram inconclusivos, uma vez que apresentaram padrões de amplificação inconsistentes nas amostras digeridas, sugerindo falhas técnicas decorrentes de digestão parcial do DNA genômico. Este conjunto amplifica uma região grande, compreendendo aproximadamente 45 repetições, mesmo utilizando um excesso considerável das enzimas de restrição, não foi possível obter resultados satisfatórios.

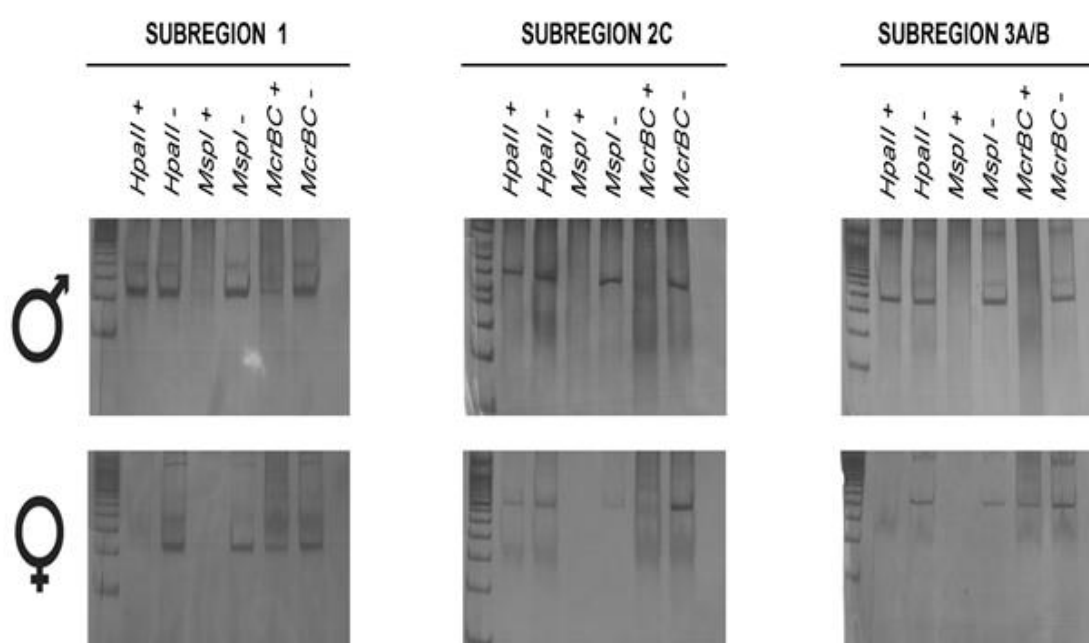


Figura 19. Resultados de digestão enzimática de amostras de DNA em machos e fêmeas de galinha doméstica e posterior PCR para amplificação de segmentos de DNA associados a região *MHM* com os conjuntos MHMs e MHMa (subregion 1), 2CF e 2CR (subregion 2C) e 3F e 3R (subregion 3A/B) visualizados em géis de acrilamida 6%.

Também foi realizada a digestão enzimática de amostras de DNA de perdiz com as enzimas *HpaII* e *MspI* com posterior amplificação do loco *MHM1*. Os resultados, porém, diferem dos encontrados para *G.gallus* (Figura 20).

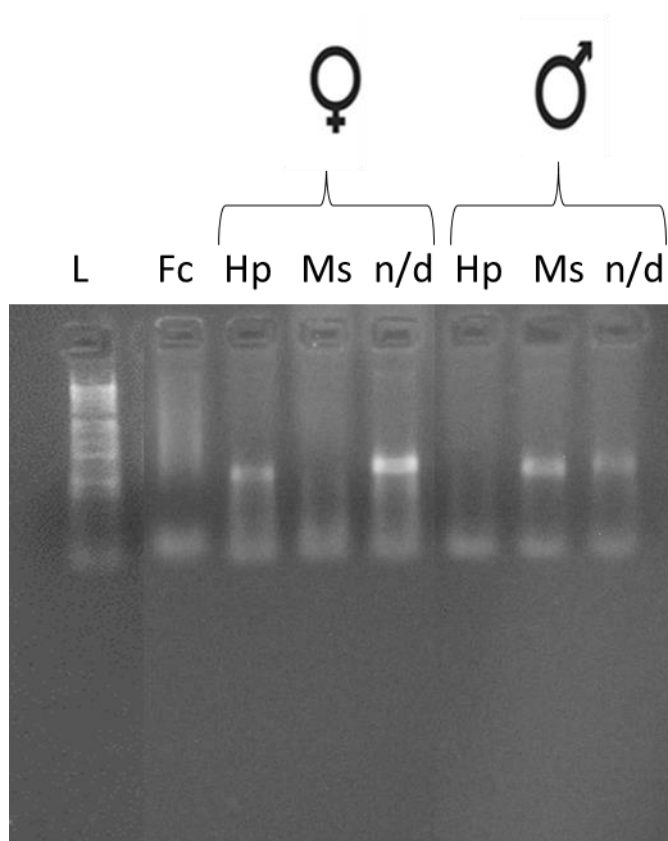
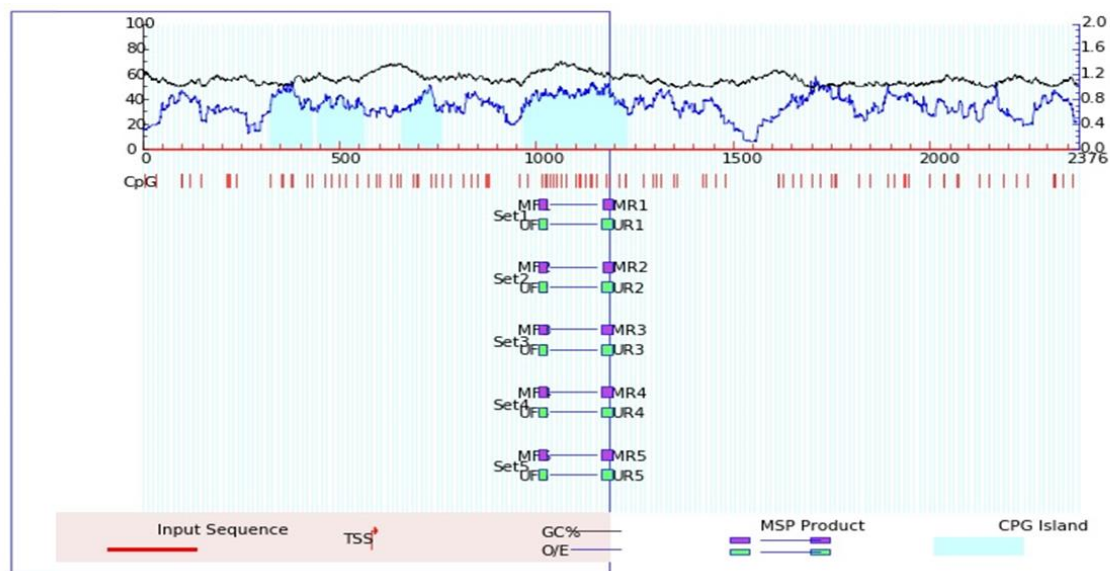


Figura 20. Resultados de digestão enzimática de amostras de DNA em machos e fêmeas de perdiz e posterior PCR para amplificação de segmentos de DNA associados a região MHM 1 visualizados em géis de agarose 2%.

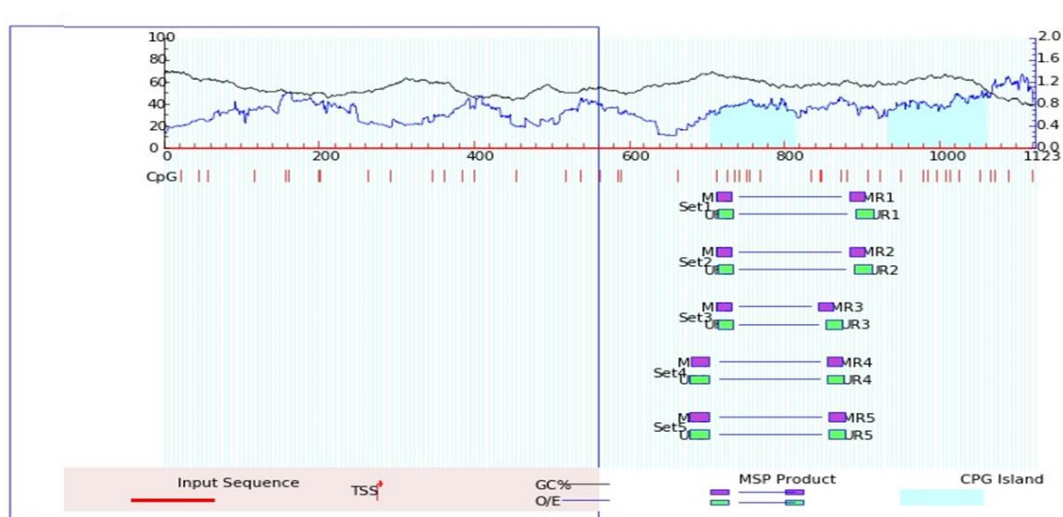
4.7. Análise dos padrões de metilação da região *MHM* por MS-PCR (*Methylation Sensitive PCR*)

Para a realização desta técnica, foram desenvolvidos *primers* para as sub-regiões 1 e 2C com auxílio do software online Methprimer (Figura 21). Não foi possível desenvolver um conjunto de *primers* para a sub-região 3. Amostras de galinha doméstica, codorna europeia e perdiz foram tratadas com bissulfito de sódio e submetidas à amplificação dos fragmentos relacionados as sequências acima citadas. Apenas as

amostras amplificadas pelo conjunto de *primers* da sub-região 1, referentes a sequências metiladas de galinha doméstica, apresentaram resultados positivos (Figura 21).



A)



B)

Figura 21. Diagrama gerado pelo software MethPrimer com base no genoma de *G. gallus* relacionado ao local de amplificação dos *primers* por ele gerados. As regiões amplificadas estão inseridas em ilhas CpG. A) Sub-região 1. B) Sub-região 2C.

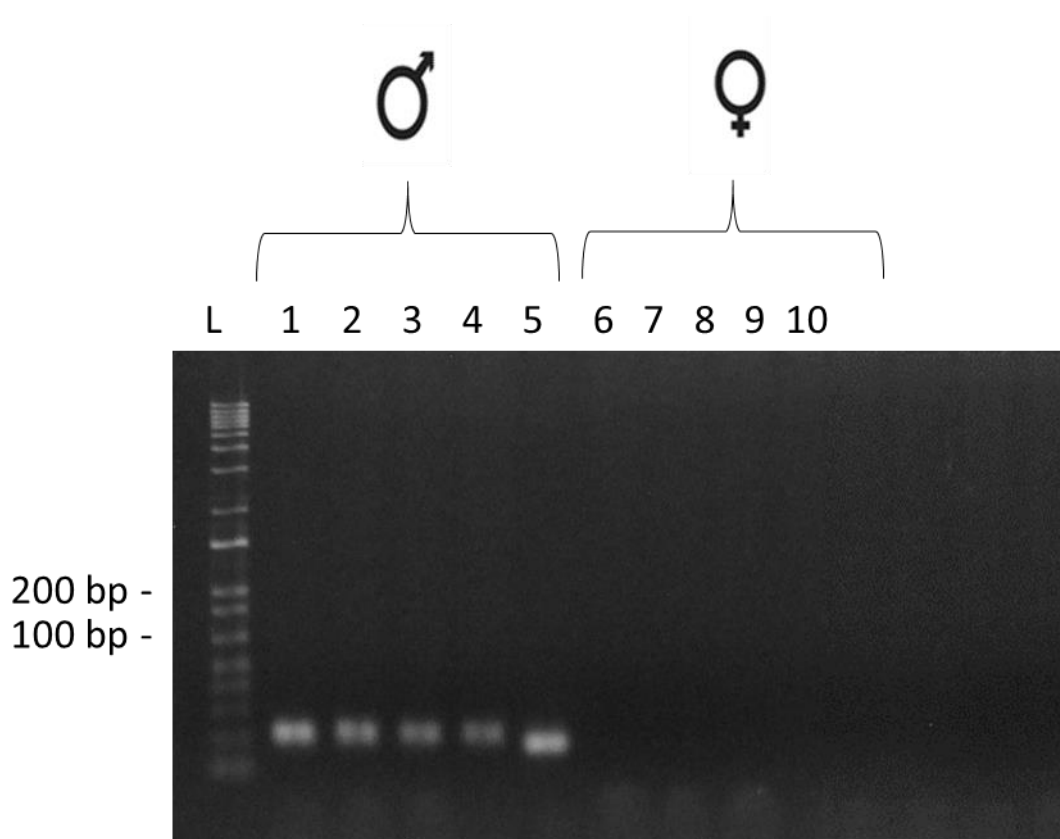


Figura 22. Resultados da amplificação de segmentos de DNA modificados por bissulfito e associados a região *MHM1*, com a utilização de *primers* específicos para DNA metilado. 1 a 5. Machos de galinha doméstica, 6 a 10. Fêmeas de galinha doméstica.

4.8. Sequenciamento nucleotídico

Foram realizadas reações de amplificação da região *MHM1* em amostras de perdiz (um macho e uma fêmea). Estas amostras foram então submetidas ao sequenciamento nucleotídico e os dados gerados foram submetidos a análises em 2 bancos de dados distintos. Segundo resultados obtidos pelo NCBI, as amostras apresentam alta similaridade com uma região do genoma de *Apteryx australis mantelli* (ave endêmica da Nova Zelândia, popularmente conhecida como kiwi marrom). Porém, ao utilizar o software online Blat que alinha a sequência depositada com genomas completos, as amostras geradas para perdiz apresentaram 100% de identidade com uma porção da região MHM 1 de galinha doméstica.

4.9. Produção de material de divulgação científica com o tema Epigenética

O material de divulgação científica produzido (textos e figuras) foi elaborado na forma de uma cartilha - denominada de “O Tema é: Epigenética – O liga e desliga do DNA” e encontra-se detalhado em anexo. O material aborda de forma descontraída as principais modificações epigenéticas, como metilação e modificações de histonas, bem como suas funções nos organismos.

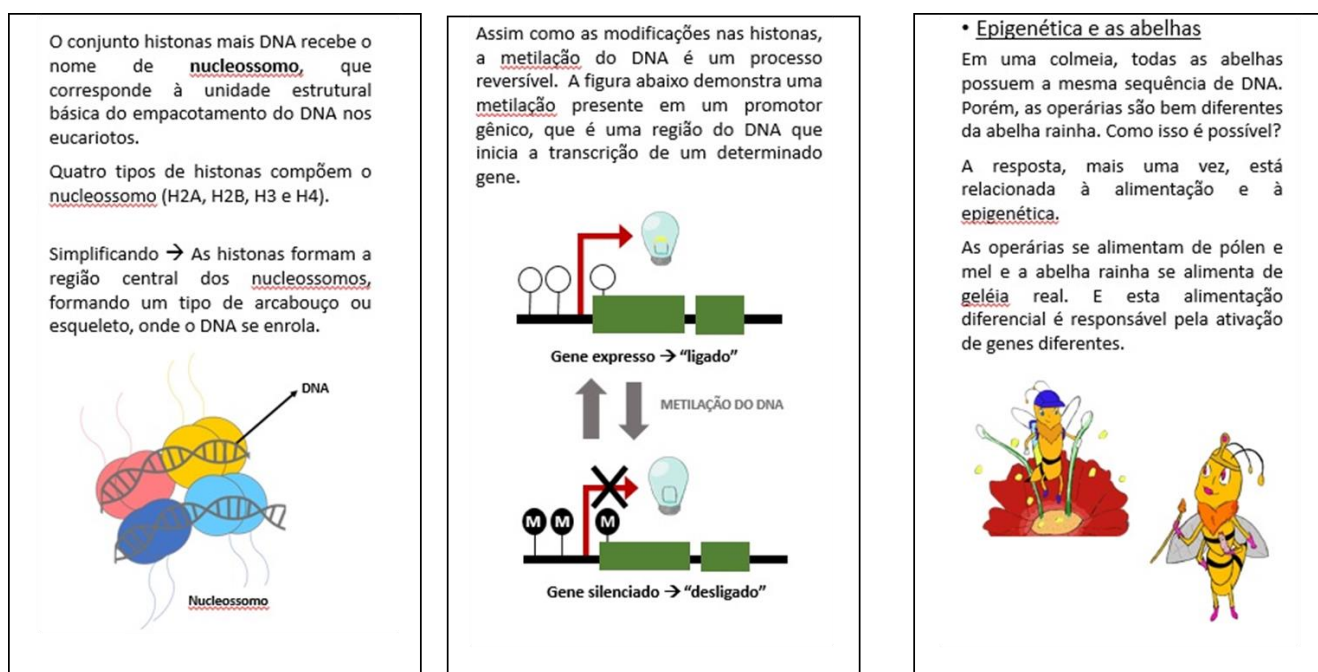


Figura 23. Exemplo de algumas das ilustrações que compõem a cartilha “O Tema é: Epigenética – O liga e desliga do DNA”

5. Discussão

5.1. Sexagem molecular em aves

A avifauna brasileira é reconhecida como uma das mais diversas do mundo - dados recentes indicam a ocorrência de 1.919 espécies, divididas em 33 ordens e 103 famílias, classificando o Brasil como o segundo país a abrigar o maior número de espécies de aves, ficando atrás apenas da Colômbia (Remsen *et al.*, 2015). Assim, estudos direcionados a este grupo de vertebrados têm ainda muito a contribuir em áreas diversas como evolução, etologia e conservação.

A identificação correta do sexo em aves é de extrema importância para criadores e pesquisadores, especialmente quando se considera a produção, estudos de ecologia populacional, programas de conservação e análises de expressão gênica diferencial. Entretanto, aproximadamente metade de todas as espécies conhecidas de aves não apresenta nenhum dimorfismo sexual (Fridolfsson & Ellegren, 1999; Farbairn *et al.*, 2007). A falta de características sexo-específicas externas em animais imaturos ou mesmo em aves adultas torna difícil ou impossível a determinação do sexo com base em caracteres fenotípicos. Desta forma, é essencial a realização de outras formas de identificação de machos e fêmeas.

Em muitas espécies diplóides, um dos cromossomos sexuais carrega um gene que é responsável pela determinação sexual. Nos mamíferos, este gene é o SRY, que está localizado no cromossomo Y e é responsável pelo desenvolvimento dos testículos nos machos (XY). O mesmo não ocorre nas aves, uma vez que ainda não foi identificado nenhum gene com função semelhante a do SRY (Smith, 2007).

A abordagem mais utilizada para sexagem molecular de aves é a PCR - muitos marcadores que exploram diferenças genéticas entre machos (ZZ) e fêmeas (ZW) já foram desenvolvidos (He *et al.*, 2019). O gene *CHD1* codifica uma proteína de ligação ao DNA que desempenha um papel importante na regulação da gênica, sendo o mais utilizado na sexagem molecular de aves. Este gene está presente nos cromossomos Z (*CHD-Z*) e W (*CHD-W*) da maioria das espécies não-ratitas, tornando-o um marcador adequado para determinação de sexo neste grupo (Griffiths *et al.* 1996; Ellegren 1996). Os primers P2 e P8, anelam-se 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, têm sido amplamente utilizados para identificação de um único fragmento de DNA em

machos (genótipo homozigoto) e de dois fragmentos distintos em fêmeas (genótipo heterozigoto) (Griffiths *et al.*, 1998).

Este marcador foi um dos escolhidos para a realização da sexagem molecular no presente estudo e mostrou-se eficaz na maioria das espécies testadas. Os exemplares de psitacídeos (papagaio-verdadeiro, maitaca e arara-azul-grande), pato doméstico, carcará, perdiz e peru apresentaram padrões sexo-específicos mais evidentes, uma vez que a diferença de tamanho entre os alelos Z e W nestas espécies é de mais de 30pb, o que possibilita sua visualização em gel de agarose 2%.

Embora trabalhos prévios utilizando os *primers* P2 e P8 não tenham mostrado sucesso na sexagem molecular de Falconiformes, Pelecaniformes e Strigiformes (Kocijan *et al.*, 2011; Itoh *et al.*, 2001; Sacchin *et al.*, 2004; Reddy *et al.*, 2007; Vucicevic *et al.*, 2013; Jensen *et al.*, 2003), os resultados obtidos para *Falco femoralis* (falcão-de-coleira), *Theristicus caudatus* (curicaca), *Asio clamator* (coruja-orelhuda), *Megascops choliba* (corujinha-do-mato), *Athene cunicularia* (coruja-buraqueira) e *Tyto furcata* (coruja-da-igreja) mostram que este conjunto de oligonucleotídeos é adequado para geração de amplicons e identificação de machos e fêmeas de espécies destas ordens. Porém, a diferença entre os alelos Z e W nestes animais é muito pequena, sendo necessária a utilização de uma metodologia mais resolutiva, como o gel de poliacrilamida. O mesmo ocorre para exemplares de galinha doméstica, codorna europeia, tucano e beija-flor. Os animais pertencentes a estes grupos foram sexados em uma análise prévia (Jeronimo BC, 2016) por meio de géis de poliacrilamida e pela técnica de SSCP. Tais metodologias foram necessárias para separação de alelos *CHD1* não resolutivas em gel de agarose. A eletroforese em gel de poliacrilamida permite uma melhor definição dos fragmentos (Walker & Rapley, 1999) e a metodologia de SSCP é altamente sensível e capaz de detectar diferenças de até um nucleotídeo (Glavac & Dean, 1993, Morinha *et al.*, 2011), que podem refletir em mudanças na conformação do DNA, o que a torna potencialmente apropriada para identificação de machos e fêmeas de espécies de aves que apresentam tamanho muito similares entre os genes *CHD1-Z* e *CHD1-W*.

Por outro lado, não foi possível identificar machos e fêmeas de avestruz - pertencente à família Struthioniformes - com os *primers* P2 e P8, fato que pode ser correlacionado à pequena diferença de tamanho entre os cromossomos Z e W das aves ratitas (Ansari *et al.*, 1988; Solari, 1994). Tal característica dos cromossomos sexuais pode refletir a presença de diferenças diminutas ou mesmo a ausência de diferenças no tamanho dos íntrons associados aos genes *CHD1-Z* e *CHD1-W* neste grupo de aves

(Fridolfsson & Ellegren, 1999; Sacchi *et al.*, 2004; Huynen *et al.*, 2006; Chang *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2008).

Não somente a separação dos produtos de PCR em gel de poliacrilamida (Kahn *et al.*, 1998; Cortes *et al.*, 1999), como também o delineamento de outros conjuntos de *primers* 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 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 *et al.*, 2002; Hinckley *et al.*, 2005). Entretanto, esta metodologia é dispendiosa e gera múltiplos fragmentos, o que dificulta a visualização de padrões sexo-específicos, especialmente se as condições de PCR não forem altamente padronizadas. Desta forma, ainda é necessária a identificação e caracterização de outros segmentos de DNA que apresentem padrões sexo-específicos nestas aves.

Em relação às amostras de perdiz (*Rhynchotus rufescens*), estes haviam sido previamente identificados como machos e fêmeas, por meio da observação de caracteres externos, pelo criador destes animais. Entretanto, os resultados de sexagem molecular de alguns animais foram contrários aos obtidos pela análise das características externas - foi observada a amplificação de duas bandas distintas, padrão esperado para fêmeas, em uma amostra previamente identificada como proveniente de macho. Tal resultado pode estar relacionado a polimorfismos presentes no gene *CHD1*, uma vez que o sexo fenotípico deste animal foi confirmado com uso do marcador molecular referente ao gene *Spindlin*. Adicionalmente, uma amostra proveniente de uma fêmea apresentou apenas uma banda, o que pode refletir uma amplificação preferencial do fragmento de menor tamanho.

Apesar dos *primers* P2 e P8 se anelarem a regiões conservadas, alguns erros de sexagem têm sido descritos em espécies de aves, devido a polimorfismos presentes no gene *CHD1-Z*. Um estudo realizado com 4 espécies de aves marinhas da família Aethia mostrou a ocorrência de polimorfismos relacionados ao cromossomo Z em todas as espécies estudadas, gerando assim padrões de fragmentos amplificados distintos dos esperados, ou seja, dois fragmentos de DNA para fêmeas e um único fragmento para machos (Dawson *et al.*, 2001). Segundo os mesmos autores, polimorfismos semelhantes também foram identificados no pavão indiano (*Pavo cristatus*), onde foram encontrados 4 padrões alternativos de bandas, visualizadas em gel de agarose.

Polimorfismos no alelo W do gene *CHD1*, embora raros, também podem gerar erros de interpretação de dados de sexagem. Nos casos em que tais polimorfismos gerem alelos *CHD1-W* e *CHD1-Z* de tamanho muito similar ou idênticos, será visualizado um único fragmento de DNA por meio de eletroforese em gel de agarose e, assim, fêmeas poderão ser erroneamente identificadas como machos (Dawson *et al.*, 2016).

Com o objetivo de verificar a ocorrência de possíveis polimorfismos referentes ao gene *CHD1* no organismo modelo do presente estudo, a galinha doméstica, foi realizada a visualização dos fragmentos amplificados pelos *primers* P2 e P8 por meio do sistema QIAxel. Este sistema apresenta uma alta sensibilidade e dispensa a utilização de gel de agarose, uma vez que é realizada uma eletroforese capilar automatizada. Comparando-se os resultados obtidos com os dados de identificação do sexo dos exemplares de galinha doméstica por meio da visualização de caracteres morfológicos, foi possível verificar o padrão esperado na amplificação dos alelos *CHD1-Z* e *CHD1-W* - duas bandas distintas para fêmeas e uma banda para machos. Entretanto, foi observada uma diferença de tamanho entre os fragmentos amplificados dos indivíduos em estudo, o que indica a ocorrência de polimorfismos intraespecíficos.

Devido a falhas de sexagem molecular baseadas no uso dos *primers* P2 e P8, novos conjuntos de oligonucleotídeos vêm sendo desenvolvidos na tentativa de obter resultados mais confiáveis. Recentemente, foi descrito um novo marcador associado ao gene *Spindlin* (Dawson *et al.*, 2016)

Em camundongos foi sugerido que o gene *spindlin* desempenha um papel na transição do oócito para o embrião e também possui homologia com o gene *Ssty*, gene que possui papel importante na espermatogênese (Conway *et al.*, 1994; Oh *et al.*, 1997). Em aves, o gene *spindlin* é um dos poucos que possui cópia nos cromossomos Z e W, a ausência de recombinação entre os cromossomos sexuais resultou em sequências diferentes, tornando este gene um potencial marcador sexo-específico (Kloet 2002, Itoh *et al.*, 2001). Dado que este gene apresenta sequências nucleotídicas altamente conservadas entre espécies pertencentes ao grupo Neognathae, é potencialmente aplicável em diversas famílias.

O marcador Z43B, desenvolvido por Dawson *et al* (2016) com base na sequência do gene *spindlin*, mostrou que este é capaz de sexar adequadamente 42 das 61 espécies testadas, ou seja, o marcador apresentou uma taxa de sucesso de 69%. Entre as espécies sexadas estão exemplares de águias, falcões, corujas, pinguins, papagaios, patos, entre outros, totalizando 10 ordens diferentes, incluindo uma espécie de ratita endêmica da

Nova Zelândia, o kiwi marrom (*Apteryx australis*). Apesar de apresentar bons resultados, este marcador também possui uma limitação - a pequena variação no tamanho do amplicon gerado em machos e fêmeas de algumas espécies. Em algumas espécies analisadas, a diferença de comprimento entre os alelos W e Z foi de apenas um par de bases, o que torna impossível a sexagem por meio de eletroforese em gel de agarose ou mesmo poliacrilamida (Dawson *et al.*, 2016). Por este motivo, no presente trabalho, foram utilizados os marcadores descritos por Kloet (2002), que amplificam um fragmento de aproximadamente 1kb específico das fêmeas e um fragmento de aproximadamente 1,2kb que é comum aos dois sexos. Estes oligos foram desenvolvidos com base na sequência do gene *spindlin* de Tinamiformes.

Os resultados obtidos com estes marcadores foram positivos, uma vez que foi possível identificar fêmeas de galinha doméstica, codorna europeia, beija-flor e coruja-orelhuda em gel de agarose, o que não é possível utilizando os *primers* relacionados ao gene *CHD 1*. Além destas espécies, também foi possível identificar machos e fêmeas de pato doméstico, carcará, perdiz e peru.

Em contraposição, fêmeas das ordens Piciformes (tucano-toco) e Psittaciformes (papagaio-verdadeiro, maitaca e arara-azul-grande) apresentaram padrão de amplificação idêntico ao encontrado em machos. Kloet (2003) encontrou resultados semelhantes, sendo necessário o uso de enzimas de restrição para gerar um padrão sexo-específico em algumas das espécies testadas, entre elas *Psittacus erithacus*, comumente chamado de papagaio-cinzento, nativo do continente africano.

Em relação às ordens Piciformes e Strigiformes, os presentes resultados diferem dos encontrados por Kloet (2003). É importante ressaltar que as espécies testadas são diferentes - em nosso estudo, foram utilizadas amostras de *Ramphastos toco* (tucanuçu) e *Asio clamator* (coruja-orelhuda), já no trabalho realizado por Kloet (2003) as espécies escolhidas foram *Ramphastus swainsonii* (tucano-de-mandíbula-castanha) e *Strix uralensis* (coruja-dos-urais). Portanto é possível que espécies pertencentes a uma mesma ordem apresentem padrões diferentes de amplificação, assim como é observado na amplificação utilizando os *primers* P2 e P8.

Também foram observados polimorfismos do alelo Z em machos de perdiz e codorna europeia. Dawson *et al* (2016) encontrou resultados semelhantes em *Aethia pygmaea* e *Terek cinereus* (aves nativas da Rússia e Sibéria), apesar deste polimorfismo foi possível realizar a sexagem destes indivíduos, uma vez que o padrão de amplificação foi diferente do encontrado em fêmeas.

As Ratitas continuam sendo um desafio na sexagem molecular de aves. Segundo os mesmos autores, foram testadas diversas alternativas com o intuito de obter sucesso na amplificação de fragmentos sexo-específicos do gene *Spindlin*, incluindo *Southern Blot* e digestão do DNA com as enzimas *Pst1*, *HindIII* ou *EcoR1*, porém nenhuma apresentou resultados positivos, o que suporta a conclusão de Itoh *et al* (2001) de que os alelos deste gene são indênticos nos cromossomos Z e W neste grupo.

Outro marcador, denominado *XhoI*, exclusivo ao cromossomo W também pode ser utilizado em testes de sexagem molecular. O uso de *primers* específicos em PCR permite a amplificação de um fragmento de 276 pares de bases somente em fêmeas (Petite & Kegelmeyer, 1995). Entretanto, a não visualização de produtos de amplificação não garante a correta identificação de machos, dado que este resultado pode estar simplesmente associado a erros de genotipagem. Este marcador também foi utilizado em nosso estudo, porém não apresentou resultados positivos. Assim como relatado por He *et al* (2019), a amplificação do locus *XhoI* gera vários amplicons devido à natureza repetitiva da região. Surpreendentemente, em nosso estudo também foi observada a amplificação da região em machos. Outro ponto negativo em relação a este marcador é o fato do locus *XhoI* ser limitado ao gênero *Gallus* (Mizuno & Macgregor 1998), impossibilitando sua utilização de uma maneira mais ampla dentro do grupo das aves.

Segundo Itoh *et al* (2011), o marcador de sexagem ideal seria referente a um loco exclusivo do cromossomo W com uma sequência não-repetitiva e amplamente conservada entre diferentes espécies. No entanto, tal sequência referente ao cromossomo W ainda não foi identificada.

Estima-se que apenas 0,5% do cromossomo W tenha sido mapeado adequadamente, portanto apenas alguns genes foram identificados neste cromossomo, entre eles estão: *CHD1W*, *ATP5A1W*, *ASW/Wpkci/ HINT1W*, *SPINW*, *SMAD2* (Chen *et al.*, 2012). Destes, a maioria possui cópias muito similares em seus alelos presentes no cromossomo Z. No entanto, a sequência do gene *ASW/Wpkci/ HINT1W* é altamente diferenciada de seu gametólogo, *HINTZ* (Hori *et al.* 2000; O'Neill *et al.* 2000; Pace & Brenner 2003; Ceplitis & Ellegren, 2004). Adicionalmente, este gene demonstrou ser amplamente conservado entre as diferentes espécies de aves, sendo expresso em embriões de galinha doméstica antes do início da diferenciação gonadal (Hori *et al.*, 2000). Devido a estas características, escolhemos este gene para desenvolver um marcador específico ao cromossomo W.

O gene *ASW/Wpkci/HINT1W* foi identificado em 2000 por dois grupos de pesquisa distintos O'Neil *et al* o nomearam de ASW (Avian sex specific W-linked) e Hori *et al* de *Wpkci* (W-linked protein kinase C inhibitor). Em 2004, Ceplitis & Ellegren realizaram um estudo acerca da evolução adaptativa deste gene e sugeriram renomeá-lo como *HINTW* (histidine triad nucleotide binding W-linked), nome que vem sendo mais utilizado atualmente. Os marcadores para amplificação deste gene foram desenvolvidos com base no genoma de galinha doméstica. Com o intuito de garantir que a amplificação do amplicon gerado fosse sexo-específica foram realizadas verificações nos bancos de dados NCBI (National Center for Biotechnology Information) e UCSC Genome Browser, porém foi observada amplificação em machos de *G.gallus*. Dentre todas as espécies testadas, a única que apresentou resultados positivos foi *M. gallopavo* (peru) - nesta espécie, foi observada amplificação apenas nas fêmeas. Apesar destes resultados promissores, mais testes precisam ser realizados devido ao baixo número amostral (2 fêmeas e 2 machos).

Assim como observado por Romanov *et al* (2019), nossos experimentos demonstraram que a escolha de um marcador molecular adequado para a identificação do sexo em aves está diretamente ligada a espécie em estudo e ao modo de visualização dos fragmentos gerados. Enquanto em algumas espécies os padrões sexo-específicos podem ser facilmente observáveis em agarose, outros dependem de métodos mais resolutivos, como poliacrilamida ou ainda, eletroforese capilar.

A Tabela abaixo indica as metodologias mais adequadas para sexagem molecular das espécies analisadas e podem servir de base para futuros estudos que envolvam a identificação correta de machos e fêmeas. Estes dados também podem subsidiar a implementação de novos testes de diagnóstico molecular realizados por laboratórios especializados não somente em sexagem molecular de aves como também em investigações de paternidade.

Tabela 2. Resumo dos resultados referentes ao melhor método de sexagem aplicado por espécie testada.

Espécie	Nome popular	Marcador molecular	Visualização fragmentos
<i>Rhynchotus rufescens</i>	Perdiz	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Anas platyrhynchos</i>	Pato doméstico	<i>Spindlin e CHD1</i>	Agarose
<i>Gallus gallus</i>	Galinha doméstica	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Coturnix coturnix</i>	Codorna europeia	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Meleagris gallopavo</i>	Peru	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Struthio camelus</i>	Avestruz	Ainda não identificado	-
<i>Theristicus caudatus</i>	Curicaca	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Coragyps atratus</i>	Urubu-de-cabeça-preta	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Circus cinereus</i>	Gavião-cinza	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião-carijó	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Rupornis magnirostris</i>	Gavião pega-macaco	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Vanellus chilensis</i>	Quero-quero	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Guira guira</i>	Anu-branco	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Asio clamator</i>	Coruja-orelhuda	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Megascops choliba</i>	Corujinha-do-mato	<i>CHD1</i>	Poliacrilamida
<i>Athene cunicularia</i>	Coruja-buraqueira	<i>CHD1</i>	Poliacrilamida

<i>Tyto furcata</i>	Coruja-da-igreja	<i>CHD1</i>	Poliacrilamida
<i>Nyctibius griseus</i>	Urutau	<i>CHD1 e Spindlin</i>	Agarose
<i>Amazilia versicolor</i>	Beija-flor-de-banda-branca	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Eupetomena macroura</i>	Beija-flor-tesoura	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Florisuga fusca</i>	Beija-flor-preto	<i>Spindlin</i>	Agarose
<i>Ramphastos toco</i>	Tucanuçu	<i>CHD1</i>	Poliacrilamida
<i>Cariama cristata</i>	Seriema	<i>CHD1</i>	Eletroforese capilar *
<i>Caracara plancus</i>	Carcará	<i>Spindlin e CHD1</i>	Agarose
<i>Falco femoralis</i>	Falcão-de-coleira	<i>CHD1</i>	Poliacrilamida*
<i>Anodorhynchus hyacinthinus</i>	Arara-azul-grande	<i>CHD1</i>	Agarose
<i>Amazona aestiva</i>	Papagaio-verdadeiro	<i>CHD1</i>	Agarose
<i>Pionus maximiliani</i>	Maitaca	<i>CHD1</i>	Agarose

Os campos marcados com asterisco (*) referem-se a dados gerados por outros autores, uma vez que as amostras analisadas no presente estudo geraram apenas uma banda na amplificação com os marcadores referentes aos genes *CHD1* e *Spindlin*. Estudos anteriores demonstraram que as diferenças de tamanhos entre os alelos Z e W nestes genes são muito pequenas nestas espécies, sendo necessária a aplicação de técnicas mais resolutivas (Çakmak *et al.* 2017; Gábor *et al.* 2014; Jensen *et al.*, 2013).

5.2. Potencial uso de padrões diferenciais de metilação da região *MHM* para sexagem molecular de aves

A maioria das técnicas baseadas em PCR para a determinação do sexo das aves baseia-se na amplificação do gene *CHD1*, que está presente nos cromossomos sexuais Z e W (*CHD1-Z* e *CHD1-W*, respectivamente) (Fridolfsson & Ellegren, 1999). Porém, variações nas sequências deste gene parecem ser frequentes e essa característica pode limitar ou influenciar a aplicabilidade dos protocolos de sexagem molecular em algumas espécies (Dawson *et al.*, 2001; Eilers *et al.*, 2012). É o caso das Ratitas (avestruz, ema, emu), o padrão evolutivo característico dos cromossomos sexuais neste grupo tem dificultado a aplicabilidade dos marcadores clássicos e ligados ao sexo desenvolvidos com base nas diferenças dos cromossomos Z e W das espécies não-ratites (Griffiths *et al.*, 1998; Fridolfsson e Ellegren, 1998). Os cromossomos Z e W destas espécies possuem diferenças muito sutis entre eles, tornando impossível a sexagem molecular utilizando os técnicas já descritas. Algumas sequências específicas do cromossomo W foram identificadas pela técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), porém esta metodologia é complexa e laboriosa, e esses marcadores são geralmente espécie-específicos (Morinha *et al.*, 2012), o que não é viável em estudos que abrangem uma maior diversidade de espécies, como no presente trabalho.

Baseando-se na metilação de citosinas da região *MHM* em galinha doméstica - hipometilação em fêmeas e hipermetilação em machos (Teranishi *et al.*, 2001; Itoh *et al.*, 2010) - Caetano & Ramos (2008) propuseram que tais padrões diferenciais poderiam ser utilizados em uma nova metodologia de sexagem molecular em *G.gallus*. A realização de digestão enzimática de amostras de DNA de galinha doméstica com a enzima *HpaII*, sensível à metilação de sítios CCGG seguida de PCR com *primers* específicos para amplificação concomitante de dois segmentos da região *MHM* - um de menor tamanho e mapeado fora da ilha CpG e outro de maior tamanho e que inclui a ilha CpG - levou à visualização, em gel de agarose, de um único fragmento em fêmeas e de dois fragmentos em machos. Dados similares foram também obtidos para peru e codorna europeia (Jeronimo, 2016).

No presente trabalho, optamos por utilizar apenas os *primers* MHMs e MHMa (Caetano e Ramos, 2008) que amplificam um fragmento de 240 pb, uma vez que estudos baseados na última versão do genoma de galinha doméstica disponibilizados no GenBank

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), mostram que ambos os fragmentos, de 240 pb e de 750 pb, encontram-se dentro de ilhas CpGs.

Entre os nucleotídeos que formam o DNA, a citosina é a mais dinâmica (Rivera & Ren, 2014). A metilação do carbono 5 das citosinas é a modificação epigenética mais estudada, isso se deve ao fato da importância desta alteração para o desenvolvimento dos organismos. A metilação do DNA tem papel proeminente não apenas durante todo o desenvolvimento embrionário, como também no papel de silenciamento de genes, retrotransposons, inativação do cromossomo X, proteção do genoma contra vírus, entre outros (Bird, 2002). As técnicas mais utilizadas para análise de perfis de metilação incluem a conversão do DNA por bissulfito e a digestão do DNA com enzimas de restrição sensíveis a metilação (Zilberman & Henikoff, 2007).

Como Caetano e Ramos (2008) utilizaram enzimas de restrição para comprovar o padrão diferencial de metilação da região *MHM* entre machos e fêmeas de galinha doméstica, optamos por utilizar a abordagem chamada de MS-PCR para comparar os resultados. Nesta técnica, amostras de DNA são inicialmente tratadas com bissulfito de sódio, este tratamento converte as citosinas não-metiladas em uracilas. Em seguida, as amostras são submetidas a reações de amplificação com *primers* específicos para as sequências metiladas e não-metiladas. Os resultados observados após a técnica de MS-PCR com *primers* específicos para metilação estão de acordo com o esperado para a região *MHM1*: houve amplificação apenas em machos. Apesar de ser mais trabalhosa que outras técnicas baseadas em PCR, a MS-PCR possui um custo mais baixo em relação ao uso de enzimas de restrição.

Constava com um dos objetivos do presente trabalho padronizar estes perfis diferenciais de metilação para utilizá-los na sexagem molecular em outras espécies de aves. Porém, não foi possível identificar fragmentos da região *MHM* em espécies fora do clado Galliformes. Apesar de amostras de *Rhynchotus rufescens* (perdiz) terem gerados padrões de amplificação esperados para a região *MHM1*, o mesmo não ocorreu com as amostras de DNA digeridas com enzimas específicas. Os padrões observados em perdiz diferem dos descritos para galinha doméstica, este resultado pode ser em razão de falhas nas reações de digestão, ou mais provavelmente, é possível que a região *MHM* não esteja conservada no grupo Tinamiformes, uma vez que a técnica MS-PCR também não apresentou resultados positivos nessa espécie (dados não mostrados) e o sequenciamento nucleotídico apresentou resultados inconsistentes. É possível ainda que, em perdiz, essa região seja regulada por metilação do DNA.

Apesar dos resultados positivos observados em galinha doméstica, codorna europeia e peru, nossos dados sugerem que a técnica utilizada por Caetano & Ramos (2008) possui algumas desvantagens. A principal se deve ao fato da sequência ser restrita a apenas algumas espécies, o que limita muito seu uso. Outro fator que deve ser levado em consideração ao escolher uma metodologia é o custo da mesma, por utilizar diferentes enzimas de restrição, esta técnica gera mais gastos do que as que utilizam amplificação de DNA inteiro em reações de PCR, como as técnicas que amplificam fragmentos dos genes *CHD1* e *Spindlin*, ou mesmo a técnica MS-PCR.

5.3. Estrutura genômica e presença da região *MHM* em aves fora do clado *Galloanserae*

A galinha doméstica (*Gallus gallus*) configura-se como um importante organismo modelo em diversas áreas de estudo, como medicina, desenvolvimento, imunologia e também em pesquisa nutricional (Burt, 2007; Stern, 2005). Na área de Genética não é diferente, uma vez que muito do que sabemos sobre organização cromossômica, determinação sexual e diferenciação gonadal em aves vem de estudos utilizando *G. gallus* como modelo. Devido a sua importância, esta espécie foi a primeira fora do grupo dos mamíferos a ter o genoma completo sequenciado. A montagem mais recente de seu genoma identificou 26.640 genes (incluindo pseudogenes e genes não-codificantes) (Warren *et al.*, 2017). Porém, apesar de todos os dados que já existem sobre a espécie, ainda não sabemos com exatidão quais são os principais mecanismos genéticos responsáveis pelo desencadeamento das diferenças entre machos e fêmeas.

O mecanismo de compensação de dose utilizado pelas aves também não é completamente compreendido. A expressão dos genes do cromossomo Z é cerca de 30-40% maior em machos do que em fêmeas (Itoh *et al.*, 2010; Arnold *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2010; Morey & Avner, 2011) e vários genes do cromossomo Z parecem ser expressos bialelicamente, sugerindo que a inativação de um cromossomo Z inteiro não ocorre em machos (Kuroiwa *et al.*, 2002). Alguns estudos sugerem que a metilação do DNA pode estar envolvida em processos de regulação de dosagem nestes animais (Sun *et al.*, 2019; Melamed & Arnold, 2009).

A região *MHM* (*Male Hypermethylated*) foi identificada em Galiformes, está localizada no cromossomo Z e apresenta padrões diferenciais de metilação, por estes

motivos tem sido sugerido que este *locus* desempenhe um papel no processo de determinação sexual destes animais.

Recentemente foi sugerido que o padrão observado na região *MHM* - repetições em tandem e a presença de LINEs - não se restringe ao local inicialmente descrito por Teranish *et al* (2001) e Itoh *et al* (2004) (Jeronimo BC, 2016). Devido a estas características foi sugerido renomear a região *MHM* para *eMHM* (*expanded MHM*), esta região expandida incluiria as regiões descritas pelos autores acima citados e também as recém descobertas (3A/B). No presente trabalho pudemos comprovar que além destas características, estas novas regiões também apresentam um padrão diferencial de metilação entre os sexos.

Em 2019 foi identificada em *G. gallus* uma nova região que foi denominada de *MHM 2*, além de ser repetitiva, apresentar padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas, também foi observada a presença de um lncRNA em fêmeas (Sun *et al.*, 2019). Outros RNAs não-codificantes, como *Xist* em mamíferos e genes *roX* em *Drosophila*, estão implicados no controle da compensação de dose do cromossomo X. Estas observações sugerem que o lncRNA da região *MHM* e a acetilação específica de histonas podem levar a um aumento da transcrição de alguns genes do cromossomo Z nas fêmeas, o que poderia igualar a expressão dos genes desta região entre os sexos. Logo, ainda não está claro se o mecanismo de compensação de dose em *Gallus gallus* ocorre em apenas um ou em ambos os sexos, e quais partes do cromossomo Z podem ser afetadas (Bisoni *et al.*, 2005).

Interessantemente, da mesma forma como caracterizado nas regiões *MHM1*, *MHM2*, *MHM2C* e *MHM3A/B* de *G. gallus*, LINEs também estão presentes no cromossomo X de mamíferos e foi sugerida uma relação entre o RNA *Xist* e estes elementos. Segundo Lyon (1998), a propagação de marcas relacionadas ao silenciamento gênico causada pelo RNA *Xist* ocorre quando este RNA, possivelmente complexado com uma proteína, entra em contato com um denso grupo de elementos LINE, facilitando a ancoragem do RNA ao cromossomo X e promovendo assim sua inativação. Em fêmeas de galinha doméstica, o loco *MHM* codifica um lncRNA específico que se acumula no sítio de transcrição, podendo desempenhar função regulatória nos genes adjacentes (Teranishi *et al.*, 2001). A expressão do loco *MHM* e seu acúmulo próximo ao sítio de transcrição parece ser importante para o desenvolvimento das fêmeas e, apesar de seu efeito ser o oposto do RNA *Xist*, este também deve desempenhar um mecanismo regulatório similar ao que ocorre nos mamíferos. Estudos demonstram que, embora

frequentemente associados ao silenciamento gênico, *lncRNAs* podem alternativamente estarem associados à ativação gênica e compensação de dose (Akhtar, 2003).

Outra hipótese amplamente defendida é a de que o *lncRNA* gerado na região *MHM* nas fêmeas desempenhe o papel de silenciar o gene *DMRT1* nestes animais (Teranish *et al.*, 2001, Sun *et al.*, 20019, Caetano *et al.*, 2014)). Segundo Sun *et al* (2019), este *lncRNA* pode afetar genes próximos a região *MHM* (25–32 Mb). Como pode ser observado na Figura 23, genes da família *DM* estão bem próximos à região *MHM* 1, podendo, portanto serem influenciados por este loco.



Figura 23. Diagrama acerca da localização região *MHM*, bem como genes adjacentes.

A região *MHM* também possui similaridades com o sistema de compensação de dose descrito em *Drosophila*. Neste sistema, a acetilação da histona H4 é fundamental na regulação positiva dos genes do cromossomo X em machos (Smith *et al.*, 2000). Esta modificação é efetuada pela acetiltransferase MOF que, na presença de um ncRNA (rox-1 ou rox-2) se complexa com proteínas do tipo MSL efetuando assim a acetilação sexo-específica (Smith *et al.*, 2000; Park *et al.*, 2003). Um estudo identificou um homólogo da acetiltransferase MOF no banco de dados de ESTs de galinha doméstica (Boardman *et al.*, 2002) e, desta maneira, pode-se supor que em fêmeas o RNA associado à região *MHM* atue de maneira semelhante ao de *Drosophila*, promovendo a modificação da cromatina e, assim, aumentando a expressão de alguns genes deste local. Diversos estudos evidenciaram a ocorrência de uma regulação positiva dos genes próximos a região *MHM* em fêmeas de galinha doméstica (Bisoni *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2019;).

Inicialmente tida como exclusiva ao genoma de Galliformes (Itoh *et al.*, 2007; Warren *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2014), repetições *MHM* encontram-se presentes também

outras ordens. Segundo estudo realizado por Wright *et al* (2015) a região *MHM* também está presente em membros da ordem Anseriformes (*Anas platyrhynchos* - pato-real e *Anser cygnoides* - ganso africano). 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.

No presente estudo, foi possível amplificar fragmentos da região *MHM1* em amostras de perdiz, os fragmentos gerados foram submetidos ao sequenciamento nucleotídico e as sequências obtidas foram submetidas a análises em bancos de dados. Os resultados encontrados, porém, foram divergentes. Segundo o NCBI, as sequências de perdiz apresentam 100% de similaridade com uma sequência de kiwi marrom. Em contraposição, o banco de dados UCSC Genome Browser (University of California Santa Cruz), alinhou a sequência de perdiz na posição 27268663-27268683 do cromossomo Z de galinha doméstica, região essa na qual está localizada uma porção do *locus MHM* nesta espécie.

O *locus MHM* mostrou-se ausente no genoma de Ratitas (Wright *et al.*, 2015). Interessantemente, os grupos das Ratitas e dos Tinamiformes são considerados grupos irmãos. Análises cariotípicas demonstraram que o cromossomo W de *R. rufescens* apresenta uma diferenciação intermediária entre o cromossomo W das aves neognatas (altamente diferenciado) e o cromossomo W das ratitas (amplamente indiferenciado) (Pigozzi & Solari, 1999). Portanto, é possível que tais características se estendam ao cromossomo Z. O que explicaria o fato dos animais analisados apresentarem similaridades com sequências nucleotídicas do kiwi marrom e também de galinha doméstica, uma vez que também já foi demonstrada similaridade entre as sequências dos alelos do gene *CHD1* nestes dois grupos (Garcia-Moreno & Mindell, 2000). Embora os resultados sejam ainda inconclusivos devido à baixa qualidade dos resultados de sequenciamento e a falta de análises comparativas entre a região *MHM* destas duas ordens, estes indicam que é importante investir em novas análises com o objetivo de verificar se a região *MHM 1* também está presente nestes animais.

5.4. Material de divulgação científica sobre Epigenética

O material de divulgação científica produzido foi elaborado na forma de uma cartilha - denominada de “O Tema é: Epigenética – O liga e desliga do DNA” e encontra-se detalhado em anexo. A escolha de elaboração de uma cartilha baseou-se em seu propósito (ser utilizada como uma ferramenta de comunicação para informar conceitos ou projetos específicos, características técnicas ou ações sociais) e em suas características (impresso gráfico de material dobrado e com ilustrações, com uma sequência de argumentos, de forma a despertar a curiosidade para a abertura do mesmo). Esta configurará um material não somente de difusão científica (referente a todo e qualquer processo usado para comunicação da informação científica e tecnológica) como também de divulgação científica (definida como o uso de processos e recursos técnicos para a comunicação da informação científica e tecnológica ao público em geral) (Albagli, 1996). Os textos da cartilha foram elaborados com uma linguagem apropriada, de modo a ser acessível a um público mais amplo, especialmente professores e alunos do ensino superior e do ensino médio. Devido aos avanços do conhecimento biológico no campo da Genética, assuntos relacionados ao DNA são comumente abordados pela mídia mundial. Para a compreensão dessas informações, é fundamental a construção dos conteúdos de Genética no ensino formal. Entretanto, diversos estudos apontam que os estudantes têm dificuldade de entender e apreender os conceitos e processos desta área da Biologia, apresentando várias concepções errôneas do ponto de vista científico (Lewis *et al.*, 2000; Marbach, 2001; Chattopadhyay, 2005). Desta forma, ações de educação e divulgação científica para abordagem de temas da Genética, incluindo assuntos associados ao tema “epigenética”, são extremamente pertinentes para maior apropriação do conhecimento científico.

6. Conclusão

Segundos os resultados do presente trabalho podemos concluir que:

- Os padrões gerados pela amplificação dos *primers* P2/P8 permitiram identificar com segurança o sexo de membros das ordens Anseriformes (pato doméstico), Psittaciformes (papagaio-verdadeiro, arara-azul-grande e maitaca), Falconiformes (carcará) e Nyctibiiformes (urutau) em géis de agarose.

- Os *primers* SPIN12/SPIN13 que amplificam fragmentos do gene *Spindlin* geraram padrões sexo-específicos facilmente observáveis em géis de agarose em membros das ordens Tinamiformes (perdiz), Galliformes (galinha doméstica, codorna europeia e peru), Anseriformes (pato doméstico), Strigiformes (coruja-orelhuda), Nyctibiiformes (urutau), Falconiformes (carcará) e Apodiformes (beija-flor-da-banda-branca, beija-flor-tesoura, beija-flor-preto).

- Os marcadores que amplificam fragmentos do cromossomo W referentes ao gene *ASW* e a repetição *XhoI* não são eficientes na sexagem molecular de aves.

- A técnica MS-PCR mostrou-se segura para a identificação do sexo de exemplares de *G.gallus*.

- Os padrões diferenciais de metilação de citosinas da região *MHM* identificados por Teranish *et al* (2001) e Itoh *et al* (2004) não estão restritos às regiões inicialmente descritas.

7. Referências Bibliográficas

- Akhtar. Dosage compensation: an intertwined world of RNA and chromatin remodelling. **Curr Opin Genet Dev**, v.13, p.161–169, 2003.
- Albagli. Divulgação científica: informação científica para cidadania. **Revista Inclusão Social**, v.25, 1996.
- Altschul *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal of Molecular Biology**, v.215, p.403–410, 1990. Disponível em: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).
- Arnold AP, Itoh Y, Melamed E. A bird eye view of sex chromosome dosage compensation. **Annual Review of Genomics and Genetics**, v.9, p.109–127, 2008.
- Bachtrog *et al.* Are all sex chromosomes created equal? **Trends Genet**, v.27, p.350–357, 2011.
- Bachtrog *et al.* Sex determination: Why so many ways of doing it? **PLoS Biology**, v12, p.1–13, 2014.
- Bel *et al.* Quantitative real-time PCR with SYBR Green detection to assess gene duplication in insects: Study of gene dosage in *Drosophila melanogaster* (Diptera) and in *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera). **BMC Research Notes**, v.4, 2011.
- Bellott DW *et al.* Avian W and mammalian Y chromosomes convergently retained dosage-sensitive regulators. **Nat Genet**, v.49, p.387–394, 2017.
- Bermudez-Humaran *et al.* Loss of restriction site DdeI, used for avian molecular sexing in *Oreophasis derbianus*. **Reproduction of Domestic Animals**, v.37, p.321–323, 2002.
- Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & Development*. v.16, p.6–21, 2002.
- Bisoni L *et al.* Female-specific hyperacetylation of histone H4 in the chicken Z chromosome. **Chromosome Research**, v.13, p.205–214, 2005.
- Boardman *et al.* A comprehensive collection of chicken cDNAs. **Curr Biol**, v.12, p.1965–1969, 2002.
- Bone JR *et al.* Acetylated histone H4 on the male X chromosome is associated with dosage compensation in *Drosophila*. **Genes Dev**, v.8, p.96–104, 1994.
- Brubaker *et al.* (2011). A noninvasive, direct real-time PCR method for sex determination in multiple avian species. **Molecular Ecology Resources**, v.11, p.415–417, 2017. <https://doi.org/10.1111/>
- Bruford *et al.* Single-Locus and DNA fingerprinting. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analyses of populations. A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, p.225–269, 1992.

- Bull JJ. **Evolution of Sex Determining Mechanisms**. Menlo Park, CA: Benjamin Cummings, 1983.
- Burt. Emergence of the Chicken as a Model Organism: Implications for Agriculture and Biology. *Poult Sci*, v.86, p.1460-1471, 2007.
- Caetano & Ramos. MHM assay: molecular sexing based on the sex-specific methylation pattern of the MHM region in chickens. *Conservation Genetics*, v.9, p.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**. v.13, p.838-849, 2014. DOI: 10.4238/2014
- Çakmak *et al*. Comparison of three different primer sets for sexing birds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.29, p.59–63, 2007.
- Capel. Vertebrate sex determination: evolutionary plasticity of a fundamental switch. **Nat Rev Genet** 18, 675–689, 2017. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.60>
- Carthew & Sontheimer. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNA. **Cell**, v.20, p. 642–655, 2009. doi:10.1016/j.cell.2009.01.035.
- Ceplitis & Ellegren. Adaptive Molecular Evolution of *HINTW*, a Female-Specific Gene in Birds. **Mol. Biol. Evol**, v.21, p.249–254. 2004. DOI: 10.1093/molbev/msg239
- Chang HW *et al*. High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based realtime PCR combined with melting curve analysis. **BMC Biotechnology**, v.8, p.1-12, 2008.
- Charlesworth B. The evolution of chromosomal sex determination and dosage compensation. **Curr Biol** v.6, p.149–162, 1996.
- Charlesworth D, Charlesworth B, Marais G. Steps in the evolution of heteromorphic sex chromosomes. **Heredity**, v.95, p.118–128, 2005.
- Chattopadhyay. Understanding of genetics information in higher secondary students in northeast India and the implications for genetics education. **Cell Biologycal Education**, v. 4, p. 97-104, 2005.
- Chen *et al*. Epigenetic Regulation: A New Frontier for Biomedical Engineers. **Annu. Rev. Biomed. Eng**, v.19, p.195–219, 2017.
- Chen *et al*. Identification of avian W-linked contigs by short-read sequencing **BMC Genomics**, v.13, 2012. <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/183>
- Conrad T, Akhtar A. Dosage compensation in *Drosophila melanogaster*: epigenetic fine-tuning of chromosome-wide transcription. **Nat Rev Genet**, v.13, p.123–134, 2012.
- Conway *et al*. Y353/B: a candidate multiple-copy spermiogenesis gene on the mouse Y chromosome, **Mamm. Genome**, v.5, p.203 – 210, 1994.

Dawson *et al.* A critique of avian CHD-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.201–204, 2001.

Dawson *et al.* A New Marker Based on the Avian *Spindlin* Gene That Is Able to Sex Most Birds, Including Species Problematic to Sex With CHD Markers. **Zoo Biology**, v.35, p.533–545, 2016.

Deeming, & Bubier. Behaviour in natural and captive environments. in **The Ostrich: Biology, Production and Health**. D. C. Deeming, ed. CABI Publishing, Wallingford, UK, 1999.

Dementyeva EV & Zakian SM. Dosage compensation of sex chromosome genes in eukaryotes. **Acta Naturae**, v.2, p.36–43, 2010.

Disteche CM. Dosage compensation of the sex chromosomes and autosomes. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, v.56, p.9–18, 2016.

Djebali *et al.* Landscape of transcription in human cells. **Nature**, v. 489, p.101–108, 2012.

Donald PF. Adult sex ratios in wild bird populations. **Ibis**, v.149, p.671–692, 2007.

Drummond AJ. **Genetics** 4.8.5, 2009. Disponível em: (www.geneious.com).

Dubendorfer A, Hediger M, Burghardt G, Bopp D. *Musca domestica*, a window on the evolution of sex-determining mechanisms in insects. **Int J Dev Biol**, v.46, p.75–79, 2002.

Dubiec & Zagalska-Neubauer. Molecular techniques for sex identification in birds. **Biological Letters**, v. 43, p.3–12, 2006.

Eilers *et al.* Sex at second sight. Pitfalls of sexing Water Rails *Rallus aquaticus* and Spotted Crakes *Porzana porzana* using morphology and molecular techniques. **Acta Ornithol**, v.47, p.1–9, 2012.

Elbrecht & Smith. Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. **Science**. v.255, 1992.

Ellegren, Parsch. The evolution of sex-biased genes and sex-biased gene expression. **Nature Review Genetics**, v.8, p.689–698, 2007.

Ellegren. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. **Biological Sciences**, v.263, p.1635–1341, 1996.

Fairbairn. **Sex, Size and Gender Roles: Evolutionary Studies of Sexual Size Dimorphism**. Oxford, 266 p, 2000.

Fridolfsson & Ellegren. A simple and universal method for molecular sexing of nonratite birds. **Journal of Avian Biology**, v.30, p.116–121, 1999.

Gábor *et al.* Sex Determination of Superorder Neognathae (class Aves) by Molecular Genetics Methods. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, 2014.

- Garcia-Moreno & Mindell. Rooting a Phylogeny with Homologous Genes on Opposite Sex Chromosomes (Gametologs): A Case Study Using Avian CHD. **Mol. Biol. Evol.**, v.17, p.1826–1832. 2000.
- Gardiner-Garden & Frommer. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of Molecular Biology**, v.196, p.261-282, 1987.
- Ghorpade *et al.* Molecular sexing of threatened Gyps vultures: an important strategy for conservation breeding and ecological studies. **SpringerPlus**, v.62, 2012.
- Gilbert. **Developmental Biology**. 7th edition. Sinauer Associates, Inc, Sunderland, 2003.
- 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 & Peichel. Are homologies in vertebrate sex determination due to shared ancestry or limited options? **Genome Biology**, v.11, 2010.
- Graves JAM. Evolution of vertebrate sex chromosomes and dosage compensation. **Nature Reviews Genetics**, v.17, p.33–46, 2016.
- Graves JAM. Weird animal genomes and the evolution of sex and sex chromosomes. **Annual Review of Genetics**, v.42, p.565–586, 2008.
- Griffiths R *et al.* A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology**, v.7, p.1071-1075, 1998.
- Griffiths R, Phil D. Sex identification in birds. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine**, v.9, p.14-26, 2000.
- Griffiths, Daan, Dijkstra. Sex identification in birds using two CHD genes. **Proceedings of the Royal Society of London B**, v.263, p.1251-1256, 1996.
- Hake L & O'Connor C. Genetic mechanisms of sex determination. **Nature Education**, 2008.
- Hayatsu. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*, v.84, p.321–330, 2008. doi: 10.2183/pjab/84.321
- He *et al.* Simple, sensitive and robust chicken specific sexing assays, compliant with large scale analysis. **PLoS ONE**, v.14, 2019. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0213033>
- Hinckley *et al.* Identification and development of sex specific DNA markers in the ostrich using Polymerase Chain Reaction. **International Journal of Poultry Science**, v.4, p.663-669, 2005.

Hirst *et al.* Data Undermine the W Chromosome and Support Z-linked DMRT1 as the Regulator of Gonadal Sex Differentiation in Birds. **Endocrinology**, v.158, p.2970–2987, 2017.

Hirst, Major, Smith. Sex determination and gonadal sex differentiation in the chicken model. **The International Journal of Developmental Biology**, v.62, p.153-166, 2018. DOI: 10.1387/ijdb.170319cs

Hori *et al.* *Wpkci*, encoding an altered form of PKCI, is conserved widely on the avian W chromosome and expressed in early female embryos: implication of its role in female sex determination. **Mol Biol Cell**, v.11, p.3645– 3660, 2000.

Hu *et al.* Molecular cloning, expression profile and transcriptional modulation of two splice variants of very low density lipoprotein receptor during ovarian follicle development in geese (*Anser cygnoide*). **Anim. Reprod. Sci**, v.149, p.281– 296, 2014.

Huynen *et al.* 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**, v.148, p.167-168, 2006.

International Chicken Genome Sequencing Consortium. Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. **Nature**, v.432, p.695-716, 2004.

Ishikawa *et al.* Comparison of sex determination mechanism of germ cells between birds and fish: Cloning and expression analyses of chicken forkhead box L3-like gene. **Dev Dyn**, v.248, p.826-836, 2019.

Ito *et al.* Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes. **Zoological Science**, v.20, p.339-344, 2003.

Itoh *et al.* Chicken spindlin genes on W and Z chromosomes: transcriptional expression of both genes and dynamic behavior of spindling in interphase and mitotic cells. **Chromosome Res**, v.9, p.283–299, 2001.

Itoh *et al.* Dosage compensation is less effective in birds than in mammals. **Journal of Biology**, v.6, 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**, v.20, p.512-518, 2010.

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**, v.22, p.561-571, 2003.

Jeronimo BC. Caracterização da região MHM em aves: padrões diferenciais de metilação em machos e fêmeas. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas Genética). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2016.

Kahn, St. John, Quinn. Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. **Auk**, v.115, p.1074-1078, 1998.

Kloet. Evolution of the *Spindlin* gene in birds: independent cessation of the recombination of sex chromosomes at the *Spindlin* locus in neognathous birds and tinamous, a palaeognathous avian family. **Genetica**, v.119, p.333–342, 2003.

Kloet. Molecular sex identification of tinamous with PCR using primers derived from the *Spindlin* gene. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p.465–466, 2002.

Kocijan *et al.* Sex-typing bird species with little or no sexual dimorphism: an evaluation of molecular and morphological sexing. **J Biol Res**, v.15, p.145– 150, 2011.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, p.693–705, 2007.

Kuroiwa *et al.* Biallelic expression of Z-linked genes in male chickens. **Cytogenet Genome Res**, v.99, p.310-314, 2002.

Lambeth LS *et al.* Over-expression of DMRT1 induces the male pathway in embryonic chicken gonads. **Dev Biol**, v.389, p.160-172, 2014.

Lewis *et al.* Chromosomes: the missing link- Young people's understanding of mitosis, meiosis and fertilization. **Journal of Biological Education**, v.34, p.189-200, 2000.

Li & Dahiya. MethPrimer: designing primers for metilation PCRs. **Bioinformatics**, v.18, p.1427-1431, 2002.

Lyon. X - Chromosome inactivation: a repeat hypothesis. **Cytogenet Cell Genet**, v.80, p.133–137, 1998.

Mank JE, Hosken DJ, Wedell N. Some inconvenient truths about sex chromosome dosage compensation and the potential role of sexual conflict. **Evolution**, v.65, p.2133-2144, 2011.

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**, v4: 59, 2006.

Marbach. Attempting to break the code in students' comprehension of genetics concepts. **Journal of Biological Education**, v.35, p.183-189, 2001.

Marin, Siegal, Baker. The evolution of dosage compensation mechanisms. **Bioessays**, v22, p.1106–1114, 2000.

Melamed E, Arnold AP. Regional differences in dosage compensation on the chicken Z chromosome. **Genome Biology** v.8, 2007.

Meyer BJ. Targeting X chromosomes for repression. **Curr Opin Genet Dev**, v.20, p.179–189, 2010.

- Mine. Application of a sex identification technique in juvenile ostriches and its potential application in Botswana. **South African Journal of Animal Science**, v.32, p.160- 163, 2002.
- Ming & Renner SS (2011). Sex chromosomes in land plants. **Annu Rev Plant Biol**, v.62, p.485–514, 2011. doi:[10.1146/annurev-arplant-042110-103914](https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042110-103914)
- Miyaki CY *et al.* Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: perspectives for wild and captive population studies. **Zoo Biology**, v.17, p.415-423, 1998.
- Mizuno & Macgregor. The ZW lampbrush chromosomes of birds: a unique opportunity to look at the molecular cytogenetics of sex chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, v.80, p.149–157, 1998.
- Morey & Avner. The demoiselle of X-inactivation: 50 years old and as trendy and mesmerising as ever. **Plos Genetics**, v.7, p. 1-11, 2011.
- Morinha *et al.* (R)evolution in the molecular sexing of ratite birds: identification and analysis of new candidate sex-linked markers. **Avian Biology Research**, v.8, p.145–159, 2015.
- Morinha, Cabral, Bastos E. Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. **Theriogenology**, v.78, p.703–714, 2012.
- Nakata *et al.* Chicken hemogen homolog is involved in the chicken-specific sex determining mechanism. **Pro Natl Acad Sci USA**. v.110, p.3417-3422, 2013.
- Nanda I *et al.* Conserved syntenic 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**, v.89, p.67-78, 2000.
- Navarro-Martín L *et al.* DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. **PLoS Genet**, v.7, 2011.
- O'Neill *et al.* ASW: a gene with conserved avian W-linkage and female specific expression in chick embryonic gonad. **Dev Genes Evol**, v.210, p.243–249, 2000.
- Ogawa *et al.* Molecular characterization and cytological mapping of a non-repetitive DNA sequence region from the W chromosome of chicken and its use as a universal probe for sexing Carinatae birds. **Chromosome Res**, v.5, p.93–101, 1997.
- Oh *et al.* *Spindlin*, a major maternal transcript expressed in the mouse during the transition from oocyte to embryo. **Development**, v.124, p.493–503, 1997.
- Ohno S. **Sex chromosomes and sex-linked genes**. Berlin: Springer, 1967.
- Ong AH and Vellayan S. An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. **Zoo Biol**, v.27, p.62–69, 2008.

- Pace & Brenner. Feminizing chicks: a model for avian sex determination based on titration of Hint enzyme activity and the predicted structure of an Asw-Hint heterodimer. **Genome Biol**, v.4, 2003.
- Park & Kuroda. Epigenetic aspects of X-chromosome dosage compensation. **Science**, v.293, p.1083–1085, 2001.
- Park *et al.* Sequence-specific targeting of *Drosophila* roX genes by the MSL dosage compensation complex. **Mol Cell**, v.11, p.977–986, 2003.
- Petite & Kegelmeyer. Sex Determination of chick embryos using a W chromosome-specific oligonucleotide probe and PCR. **Proceedings of the XIX World's Poultry Congress Amsterdam**, p.531, 1992.
- Piferrer. Epigenetics of sex determination and gonadogenesis. *Dev Dyn*, v.242, p.360-70, 2013. doi: 10.1002/dvdy.23924
- Pigozzi & Solari. The ZW pairs of two paleognath birds from two orders show transitional W chromosome differentiation. **Chromosome Res**, v.7, p.541–551, 1999.
- Raymond *et al.* Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. **Developmental Biology**, v.215, p.208-220, 1999.
- Reddy *et al.* A rapid, non-invasive, PCR-based method for identification of sex of the endangered Old World vultures (*white-backed and longbilled vultures*) - Implications for captive breeding programmes. **Current Science**, v.92, p.659-662, 2007.
- Remsen, JV Jr *et al.* A classification of the bird species of South America. **American Ornithologists' Union**. Version 30, 2015.
- Rivera & Ren. Mapping Human Epigenomes. **Cell**, v.155, 2013 doi:10.1016/j.cell.2013.09.011.
- Robertson & Gemmell. PCR-based sexing in conservation biology: Wrong answers from an accurate methodology? **Conservation Genetics**, v.7, p.267-271, 2006.
- Rodrigues *et al.* Sex determination of Neotropic cormorant (*Phalacrocorax brasilianus*) by molecular sexing. **Avian Biology Research**, v.12, p.10–12, 2019
- Roeszler, Sinclair, Smith. The long non-coding RNA, MHM, plays a role in chicken embryonic development, including gonadogenesis. **Developmental Biology**, v.366, p.317-326, 2012.
- Romanov *et al.* Widely Applicable PCR Markers for Sex Identification in Birds. **Russian Journal of Genetics**, v.55, p. 220–231, 2019.
- Sacchin *et al.* A non-invasive test for sex identification in shorttoed Eagle (*Circaetus gallicus*). **Mol Cell Probes**, v.18, p.193–196, 2004.

Smirnov & Trukhina. Comparison of Sex Determination in Vertebrates (Nonmammals). **Gene Expression and Phenotypic Traits**. 2019.

Smith & Sinclair. Sex determination: insights from the chicken. **Bioessays**, v.26, p.120-132, 2004.

Smith CA *et al.* Conservation of a sex-determining gene. **Nature**, v.402, p.601-602, 1999.

Smith CA *et al.* The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. **Nature**, v.461, p.267-271, 2009.

Smith *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**, v.25, p.9175-9188, 2005.

Smith, Katz, Sinclair. DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. **Biol. Reprod**, v. 68, p.560–570, 2003.

Smith. Sex determination in birds: HINTs from the W sex chromosome? **Sex Dev**, v.1, p. 279–285, 2007.

Solari. **Sex chromosomes and sex determination in vertebrates**. CRC Press, Boca Raton, 1994.

Stern. The Chick: A Great Model System Becomes Even Greater. **Dev Cell**, v.8, p.9-17, 2005.

Straub T, Becker PB. Dosage compensation: the beginning and end of generalization. **Nat Rev Genet**, v.8, p.47–57, 2007.

Sun *et al.* Regional epigenetic differentiation of the Z Chromosome between sexes in a female heterogametic system. **Genome Research**, v.29, p.1673–1684. 2019.

Tan *et al.* Identification of 67 Histone Marks and Histone Lysine Crotonylation as a New Type of Histone Modification. **Cell**, v.146, p.1016–1028, 2011.

Technelysium Pty Ltd. **Chromas lite version 2.01**, 2007. Disponível em: (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**, v.9, p.147-165, 2001.

Tian *et al.* Enhanced top-down characterization of histone post-translational modifications. **Genome Biol**, 2012.

Vaillant, Dorizzi, Pieau C. Sex reversal and aromatase in chicken. **J Exp Zool**, v.290, p.727-740, 2001.

Vucicevic *et al.* Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal marker in bird sexing. **Zoo Biol**, v.32, p.269–276, 2013.

Walker & Rapley. **Guia de rotas na tecnologia do gene**. São Paulo: Atheneu Editora, 1999, p.334.

Wang *et al.* Corticosterone regulation of ovarian follicular development is dependent on the energy status of laying hens. **J. Lipid Res**, v.54, p.1860–1876, 2013.

Wang *et al.* Whole genome sequencing of the Black grouse (*Tetrao tetrix*): reference guided assembly suggests faster-Z and MHC evolution. **BMC Genomics**, v.15, 2014.

Wang *et al.* Sex identification of owls (Family Strigidae) using oligonucleotide microarrays. **Journal of Heredity**, v.99, p.187-192, 2008.

Warren *et al.* A New Chicken Genome Assembly Provides Insight into Avian Genome Structure. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v.7, p.109-117, 2017.

Wright *et al.* Conservation of regional variation in sex-specific sex chromosome regulation. **Genetics**, v.201, p.587-98, 2015.

Xing. Minireview: Gene methylation in thyroid tumorigenesis. **Endocrinology**, v.148, p.948-953, 2007.

Yang *et al.* Exogenous cMHM regulates the expression of DMRT1 and ER alpha in avian testes. **Molecular Biology and Reproduction**, v.37, p.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**, v.11, p.11-13, 2010.

Zhao *et al.*, 2015. Female-to-male sex reversal in mice caused by transgenic overexpression of Dmrt1. **Development**, v.142, p.1083-1088, 2015

Zhou *et al.* Complex evolutionary trajectories of sex chromosomes across bird taxa. **Science**, v.346, 2014.

Zilberman & Henikoff. Doxorubicin inhibits DNMT1, resulting in conditional apoptosis. **Mol Pharmacol**, v. 66, p.1415-1420, 2004.