ReGeo
ISSN: 2177-3246

SEXAGEM MOLECULAR DE AMOSTRA DO CONCEPTO EQUINO COLETADA VIA FÓRNIX VAGINAL

MOLECULAR SEXING OF EQUINE CONCEPTUS SAMPLE COLLECTED VIA VAGINAL FORNIX

SEXADO MOLECULAR DE UNA MUESTRA DE CONCEPTUS EQUINO RECOLECTADA A TRAVÉS DE FÓRNIX VAGINAL

10.56238/revgeov17n3-144

Vinicius Motta Ferreira
Graduado em Medicina Veterinária
Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)
Endereço: Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: viniciusmottaferreira@gmail.com

José Renato Costa Caiado
Doutor em Produção Animal
Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)
Endereço: Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: jrccaiado@uenf.br
Lattes: http://lattes.cnpq.br/7567435157683445
Orcid: https://orcid.org/0009-0008-2952-5739

Paulo Roberto de Oliveira Almeida Filho
Graduado em Medicina Veterinária
Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF)
Endereço: Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: betoalmeida3x@gmail.com
Lattes: https://lattes.cnpq.br/3284887600834348
Orcid: https://orcid.org/0009-0008-7183-3807

Eduardo Shimoda
Doutor em Produção Animal
Instituição: Universidade Cândido Mendes (UCAM)
Endereço: Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: shimoda@ucam-campos.br
Lattes: http://lattes.cnpq.br/7869107089401453
Orcid: https://orcid.org/0000-0001-6544-687X

ReGeo
ISSN: 2177-3246

José Frederico Straggiotti Silva
Doutor em Medicina Veterinária pela TiHo (Alemanha)
Instituição: Universidade Estadual do Norte Fluminense (UENF), Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro
Endereço: Rio de Janeiro, Brasil
E-mail: straggio@uenf.br
Lattes: http://lattes.cnpq.br/1845406575748415
Orcid: https://orcid.org/0000-0002-2975-9382

RESUMO
A determinação do sexo do embrião é de grande importância e vem sendo aprimorada ao longo dos tempos, principalmente em bovinos, devido à sua maior adequação às técnicas e metodologias existentes. Em equinos, as técnicas não são tão precisas, além de só poderem ser realizadas em curtos períodos durante a gestação. Em humanos, assim como em bovinos, a amniocentese é realizada com sucesso, visto que as amostras obtidas possibilitam a realização da genotipagem e sexagem dos fetos com precisão. Neste trabalho foi testada uma técnica de punção, por via transvaginal, de líquido vitelínico (ocorre até o dia 30 da fase embrionária) e/ou líquido alantoide de embriões e fetos, para obtenção de amostras de material genético destinado à sexagem molecular e determinação do período mais indicado à realização da punção, tornando-a uma técnica segura e eficiente. A genotipagem dos conceptos, assim como dos equinos adultos, obteve sucesso em caracterizar os perfis dos indivíduos e distingui-los, principalmente nos casos em que o concepto era do sexo feminino, comprovando que o perfil genético obtido a partir do DNA extraído da amostra puncionada era distinto do perfil genético obtido a partir do DNA da amostra de sangue da égua gestante. Comprovou-se que a punção foi realizada corretamente e que o método de coleta foi eficaz em trazer amostras de DNA dos conceptos tanto em quantidade como em qualidade, sendo possível a realização de testes genéticos de sexagem e genotipagem com eficiência.

Palavras-chave: Equino. Sexagem Molecular. Concepto. Via Transvaginal.

ABSTRACT
The determination of the sex of the embryo is of great importance and has been improved over time, especially in cattle, due to its greater adequacy to existing techniques and methodologies. In horses, the techniques are not as precise, and can only be performed in short periods during gestation. In humans, as well as in cattle, amniocentesis is successfully performed, since the samples obtained make it possible to perform genotyping and sexing of fetuses with precision. In this work, a technique of transvaginal puncture of yolk fluid (occurs up to day 30 of the embryonic phase) and/or allantoic fluid from embryos and fetuses was tested, in order to obtain samples of genetic material for molecular sexing and to determine the most suitable period for puncture, making it a safe and efficient technique. . The genotyping of the conceptus, as well as of the adult horses, was successful in characterizing the profiles of the individuals and distinguishing them, especially in cases where the conceptus was female, proving that the genetic profile obtained from the DNA extracted from the punctured sample was distinct from the genetic profile obtained from the DNA of the blood sample of the pregnant mare. It was proven that the puncture was performed correctly and that the collection method was effective in bringing DNA samples from the conceptus both in quantity and quality, making it possible to perform genetic tests of sexing and genotyping efficiently.

Keywords: Equine. Molecular Sexing. Conceptus. Transvaginal Route.

RESUMEN
La determinación del sexo del embrión es de gran importancia y se ha perfeccionado con el tiempo, especialmente en bovinos, debido a su mayor adaptabilidad a las técnicas y metodologías existentes. En equinos, las técnicas no son tan precisas y solo pueden realizarse durante cortos periodos de gestación. Tanto en humanos como en bovinos, la amniocentesis se realiza con éxito, ya que las muestras obtenidas permiten la genotipificación y la determinación del sexo de los fetos con precisión. En este trabajo, se evaluó una técnica de punción transvaginal para obtener líquido del saco vitelino (que se produce hasta el día 30 de la fase embrionaria) y/o líquido alantoideo de embriones y fetos, con el fin de obtener muestras de material genético para la determinación molecular del sexo y determinar el periodo más adecuado para realizar la punción, convirtiéndola en una técnica segura y eficiente. La genotipificación de fetos, así como de caballos adultos, permitió caracterizar y diferenciar con éxito perfiles individuales, particularmente en los casos en que el feto era hembra. El perfil genético obtenido a partir del ADN extraído de la muestra obtenida por punción resultó distinto del perfil genético obtenido a partir de la muestra de sangre de la yegua gestante. Se confirmó que la punción se realizó correctamente y que el método de recolección fue eficaz para obtener muestras de ADN de los fetos, tanto en cantidad como en calidad, lo que permitió realizar pruebas eficientes de determinación genética del sexo y genotipado.

Palabras clave: Equino. Determinación Molecular del Sexo. Conceptus. Vía Transvaginal.

1 INTRODUÇÃO

A determinação do sexo em mamíferos depende do sistema XY, onde XX denota fêmea e XY designa macho. Uma complexa rede de genes determina esse processo, com alguns genes-chave no cromossomo Y sendo vitais para o desenvolvimento masculino. O gene SRY, situado na região determinante do sexo do cromossomo Y, é particularmente crucial. Quando presente codifica o fator determinante do testículo (PIPREK 2010), levando à diferenciação das células da crista genital em testículos. Por outro lado, a ausência desses genes específicos resulta no desenvolvimento feminino (TONEKABONI *et al*., 2020). Em várias espécies de mamíferos, incluindo humanos e animais domésticos, a presença ou ausência genética do gene SRY é fundamental para estabelecer o destino sexual de um indivíduo.

O planejamento estratégico para fins comerciais baseando-se na antecipação do sexo fetal permite um maior impacto no valor de mercado do estoque durante as vendas. Certos garanhões exibem preferências por produzir fêmeas ou machos de qualidade, facilitando decisões de reprodução direcionadas e simplificando o manejo de éguas reprodutoras com base no conhecimento do gênero fetal (LEON *et al*., 2012).

A eficácia dessa técnica da ultrassonografia no equino varia entre 84 e 100% (LIVINI 2010; CARMO *et al*., 2008).

O método molecular baseado em PCR fornece um método altamente confiável, rápido e preciso para o sexo do embrião de cavalo (HAN *et al*., 2010).

2 JUSTIFICATIVA

A determinação precoce do sexo fetal pode melhorar significativamente o manejo da fazenda do ponto de vista econômico. A antecipação do sexo fetal permite o planejamento estratégico para fins comerciais, impactando o valor de mercado do estoque durante as vendas. Certos garanhões exibem preferências por produzir fêmeas ou machos de qualidade, facilitando decisões de reprodução direcionadas e simplificando o manejo de éguas reprodutoras com base no conhecimento do gênero fetal (LEON *et al*., 2012). A resolução de problemas de maternidade e paternidade através da tipagem dos animais para a identificação individual, controle de parentesco vêm sendo um procedimento de rotina para criadores de cavalos (OLIVEIRA *et al*., 2014). Assim, pode-se diferenciar geneticamente um animal de outro. A determinação do sexo pré-natal por PCR é uma alternativa precisa, sendo emitida através de um laudo laboratorial com 99,91% de certeza (BYDLOWSKI; LEYTON, 1998).

3 OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi desenvolver uma técnica de punção, por via transvaginal, de líquido vitelínico e/ou líquido alantoide de embriões e fetos, para obtenção de amostras de material

genético destinado à sexagem molecular e determinação do período mais indicado à realização da punção, tornando-a uma técnica segura e eficiente.

4 REFERÊNCIAL TEÓRICO

A sexagem fetal molecular em equinos é o mais recente método realizado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), onde se consegue resultados, precisos, rápidos e confiáveis (HAN et al., 2010), uma vez que a diferenciação sexual é determinada pela presença ou ausência do cromossomo Y e pela expressão do gene SRY (*sex determining region* Y). O determinante do sexo do animal é este fragmento de DNA que codifica a proteína TDF (fator de determinação testicular) que vai agir nas gônadas, dando origem aos testículos. A ação da proteína TDF se assemelha a um gatilho na porção reguladora para a expressão deste gene na gônada indiferenciada, de forma, que não permita a diferenciação em ovário, formando, então, o tecido testicular. Com a ação do TDF na atrofia dos ductos de Müller, desencadeia-se o desenvolvimento da gônada masculina, a formação de túbulos seminíferos com a formação das células Leydig e a produção de testosterona (DAMIANI et al., 2000).

A ausência desses fatores determina o desenvolvimento das gônadas femininas (HAN et al., 2010; PIPREK 2010).

A sexagem, utilizando a metodologia de PCR, foi empregada em embriões equinos , por meio dos genes SRY e AMELX-ALMEY por Choi et al., (2010) e por Hasegaw et al., (2009) e Peippo et al., (1995) por meio do ZFX/ZFY.

Foi relatado por Lo e colaboradores (1997) a presença de DNA fetal livre circulante (ccffDNA) no plasma de mulheres grávidas, de forma que isto permite que o diagnóstico pré-natal seja determinado pelo material genético presente no plasma da mãe, o que possibilita a determinação do sexo fetal, podendo ser um complemento para tal identificação (AKOLEKAR et al., 2010).

A determinação do sexo do embrião é de grande importância e vem sendo aprimorada ao longo dos tempos, principalmente em bovinos, devido à sua maior adequação às técnicas e metodologias existentes.

A determinação do sexo é regulada pela região determinante do sexo no cromossomo Y (SRY), a presença do gene SRY ativa a via de desenvolvimento masculino e suprime a rede gênica necessária para o desenvolvimento da gônada feminina (PIPRE, 2010). O dimorfismo sexual foi baseado na presença ou ausência de uma sequência senoidal entre os genes ZFX e ZFY e foi facilmente detectado por análises de PCR. O DNA masculino tem dois produtos de PCR aparecendo como duas bandas distintas (ZFX e ZFY) e o DNA feminino tem uma única banda (ZFX). A sexagem molecular também foi descrita usando genes AMELX-AMELY, onde os machos têm banda heteroduplex AMELX-AMELY, enquanto as mulheres têm apenas AMELX homoduplex (HASEGAW *et al*., 2000).

O principal método, atualmente, para determinar o sexo fetal em éguas é a ultrassonografia transretal e transabdominal, identificando o tubérculo genital entre os membros posteriores fetais de 57 a 70 dias. O tubérculo migra em direção à cauda nas fêmeas e ao cordão umbilical nos machos. Embora, geralmente, viável, esse método pode apresentar dificuldades e riscos, exigindo instrumentos especializados e habilidades do operador (BUCCA 2005). O diagnóstico preciso da determinação do sexo fetal na indústria pecuária tem valor comercial para muitos criadores (KADIVAR *et al*., 2021).

A placenta da égua é classificada como epiteliocorial, difusa, microcotiledonária e adeciduada (ABD-ELNAEIM *et al*., 2006). Na égua, a aderência placentária ocorre somente por volta dos dias 24 a 40 (HAFEZ E HAFEZ, 2004). Este tipo de placentação não é invasivo e produz uma mínima resposta celular materna (GINTHER 1992; GINTHER *et al*., 1999). A placenta equina é classificada como epiteliocorial, uma vez que o epitélio uterino está em contato com a camada do córion, apresentando, portanto, seis camadas de tecido entre os capilares materno e fetal (endotélio, tecido conjuntivo e epitélio), por isso, nesta espécie não ocorre à passagem de imunoglobulinas da mãe para o feto, sendo a administração do colostro muito importante para a imunidade do potro. A classificação difusa se deve ao fato de que a vilosidade do córion está distribuída uniformemente sobre toda a superfície de tecido materno, formando pequenos agrupamentos dos vilos aparentando microcotilédones (ALLEN *et al*.,2002a). A característica adeciduada da placenta se deve ao fato de não ocorrer perda de tecido materno durante o parto (GINTHER, 1992; GERSTENBERG *et al*.,1999).

Pelo motivo dos equinos apresentarem a placenta do tipo epiteliocorial, com padrão de vilosidades coriônicas difusas completas que não permite a comunicação da circulação materna com a circulação fetal (DYCE et al., 2002), acredita-se que células fetais que sofreram lise celular, resultando em danos físicos, imunológicos e/ou apoptose, possam ultrapassar as barreiras placentárias e, então, incorporar o plasma da mãe (LEON et al., 2012).

No terço final de gestação Leon e colaboradores (2012) executaram ensaios de PCR para detecção e extração do ccffDNA no plasma de éguas prenhes, com o objetivo de determinar o sexo fetal pela identificação do gene SRY, além de validarem os resultados mediante a reamplificação do produto de PCR e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) com um grupo controle. O exame foi feito em sangue com anticoagulante (EDTA), sendo centrifugado e o plasma obtido é congelado a -80ºC. O DNA foi extraído para a detecção e a ampliação da sequência do cromossomo Y, sendo, então, desenhado por um *software* para obter-se o par de *primers* pela sequência já existente de *Equus caballus* no *GenBank* (LEON et al., 2012). O grupo controle negativo foi o com DNA feminino e o grupo controle positivo com DNA masculino. As análises foram reamplificadas, aumentando a quantidade de fragmentos do DNA denominada de qPCR (LEON et al., 2012). Os resultados das análises para identificar a presença de SRY apresentaram uma eficiência de 85%, com sensibilidade

de 72,7%, sendo que na reamplificação a eficiência foi de 95%, e a sensibilidade de 90,9%. A especificidade foi de 100%, identificando as fêmeas (LEON et al., 2012).

No diagnóstico por PCR, pode ocorrer incapacidade de detecção do DNA circulante fetal e, consequentemente, falha na identificação do sexo, uma vez que o plasma materno com fetos femininos é marcado pela ausência do cromossomo Y, sendo assim, a fêmea pode estar gestando fetos masculinos. Portanto aconselha-se testar alternativas para diminuir possíveis falhas, como maior volume de plasma e testes mais sensíveis. O qPCR tem maior sensibilidade ao detectar número baixo de cópias de DNA, fazendo diferença nas gestações em períodos iniciais (LEON et al., 2012).

O DNA fetal livre de células circulantes (ccffDNA) é um material genético que é liberado pela placenta e circula em pequenas quantidades no sangue materno durante a gravidez, começando no primeiro trimestre e aumentando ao longo da gravidez, portanto, reflete geneticamente a composição genética do feto em desenvolvimento. É livre de células porque está na circulação materna como DNA sem ser envolto dentro de uma célula. Isso acontece porque algumas células migram para a circulação materna da interface feto-materna na placenta e, por apoptose, essas células são quebradas e seu DNA fica livre na circulação materna. Enquanto o DNA materno nessa circulação seria de cerca de 90% e espera-se que cerca de 10% seja de origem não materna, que se presume ser DNA fetal, permitindo assim a determinação do sexo fetal por amplificação de DNA e detecção de sequência específica do cromossomo Y no sangue materno (AKOLEKAR *et al*., 2010).

Estudo conduzido por Mourijavagar *et al*., (2025) demonstra a identificação do sexo fetal usando genes SRY e detecção de cfDNA no sangue de éguas prenhes por ensaio de PCR. A presença de expressão gênica específica do cromossomo Y no sangue materno indica a transferência de células derivadas do feto para o sistema materno. As células do anel coriônico equino exibem comportamento semelhante ao câncer, invadindo os vasos sanguíneos, o que permite a determinação do sexo fetal. Em conclusão, os ácidos nucléicos livres de células no plasma materno servem como biomarcadores, oferecendo aos pesquisadores a oportunidade de desenvolver diagnósticos precoces de gravidez usando esses ácidos nucléicos livres de células.

Em equinos, as técnicas mais utilizadas são as de ultrassonografia, porém não são tão precisas, além de só poderem ser realizadas em curtos períodos durante a gestação. O sexo fetal pode ser determinado por PCR, utilizando células de líquido amniótico e alantoide coletado via amniocentese transvaginal guiada por ultrassom (KAMIMURA *et al*., 1996). Em humanos, assim como em bovinos (KAMIMURA, *et al*., 1996), a amniocentese é realizada com sucesso, visto que as amostras obtidas possibilitam a realização da genotipagem e sexagem dos fetos com precisão (NAZARETH *et al.*, 1981). A sexagem se baseia, fundamentalmente, na utilização do ultrassom ou da PCR (*polymerase chain reaction*) tanto em equinos quanto em bovinos e outras espécies. Assim como, também, há métodos de sexagem baseados em anticorpos específicos para o antígeno H-Y, um antígeno

de transplantação específico do sexo masculino e bem representado na superfície dos espermatozoides (WACHTEL, 1983). A determinação do sexo pré-natal por PCR é uma alternativa precisa, sendo emitida através de um laudo laboratorial com 99,91% de certeza (BYDLOWSKI; LEYTON, 1998). Em sexagens moleculares de indivíduos fenotipicamente definidos, trabalhos mostram a análise de DNA por meio da identificação de duas regiões genômicas, uma encontrada apenas no cromossomo Y e outra localizada em ambos os cromossomos sexuais, X e Y; esta segunda região é utilizada como controle positivo da reação, já a região do cromossomo Y é detectada apenas quando o individuo é do sexo masculino. Machado (2007) afirma, também, que o diagnóstico do sexo feminino é feito por exclusão, sendo possível a realização dessa técnica por meio da PCR, na qual há a multiplicação do fragmento de DNA alvo. A determinação rápida do sexo genético em mamíferos consiste na amplificação simultânea do gene SRY e do gene da amelogenina (AMEL), localizados em ambos os cromossomos sexuais X e Y. O gene SRY age como um indutor na determinação sexual masculina (DAMIANI *et al*., 2000) . Utilizando a técnica da PCR seguida da análise dos produtos de amplificação por eletroforese em géis de agarose, Hasegawa *et al*., (2000) descreveram perfis eletroforéticos discriminatórios para machos e fêmeas: indivíduos típicos masculinos apresentam 1 pico de fluorescência para o marcador SRY e 2 picos para o marcador AMEL (AMELY ; AMELX). Já os indivíduos femininos apresentam somente 1 pico, que corresponde à amplificação do gene da AMEL localizada nos cromossomos X, e nenhuma amplificação relativa ao cromossomo Y. O sistema QF-PCR biplex para os marcadores SRY e amelogenina se mostrou eficiente para a sexagem molecular em equinos adultos, revelando-se assim, um método confiável (MACHADO 2007).

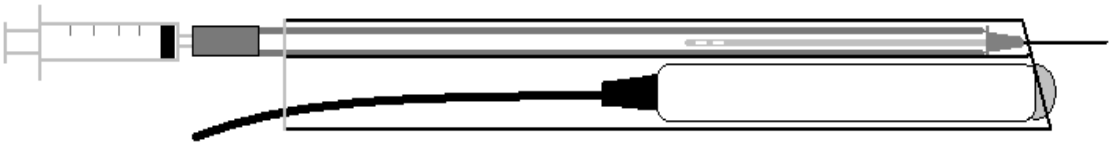
A tipagem dos animais para a identificação individual, controle de parentesco e a resolução de problemas de maternidade e paternidade vêm sendo um procedimento de rotina para criadores de cavalos (OLIVEIRA *et al*., 2014) Assim, pode-se diferenciar geneticamente um animal de outro. A aplicação de marcadores de DNA possui uma extensiva capacidade de distinção individual, e essa habilidade vem sendo utilizada em análises de parentesco (TOZAKI *et al*., 2001). A reação quantitativa fluorescente em cadeia da polimerase (QF-PCR) entrou no campo do diagnóstico genético, permitindo o diagnóstico rápido de estudos cromossômicos (JAUNIAUX *et al*., 2003). A análise automatizada de STR usa o produto amplificado de DNA marcado com fluorocromos e a leitura da eletroforese se dá automaticamente em aparelho próprio, o que faz a QF-PCR ser mais confiável e precisa do que a PCR convencional por géis em que a análise é feita visualmente. Diferentes fluorocromos, agentes químicos fluorescentes são utilizados (BUTLER 2005).

Na equideocultura atual é, ainda, necessário substituir o procedimento de sexagem dos conceptos através da utilização da ultrassonografia pelo desenvolvimento de uma técnica com maior precisão e exequibilidade destinada a este fim.

5 MATERIAIS E MÉTODO

Foram coletadas 04 amostras de líquido vitelínico e/ou alantoide de embriões e fetos equinos. O aparelho de punção compõe-se de uma agulha acoplada a uma palheta de 0,5 mL (recipiente de armazenagem de amostra); este conjunto acopla-se a uma das extremidades de uma pipeta de inseminação equina e na outra extremidade da pipeta a uma seringa de 1 mL, conforme mostra a figura 1.

Figura 1: Aparelho de punção: verifica-se recipiente de armazenagem de amostra (palheta 0,5 mL), acoplado numa extremidade a uma agulha e a outra extremidade a uma seringa que é o módulo do aparelho de punção que encontra-se dorsalmente acoplado à guia de biópsia guiado por transdutor setorial conectado a um aparelho de ultrassonografia Falcon®.



Fonte: Elaborado pelos autores.

A guia de biópsia se acopla a um transdutor setorial de cinco MHz, que é conectado a um aparelho de ultrassom Falcon Vet®. O procedimento iniciou-se com a antissepsia do trato genital externo utilizando detergente e água corrente, secando-se a região perineal com papel-toalha. O embrião, ou feto, foi localizado por meio de exame ultrassonográfico retal, enquanto a guia de biópsia é introduzida por via vaginal e guiada até o fórnix, na área mais próxima ao *conceptus.* A guia de biópsia é untada com digluconato de Clorexidina 0,7 % em pasta (Furanil®), a fim de promover a antissepsia do local da punção, possuindo efeito antimicrobiano geral, antifúngico e antiprotozoário. Em seguida, a agulha é exposta e atravessa as camadas da parede vaginal; logo após, continua, atravessando o útero e anexos embrionários, ou placentários, chegando ao espaço preenchido por líquido vitelínico ou alantoide. Este líquido proveniente do *conceptus* é puncionado e armazenado em uma palheta de 0,5 mL no interior do aparelho de biópsia. Todo o procedimento é guiado ultrassonograficamente com transdutor setorial via fundo de saco vaginal. Após a punção do fluido dos anexos, a agulha volta à proteção da guia de biópsia e o conjunto é retirado da égua. Não foi preestabelecido um período de gestação em que a punção pudesse ser feita, sendo que esta foi realizada entre D18 (18 dias de gestação: embrião) e 11 meses de gestação. Foram coletadas amostras de sangue da veia jugular das éguas prenhes submetidas à punção, as quais foram armazenadas em tubos de Vacutainer® com anticoagulante (EDTA), a fim de extrair o DNA genômico dos leucócitos dessas amostras, para que se efetuassem as genotipagens nos casos em que o concepto apresentasse o sexo genético feminino e para comprovar que a amostra obtida na punção pertencia de fato ao concepto. As amostras coletadas (sangue, líquido vitelínico e líquido alantoide) foram submetidas ao método de extração do DNA genômico utilizando o *kit* de extração e purificação de DNA genômico "GFX Genomic blood purification kit", Armesham Pharmacia Biotech, USA, conforme a especificação do

fabricante. Após a diluição apropriada, uma alíquota de aproximadamente dois nanogramas de DNA total foi submetida ao processo de amplificação pelo método da QF-PCR com o emprego dos *primers* para os marcadores SRY e AMEL (biplex para sexagem molecular em equinos). Um iniciador de cada par foi marcado com um fluorocromo, permitindo a análise mais precisa dos produtos da PCR (SHERLOCK *et al*., 1998). Após a desnaturação a 95ºC por 11 minutos foram, realizados 28 ciclos de 94ºC por 1 minuto, 59ºC 1 minuto, 72ºC. A extensão final foi por 60 minutos a 60ºC. Com a finalidade de diferenciar o genótipo materno do genótipo do concepto, quando este for fêmea, foi utilizado o *kit* de genotipagem e paternidade comercial *StockMarks for Horses Genotyping Kit* (Applied Biosystems, USA). O exame de genotipagem é baseado na análise das características genéticas que são próprias e exclusivas para cada indivíduo, através de regiões altamente polimórficas (apresentam formas diferentes em indivíduos da mesma espécie) do DNA. Após a diluição apropriada, uma alíquota de aproximadamente dois nanogramas de DNA total foi submetida ao processo de amplificação pelo método da QF-PCR para os seguintes marcadores STR de dinucleotídeos: VHL20, HTG4, AHT4, HMS7, HTG6, AHT5, HMS6, ASB23, ASB2, HTG10, HTG7, HMS3, HMS2, ASB17, LEX3, HMS1, CA425, completando um total de 17 marcadores polimórficos. Após a desnaturação a 95ºC por 10 minutos, foram realizados 30 ciclos de 95ºC por 30 segundos, 60º C por 1 minuto, 72º C por 1 minuto. A extensão final foi por 60 minutos a 72ºC. Os produtos da QF-PCR foram submetidos à separação eletroforética em capilar utilizando o analisador automático *ABI PRISM 310 GENETIC ANALYZER* (Applied Biosystems USA). As amostras foram preparadas com adição de formamida (Hi-Di^{TM} Formamide, Applied Biosystems) e do marcador de peso molecular *GeneScan^{TM} – 500 LIZ® Size Standard* da Applied Biosystems, conforme especificação do fabricante. Os perfis eletroforéticos foram analisados utilizando os programas GeneScan^{TM} e Genotyper^{TM} (Applied Biosystems). Os perfis eletroforéticos foram analisados usando os programas *Genescan* e *Genotyper* da Applied Biosystems. Os alelos foram nomeados com o valor em pares de nucleotídeos dos produtos da PCR. Os produtos de amplificação correspondem a alelos que variam em comprimento (pares de base) para cada sistema. Os alelos são registrados como picos de fluorescência com intensidade variada (eixo Y) e comprimento variado (eixo X). Indivíduos heterozigotos para um determinado marcador exibem dois picos de fluorescência de intensidade comparável, porém de tamanhos em pares de bases diferentes.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As amostras obtidas, a partir dos fluidos dos anexos embrionários, mostraram possuir DNA genômico mesmo em poucos dias de gestação, sendo necessário identificar, em estudos posteriores, de quais tecidos seriam provenientes as células que continham o DNA analisado. O *kit* de extração e purificação de DNA genômico “GFX Genomic blood purification kit”, Armesham Pharmacia Biotech, USA, comumente usado em amostras, contendo células provenientes de humanos, mostrou eficiência

na extração e purificação de DNA genômico de células do sangue, de liquido vitelínico e de liquido alantoide de equinos.

A sexagem molecular de equinos se mostrou muito eficiente tanto em animais adultos (MACHADO 2007) quanto em conceptos, obtendo resultados elucidativos e conclusivos.

Corroborando os resultados de Hasegawa e colaboradores (2000), a amplificação simultânea da região determinante do sexo do cromossomo Y (gene SRY) e do gene da amelogenina resulta na determinação do sexo de equinos, mostrando-se um método eficaz. Em todas as amostras analisadas foi possível a realização da sexagem com precisão.

Das quatros amostras colhidas, verificou-se a presença de dois machos (dias 21e 30) e duas fêmeas (3 meses e 6 meses). As amostras de DNA obtidas dos *conceptus* fêmeas foram genotipadas com sucesso, sendo possível distinguir o genótipo materno, do genótipo do concepto do sexo feminino, comprovando que o material obtido na punção era do concepto.

As amostras obtidas possibilitarão a realização, paralelamente na mesma amostra, de outras avaliações, tais como o teste de paternidade, exigido pelas associações de criadores de cavalos de raça, podendo comprovar precocemente se uma prenhes é ou não indesejada, verificação de anomalias genéticas, *pedigree* genético universal e avaliação da presença de características desejáveis.

A sexagem molecular de equinos e a genotipagem dos conceptos, assim como dos equinos adultos, levaram à obtenção de resultados conclusivos nas quatro amostras processadas (Figura 2, Figura 3, Figura 4 e Figura 5).

O eletroferograma evidencia os resultados obtidos pelo marcador para amelogenina, uma vez que para o sexo feminino ocorre apenas um pico de fluorescência e para o sexo masculino dois picos de fluorescência, conforme preconizado por Hasegawa e colaboradores (2000).

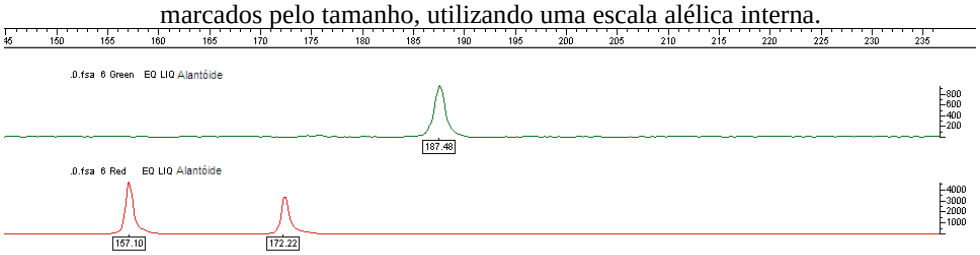
Já o eletroferograma para o marcador SRY apresenta a presença de um pico de fluorescência para indivíduos do sexo masculino ou ausência de picos para indivíduos do sexo feminino. As amostras de DNA de fêmeas exibem um perfil monoalélico para amelogenina, indicativo da condição XX (173 pb).

Os machos exibem um perfil dialélico para amelogenina e a presença da amplificação do marcador SRY, indicativo da condição XY (173 pb e 157 pb).

Em sexagem molecular de indivíduos fenotipicamente definidos, trabalhos mostram a análise de DNA por meio da identificação de duas regiões genômicas, uma encontrada apenas no cromossomo Y e outra localizada em ambos os cromossomos sexuais, X e Y; esta segunda região é utilizada como controle positivo da reação, já a região do cromossomo Y é detectada apenas quando o individuo é do sexo masculino. O diagnóstico do sexo feminino é feito por exclusão, sendo possível a realização dessa técnica por meio da PCR, na qual há a multiplicação do fragmento de DNA alvo (MACHADO 2007). A determinação rápida do sexo genético consistiu na amplificação simultânea do gene SRY e do gene

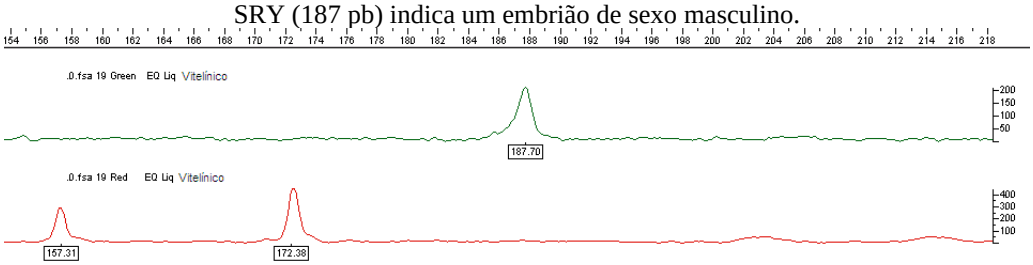
da amelogenina (AMEL), localizados em ambos os cromossomos sexuais X e Y. O gene SRY age como um indutor na determinação sexual masculina (DAMIANI *et al*., 2000) .

Figura 2: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantoide, a amplificação do gene da amelogenina Y (157 pb), amelogenina X (172 pb) e do gene SRY (187 pb) indica um embrião de sexo masculino. O eixo X representa o tamanho dos produtos do QF-PCR em pares de bases. O eixo Y representa a atividade fluorescente em unidades arbitrárias. Os picos representam os alelos e estão marcados pelo tamanho, utilizando uma escala alélica interna.



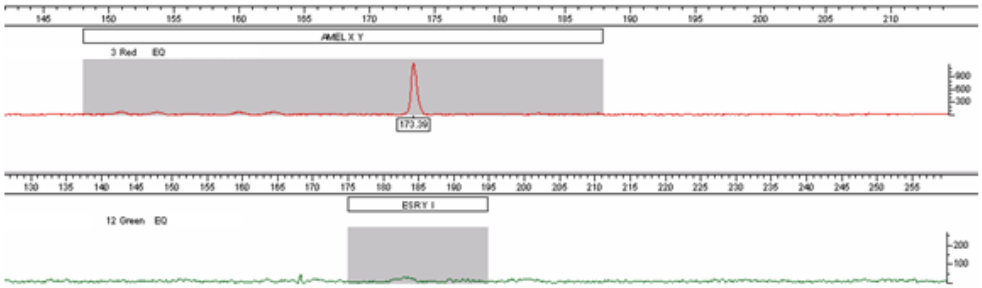
Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 3: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido vitelínico, a amplificação do gene da amelogenina Y (157 pb), amelogenina X (172pb) e do gene SRY (187 pb) indica um embrião de sexo masculino.



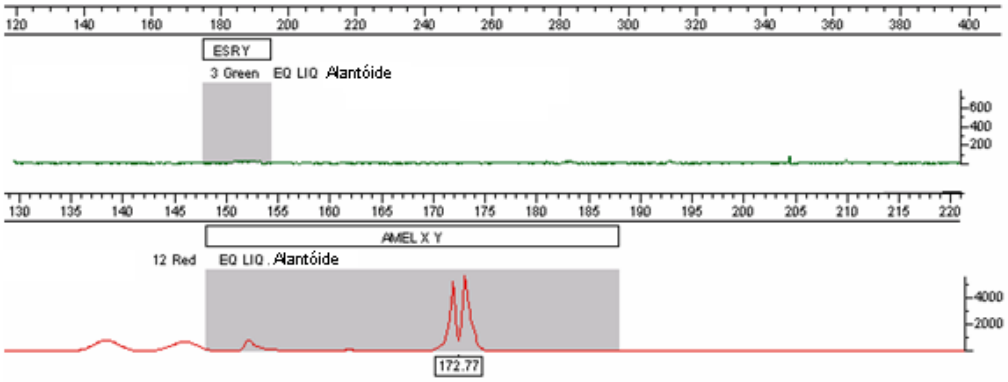
Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 4: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantoide, a amplificação do gene da amelogenina X (173 pb) e a não amplificação do gene SRY indica um embrião de sexo feminino.



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 5: Eletroferograma dos produtos de amplificação do gene SRY (acima) e amelogenina (abaixo) para DNA presente no líquido alantoide, a amplificação do gene da amelogenina X (172 pb) e a não amplificação do gene SRY indica um embrião de sexo feminino.



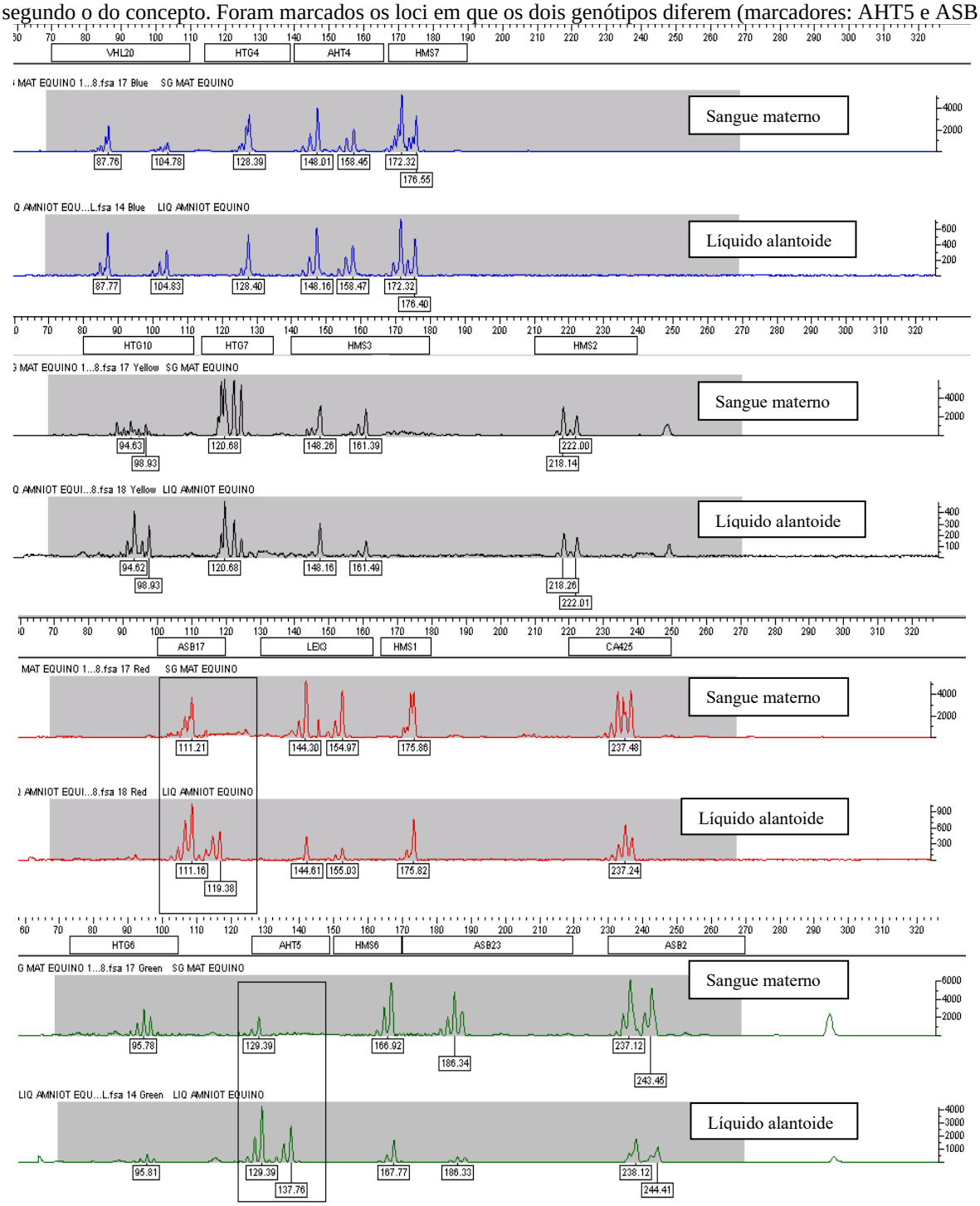
Fonte: Elaborado pelos autores.

A genotipagem dos conceptos, assim como dos equinos adultos, obteve sucesso em caracterizar os perfis dos indivíduos e distingui-los, como demonstrado nas figuras 6 e 7, principalmente, nos casos em que o concepto era do sexo feminino, comprovando que o perfil genético obtido a partir do DNA extraído da amostra puncionada dos conceptos era distinto do perfil genético obtido a partir do DNA da amostra de sangue da égua gestante.

Comprovou-se que a punção foi realizada corretamente, atingindo-se o objetivo deste trabalho em desenvolver uma técnica de punção, por via transvaginal, de líquido vitelínico e/ou líquido alantoide de embriões e fetos, para obtenção de amostras de material genético destinado à sexagem molecular e determinação do período mais indicado à realização da punção, tornando-a uma técnica segura e eficiente.

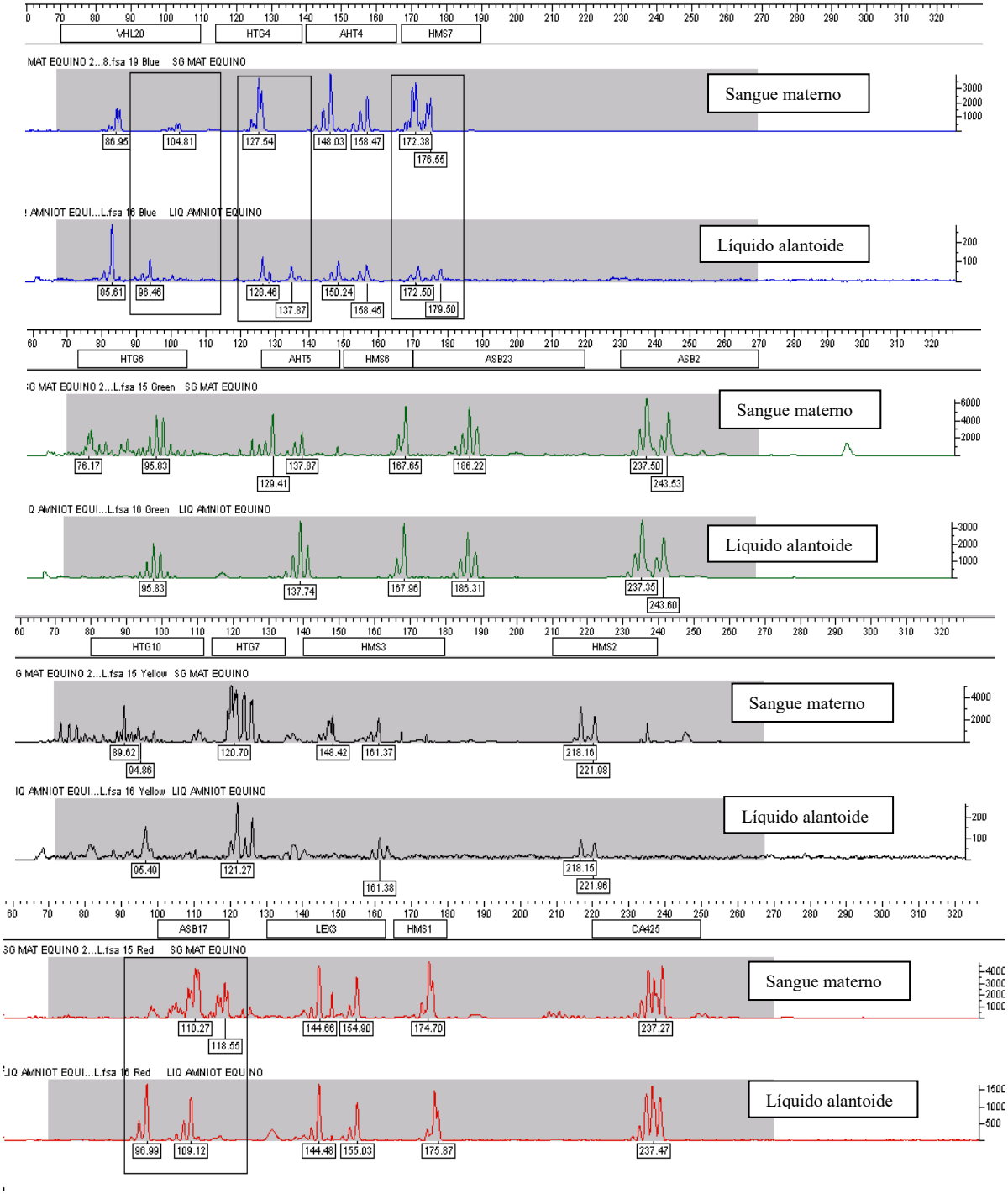
O método de coleta foi eficaz em trazer amostras de DNA dos conceptos equinos, tanto em quantidade como em qualidade, sendo possível a realização de testes genéticos de sexagem e genotipagem com eficiência.

Figura 6: Eletroferograma 17 loci polimórficos (discriminados sempre na parte superior; exemplo: VHL20) a serem comparados. Os números indicados abaixo dos picos de fluorescência referem-se ao tamanho em pares de bases dos alelos determinados para cada marcador. Primeiro eletroferograma de cada fluorescência representa o genótipo materno e em segundo o do concepto. Foram marcados os loci em que os dois genótipos diferem (marcadores: AHT5 e ASB17).



Fonte: Elaborado pelos autores.

Figura 7: Eletroferograma 17 loci polimórficos a serem comparados. Os números indicados abaixo dos picos de fluorescência referem-se ao tamanho em pares de bases dos alelos determinados para cada marcador. Primeiro eletroferograma de cada fluorescência representa o genótipo materno e em segundo o do concepto. Foram marcados os loci em que os dois genótipos diferem (marcadores: VHL20, HTG4, HMS7 e ASB17).



Fonte: Elaborado pelos autores.

REFERÊNCIAS

ABD-ELNAEIM MMM, LEISER R, WILSHER S, ALLEN WR. Structural and haemovascular aspects of placental growth throughout gestation in young and aged mares. **Placenta**, v. 27, p. 1103-1113, 2006. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0143400405002912, Acesso em: 14/02/2025.

AKOLEKAR, R,; FARKAS, D.H.; VANAGTMAEL, A.L.; BOMBARD, A.T.; NICOLAIDES, K.H. Foetal sex determination using circulating cell-free foetal DNA (ccffDNA) at 11 to 13 weeks of gestation. **Prenat Diagn.**, v. 30(10), p. 918-923, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20721878/, Acesso em 02/03/2025.

ALLEN WR. **The Physiology of Early Pregnancy in the Mare**. In*: American Association of Equine Practitioners*. Proceedings…, 46: 338-354, 2000.

BUCCA S. Equine foetal gender determination from mid- to advanced-gestation by ultrasound. **Theriogenology**, v. 64(3), p. 568-571, 2005. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0093691X05001731, Acesso em: 12/03/2025. doi:10.1016/j.theriogenology.2005.05.013.

BUTLER, J.M. **Forensic DNA typing: biology, technology, and genetics of STR markers**. Amsterdam; Boston, Elsevier Academic Press, 2005. Disponível em: https://books.google.com.br/books/about/Forensic_DNA_Typing.html?id=gwDyBq2xLjIC&redir_esc=y, Acesso em 04/40/2024.

BYDLOWSKI, S. P.; LEYTON J. A tecnologia do DNA; **A Revista Oficial da ABCCMM**, n 36, 1998.

CARMO, M.T.; OLIVEIRA, J.V.; ALMEIDA, M.T.; ALVARENGA, M.A. **Avaliação ultrassonográfica da gônada fetal em equinos: uma nova alternativa para sexagem**. In: Conferência Anual da Abraveq e Congresso Internacional de Medicina Veterinária, 9, 2008, São Paulo. Anais eletrônicos... São Paulo, SP: Abraveq, 2008. Disponível em: http://www.itarget.com.br/newclients/abraveq2012/down/2012/ix_conf_08%20Sexagem_fetal_ABRAVEQ.pdf., Acesso em: 10/11/2024.

CHOI, Y.H.; GUSTAFSON-SEABURY, A.; VELEZ, I.C.; HARTMAN, D.L.; BLISS, S.; RIERA, F.L.; ROLDÁN, J.E.; CHOWDHARY, B.; HINRICHS, K. Viability of equine embryos after puncture of the capsule and biopsy for preimplantation genetic diagnosis. **Reproduction**, v. 140, p. 893-902, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20843896/, Acesso em: 04/09/2023.

DAMIANI, D.; DICHTCHEKENIAN, V.; SETIAN, N. O Enigma da Determinação Gonadal, **Arq Bras Endocrinol Metab**, v.44 n.3, 2000. Disponível em: https://www.scielo.br/j/abem/a/gKSzZGBkZc6BKZBz3gWJbzz/, Acesso em: 11/12/2024.

DYCE, K.M.; SACK, W.O.; WENSING, C.J.G. **Textbook of veterinary anatomy**. 3.ed. Philadelphia: WB Saunders, 2002. 258p.

GERSTENBERG, C.; ALLEN, W.R.; STEWART, F. Cell proliferation patterns during development of the equine placenta. **Journals of Reproduction and Fertility**, 117: 143-152, 1999. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/12669810_Cell_proliferation_patterns_during_development_of_the_equine_placenta, Acesso em: 04/05/2025.

GINTHER, O.J. **Reproductive biology of the mare**: basic and applied aspects. 2.ed. Cross Plains*: Equiservices*, 642p, 1992.

HAFEZ, B.; HAFEZ, E.S.E. **Reprodução Animal**. 7ª Ed. Monole, São Paulo, 513 p., 2004.

HAN, S.H.; YANG, B.C.; KO, M.S.; OH, H.S.; LEE, S.S. Length difference between equine ZFX and ZFY genes and its application for molecular sex determination. **J Assist Reprod Genet**., v. 27(12), p. 725-728, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20809415/, Acesso em: 23/05/2025.

HASEGAWA, T.; SATO, F.; ISHIDA, N.; FUKUSHIMA, Y.; MUKOYAMA, H. Sex determination by simultaneous amplification of equine SRY and amelogenin genes. **J Vet Med Sci.**, v. 62(10), p. 1109-1110, 2000. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11073085/, Acesso em 23/05/2025.

JAUNIAUX, E.; CIRIGLIANO, V.; ADINOLFI, M. Very early prenatal diagnosis on coelomic cells using quantitative fluorescent polymerase chain reaction. **Reprod Biomed online**, 6(4): 494-498, 2003. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1472648310621736, Acesso em: 12/05/2025.

KADIVAR, A.; HASSANPOUR, H.; MIRSHOKRAEI, P.; AZARI, M.; GHOLAMHOSSEINI, K.; KARAMI, A. Detection and quantification of cell-free foetal DNA in ovine maternal plasma; use it to predict foetal sex. **Theriogenology**, v. 79(6), p. 995-1000, 2013. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23434357/, Acessoe em 05/05/2025.

KADIVAR, A.; RASHIDZADEH, H.; DAVOODIAN, N.; NAZARI, H.; DEHGHANI TAFTI, R.; HEIDARI KHOEI, H. Evaluation of the efficiency of TaqMan duplex real-time PCR assay for non-invasive pre-natal assessment of foetal sex in equine. **Reprod Domest Anim**., v. 56(2), p. 287-291, 2021. doi:10.1111/rda.13831. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32978850/, Acesso em: 23/04/2025.

KAMIMURA, S.; NISHIYAMA, L. N.; OOKUTSU, I. S.; GOTO, K.; HAMANAL, K. **Determination of bovine fetal sex by PCR using fetal fluid aspirated by transvaginal ultrasound-guided amniocentesis**, Kagoshima, Japan. Elsevier, 1996.

LEON, P.M.M.; CAMPOS, V.F.; DELLAGOSTIN, O.A.; DESCHAMPS, J.C.; SEIXAS, F.K.; COLLARES, T. Equine foetal sex determination using circulating cell-free foetal DNA (ccffDNA). **Theriogenology**, v. 77(4), p. 694-698, 2012. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22000028/, Acesso em: 17/02/2025.

LIVINI, M. **Determination of fetal gender by transrectal ultrasound examination: field´s experience.** In: American Association of Equine Practitioners Annual Convention, 56, 2010, Baltimore. Anais eletrônicos…Baltimore: Maryland, 2010. Disponível em: http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2011/20113042293.pdf., Acesso em: 30 jun. 2012.

LO, Y.M.; CORBETTA N, C.P.F.; RAI, V.; SARGENT, I.L.; REDMAN, C.W.; WAINSCOAT, J.S. Presence of fetal DNA in maternal plasma and serum. **Lancet**, v. 350, p. 485-487, 1997. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9274585/, Acesso em: 23/07/2024.

PEIPPO, J.; HUHTINEN, M.; KOTILAINEN, T. Sex diagnosis of equine preimplantation embryos using the polymerase chain reaction. **Theriogenology**, v.44, p.619-627, 1995. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/ pii/0093691X9500242Z, Acesso em: 06/08/2023.

PIPREK, R,P. Molecular and cellular machinery of gonadal differentiation in mammals. **Int J Dev Biol**, v. 54(5-6), p. 779-86, 2010. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20446275/, Acesso em: 17/03/2025.

MOURIJAVAGAR, D.; MALARMATHI, M.; RAGHAVENDRAN, V.B. Early foetal sexing in the equines by detection of cfDNA in maternal serum, **International Journal of Veterinary Sciences and Animal Husbandry**, v. 10(2), p. 23-25, 2025. Disponível em: https://www.veterinarypaper.com/pdf/2025/vol10issue2/PartA/10-2-7-971.pdf, Acesso em: 11/03/2025.

MACHADO, L.V. **Genotipagem, sexagem molecular e verificação de pedigree em equinos por PCR quantitativo fluorescente**, Centro de biociências e biotecnologia -NUDIM- Campos dos Goytacazes, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2007.

NAZARETH, H. R. S.; PINTO JR, W.; ANDRADE, J. A. D. Diagnóstico pré-natal de aberrações cromossômicas. Primeira experiência brasileira. **Revista Brasileira de Genética**, v. (3), p. 459-470, 1981. Disponível em: https://nepas.emnuvens.com.br/amabc/article/view/613, Acesso em: 23/04/2025.

OLIVEIRA, R.A.; YAMIM, R.S.; PIVATO, I.; RAMOS, A.F. Sexagem fetal em equinos, Rev. Bras. Reprod. Anim**, v. 38, n.1, p.3 7-42, 2014. Disponível em www.cbra.org.br, Acesso em: 12/04/2024.**

SHERLOCK, J.; CIRIGLIANO, V.; PETROU, M. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. **Ann. Hum. Genet**., v. 62, p. 9–23, 1998. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9659974/, Acesso em: 19/03/2025.

TONEKABONI, F.R.; NARENJISANI, R.; STAJI, H.; AHMADI-HAMEDANI, M. Comparison of cell-free foetal DNA plasma content used to sex determination between three trimesters of pregnancy in Torkaman pregnant mare. **J Equine Vet Sci.**, v. 95, p. 103273, 2020. Disponível em: https://www.sciencedirect.com/science/article/pii /S0737080620303646, Acesso em: 12/03/2025.

TOZAKI, T.; KAKOI, H.; MASHIMA, S.; HIROTA, K.; HASEGAWA, T.; ISHIDA, N.; MIURA, N.; CHOI-MIURA, N. H.; TOMITA, M. Population study and validation of paternity testing for Thoroughbred horses by 15 microsatellite loci. **J Vet Med Sci**., v. 63: 1191-1197, 2001. Disponível em: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11767052/, Acesso em: 03/04/2025.

WACHTEL, S.S. **H−Y Antigen *and* the Biology of Sex Determination** (Grune & Stratton, New York, 1983.